

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**IDENTIFICACION DE GENES DE REFERENCIA PARA  
NORMALIZACION DE DATOS DE PCR EN TIEMPO REAL EN  
EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CHARLOTTE MARIE ELVIRA LUCHSINGER FARET

TEMUCO – CHILE  
2012

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**IDENTIFICACION DE GENES DE REFERENCIA PARA  
NORMALIZACION DE DATOS DE PCR EN TIEMPO REAL EN  
EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CHARLOTTE MARIE ELVIRA LUCHSINGER FARET

PROFESOR GUÍA: RICARDO FELMER DÖRNER

TEMUCO – CHILE

**IDENTIFICACION DE GENES DE REFERENCIA PARA  
NORMALIZACION DE DATOS DE PCR EN TIEMPO REAL EN  
EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS IN VITRO**

PROFESOR GUIA

: RICARDO NICOLAS FELMER DÖRNER

Bioquímico, Ph.D. en Biología Celular y Molecular.

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales.

Universidad de La Frontera

PROFESOR CONSEJERO

: RAÚL SEGUNDO SÁNCHEZ GUTIERREZ

Médico Cirujano, Ph.D en Medicina.

Vicerrector de Investigación y Postgrado,  
Universidad de La Frontera.

Facultad de Medicina.

Universidad de La Frontera.

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

*Con mucho amor  
A mis padres  
Sonia y Enrique*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres, porque gracias a su cariño y apoyo he llegado a cumplir una de las metas más grandes de mi vida, terminar mis estudios profesionales, que para mí son el legado más importante que pudiera recibir y por el cual les viviré eternamente agradecida. De forma especial, quisiera agradecer a mi mamá quien es el pilar fundamental de mi vida, por estar siempre junto a mí a pesar de mis tropiezos y fracasos, le agradezco infinitamente por todo sus sacrificios y horas de desvelo, por sus enseñanzas y amor incondicional, sinceramente eres la mejor mamá del mundo.

A mis hermanas, porque desde niñas hemos sido unidas y hemos permanecido así a pesar de los años, porque no imagino mi infancia y vida sin ustedes. Les agradezco por todos sus consejos, ayuda, comprensión y amistad, han hecho de mí una mejor persona. A mis sobrinos Lucas y Michelle por la alegría y amor que me entregan día a día.

A mis tutores, Drs. Ricardo Felmer y Raúl Sánchez, por permitirme desarrollar satisfactoriamente esta tesis y por las gestiones realizadas a fin de obtener el financiamiento necesario para la realización de la misma. En especial, agradezco a mi profesor guía Dr. Ricardo Felmer por todos los conocimientos que me otorgó, por su comprensión y la confianza que depositó en mí. A María Elena Arias por su disposición, ayuda y paciencia.

Agradezco también al Dr. Marcos Paredes y Daniela Nuñez por facilitarme sus dependencias y por toda la ayuda que recibí en la realización de mi tesis.

Finalmente quisiera agradecer a todas las personas que de una u otra forma me han ayudado en el transcurso de mi vida, específicamente en la realización de mi tesis. Muchas gracias.

## INDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Producción <i>in vitro</i> de embriones	3
2.1.1	Métodos de producción <i>in vitro</i>	4
2.1.1.1	Fecundación <i>in vitro</i>	4
2.1.1.2	Partenogénesis	4
2.1.1.3	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides	5
2.1.1.4	Transferencia nuclear de células somáticas	6
2.2	Cuantificación de ácidos nucleicos	8
2.2.1	Historia de las técnicas de cuantificación	8
2.2.2	Estrategias de cuantificación por PCR en tiempo real	9
2.2.2.1	Cuantificación absoluta	9
2.2.2.2	Cuantificación relativa o comparativa	10
2.3	PCR en tiempo real	12
2.3.1	Historia	12
2.3.2	Fundamento	12
2.3.3	Modelamiento matemático	13
2.3.4	Cinética de la reacción	15
2.3.5	Sistemas de detección	16
2.3.6	Instrumentación	19
2.3.7	Limitaciones	22
2.4	Normalización	22
2.5	Genes de referencia	23
2.5.1	Programas de evaluación y selección de genes de referencia	24

2.5.1.1	geNorm	25
2.5.1.2	NormFinder	26
3	HIPOTESIS	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivo general	28
4.2	Objetivos específicos	28
5	MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1	Diseño del estudio	29
5.2	Material biológico	29
5.3	Genes y diseño de partidores	31
5.4	Extracción de ARN total	31
5.5	Transcripción reversa	33
5.6	PCR en tiempo real	33
5.6.1	Estandarización del protocolo	33
5.6.2	Curvas de disociación y eficiencia	33
5.6.3	Control negativo	34
5.6.4	Reacciones de PCR	34
5.7	Análisis estadístico	35
5.8	Transformación lineal	35
5.9	Determinación de la estabilidad de expresión de los genes de referencia	35
6	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	37
6.1	Estandarización del protocolo de PCR en tiempo real	37
6.2	Curvas de disociación y eficiencia	39
6.3	Control negativo	39
6.4	Reacción de PCR	46
6.5	Análisis estadístico	49
6.6	Transformación lineal	50
6.7	Determinación de la estabilidad de los genes de referencia	54
6.7.1	geNorm	54
6.7.2	NormFinder	64

7	DISCUSIÓN	70
8	CONCLUSIONES	78
9	RESUMEN	79
10	SUMMARY	80
11	LITERATURA CITADA	81
12	ANEXOS	101

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo preimplantacional es un proceso dinámico caracterizado por una serie de etapas biológicas que varían de una especie a otra, abarcando todo el tiempo posterior a la fecundación que comprende desde la primera división hasta la formación del blastocisto, procesos que se encuentran regulados por la expresión diferencial de genes que participan activamente en el desarrollo embrionario, pero que dependiendo de la fase presenta variaciones en el número de células y del contenido total de ARN mensajero (ARNm), por lo que la adquisición de conocimientos sobre estos patrones de expresión permiten comprender las complejas vías moleculares que controlan el desarrollo temprano del embrión en mamíferos, permitiendo una mejora de las tecnologías de reproducción asistida (ART). Sin embargo, en mamíferos, el estudio de la expresión génica ha sido difícil debido a las grandes cantidades de material de inicio que requieren los procedimientos estándares de cuantificación, problemática que se ha ido resolviendo con la aparición de la técnica de PCR en tiempo real que es capaz de combinar precisión, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad en la detección y cuantificación de dicha expresión.

Por otra parte, es importante considerar que todo ensayo de PCR en tiempo real está expuesto a errores y variaciones experimentales, causadas principalmente por la cantidad y calidad del material de partida, presencia de inhibidores, variabilidad biológica, eficiencia de la transcripción reversa, extracción y procesamiento de ARN, síntesis de ADN complementario (ADNc) y posibles errores en el diseño experimental, por lo que es necesario minimizar estas variables para un correcto estudio de la expresión génica. Estas diferencias se pueden controlar mediante la normalización de los datos de PCR en tiempo real con el uso de genes controles endógenos, también denominados genes de referencia, genes constitutivos o housekeeping, los que se expresan de manera constante en las muestras a comparar, independientemente del tejido, condición experimental y/o tratamiento. Sin embargo, la estabilidad de los genes de referencia puede variar según el estado de desarrollo y condiciones experimentales, por ende, su validación para cada modelo experimental es indispensable para el análisis de la expresión génica, dado que

su uso inadecuado puede conducir a la normalización errónea de los datos de PCR en tiempo real y, por tanto, una malinterpretación del significado biológico de los resultados obtenidos. De esta manera, es fundamental la evaluación previa de la estabilidad de los genes de referencia, con el fin de identificar a aquel o aquellos más estables.

Considerando lo anteriormente expuesto, en esta tesis se propone evaluar la estabilidad génica en diferentes etapas de la maduración del ovocito y desarrollo embrionario bovino de diez genes de referencia utilizados comúnmente en estudios de expresión, así como también evaluar su estabilidad en blastocistos producidos por distintos métodos de producción *in vitro* de embriones, con el fin de validar el uso de estos genes para su posterior utilización en normalización de datos de PCR en tiempo real.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Producción *in vitro* de embriones

En las últimas dos décadas se han desarrollado nuevas tecnologías de reproducción asistida en mamíferos (ART), tales como la inseminación artificial, la superovulación de hembras, la transferencia de embriones y la producción *in vitro* de embriones (IVP), siendo su principal aplicación la investigación, con el fin de comprender el funcionamiento normal de la fecundación y embriogénesis, además de utilizarse como herramienta capaz de controlar ineficiencias producidas por procedimientos complejos como la clonación y la transgénesis (Hoshi, 2003; Moore *et al.*, 2007). Del mismo modo, estos métodos se emplean en programas de mejoramiento genético y en difusión de especies/razas que se encuentran en peligro de extinción, mediante la introgresión de alelos deseables de manera más rápida en las poblaciones de ganado, generando un aumento en la mejora genética en un periodo más corto (Meuwissen, 1998). Por otra parte, existe un especial interés comercial en la clonación y transgénesis por su alto potencial en la industria farmacéutica y clínica, entre otras aplicaciones (Melo *et al.*, 2007).

A pesar de los progresos en la producción *in vitro* de embriones, la eficiencia de esta tecnología sigue siendo baja, en donde sólo un 30-40% de los ovocitos fecundados llegan a la fase de blastocisto (Wrenzycki *et al.*, 2005), debido principalmente a condiciones subóptimas de cultivo y ambientales, las que influyen negativamente en el desarrollo embrionario, originando alteraciones en la calidad, competencia y crecimiento (Gardner y Lane, 2005; Moore *et al.*, 2007). Estos cambios modifican el nivel de transcripción en ovocitos maduros (Rzucidlo *et al.*, 2001) y en embriones preimplantacionales (Natale *et al.*, 1998; Wrenzycki *et al.*, 1999; Humpherys *et al.*, 2002; Goossens, 2007), por lo que su conocimiento ayudará a comprender la dinámica biológica del complejo proceso del desarrollo embrionario temprano (Khurana y Niemann, 2000), accediendo al perfeccionamiento de las tecnologías de reproducción asistida en mamíferos (Steuerwald *et al.*, 1999).

## **2.1.1 Métodos de producción *in vitro* de embriones**

**2.1.1.1 Fecundación *in vitro*.** La fecundación *in vitro* (FIV), es una técnica ampliamente utilizada en reproducción asistida, la cual consiste en la unión de un gameto femenino con uno masculino en un medio de cultivo, con el fin de lograr la fecundación con condiciones propicias, simuladas en un laboratorio. Ésta engloba una serie de eventos que dan lugar a dicha fusión, tales como la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida, la fusión de las membranas externas de los gametos, la unión de los pronúcleos (singamia), la alineación de sus respectivos cromosomas, entre otros (Primakoff y Myles, 2002). La fecundación *in vitro* en animales se logró por primera vez en la década de 1950, pero sólo 20 años después tuvo éxito en humanos con el primer nacimiento en 1978 (Steptoe y Edwards, 1978), desde entonces es considerada como una técnica rutinaria en laboratorios de reproducción.

La fecundación *in vitro* es un gran soporte para el desarrollo de diversas técnicas biotecnológicas que tienen un alto potencial en el área de la reproducción animal, como la micromanipulación de embriones y la producción de animales transgénicos. Además es una técnica valiosa para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en las interacciones gaméticas, fecundación y desarrollo embrionario temprano (Barros y Leal, 1982).

**2.1.1.2 Partenogénesis.** La partenogénesis es un proceso en el cual, el ovocito se desarrolla sin la presencia del gameto masculino. En mamíferos los ovocitos permanecen en la etapa de metafase II, mecanismo natural que evita la partenogénesis dentro de la hembra (Cibelli *et al.*, 2006) y este sólo se desbloquea cuando el espermatozoide provoca oscilaciones múltiples de liberación de calcio intracelular generadas al momento de la fecundación (Yang *et al.*, 1994). Una variedad de productos químicos pueden imitar los patrones de calcio intracelular y activar el óvulo sin la participación del espermatozoide para producir embriones partenogénicos (Cibelli *et al.*, 2006).

La partenogénesis ocurre de manera espontánea en diferentes grupos tales como anfibios, insectos y algunos reptiles, mientras que en mamíferos no se conocen casos naturales de este sistema reproductivo, sin perjuicio de que ha sido inducido artificialmente. Sin embargo, este proceso es incapaz de ser transferido con éxito en receptoras debido a la presencia de alteraciones esenciales en el desarrollo embrionario, causadas principalmente por la doble dotación de genes de la impronta materna y la carencia de la paterna (Brevini y Gandolfi, 2008), tomando en cuenta que ambos genomas son necesarios para el correcto crecimiento, siendo complementarias pero no equivalentes (Smith *et al.*, 2001). Específicamente en bovinos el máximo desarrollo alcanzado por un partenote en el útero se ha informado a los 48 días de gestación (Fukui *et al.*, 1992), por lo que generalmente el criterio de evaluación de los experimentos de partenogénesis *in vitro* es en estadio de blastocisto (Cibelli *et al.*, 2006). Estas anormalidades no sólo afectan al trofoblasto sino también las partes del embrión, como los músculos, hígado y páncreas (Fundele *et al.*, 1990). Por otra parte, la partenogénesis es esencial para una serie de tecnologías relacionadas con el ovocito y el embrión, tales como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides y la transferencia nuclear de células somáticas, considerando que su desarrollo *in vitro*, hasta la etapa de blastocisto, son comparables con éstos, por lo tanto puede ser una herramienta útil para investigar condiciones de cultivo, diferentes tratamientos, la exposición a productos químicos y muchas variables de rutina de laboratorio (Paffoni *et al.*, 2008). Así mismo, la principal aplicación de esta técnica está orientada al estudio de la expresión génica en embriones como una forma de explorar mecanismos subyacentes del desarrollo embrionario, tales como el análisis de genes responsables de acontecimientos esenciales, ayudando de esta manera a comprender las alteraciones en la impronta genómica, la diferenciación celular y la apoptosis (Kono *et al.*, 2004; Ruddock *et al.*, 2004).

**2.1.1.3 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.** La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es un tipo de técnica de micro-manipulación que implica la inserción mecánica de un espermatozoide seleccionado, directamente en el citoplasma de un ovocito maduro mediante una aguja microscópica.

El primer nacimiento de un animal mediante ICSI, fue un conejo y ocurrió en Japón el año 1988 (Hosoi *et al.*, 1988). Desde entonces, se ha reportado el nacimiento de diversas especies de mamíferos mediante esta técnica (Goto *et al.*, 1990, Ahmadi *et al.*, 1995; Cochran *et al.*, 1998; Hewiston *et al.*, 1999; Martin, 2000; Yamauchi *et al.*, 2002) incluso en insectos (Hatakeyama *et al.*, 1994) y aves (Hrabia *et al.*, 2003). Sin embargo, esta metodología alcanzó su máxima importancia en el año 1992, cuando seres humanos nacieron en Bélgica gracias a esta técnica (Palermo *et al.*, 1992). Desde ese año, miles de humanos han nacido en el mundo mediante ICSI, convirtiéndose actualmente en la mejor opción para superar casos de infertilidad masculina severa, debido a sus mayores tasas de éxito, mientras que el uso clínico aún no se ha concretado para animales. Adicionalmente, la introducción de la ICSI como método de reproducción asistida ha permitido investigar y comprender acontecimientos tempranos de la fecundación, tales como la capacitación espermática, la reacción del acrosoma y la formación de los pronúcleos. Más aún, esta técnica se puede aplicar para la producción de animales transgénicos en donde el espermatozoide actúa como vehículo para el transgén basándose en la interacción existente entre éste y el ADN (Yanagimachi, 2005; Moisyad *et al.*, 2009), lo que ha permitido alcanzar una alta eficiencia (46 %) en algunos animales como el ratón y con un bajo nivel de mosaicismo (Perry *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2004).

**2.1.1.4 Transferencia nuclear de células somáticas.** La transferencia nuclear de células somáticas o también ampliamente conocida como clonación, es una técnica en la cual se transfiere el núcleo (ADN) de una célula somática a un ovocito enucleado en metafase II para la generación de un individuo genéticamente idéntico al donante de las células somáticas (Campbell *et al.*, 2007). En esta técnica los genes inactivados durante la diferenciación de los tejidos pueden ser completamente re-activados por un proceso denominado reprogramación celular, es decir, la reversión de un núcleo diferenciado a su estado totipotente.

Los primeros experimentos utilizando esta técnica se realizaron en el año 1952 a partir de óvulos de rana y células embrionarias de esta misma especie (Briggs y King, 1952), con el fin de estudiar el desarrollo embrionario temprano de los anfibios. Gracias a este estudio se generaron

ranas clónicas con igual constitución genética (Gurdón *et al.*, 1975). A comienzos de los años 80, se iniciaron los estudios en mamíferos con células tomadas directamente de embriones tempranos, pero recién en el año 1995 se crearon los primeros animales vivos, *Megan* y *Morag*, a partir de células embrionarias derivadas de cultivos celulares *in vitro* (Campbell *et al.*, 1995), abriendo la posibilidad de introducir modificaciones genéticas mucho más precisas en animales de granja, que más tarde dieron origen al nacimiento de *Dolly*, el primer animal clonado a partir de células somáticas diferenciadas extraídas directamente de un animal adulto (Wilmut *et al.*, 1997). Desde entonces se ha utilizado la clonación en diferentes especies, tales como murina (Wakayama *et al.*, 1998), porcina (Polejaeva *et al.*, 2000), caprina (Keefer *et al.*, 2001), bovina (Forsberg *et al.*, 2002), felina (Long *et al.*, 2003), equina (Galli *et al.*, 2003), canina (Lee *et al.*, 2005), entre muchas otras. Sin embargo, uno de los retos más difíciles que enfrenta esta técnica es la baja eficiencia del procedimiento y la alta incidencia de anomalías en el desarrollo (Garry *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 2000), lo que queda demostrado en el bajo porcentaje de éxito obtenido, el que oscila entre el 0 y 4%, razón por la cual se ha propuesto que la baja eficiencia de la clonación se debe, en gran medida, a la reprogramación incompleta de las señales epigenéticas (Bourchis *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2001).

En la actualidad, la transferencia nuclear de células somáticas es ampliamente utilizada en programas de mejoramiento genético, permitiendo la generación de múltiples copias de animales con caracteres de elite, preservando especies amenazadas o en vías de extinción (Kues y Niemann, 2004; Loi *et al.*, 2008, Fulka *et al.*, 2009), así como también en la creación de animales transgénicos para la producción de proteínas farmacéuticas y/o como xenotrasplantes (Stice *et al.*, 1998; Robl, 1999; Polejaeva y Campbell, 2000; Kues y Niemann, 2004, Duszewska y Reklewski, 2007), convirtiéndose en un enorme potencial biomédico para la terapia génica y los alo-trasplantes (Lanza *et al.*, 1999). Además de sus aplicaciones prácticas, la clonación se ha convertido en una herramienta esencial en el estudio de la expresión génica (Capecchi, 2000), la impronta genómica (Solter, 1998) y la reprogramación entre otros tópicos (De Sousa *et al.*, 1999; Munsie *et al.*, 2000; Surani, 2001).

## 2.2 Cuantificación de ácidos nucleicos

La expresión génica es un proceso biológico mediante el cual la célula transforma la información codificada en el ADN en proteínas a través de su transcripción a ARN mensajero, mediante el proceso de traducción. La cuantificación de esta expresión se ha convertido en un elemento básico en la mayoría de los laboratorios de biología molecular, puesto que al medir la cantidad de ARN celular es posible determinar en qué medida un gen en particular se está expresando. Por otra parte, es necesario considerar que los niveles de expresión cambian drásticamente de un gen a otro gen, de célula a célula o durante una serie de condiciones experimentales. La validación de los niveles de proteínas (Kim *et al.*, 2008), la confirmación de la extensión de la transcripción de un gen (Pal *et al.*, 2007), el cambio de la expresión génica durante la diferenciación celular o el desarrollo y los estudios comparativos de los niveles de transcripción de un gen en células sometidas a la acción de toxinas, drogas, hormonas, etc., son algunos ejemplos de los posibles estudios cuantitativos que se pueden realizar con esta técnica (Higashibata *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2007).

**2.2.1 Historia de las técnicas de cuantificación.** En las últimas dos décadas se ha evidenciado una importante evolución en las técnicas de detección y cuantificación de los niveles de ARNm, considerando que la mayoría de estos métodos presentaban deficiencias, tales como el tiempo requerido, la baja sensibilidad, el carácter semi-cuantitativo, el uso de radiactividad y/o el alto riesgo de contaminación cruzada, todo lo cual generaba estimaciones inadecuadas de la expresión génica (Reisch *et al.*, 2002). Algunos de estos métodos son el Northern blot (Parker y Barnes, 1999), ensayos de protección de ARNasa (Hod, 1992; Saccomanno *et al.*, 1992), Hibridación *in situ* (Parker y Barnes, 1999), PCR convencional, entre otros. Dichos procedimientos se han ido complementando y reemplazando para generar una nueva era de métodos cuantitativos, con mayor sensibilidad y confianza, como es la técnica de PCR en tiempo real (Wittwer *et al.*, 1997; Schmittgen y Zakrajsek, 2000; Wong y Medrano, 2005; Nagaraj *et al.*, 2006; VanGuilder *et al.*, 2008), que combina la precisión, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, amplitud de rango dinámico, alto potencial de rendimiento y facilidad en su manipulación, propiedades que la convierten en el método más sensible para la detección y

cuantificación de ácidos nucleicos (Bustín, 2000; Hugget *et al.*, 2005). Esto es de especial relevancia para transcritos de ARNm de escasa abundancia, tejidos con bajas concentraciones de ARN, ARN parcialmente degradado y para muestras de tejidos limitados (Wittwer y Garling, 1991; Orlando *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 1999; Steuerwald *et al.*, 1999; Winer *et al.*, 1999; Mackay *et al.*, 2002).

**2.2.2 Estrategias de cuantificación por PCR en tiempo real.** La transcripción reversa (RT), seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), representa la técnica más potente para amplificar y detectar los niveles de ARNm presente en una determinada muestra biológica (Heid *et al.*, 1996; Bustín *et al.*, 2000). El PCR en tiempo real puede ser utilizado para comparar los niveles de ARNm en muestras de diferentes poblaciones, para caracterizar los patrones de expresión de ARNm y discriminar entre los ARNm estrechamente relacionados (Niesters, 2001). Los niveles de expresión se pueden medir en relación a genes endógenos de referencia, así como también con estándares de calibración externos, estrategias conocidas como cuantificación relativa o comparativa y cuantificación absoluta, respectivamente (Collins *et al.*, 1995; Steuerwald *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 2000; Schmittgen *et al.*, 2000; Aberham *et al.*, 2001; Pfaffl, 2001; Rajeevan *et al.*, 2001; Pfaffl *et al.*, 2004). Por lo tanto, la elección del procedimiento de cuantificación depende del diseño experimental y la disponibilidad de las secuencias de los genes de referencia caracterizados, así como del templado adecuado para la construcción de la curva de calibración.

**2.2.2.1 Cuantificación absoluta.** El método de cuantificación absoluta se basa en la construcción de una curva de calibración a partir de diluciones seriadas de un templado estándar de concentración conocida y sus niveles correspondientes, obtenidos de los datos de PCR en tiempo real, con el fin de medir el número de copias exactas de ARNm de un transcrito en particular (Pfaffl y Hageleit, 2001; Fronhoffs *et al.*, 2002), siendo además altamente reproducibles, permitiendo la generación de datos muy específicos y sensibles (Reischl y Kochanowski, 1995; Bustin, 2000; Pfaffl *et al.*, 2002). Esta curva de calibración da una relación lineal entre los valores de Ct y la cantidad inicial de templado estándar, lo que permite determinar las

concentraciones de las muestras desconocidas sobre la base de los valores de Ct (Wong y Medrano, 2005). Una variedad de muestras se han utilizado como templado estándar, incluyendo secuencias dianas amplificadas por PCR (Rose'Meyer *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2007), plásmidos que contienen la secuencia diana (Lee *et al.*, 2006; Whelan *et al.*, 2003) o ADN preparados comercialmente (Dworkin *et al.*, 2002). Sin embargo, la estabilidad y reproducibilidad de la cuantificación del ARNm de interés depende en gran medida del estándar utilizado y de la manipulación (Fu *et al.*, 2009), consideraciones que hacen de la cuantificación absoluta un procedimiento laborioso, costoso y que no siempre puede llevarse a cabo en todos los laboratorios.

**2.2.2.2 Cuantificación relativa.** La cuantificación relativa compara la expresión de un gen de interés en diversas condiciones normalizadas a la expresión de un gen control interno (Pfaffl, 2001), que se presume con expresión constante en todas las muestras (García-Vallejo *et al.*, 2004), es decir, esta estrategia se basa en la relación de la expresión de un gen de interés en contraste con un gen de referencia (Pfaffl y Hageleit, 2001), siendo adecuado para investigar cambios fisiológicos en los niveles de expresión génica. Por lo tanto, esta cuantificación no requiere estándares con concentraciones conocidas y la referencia puede ser de cualquier transcripción, siempre y cuando la secuencia sea conocida (Bustin, 2002). Sin embargo, la cuantificación relativa por PCR en tiempo real requiere de un estudio de idoneidad y estabilidad de uno o más genes de referencia en determinadas condiciones experimentales (Dheda *et al.*, 2005), evaluación que se recomienda realizar antes de la cuantificación de los genes de interés (Bustin, 2010, Dheda *et al.*, 2005). Por otra parte, se han establecido diferentes modelos matemáticos para calcular la expresión relativa de un gen de interés, fundados en la comparación de la amplificación de los distintos ciclos (Tichopad *et al.*, 2003; Tichopad *et al.*, 2004), habiéndose publicado, hasta la fecha, dos tipos de modelos de cuantificación relativa; i) sin corrección de la eficiencia (Livak, 1997; Winer *et al.*, 1999; Livak, 2001), modelo descrito en la ecuación 1 y 2;

$$R = 2^{-[\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control}]}$$

*Ecuación 1*

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{Ecuación 2}$$

y ii) con corrección de la eficiencia (Meijerink *et al.*, 2001; Pfaffl, 2001; Liu y Saint, 2002a; Liu y Saint, 2002b; Pfaffl *et al.*, 2002; Tichopad *et al.*, 2003; Tichopad *et al.*, 2004), modelo descrito en la ecuación Ns° 3, 4 y 5.

$$R = \frac{(E_{interés})^{(\Delta Ct_{interés})(control-muestra)}}{(E_{referencia})^{(\Delta Ct_{referencia})(control-muestra)}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$R = \frac{(E_{interés})^{(\Delta Ct_{interés})(media\ control-media\ muestra)}}{(E_{referencia})^{(\Delta Ct_{referencia})(media\ control-media\ muestra)}} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$R = 2^{\Delta\Delta Ct} \quad \text{Ecuación 5}$$

Por lo tanto, la expresión relativa de un gen de interés se calcula en base a la eficiencia de la reacción de PCR (E) o una eficiencia estática de 2, y la diferencia ( $\Delta$ ) de los valores de Ct de una muestra desconocida con un control, como fue descrito en las ecuaciones anteriores. De esta manera se genera la fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (ecuación 5), de la cual se desprende el método actualmente más utilizado, que permite estimar la expresión relativa de un gen de interés en relación con otro gen, basándose en el cálculo sobre los valores de “delta Ct” ( $\Delta Ct$ ) o “delta- delta Ct” ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Livak y Schmittgen, 2001). Estos cálculos se fundamentan en la comparación de los Ct, definidos como el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia alcance un umbral específico de detección y está inversamente correlacionado con la cantidad de ácidos nucleicos en la reacción (Walker, 2002). Este método expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct de un control. Con el fin de simplificar estos cálculos se crearon programas matemáticos que integran estas fórmulas permitiendo estimar la expresión de manera más rápida y fácil, tales como REST en todas sus versiones REST-MCS, REST-384 y REST-RG (Pfaffl *et al.*, 2002).

## 2.3 PCR en tiempo real

**2.3.1 Historia.** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real se basa en el revolucionario método desarrollado por Kary Mullis a comienzos de los años 80 que permite la amplificación *in vitro* de fragmentos específicos de ADN billones de veces (Saiki *et al.*, 1985; Mullis y Faloona, 1987; Mullis, 1990). Más tarde Higuchi *et al.*, (1992; 1993) diseñaron un procedimiento capaz de detectar la acumulación de estas amplificaciones a medida que se generan, a través de un sistema de fluorescencia que incluía al agente intercalante bromuro de etidio como fluoróforo. Por otra parte, la adición de una etapa inicial de transcripción reversa (RT) permitió la amplificación de cualquier tipo de ARN, convirtiéndose en un método netamente cuantitativo para la medición de la expresión génica.

**2.3.2 Fundamento.** La técnica de PCR en tiempo real se basa principalmente en la utilización de colorantes fluorescentes intercalantes o sondas específicas que combinan los pasos de amplificación y detección de la PCR en un solo procedimiento (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Esta simultaneidad de procesos es posible mediante la determinación del número de ciclos de amplificación requeridos para la generación de un aumento en la señal de fluorescencia capaz de cruzar el umbral de fluorescencia, originando el ciclo umbral, también designado como Ct por sus siglas en inglés threshold cycle. El Ct es proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos producidos durante cada ciclo de PCR (Higuchi *et al.*, 1993), por ende, estos valores generados por el equipo de PCR se correlacionan estrechamente con la cantidad original del templado, así como también de expresión génica de la secuencia. Por otra parte, existen muchos factores que inciden en los valores de Ct, tales como la concentración del templado, los componentes del mix (MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzima, entre otros), la eficiencia de la reacción de PCR y el colorante de referencia pasiva, por lo que es necesario poner énfasis en ellos con el fin de disminuir la introducción de posibles variaciones.

**2.3.3 Modelamiento matemático.** El ensayo de PCR en tiempo real se caracteriza por una serie de procedimientos que se encuentran determinados por un modelo matemático capaz de predecir la cinética de la reacción. El primer paso, luego de la extracción de ARN total, es la síntesis de ADNc mediante la transcripción reversa, en donde, teóricamente, la concentración de ADNc resultante es equivalente a la concentración de ARN presente en la muestra, sin embargo, considerando que la eficiencia de la reacción no es constante la concentración de ADNc obtenido es menor que la concentración de ARN de partida, lo que se aprecia en la ecuación N°6:

$$[\text{ADN}]_0 = [\text{ARN}]_0 \cdot E_{\text{RT}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde  $E_{\text{RT}}$  corresponde a la eficiencia de la transcripción reversa, no obstante, este valor se vuelve despreciable al manipular todas las muestras bajo las mismas condiciones experimentales y de procesamiento, como se observa en la ecuación N° 7:

$$[\text{ADN}]_0 = [\text{ARN}]_0 \quad \text{Ecuación 7}$$

Luego se realiza la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, la cual ocurre de manera progresiva, donde cada molécula de ADN de interés se convierte en el molde objetivo para la síntesis de una hebra complementaria en un ciclo determinado. Este procedimiento se ve facilitado por un sistema de temperatura definido con precisión, el cual se repite una y otra vez, produciendo duplicaciones del templado en cada nuevo ciclo de PCR. Tal ideal forma la duplicación de la reacción de PCR que se describe en la siguiente ecuación:

$$N_c = 2^c \quad \text{Ecuación 8}$$

En donde  $N_c$  es la cantidad de moléculas de un número  $c$  de ciclos, sin embargo, en la práctica cada reacción se inicia con una cantidad de ADN molde determinado, como se observa en la ecuación N°9.

$$N_C = N_0 \cdot 2^C$$

*Ecuación 9*

En una reacción de PCR perfectamente eficiente la cantidad o número de copias de moléculas de ADN se duplicaría en cada ciclo, esto no ocurre en las condiciones experimentales, donde la eficiencia de amplificación de ADN no es constante en toda la reacción, considerando que durante los primeros ciclos la concentración de ADN molde es baja y los errores de muestreo relacionados con los procesos estocásticos ocasionan que las enzimas sólo puedan amplificar una parte de las moléculas de ADN (Peccoud y Jacob, 1996). Asimismo, la PCR en tiempo real se basa en el supuesto de que estos factores son idénticos para todas las amplificaciones, lo cual puede ser estadísticamente correcto para valores  $N_0$ , que son lo suficientemente grandes como para que los errores de muestreo se conviertan en insignificantes (Stolovitzky y Cecchi, 1996). Por lo tanto, la eficiencia de la PCR oscila entre 2, que corresponde a la duplicación de la concentración de ADN en cada ciclo, razón por la cual se incluye un factor de eficiencia que fluctúa en un rango de 0 a 100%, expresado como 0 a 1 (Livak y Schmittgen, 2001), tal como se muestra en la ecuación N° 10.

$$N_C = N_0 \cdot (1 + E)^C$$

*Ecuación 10*

En donde,  $N_C$  es el número de ciclos de amplificación, mientras que  $N_0$  es la concentración de ADN al inicio y  $E$  es la eficiencia de la PCR en tiempo real, no obstante, en la PCR en tiempo real se obtienen los resultados como valor  $C_t$  y no según el número de ciclos como ocurre en la técnica convencional.

$$N_{C_t} = N_0 \cdot (1 + E)^{C_t}$$

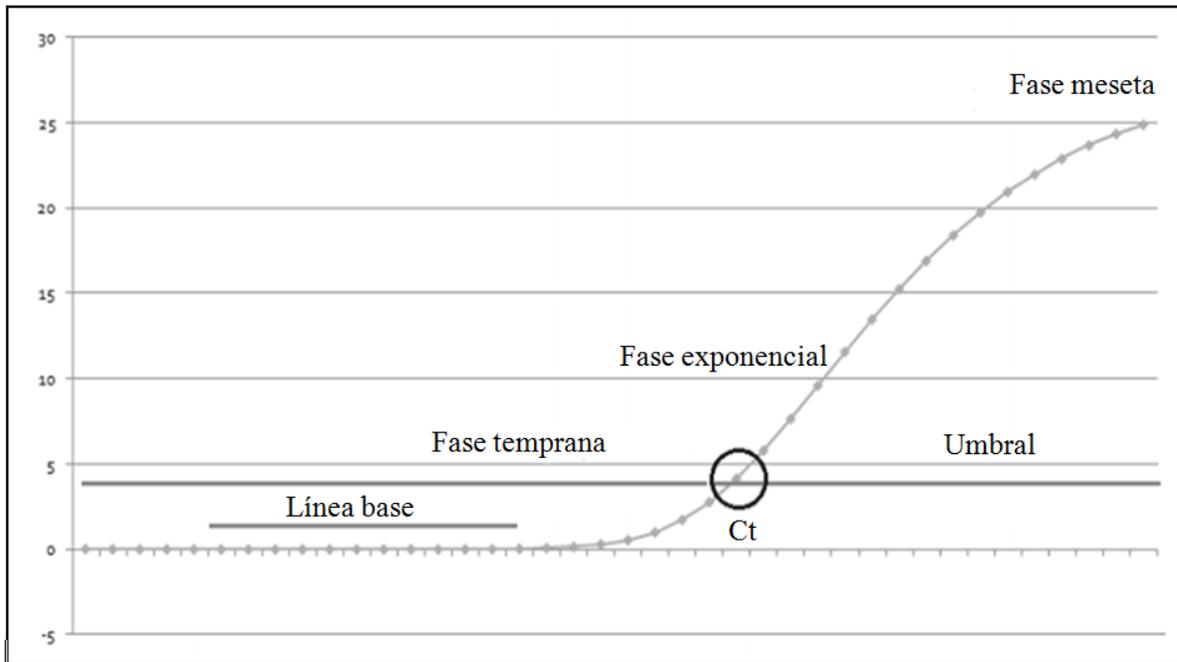
*Ecuación 11*

Asumiendo que la eficiencia y los valores Ct son constantes en la reacción, la estructura de la ecuación anterior se torna lineal ( $y = mx + b$ ), por ende, la pendiente de la ecuación es  $-\log(1 + E)$ , como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$\text{Pendiente} = -\text{Log}(1 + E) \quad \text{Ecuación 12}$$

$$E = 10^{(-\text{pendiente})} - 1 \quad \text{Ecuación 13}$$

**2.3.4 Cinética de la reacción.** La cinética de la PCR en tiempo real normalmente genera curvas de amplificación de forma logística o sigmoidea, lo que indica que consiste en fases características: i) temprana, ii) exponencial y iii) meseta (Schnell y Mendoza, 1997; Peccoud y Jacob, 1998; Liu y Saint, 2002a; Tichopad *et al.*, 2003), como se muestra en la Figura 1. En la fase temprana aunque el carácter exponencial de la amplificación del molde de ADN está presente no es posible su detección ya que se encuentra por debajo del un umbral de detección de fluorescencia por el equipo en PCR en tiempo real. No obstante, la amplificación está presente en esta fase pero con carácter lineal (Rasmussen, 2001). Por otra parte, en la fase exponencial la duplicación del producto de cada ciclo produce los primeros cambios detectables en las señales de fluorescencia generando un crecimiento exponencial descrito por la ecuación 11 (Wittwer *et al.*, 1997), por ende, el análisis de la abundancia relativa de los productos de PCR se realiza durante esta fase, considerando que no existe limitación de los reactivos, con una eficiencia del 100% de la reacción (Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996). Con los progresivos ciclos de la PCR la reacción se agota en la fase de meseta (Kainz, 2000), por lo que la tendencia de crecimiento decae y su curso se torna más estocástico, debido a la generación de productos no específicos (Peccaud y Jacob, 1996; Wittwer *et al.*, 1997; Kainz, 2000).



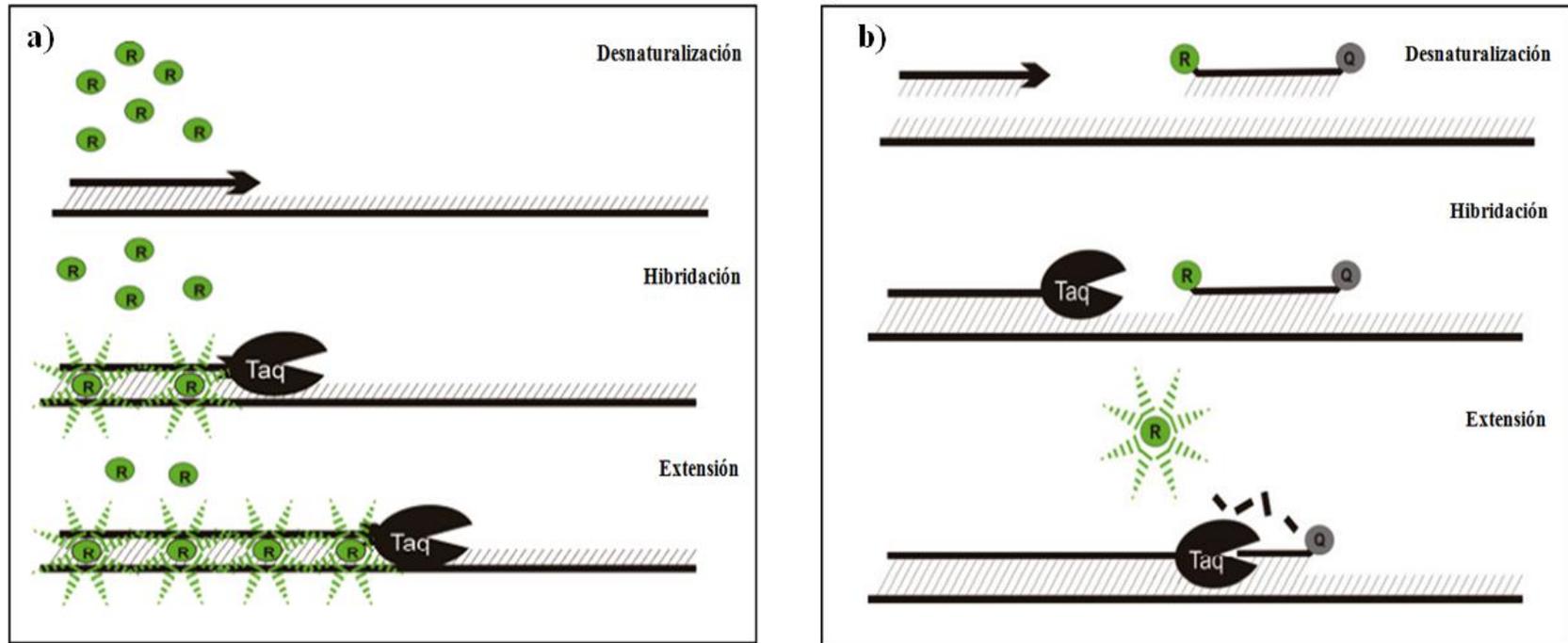
**Figura 1.** Gráfica modelo de las partes de la curva de PCR en tiempo real. El umbral determina la fase temprana debido a que la señal de fluorescencia no es detectable por el equipo de PCR en tiempo real ya que las amplificaciones se pierden en el ruido de fondo. La fase exponencial de la curva se caracteriza por generar los primeros cambios detectables de las amplificaciones por encima del umbral. Finalmente y con el agotamiento de los reactivos la reacción entra en la fase meseta.

**2.3.5 Sistemas de detección.** La técnica de PCR en tiempo real permite medir el número de ciclos (Ct) necesarios para detectar una señal fluorescente para determinar la cantidad de ácidos nucleicos presentes en una muestra. Con el fin de simplificar este proceso de cuantificación se han desarrollado diferentes métodos fluorescentes (Gibson *et al.*, 1996), existiendo básicamente dos formatos de químicos que permiten correlacionar la cantidad de ARN o ADN con las señales de fluorescencia: i) detección no específica y ii) detección específica.

La detección no específica, utiliza fluoróforos que se unen de manera no específica al ADN generado durante la reacción de PCR, emitiendo fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN presente en la reacción; este método incluye colorantes de unión e intercalantes, tales como bromuro de etidio o SYBR Green, siendo este último el de mayor uso en esta técnica

(Ponchel *et al.*, 2003; Zipper *et al.*, 2004; Wong y Medrano, 2005; Kubista *et al.*, 2006) (Figura 2a). Dichos colorantes son añadidos directamente a la reacción de PCR y aunque intrínsecamente no son específicos a un fragmento en particular, pueden igualmente generar datos precisos, considerando que los productos inespecíficos sólo aparecen en ciclos tardíos (Pfaffl y Hageleit, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002), sugiriendo que la detección por SYBR Green es más exacta y produce curvas estándares más lineales que la detección por sondas específicas tipo TaqMan (Schmittgen *et al.*, 2000). Esta clase de detección presenta dos ventajas sobre la basada en sondas, i) se pueden incorporar para optimizar y establecer protocolos que utilizan variados partidores y condiciones experimentales y, ii) son significativamente más económicos, ya que no existe costo asociado a la elaboración de la sonda, mientras que sus principales desventajas corresponden a su unión indiscriminada a cualquier ADN de doble cadena, obligando a utilizar curvas de fusión para el ensayo, lo que añade complejidad en el análisis de los datos.

Por su parte la detección específica consiste en el diseño y síntesis de una o más sondas específicas para la secuencia que se desea detectar, compuestas por dos tipos de fluoróforos, el primero denominado “*reportero*” que se ubica en el extremo 5’ de la sonda y el otro denominado “*amortiguador o quencher*” que se sitúa en el extremo 3’ de la cadena. La señal de fluorescencia del *reportero* es silenciada por el *quencher* mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) cuando la sonda se encuentra intacta. No obstante, al hibridar la sonda a su cadena complementaria la actividad 5’ exonucleasa de la ADN polimerasa corta el extremo de unión del *reportero*, liberándolo de su *quencher*, con la consiguiente emisión de fluorescencia (figura 2b). Existen otras tecnologías a parte de las sondas TaqMan (Livak *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 1996) disponibles en el comercio tales como Molecular Beacons (Tyagi y Kramer, 1996), LightCycler, Scorpions (Whitcombe *et al.*, 1999) y Amplifluor, todas ellas basadas en FRET o interacciones similares entre moléculas reporteras y amortiguadores (Clegg, 1992; Selvin, 1995; Wittwer *et al.*, 1997; Winer *et al.*, 1999; Wittwer *et al.*, 2001). La señal fluorescente sólo se genera si la sonda de amplificación específica se hibrida con la secuencia diana complementaria. Por ende, la ventaja principal de esta metodología es la especificidad del ensayo, sin embargo el alto costo de la técnica limita el uso de esta tecnología (Wong y Medrano, 2005; Kubista, *et al.*, 2006).

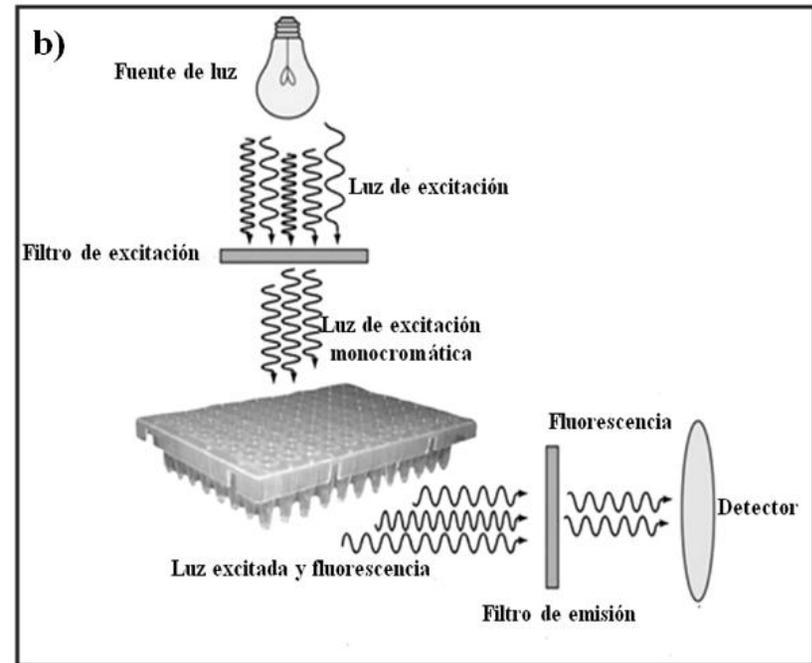
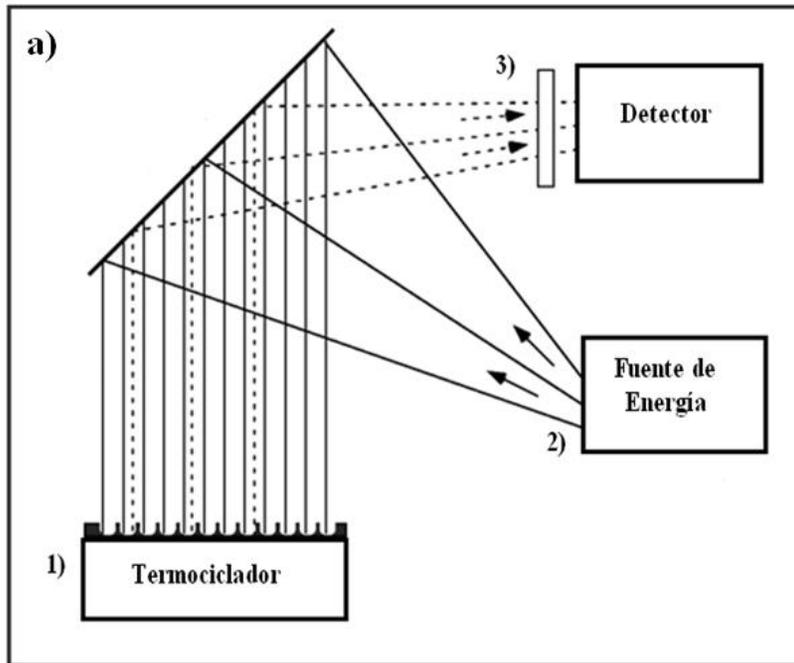


**Figura 2 (a-b).** Representación gráfica de los principales sistemas de detección. **a)** Ilustración de la incorporación de SYBR<sup>®</sup> Green a la reacción de PCR. En la etapa de desnaturalización el colorante se mantiene suspendido libremente en la reacción y su señal de fluorescencia es limitada. SYBR<sup>®</sup> Green se intercala en la doble cadena de ADN a medida que es sintetizada por la enzima Taq polimerasa en la etapa de extensión, incrementando drásticamente la señal de fluorescencia. Este aumento en la fluorescencia es proporcional al número de moléculas de SYBR Green unidas a la doble cadena. El proceso se repite en cada ciclo con el aumento de la señal de fluorescencia total. **b)** Ilustración de las sondas Taqman<sup>®</sup>. Este sistema de detección está basado en una sonda compuesta por un fluoróforo *reportero* que es silenciado por una segunda molécula *quencher* mediante el sistema FRET. En la etapa de desnaturalización la sonda se encuentra libre en la solución, sin emisión de fluorescencia del *reportero*. La sonda se hibrida de manera complementaria a la cadena de la secuencia diana durante la síntesis de ADN mediante la Taq polimerasa con una actividad nucleasa 5' a 3'. A medida que la polimerasa se extiende en el molde de ADN se encontrará con el extremo 5' de la sonda, generando un desplazamiento y degradación de esta, provocando la liberación del *reportero*. Tras esta separación del *reportero* y el *quencher*, es posible detectar la señal fluorescente del *reportero*.

**2.3.6 Instrumentación.** La aplicación de técnicas de fluorescencia para PCR en tiempo real, junto con la instrumentación adecuada capaz de combinar la amplificación, detección y cuantificación es indispensable para un experimento de PCR, debido a que los sistemas químicos requieren tanto de una entrada específica de energía para la excitación como de una longitud de onda particular para la detección, por ende, la instrumentación debe ser capaz de hacer ambas cosas al mismo tiempo y en las longitudes de ondas deseadas (Orlando *et al.*, 1998).

De manera general, todo equipo de PCR en tiempo real está compuesto de tres mecanismos principales: i) una fuente de luz, que genera un haz de luz de una longitud de onda determinada, que incide en cada muestra, permitiendo la emisión de la señal de fluorescencia, ii) un sistema de detección, donde se fija el rango espectral y sensibilidad del ensayo, y iii) un mecanismo de termociclado, que establece la velocidad de ejecución del ensayo, además de uniformar los cambios de temperatura (Figura 3a-b). Adicionalmente todo equipo de PCR en tiempo real necesita un programa de adquisición de datos con el fin de simplificar el análisis. Muchos equipos ofrecen la representación gráfica de los resultados del ensayo, incluyendo las curvas de amplificación y de disociación, entregando la primera información sobre la cinética de la amplificación de las secuencias dianas, mientras que la curva de disociación revela las características del producto final amplificado (Valasek y Repa, 2005).

Como se muestra en el cuadro 1, los equipos de PCR en tiempo real se diferencian principalmente en la capacidad de análisis de muestras, que va desde 48 a 384 pocillos como formato estándar; por el método de excitación, tales como láser, láser de amplio espectro y fuentes de luz con varios filtros; así como también por la adquisición de canales de fluorescencia. Otra distinción específica es la forma en que el programa procesa los datos, ya sea con enfoques de cuantificación absoluta o relativa (Livak, 1997; Livak, 2001; LightCycler Software, 2001).



**Figura 3 (a-b).** Instrumentación de la PCR en tiempo real. **a)** Partes generales de la PCR en tiempo real. 1) Las muestras se colocan en un termociclador que controla la temperatura necesaria para cada ciclo de PCR, 2) son expuestas a la fuente de energía de excitación y 3) la fluorescencia resultante se mide con el detector con cada ciclo. **b)** Diseño óptico para la detección de la fluorescencia en un termociclador de PCR en tiempo real. El procedimiento de detección se basa en un sistema de excitación y de emisión mediante filtros. Dependiendo del fabricante del instrumento, la fuente de luz consiste en una de xenón, tungsteno-halógeno o un LED (diodo emisor de luz), y el detector es una cámara CCD (dispositivo de carga acoplado) o PMT (tubo fotomultiplicador).

**Cuadro 1.** Comparación entre las características de los instrumentos más utilizados en PCR en tiempo real.

Instrumento/ Configuración	ABI Prism® 7500	ABI Prism® 7900	Bio-Rad iQ® 5	Bio-Rad MIR Chromo 4™	Corbett Rotor Gene™	Eppendorf Mastercycler®	Roche LightCycler®	Roche LightCycler® 480	Stratagene Mx® 3005p	Techne Quantica™	
<b>Fuente de luz</b>	Tungsteno- halógeno	Laser Argón	Tungsteno- halógeno	4 LEDs	4 LEDs	96 LEDs	Blue LED	Lámpara Xenón	Tungsteno- halógeno	Tungsteno- halógeno	
<b>Detector</b>	Cámara CCD	Cámara CCD	Cámara CCD	4 detectores fotodiodos	4 PMTs	2 canales PMTs	Fotodiodos	Cámara CCD	PMT	4 PMTs	
<b>Sistema de escaneo</b>	Placa entera	Escaneo por fila	Placa entera	Escaneo fotónico	Mediante tubo	96 cables de fibra óptica	Mediante tubo		Escaneo placa	Placa entera	
<b>Longitud de excitación</b>	450-650 nm	488 nm	400- 700 nm	450-650 nm	470-625 nm	470 nm	480 nm	450-615 nm	350-635 nm	460- 650 nm	
<b>Longitud de emisión</b>	500-700 nm	500-660 nm	400-700 nm	515-730 nm	510- 665 nm	520-605 nm	530-710 nm	500-670 nm	440-610 nm	500- 710 nm	
<b>Capacidad múltiple</b>	5	2	5	4	4	4	6	6	5	4	
<b>Recipiente muestra</b>	96	96/384	96	96	36/72	96	32	96/384	96	96	
<b>Volumen muestra</b>	20- 100µl	20- 100µl/96	10- 50µl	20- 100µl	100- 200µl	10- 50µl	10- 20µl/pequeño	20- 100µl/96	25µl	15- 50µl	
<b>Sensibilidad</b>	9- logs	9- logs	9- logs	6- logs	10- logs	12- logs	9- logs	9- logs	8- logs	10- logs	9- logs

**2.3.7 Limitaciones.** A pesar de que la PCR en tiempo real tiene varias ventajas sobre otros métodos de cuantificación de ácidos nucleicos, también presenta algunas limitaciones importantes. La mayoría de las técnicas basadas en PCR son susceptibles a la inhibición por compuestos presentes en ciertas muestras biológicas que alteran el funcionamiento normal de la reacción. Otro inconveniente de este procedimiento es el análisis de expresión génica debido a la utilización de ARN como secuencia diana, que requiere de un paso enzimático extra para su conversión a ADNc, lo cual añade más posibilidades de variabilidad al ensayo (Bustin, 2000; Bustin, 2002; Bustin y Nolan, 2004). Además, hay que tener en cuenta la extrema fragilidad del ARN en contraste con el ADN, por lo tanto, su aislamiento debe ser cuidadosamente realizado con el fin de garantizar tanto la integridad del ARN como la eliminación de nucleasas, ADN genómico e inhibidores de la PCR. Sin perjuicio de lo anterior, probablemente la mayor limitación actual de la PCR en tiempo real no es inherente a la tecnología, sino más bien reside en el error humano, como por ejemplo el desarrollo del ensayo inadecuado, el análisis incorrecto de los datos y/o conclusiones injustificadas.

## **2.4 Normalización**

La existencia de variables como la inestabilidad inherente del ARN, la diversidad de protocolos de extracción y transcripción reversa y las diferencias de eficiencia de la PCR generan errores experimentales en la cuantificación de los transcritos los que son introducidos principalmente durante las etapas sucesivas a la extracción y purificación del ARN, especialmente cuando las muestras se han obtenido de diferentes individuos, tejidos y tiempos (Bustin *et al.*, 2004). Estos errores pueden ser controlados y corregidos por estrategias de normalización (Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004; Huggett *et al.*, 2005), componente indispensable del proceso de análisis de expresión génica (Hendriks-Balk *et al.*, 2007). El proceso de normalización es la corrección que asegura que las cantidades estimadas de ácidos nucleicos para dos muestras biológicas sean comparadas en igualdad de condiciones, lo que permite minimizar posibles diferencias en la calidad y cantidad de las muestras de interés (Huggett *et al.*, 2005). En la actualidad, la normalización sigue siendo una de las principales limitaciones de la técnica de PCR en tiempo real (Thellin *et al.*, 1999; Dheda, 2004), razón por la

cual diversos autores enfatizan el estudio de diferentes estrategias dirigidas a este propósito, con el fin de remover esta variación experimental. Algunas de estas estrategias se basan en el tamaño de muestra, cuantificación del ARN total, ADN genómico y uso de genes de referencia y/o moléculas artificiales, cada una con sus ventajas y consideraciones (Huggett *et al.*, 2005).

## 2.5 Genes de referencia

El método más común para la normalización de los datos de PCR en tiempo real corresponde al uso de un gen de referencia, también denominado gen interno, constitutivo o housekeeping. En 1965, Watson *et al.*, definieron el término genes de referencia “*como aquellos genes que se expresan en todos los tejidos para mantener las funciones celulares básicas*” (Watson *et al.*, 1987), dicha definición es el fundamento principal de la cuantificación relativa de ácidos nucleicos actual. Basándose en lo anterior, se ha planteado que dichos genes deben expresarse en todas las células en las que se examina un gen de interés sin presentar variabilidad en sus niveles de transcripción independientemente de las condiciones experimentales y/o ambientales (Marten *et al.*, 1994; Foss *et al.*, 1998; Thellin *et al.*, 1999; Dheda *et al.*, 2004; Tichopad *et al.*, 2004; Ohl *et al.*, 2005; Bär *et al.*, 2009). Además, se ha establecido que codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células, funciones tales como estructura, metabolismo, señalización, transcripción, defensa, expresión proteica, entre otras. No obstante, en términos de estructura y regulación, los genes de referencia no presentan características que permitan su distinción de forma inequívoca respecto de otros genes (Zhu *et al.*, 2008).

Si bien el uso de los genes de referencia está muy extendido en análisis de expresión génica, es importante establecer la existencia de genes que cumplan con estos criterios mediante su validación, donde más del 90% de los análisis de expresión génica publicada en revistas de alto impacto utilizan un único gen de referencia mostrando una variabilidad inaceptable en la expresión (Suzuki *et al.*, 2000). Por lo tanto, la aprobación de los genes de referencia apropiados es crucial en estudios de expresión génica, considerando que su uso inadecuado puede conducir a

una normalización errónea de los datos de PCR en tiempo real y por tanto a una interpretación incorrecta de los resultados (Zhang *et al.*, 2005; McCurley *et al.*, 2008). Sin embargo, es muy difícil encontrar un gen de referencia universal que se exprese de manera estable a través de las diferentes células o tejidos (Rubie *et al.*, 2005; Lisowski *et al.*, 2008; Kessler *et al.*, 2009), por lo que surge la siguiente pregunta; ¿cuál(es) es el gen(es) de referencia adecuado para una condición experimental determinada? (Thellin *et al.*, 1999; Bustin, 2000; Goidin *et al.*, 2001). Como una forma de solucionar este problema, Vandesompele *et al.*, (2002) postularon una serie de algoritmos capaces de evaluar la estabilidad relativa de la expresión génica, lo que permite establecer los genes de referencia más apropiados para un tratamiento experimental en particular, asumiendo que estos genes son expuestos a la misma manipulación que el gen de interés.

### **2.5.1 Programas de evaluación y selección de genes de referencia**

Los genes de referencia poseen la capacidad intrínseca para captar y medir la variabilidad genética de todo el proceso, representando la mejor estrategia de normalización (Huggett *et al.*, 2005; VanGuilder *et al.*, 2008). No obstante, no existe un gen de referencia con validez universal (Thellin *et al.*, 1999; Bustin, 2000; Schmittgen y Zakrajsek, 2000; Suzuki *et al.*, 2000; Bustin, 2002; Tricarico *et al.*, 2002). A mayor abundamiento, se revela la inexistencia de dicho gen (Vandesompele *et al.*, 2002). Afortunadamente, en la mayoría de los estudios, un gen de referencia universal no es necesario, considerando que los diseños experimentales se limitan a un sólo tipo de tejido o etapa, en el que, probablemente, uno o más genes son expresados constitutivamente para esa condición. La tarea de identificar estos genes no es sencilla (Andersen *et al.*, 2004), considerando que la evaluación de la estabilidad de expresión de los genes candidatos presenta un problema, que nos lleva a formularnos la siguiente interrogante; ¿cómo se puede evaluar la estabilidad de la expresión de un gen candidato si no se dispone de una medida confiable para normalizar dicho candidato?; En respuesta a dicha problemática, se han diseñado y propuesto estrategias mediante algoritmos matemáticos, destacando programas como geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004), entre otros, los cuales determinan una medida de la estabilidad del gen de referencia, la que puede ser utilizada para establecer un clasificación capaz de seleccionar aquellos genes más estables.

**2.5.1.1 geNorm.** Vandesompele *et al.*, (2002) fue el primer autor en considerar los errores asociados al uso de un único gen de referencia sin su previa validación en estudios de expresión, por lo que desarrolló un método capaz de seleccionar los genes más adecuados según su estabilidad de expresión, proponiendo el uso de múltiples genes de referencia para calcular el factor de normalización. Con el fin de minimizar los cálculos matemáticos, y por ende, facilitar este análisis, formularon una aplicación en Visual Basic para Microsoft Excel, denominado geNorm. Este programa se basa en la estimación de la estabilidad de la expresión de los potenciales genes de referencia enunciados como valor M, el cual es determinado por el promedio de a pares (V) de un gen en particular en contraste con todos los otros genes candidatos, donde un gen es emparejado con cada uno de los demás candidatos evaluados para luego calcular un valor de expresión relativa. Luego por etapas sucesivas de exclusión son eliminados los genes con menor estabilidad recalculando así los valores M que finalmente permitirán la clasificación de los genes según su estabilidad. Por lo tanto, el principio que rige esta aproximación es que la variación en los valores de expresión de dos genes delata la falta de constancia en la expresión de al menos uno de ellos. Adicionalmente, este programa calcula un factor de normalización (NF) sobre la base de la media geométrica de los genes de referencia más estables para obtener el número óptimo de genes para ser usados como normalizadores en estudios de expresión génica. Este número se determina por la variación que experimenta el conjunto de NFs del panel de muestras a medida que aumenta el número de genes empleados para su cálculo. Esta incorporación de genes finaliza cuando ello no supone un cambio significativo en los valores que adquieren los NFs. La principal ventaja de geNorm tiene relación con el control de las variaciones introducidas por la cantidad y calidad de las muestras, considerando que estos cambios afectan de igual forma a los genes emparejados, sin embargo, es sensible a la existencia de co-regulación transcripcional entre los genes de referencia candidatos.

**2.5.1.2 NormFinder.** Este programa se basa en un modelo de aproximación estadística propuesto por Andersen *et al.*, (2004) el cual evalúa la variación en los niveles de expresión de un gen de referencia candidato, tanto dentro como entre grupos de muestras, mediante el cálculo de la varianza. Este cálculo entre variaciones proporciona un valor de variabilidad y de acuerdo a éste, se genera una clasificación que permite seleccionar el gen de referencia más apropiado para

un determinado grupo de muestras y condiciones experimentales. Las principales ventajas de NormFinder son el balance que realiza entre dos variaciones, dando mayor validez a la clasificación, así como también, su capacidad para no ser afectado por la co-regulación de los genes de referencia candidatos. No obstante, se ve limitado por su escasa sensibilidad a los errores o variaciones introducidas durante el procesamiento de las muestras.

### 3. HIPOTESIS

La estabilidad de los genes de referencia puede variar según el estado de desarrollo embrionario y condiciones experimentales, por lo tanto su validación para cada modelo experimental es indispensable para un adecuado análisis de la expresión génica. Estos antecedentes permiten plantear la siguiente hipótesis: *“La expresión de genes de referencia varía en la etapa de post compactación embrionaria en embriones bovinos generados por diferentes técnicas de producción in vitro”*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Identificar los genes de referencia más apropiados de un panel de diez genes candidatos para estudios de expresión génica en embriones bovinos producidos *in vitro*.

### 4.1 Objetivos específicos

- 4.1.1 Implementar los protocolos de PCR en tiempo real para los potenciales genes de referencia seleccionados.
- 4.1.2 Evaluar los niveles de expresión de estos genes en distintas etapas: ovocito inmaduro (O), ovocito maduro (MII) y embriones de 16-32 células (16-32C) producidos por Fecundación *in vitro*.
- 4.1.3 Evaluar la expresión diferencial de estos genes de referencia en embriones bovinos producidos mediante Fecundación *in vitro* (FIV), Transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y Partenogénesis (PA).

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Diseño del estudio

El estudio consistió de dos experimentos, en los cuales se comparó y evaluó la estabilidad e idoneidad de un panel de genes de referencia: *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ* (cuadro 2), bajo condiciones experimentales específicas. En el primer experimento, la abundancia relativa de los transcritos de estos diez genes se midió en diferentes etapas del desarrollo embrionario bovino, incluidas: i) ovocito inmaduro, ii) ovocito maduro y iii) embriones de 16-32 células. Cada análisis se realizó en tres repeticiones biológicas y dos repeticiones técnicas (3x2). En el caso del segundo experimento, los niveles de ARNm de los genes candidatos se compararon en embriones en estado de blastocisto, producidos *in vitro* por distintos métodos, incluyendo: i) Fecundación *in vitro*, ii) Inyección intracitoplasmática de espermatozoides, iii) Transferencia nuclear de células somáticas, y iv) Partenogénesis. Cada análisis fue realizado mediante tres repeticiones biológicas y dos repeticiones técnicas (3x2).

### 5.2 Material biológico

Se utilizaron embriones bovinos, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Reproducción del Centro de Biotecnología de la Reproducción (BIOREN-CEBIOR) de la Universidad de La Frontera. Para el primer experimento se utilizaron embriones generados mediante la técnica de fecundación *in vitro* descrita por Felmer *et al.* (2011) en etapa de ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células. En el caso del segundo experimento, se emplearon embriones en estado de blastocisto generados por Fecundación *in vitro* (FIV), Inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI), Transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y Partenogénesis (PA), de acuerdo a los métodos descritos por Felmer *et al.* (2008) y Arias *et al.* (2011).

**Cuadro 2.** Descripción de los genes de referencia candidatos.

<b>Símbolo</b>	<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<i>ACTB</i>	Beta actina	Proteína estructural del citoesqueleto	Rodríguez <i>et al.</i> , 2007
<i>eEF1A2</i>	Factor de elongación de traducción eucarionte 1- $\alpha$ 2	Factor de elongación de la traducción de proteínas	Pérez <i>et al.</i> , 2008
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Metabolismo. Oxidoreductasa en la glucólisis y gluconeogénesis	Goossens <i>et al.</i> , 2005
<i>H2A</i>	Familia histona H2a, miembro z	Estructura nucleosoma	Robert <i>et al.</i> , 2002
<i>HMBS</i>	Sintasa hidroximetilbilano	Síntesis de hemos y metabolismo de porfirinas	Nygaard <i>et al.</i> , 2007
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1	Síntesis de purinas	Solomon <i>et al.</i> , 2007
<i>PPIA</i>	Isomerasa peptidilpropil A (ciclofilina A)	Catálisis de la isomerización cis-trans de la prolina, interacciones imídicas entre péptidos, y aceleración del plegamiento de las proteínas	Ross <i>et al.</i> , 2010
<i>SDHA</i>	Complejo succinato deshidrogenasa, subunidad A	Estrés oxidativo. Transportador de electrones en el ciclo de Krebs y en la cadena respiratoria	Goossens <i>et al.</i> , 2005
<i>SF3A1</i>	Factor de splicing 3, subunidad 1	Componente estructural del sistema de empalme de ARN.	Pérez <i>et al.</i> , 2008
<i>YWHAZ</i>	Tirosina 3-monooxigenasa/ proteína de activación triptófano 5-monooxigenasa	Medidor en la transducción de señales	Goossens <i>et al.</i> , 2005

### 5.3 Genes y diseño de partidores

Se seleccionaron siete genes utilizados comúnmente como genes de referencia en diversos estudios de expresión génica en embriones: *ACTB*, *GAPDH*, *H2A*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA* e *YWHAZ* y otros tres genes de referencia utilizados en tejido muscular y de placenta de bovinos: *eEF1A2*, *SF3A1* y *HMBS*, respectivamente. Los partidores *ACTB*, *eEF1A2*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1* y *SF3A1* fueron seleccionados de la revisión bibliográfica como se señala en el cuadro 3 y los genes restantes *GAPDH*, *PPIA*, *SDHA* e *YWHAZ* se diseñaron mediante el programa Fast PCR basándose en la secuencia publicada en GenBank, usando preferentemente las secuencias de la especie *Bos taurus*. La especificidad de los partidores diseñados se verificó mediante un análisis de BLAST en contraste con la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 5.4 Extracción de ARN total

El ARN total se extrajo a partir de un pool de ovocitos y blastocistos (n= 30 y n= 5, respectivamente) mediante el Kit PicoPure® RNA isolation (Arcturus) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método está diseñado para recuperar ARN total de alta calidad a partir de muestras con bajas concentraciones de ácidos nucleicos. Con el fin de minimizar las variaciones asociadas a la manipulación de laboratorio se realizaron de forma simultánea y bajo las mismas condiciones todas las extracciones de ARN para un tratamiento. La purificación del ARN y por tanto, la remoción del ADN genómico, se realizó mediante el tratamiento del ARN con la enzima ADNasa 1 (Fermentas) mediante una incubación de quince minutos a temperatura ambiente (Anexo 1).

**Cuadro 3.** Información de partidores utilizados para PCR en tiempo real.

<b>Gen</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Secuencia</b>	<b>GenBank</b>	<b>Referencia Partidores</b>
<i>ACTB</i>	87 pb	<b>Sentido:</b> CCTCACGGAACGTGGTTACA <b>Anti-sentido:</b> TCCTTGATGTCACGCACAATTT	AY141970	Goosens <i>et al.</i> , 2005
<i>eEF1A2</i>	196pb	<b>Sentido:</b> GCAGCCATTGTGGAGATG <b>Anti-sentido:</b> ACTTGCCCGCCTTCTGTG	BC108110.1	Perez <i>et al.</i> , 2008
<i>GAPDH</i>	119pb	<b>Sentido:</b> TTCAACGGCACAGTCAAGG <b>Anti-sentido:</b> ACATACTCAGCACCAGCATCA	XM583628	
<i>H2A</i>	176 pb	<b>Sentido:</b> GCCATCCTGGCGTACCTCAC <b>Anti-sentido:</b> TGGATGTGTGGAATGACACC-	NM_174809	Vireque <i>et al.</i> , 2009
<i>HMBS</i>	80 pb	<b>Sentido:</b> CTTTGGAGAGGAATGAAGTGG <b>Anti-sentido:</b> AATGGTGAAGCCAGGAGGAA	BC112573.1	Perez <i>et al.</i> , 2008
<i>HPRT1</i>	154pb	<b>Sentido:</b> TGCTGAGGATTTGGAGAAGG <b>Anti-sentido:</b> CAACAGGTCGGCAAAGAACT	AF176419	Goosens <i>et al.</i> , 2005
<i>PPIA</i>	203 pb	<b>Sentido:</b> CTGGCATCTTGTCCATGGCAA <b>Anti-sentido:</b> CCACAGTCAGCAATGGTGATCTTC	NM_178320.2	
<i>SDHA</i>	185 pb	<b>Sentido:</b> GCAGAACCTGATGCTTTGTG <b>Anti-sentido:</b> CGTAGGAGAGCGTGTGCTT	NM_174178.2	
<i>SF3A1</i>	125pb	<b>Sentido:</b> GCGGGAGGAAGAAGTAGGAG <b>Anti-sentido:</b> TCAGCAAGAGGGACACAAA	XM_878187.1	Perez <i>et al.</i> , 2008
<i>YWHAZ</i>	120pb	<b>Sentido:</b> GCATCCCACAGACTATTTCC <b>Anti-sentido:</b> GCAAAGACAATGACAGACCA	BM446307	

## 5.5 Transcripción reversa

A partir del ARN total extraído se sintetizaron los ADNc mediante el Kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2). Los tubos fueron incubados a 70° C durante 5 minutos para permitir la desnaturalización de las hebras de ácidos nucleicos, seguido de 10 minutos a 25°C para el alineamiento de la secuencia de ARN. El ARN se transcribe de manera inversa posteriormente a los 42°C durante 60 minutos. Para terminar la reacción se incubaron las muestras a 70°C durante 10 minutos con el fin de desnaturalizar a la enzima, luego las muestras fueron enfriadas a 4°C. Los 20 µl resultantes de la síntesis de ADNc son diluidos en 80 µl de agua bidestilada estéril y guardadas hasta su uso a -20°C (Anexo 2).

## 5.6 PCR en tiempo real

**5.6.1 Estandarización del protocolo de PCR en tiempo real.** La estandarización de los protocolos de amplificación para cada uno de los genes de referencia candidatos se realizó mediante una reacción de PCR en tiempo real utilizando un protocolo estándar. Para esto, en cada reacción se modificó la concentración de los partidores (100, 200, 300 y 400 mM) con el fin de confirmar la especificidad de la amplificación de los productos de PCR. Adicionalmente, se realizó una curva de disociación, que permitió detectar la formación de dímeros mediante una evaluación de diferentes temperaturas de hibridación ( $T_m$ : 55, 58, 60, 62 y 65 °C), luego los productos resultantes fueron analizados en un gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño e intensidad de las bandas. Las condiciones que se establecieron se utilizaron posteriormente en la amplificación de los genes de referencia mediante PCR en tiempo real.

**5.6.2 Curvas de disociación y eficiencia.** La eficiencia (E) de cada reacción se calculó utilizando el método de curva estándar relativa para *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ*, derivada de diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ) a partir de una mezcla ADNc obtenida de embriones bovinos producidos *in vitro*.

Estos valores se determinaron mediante las pendientes de las curvas de calibración, de acuerdo a la ecuación  $E = 10^{(1-\text{pendiente})}$  establecida por Pfaffl, (2001). Además se analizaron las curvas de disociación de cada uno de los partidores a partir de las diluciones anteriores con el fin de verificar la presencia de un solo fragmento de amplificación así como también de la temperatura de fusión.

**5.6.3 Control negativo.** Se realizaron controles negativos para cada uno de los genes de referencia en estudio para comprobar la ausencia de ácidos nucleicos contaminantes de los reactivos utilizados para las reacciones de PCR en tiempo real. Estos controles se implementaron utilizando un protocolo estándar de PCR, pero en reemplazo del ADNc se añadió agua bidestilada estéril.

**5.6.4 Reacciones de PCR.** Las reacciones de PCR en tiempo real para los análisis se realizaron en el equipo Mx3000P™ real-time PCR Thermocycler (Stratagene®), usando SYBR® Green II como fluoróforo de detección. La mezcla de cada reacción de PCR es de 20 µl finales, los que contienen: 10 µl de Master mix (2x Brilliant® II SYBR green QPCR mix Agilent), 1 µl de colorante pasivo ROX (100 nM), 1 µl de agua bidestilada y esterilizada, 4 µl de partidores (300 mM) y 4 µl de ADNc. El programa de amplificación constó de una etapa previa de 95°C durante 10 minutos con el fin de activar la enzima Taq polimerasa. Luego se realizaron 40 ciclos de amplificación separadas en tres etapas: i) desnaturalización, 95°C durante 20 segundos, ii) hibridación, 58°C durante 20 segundos y iii) extensión 72°C durante 20 segundos. Adicionalmente, se incluyó en el perfil térmico un segmento para la medición de la curva de disociación compuesta por cuatro etapas con diferentes temperaturas y tiempos: i) 95°C durante 2 minutos, ii) 25°C por 1 segundo, iii) 70°C durante 15 segundos y iv) 95°C por 1 segundo (Anexo 3). La especificidad del producto fue confirmada en una electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Anexo 4).

## 5.7 Análisis estadístico

Los datos Ct proporcionados por el equipo de PCR en tiempo real se examinaron por un análisis de varianza (ANOVA) siendo el procedimiento principal para el análisis de datos experimentales. En este análisis se realizó una ANOVA multifactorial con una significancia de 0,05 mediante el programa estadístico STATGRAPHICS plus 5.1 donde se designó a los valores Ct como variable dependiente y a las repeticiones biológicas, repeticiones técnicas, etapas de desarrollo, métodos de producción *in vitro* de embriones y genes de referencia candidatos como factores, con el fin de establecer si existían diferencias significativas entre estos parámetros.

## 5.8 Transformación lineal

Se realizó una transformación de los valores Ct obtenidos de las amplificaciones a cantidades de expresión relativa (Q) en escala lineal, a través del método conocido como delta Ct (Higuchi *et al.*, 1993; Livak y Schmittgen, 2001), el cual consistió en agrupar todos los datos Ct y escoger para cada gen el Ct de menor valor para luego restarle los demás valores Ct de ese gen en particular, como se describe en la ecuación N° 18.

$$Q = (E)^{dCt} \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde, Q es la cantidad de expresión relativa del pool de embriones, dCt es el valor Ct mínimo dentro de los datos de un mismo gen menos el Ct de la muestra de cada uno de los pools de embriones, y E es la eficiencia según lo determinado por el equipo de PCR en tiempo real.

## 5.9 Determinación de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia

Para determinar la estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos en las diferentes etapas del desarrollo embrionario y en los distintos métodos de producción *in vitro* de embriones, se exportaron los datos Ct en cantidades de expresión relativa Microsoft Excel 2007

para luego importarlos a la matriz de los programas geNorm (versión 3.5) y NormFinder (versión 0.953) con el fin de analizar estos datos siguiendo los respectivos manuales.

## 6. PRESENTACION DE RESULTADOS

### 4.1 Estandarización de las condiciones de PCR en tiempo real

La estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de los diez genes de referencia candidatos se estableció mediante dos parámetros i) temperatura de hibridación y ii) concentración de partidores utilizando una mezcla de ADNc de embriones bovinos generados por la técnica de fecundación *in vitro*.

Las temperaturas evaluadas fueron de 55°C, 58°C, 60°C, 62°C y 65°C basadas en la temperatura de fusión de los partidores. La reacción con una temperatura de 55°C mostró buenos resultados, no obstante, para algunos de los genes candidatos *ACTB*, *eEF1A2*, *H2A*, *PPIA* y *SDHA* evidenció curvas y amplificaciones imperfectas. Mientras que la amplificación con una temperatura de hibridación de 58°C reveló una mejora sustancial en la especificidad de las curvas de disociación así como también un aumento en la cantidad de fluorescencia emitida por la amplificación de dichos genes. Adicionalmente se probaron las temperaturas de 60°C, 62°C y 65°C, si bien se pudo observar buenas amplificaciones la cantidad de fluorescencia bajó, indicando una disminución en la eficiencia de la PCR en tiempo real. Finalmente se seleccionó la temperatura de hibridación de 58°C como la más eficiente para las reacciones de todos los genes en estudio, lo que permitió establecer el programa térmico de la reacción de PCR en tiempo real como se describe en la cuadro 4.

Por otra parte, se evaluaron diferentes concentraciones de partidores de 100 mM, 200 mM, 300 mM y 400 mM basándose en las recomendaciones de los protocolos de PCR en tiempo real. Las reacciones se realizaron utilizando el programa establecido anteriormente (cuadro 4). Al probar con concentraciones de partidores de 100 mM y 200 mM se observaron fragmentos de amplificación, pero con una fluorescencia muy baja, sin embargo, al aumentar dicha concentración a 300 mM se evidenció un incremento significativo en la fluorescencia emitida por la amplificación así como también la inexistencia de exceso de partidores. Al realizar la reacción

utilizando 400 mM de partidores mostró un exceso de estos mismos en las curvas de amplificación y de disociación, por lo que no representa una mejora significativa para la reacción. Finalmente, se escogió la concentración de 300 mM como la óptima para la reacción de PCR en tiempo real para todos los genes en estudio, lo que permitió determinar las condiciones de reacción descritos en el cuadro 5.

**Cuadro 4.** Programa final para la PCR en tiempo real.

<b>Procedimiento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Activación de la Taq polimerasa	95°C	10:00	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	0:20	40 ciclos
Hibridación	58°C	0:20	
Extensión	72°C	0:20	
Curva de disociación	95°C	2:00	1 ciclo
	25°C	0:01	
	70°C	0:15	
	95°C	0:01	

**Cuadro 5.** Condiciones finales de la reacción de PCR en tiempo real.

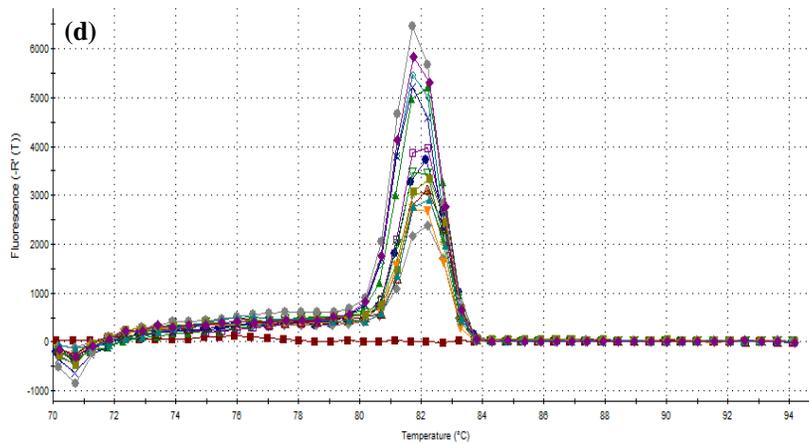
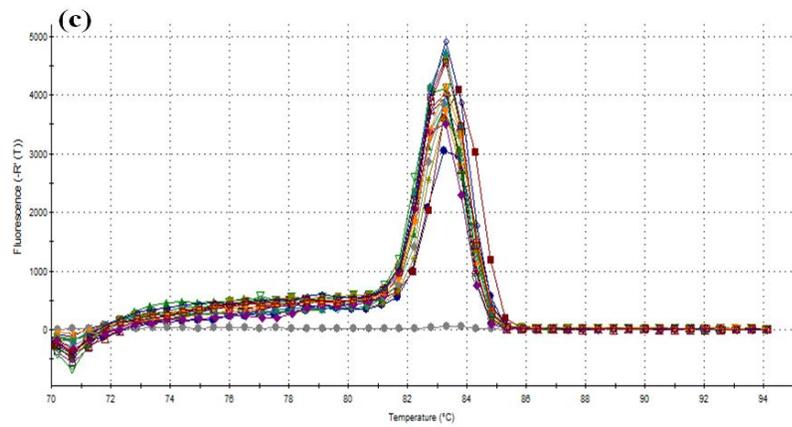
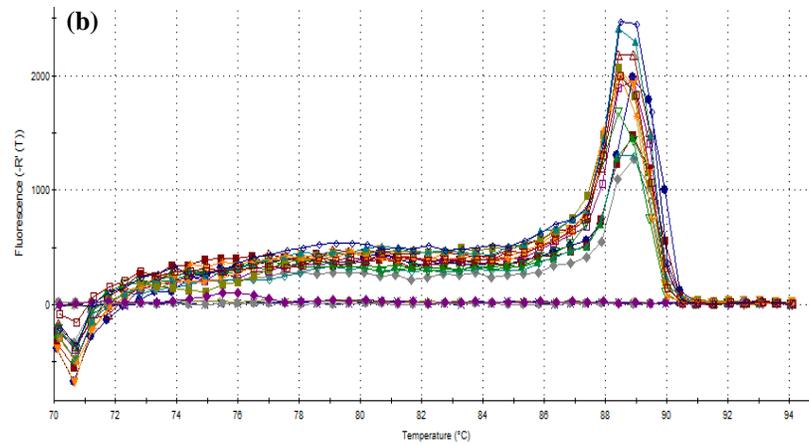
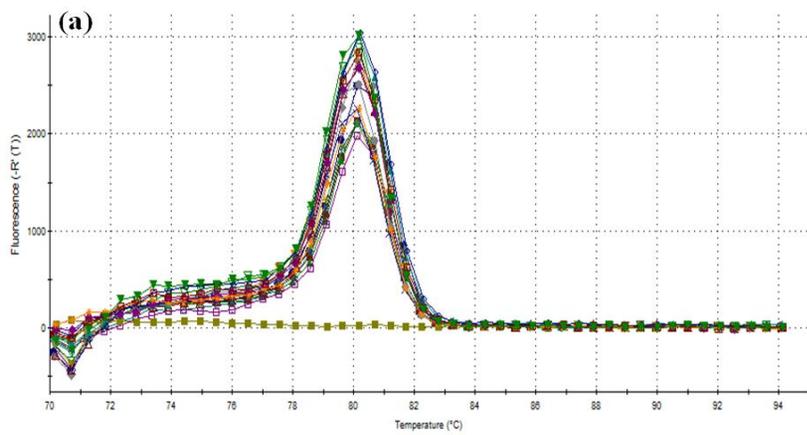
<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>	<b>Concentración en reacción</b>	<b>Volumen</b>
Brilliant® II SYBR green QPCR mix Agilent	2X	1X	10 µl
ROX	1 µM	100 nM	1 µl
Partidor 1	10 µM	300 mM	2µl
Partidor 2	10 µM	300 mM	2 µl
H <sub>2</sub> O bidestilada	---	---	1 µl
ADNc	---	---	4 µl
<b>Volumen total reacción</b>		<b>20 µl</b>	

## 6.2 Curvas de disociación y eficiencia

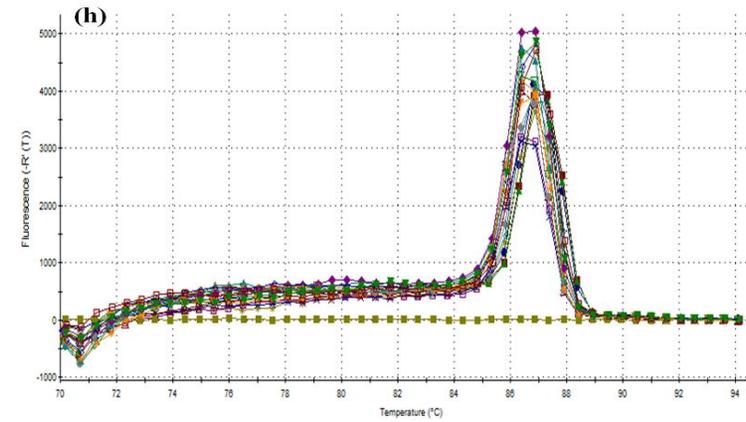
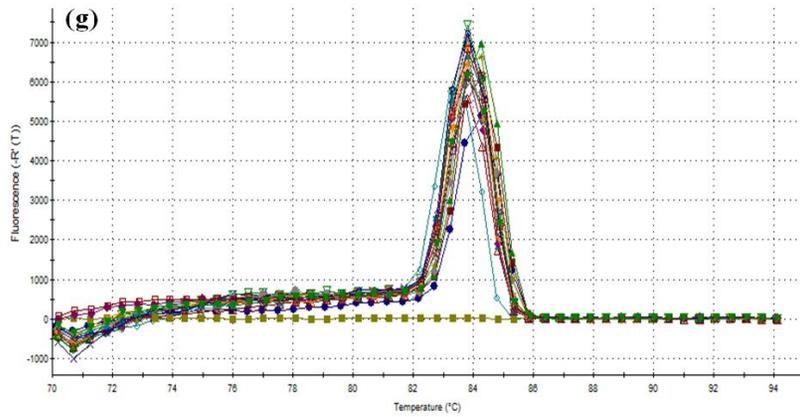
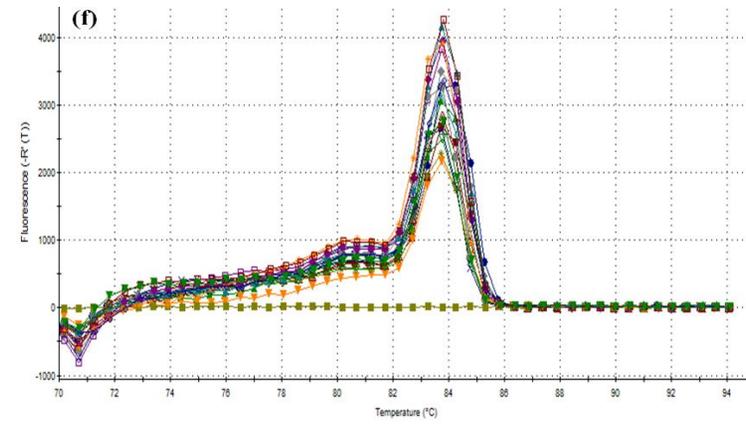
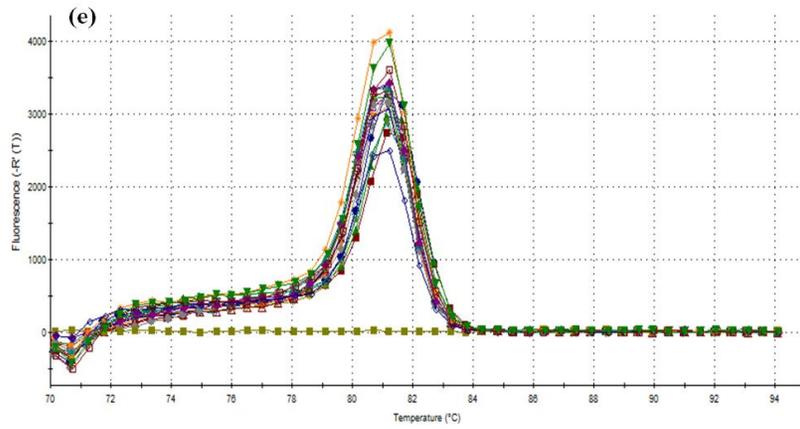
Se realizó un análisis inicial de la amplificación de los diez partidores mediante PCR en tiempo real, la cual evidenció la expresión de todos los genes en estudio en ovocitos inmaduros, ovocitos maduros y en embriones de 16-32 células, así como también en blastocistos generados por diferentes métodos de producción *in vitro*, pero con diferencias en la intensidad de la señal de fluorescencia. La especificidad de las amplificaciones se confirmó a través de la fluorescencia de las cinéticas de amplificación y las curvas de disociación obtenidas para cada gen, las cuales mostraron un sólo pico de temperatura homogénea (Figura 4a-b-c). Además, los productos de PCR fueron examinados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en los que se observa una sola banda con el tamaño de pares de bases esperados (Figura 5). Para todos los genes en estudio, las curvas de disociación derivadas de las diluciones seriadas de una mezcla de ADNc de embriones, mostraron un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) superior a 0,979 y eficiencias mayores del 88% derivadas de la fórmula de eficiencia de PCR =  $10^{1/pendiente} - 1$  calculadas por el programa de Mx3000P real-time PCR, como se muestra en el cuadro 6. Los partidores *HPRT1* y *PPIA* muestran una eficiencia superior al 100% como consecuencia del método de cálculo utilizado que corresponde a una sobreestimación de la eficiencia real (Bustin, 2004). Las eficiencias de la reacción de cada par de partidores se emplearon para transformar los valores Ct a valores lineales para su posterior análisis con los programas de determinación de la estabilidad de los genes de referencia candidatos, como se describe más adelante.

## 6.3 Controles negativos

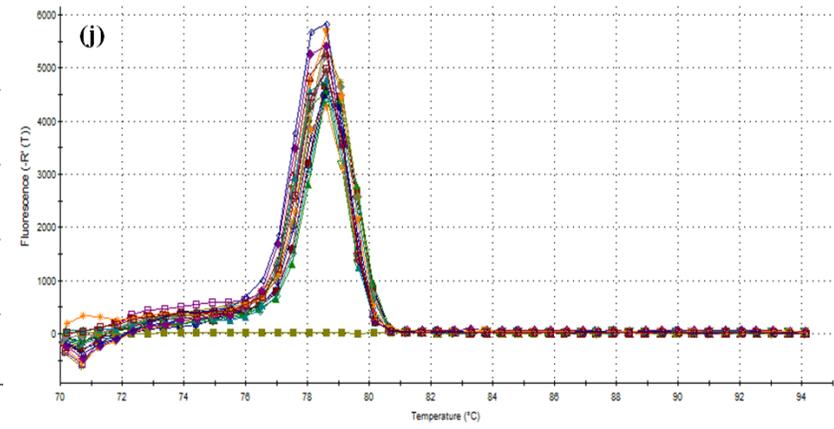
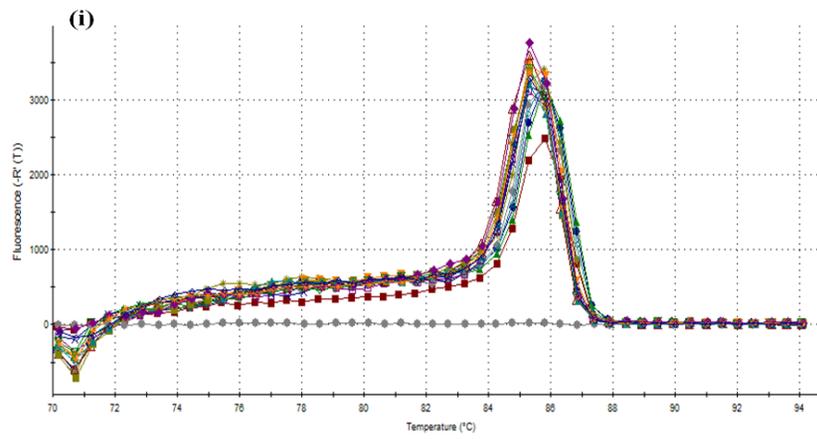
Los resultados obtenidos para los controles negativos se pueden observar en la figura 6a-b, en donde, tanto las curvas de amplificación como los geles de agarosa indican la ausencia de agentes contaminantes en cada uno de los pares de partidores en estudio. Este análisis nos permite proceder a realizar las reacciones de PCR en tiempo real para los tratamientos a evaluar.



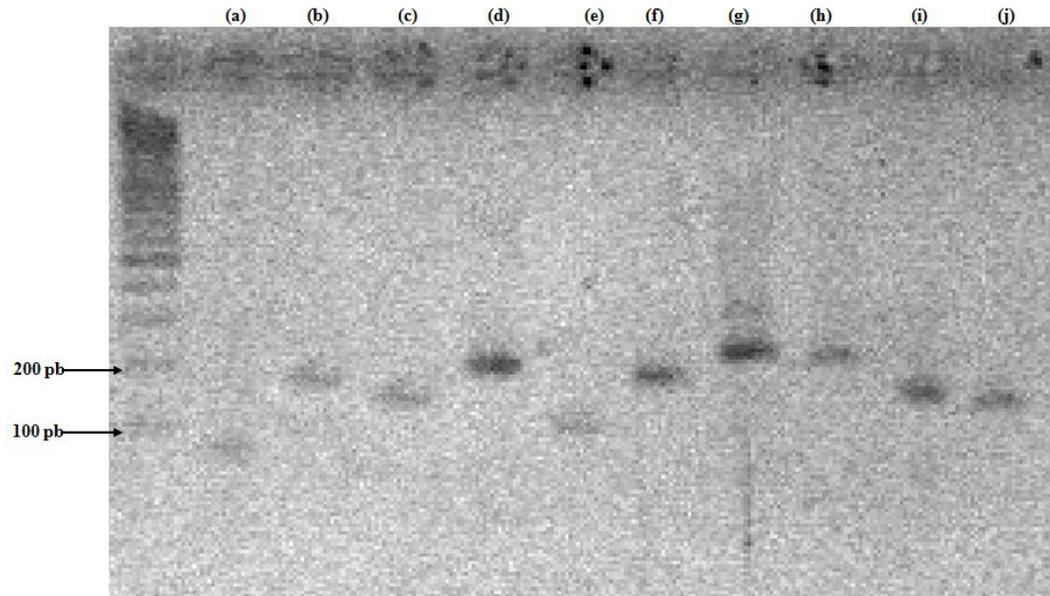
**Figura 4a.** Representación de las curvas de disociación del fragmento de amplificación de los genes *ACTB* (a), *eEF1A2* (b), *GAPDH* (c), *H2A* (d) respectivamente.



**Figura 4b.** Representación de las curvas de disociación del fragmento de amplificación de los genes *HMBS* (e), *HPRT1* (f), *PPIA* (g), *SDHA* (h) respectivamente.



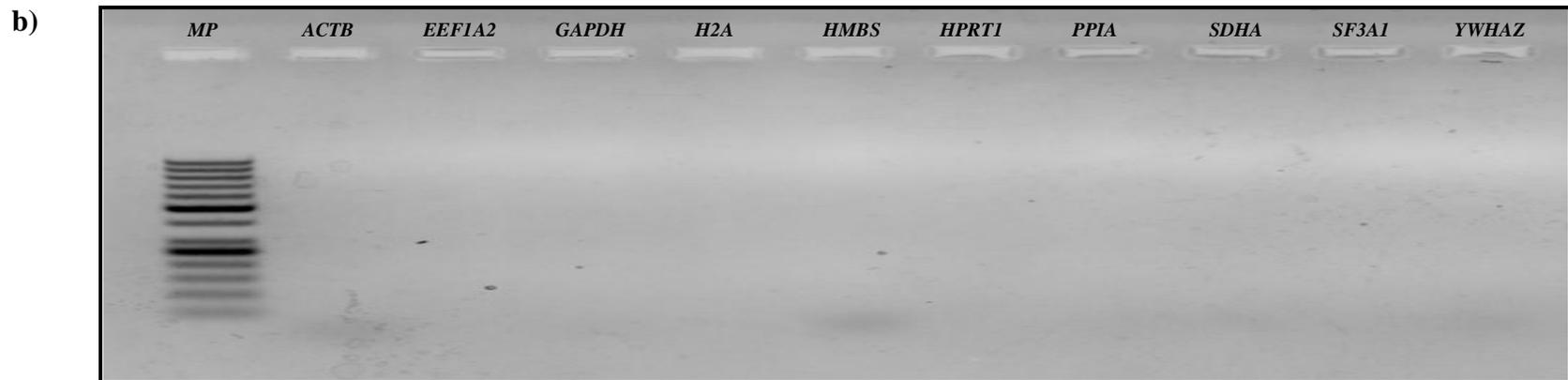
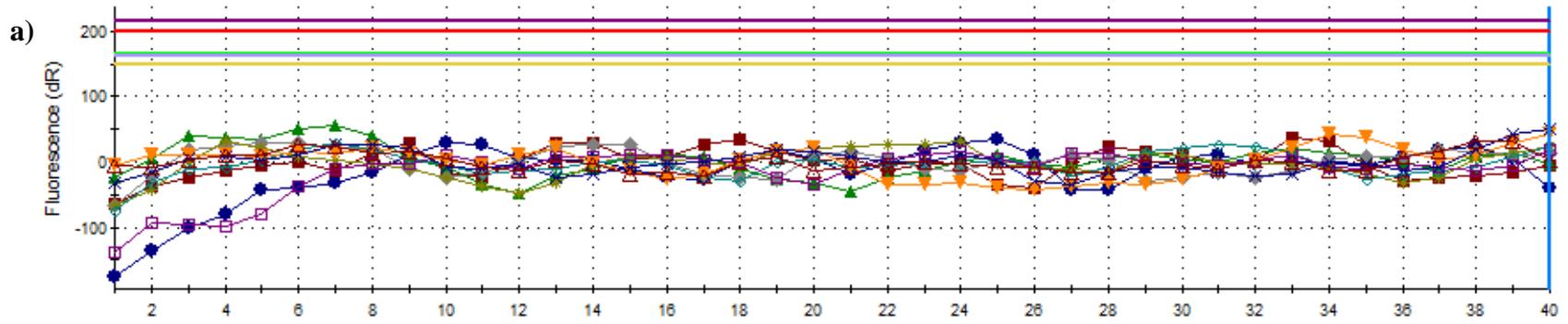
**Figura 4c.** Representación de las curvas de disociación del fragmento de amplificación de los genes *SF3A1* (i) e *YWHAZ* (j) respectivamente.



**Figura 5.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de los productos de la PCR en tiempo real de los genes *ACTB* (a) 87pb, *eEF1A2* (b) 196pb, *GAPDH* (c) 119pb, *H2A* (d) 176pb, *HMBS* (e) 80pb, *HPRT1* (f) 154pb, *PPIA* (g) 203pb, *SDHA* (h) 185pb, *SF3A1* (i) 125 pb e *YWHAZ* (j) 120pb, con sus respectivos tamaños moleculares.

**Cuadro 6.** Eficiencia de los partidores de los genes de referencia candidatos.

<b>Gen</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Eficiencia (%)</b>	<b>Ecuación</b>	<b>Pendiente</b>
<i>ACTB</i>	0,979	95,2	$Y = -3,443 * \text{Log}(x) + 1,08$	-3,443
<i>eEF1A2</i>	0,999	96,7	$Y = -3,403 * \text{Log}(x) + -1,01$	-3,403
<i>GAPDH</i>	1	89,9	$Y = -3,589 * \text{Log}(x) + -1,93$	-3,589
<i>H2A</i>	0,993	93,3	$Y = -3,493 * \text{Log}(x) + -1,07$	-3,493
<i>HMBS</i>	0,998	94,4	$Y = -3,464 * \text{Log}(x) + -1,49$	-3,464
<i>HPRT1</i>	0,999	101	$Y = -3,298 * \text{Log}(x) + -0,86$	-3,298
<i>PPIA</i>	0,998	107,9	$Y = -3,146 * \text{Log}(x) + - 2,03$	-3,146
<i>SDHA</i>	0,999	88,3	$Y = -3,639 * \text{Log}(x) + -2,25$	-3,639
<i>SF3A1</i>	1	95,1	$Y = -3,446 * \text{Log}(x) + -2,21$	-3,446
<i>YWHAZ</i>	1	89,3	$Y = -3,609 * \text{Log}(x) + -1,08$	-3,609



**Figura 6 (a-b).** Controles negativos de los genes *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ*, a) Curvas de amplificación por PCR en tiempo real. b) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio en donde se observa la ausencia de fragmentos.

## 6.4 Reacción de PCR en tiempo real

Una vez que el protocolo de PCR en tiempo real fue estandarizado se procedió a realizar las reacciones para cuantificar los transcritos de ARNm de cada uno de los genes de referencia candidatos en dos experimentos por separado.

En el primer experimento se amplificaron *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ*, en diferentes etapas las cuales se incluyeron a ovocito inmaduro, ovocito maduro y en embriones de 16-32 células generados por fecundación *in vitro*, en donde se evidenció una amplitud en la expresión génica basándose en los valores Ct obtenidos, que van desde los 23,40 hasta los 37,54. El gen *PPIA* obtuvo los valores Ct más altos en todas las etapas embrionarias estudiadas, es decir, mostró la mayor abundancia de transcripción, seguido de los genes *SF3A1* y *GAPDH*. Mientras que *H2A* fue el gen menos abundante en las etapas de ovocito inmaduro y maduro. En general, la expresión de casi todos los genes surgió en ovocito inmaduro y se mantuvo constante en todas las etapas estudiadas, exceptuando el gen *H2A* que muestra una baja expresión en la etapa inicial aumentado considerablemente en la etapa de 16-32 células (cuadro 7). Además se observa una escasa presencia de amplificación del gen *eEF1A2* en las tres etapas estudiadas, sugiriendo una baja expresión para ese gen. Por otra parte, en el segundo experimento se evaluó la expresión de los diez genes de referencia en estudio en blastocistos producidos por diferentes métodos de producción *in vitro*, en donde se incluyó la fecundación *in vitro*, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, la transferencia nuclear de células somáticas y la partenogénesis. Las amplificaciones obtenidas presentaron diferencias significativas en los valores Ct entre genes, en donde *PPIA*, *GAPDH*, *eEF1A2* y *SF3A1* mostraron la mayor abundancia de transcripción, mientras que *YWHAZ* fue el gen menos expresado, no obstante, la expresión para cada gen en particular se mostró relativamente constante independientemente del método de producción *in vitro* de origen (cuadro 8).

**Cuadro 7.** Valores Ct para cada gen de referencia candidato en las diferentes etapas analizadas: Ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células, respetivamente.

Gen	Ovocito inmaduro			Ovocito maduro			Embriones de 16-32 Células		
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3
<i>ACTB</i>	28,9	28,795	28,65	28,8725	28,86	28,885	30,445	28,91	29,94
<i>eEF1A2</i>	36,015	36,425	36,235	35,955	35,535	36,375	36,84	36,49	36,665
<i>GAPDH</i>	24,505	24,47	24,315	24,4775	24,535	24,42	29,18	28,345	29,44
<i>H2A</i>	37,54	37,13	37,145	37,1625	37,185	37,14	29,575	29,355	29,585
<i>HMBS</i>	29,38	28,51	29,285	29,3425	29,33	29,355	30,3	29,545	30,435
<i>HPRT1</i>	25,68	25,625	25,58	25,7425	25,715	25,77	28,495	28,07	28,605
<i>PPIA</i>	24,64	23,865	23,765	24,14	23,82	24,46	24,655	23,845	24,76
<i>SDHA</i>	27,855	27,305	27,345	27,495	27,49	27,5	29,245	28,57	29,36
<i>SF3A1</i>	23,695	23,49	23,4	23,625	23,645	23,605	27,63	27,52	27,745
<i>YWHAZ</i>	31,16	30,15	30,15	30,1725	30,17	30,175	33,145	32,99	33,425

\*Pool 1, Pool 2 y Pool 3: Promedio de las repeticiones técnicas para cada repetición biológica.

**Cuadro 8.** Valores Ct para cada gen de referencia candidato en los diferentes métodos de producción *in vitro* de embriones analizados: fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y partenogénesis (PA), respetivamente.

Gen	FIV			ICSI			TNCS			PA		
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3
<i>ACTB</i>	30,50	31,14	28,63	29,65	29,58	31,81	34,67	34,58	34,76	26,71	26,61	26,43
<i>eEF1A2</i>	29,89	30,66	30,77	29,65	30,49	29,45	30,20	30,11	29,55	28,72	29,47	30,49
<i>GAPDH</i>	29,60	31,17	28,98	29,72	29,94	29,82	29,28	28,11	30,45	29,55	27,68	29,85
<i>H2A</i>	33,71	34,38	31,49	32,89	33,30	33,76	31,48	31,52	31,43	31,44	30,66	34,77
<i>HMBS</i>	33,08	33,71	32,57	33,03	33,24	33,57	32,80	32,31	33,29	32,70	32,48	32,45
<i>HPRT1</i>	32,70	33,93	33,10	33,53	32,56	34,61	32,59	32,98	32,21	32,06	31,88	34,24
<i>PPIA</i>	28,55	31,01	27,88	28,32	27,96	27,75	26,33	26,05	26,60	28,27	26,19	28,39
<i>SDHA</i>	33,57	36,75	33,49	33,76	32,67	34,02	30,83	30,67	30,98	31,96	30,68	34,49
<i>SF3A1</i>	30,00	31,18	29,88	30,61	29,76	28,44	29,00	28,92	29,09	28,71	28,35	30,17
<i>YWHAZ</i>	37,37	39,13	38,25	36,90	34,91	35,42	34,88	35,38	34,39	31,52	32,88	34,08

\*Pool 1, Pool 2 y Pool 3: Promedio de las repeticiones técnicas para cada repetición biológica.

## 6.5 Análisis estadísticos

El análisis de varianza (ANOVA) de los valores Ct en las distintas etapas embrionarias indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre repeticiones biológicas y técnicas, mostrando valores de probabilidad ( $p$ ) mayores al nivel de significancia establecido de 0,05, por lo que se acepta la hipótesis nula. Sin embargo, se establecieron diferencias altamente significativas en la expresión de los diferentes genes de referencia y entre las etapas evaluadas, revelando valores  $p$  de 0,000 y 0,003 respectivamente, por lo que se rechaza la hipótesis nula, que señala la inexistencia de diferencias entre estas variables (Cuadro 9). Por otra parte, la ANOVA para los valores Ct en blastocistos producidos por diferentes métodos *in vitro* demostró la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas entre repeticiones biológicas y técnicas al obtener valores  $p$  de 0,736 y 0,5141 respectivamente, mientras que se establecieron diferencias entre los métodos de producción *in vitro* y los genes evaluados mostrando un valor  $p$  menor al nivel de significancia de 0,05 (Cuadro 10).

**Cuadro 9.** Análisis de varianza (ANOVA) de los valores Ct obtenidos en las diferentes etapas: ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Estadístico F	Valor $p$
<b>Gen</b>	2624,4400	9	291,6050	109,6600	0,0000
<b>Repetición biológica</b>	3,7841	2	1,8920	0,7100	0,4924
<b>Repetición técnica</b>	0,2074	1	0,2074	0,0800	0,7804
<b>Estadío</b>	45,8817	2	22,9409	8,6300	0,0003
<b>Residual</b>	438,7600	165	2,6592		
<b>Total</b>	3113,07	179			

\*Significancia de 0,05

**Cuadro 10.** Análisis de varianza (ANOVA) de los valores Ct obtenidos en blastocistos producidos por diferentes métodos *in vitro*: fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Estadístico F	Valor <i>p</i>
<b>Gen</b>	1191,36	9	132,373	58,81	0
<b>Repetición biológica</b>	1,5848	2	0,7924	0,35	0,7036
<b>Repetición técnica</b>	0,9613	1	0,9613	0,43	0,5141
<b>Método</b>	98,3249	3	32,775	14,56	0
<b>Residual</b>	504,178	224	2,2508		
<b>Total</b>	1796,4	239			

\*Significancia de 0,05

## 6.6 Transformación lineal de los valores Ct

Los valores Ct resultantes de las amplificaciones de los diez genes de referencia candidatos en las etapas de ovocito inmaduro, ovocito maduro y 16-32 células así como también en blastocistos producidos *in vitro* por fecundación *in vitro*, partenogénesis, inyección intracitoplasmática de espermatozoides y transferencia nuclear de células somáticas se transformaron a cantidades relativas (Q) mediante el método delta Ct (ecuación 18). Esta transformación puede apreciarse en los cuadros 11 y 12, respectivamente. Adicionalmente se transformaron los datos considerando en conjunto las técnicas de generación *in vitro* de embriones en estudio, dichos datos pueden observarse en el cuadro 13.

**Cuadro 11.** Valores de los datos linealizados por el método delta Ct en las etapas de ovocito inmaduro (O), ovocito maduro (MII) y embriones de 16-32 células (16-32C) para cada gen de referencia candidato.

	<b>O1</b>	<b>O2</b>	<b>O3</b>	<b>MI1</b>	<b>MI2</b>	<b>MI3</b>	<b>16-32C1</b>	<b>16-32C2</b>	<b>16-32C3</b>
<i>ACTB</i>	0,846	0,908	1	0,992	1	0,983	0,358	1	0,502
<i>eEF1A2</i>	1	0,758	0,862	0,753	1	0,567	0,789	1	0,888
<i>GAPDH</i>	0,885	0,905	1	0,964	0,929	1	0,585	1	0,495
<i>H2A</i>	0,763	1	0,990	0,985	0,971	1	0,865	1	0,859
<i>HMBS</i>	0,561	1	0,597	0,992	1	0,984	0,605	1	0,553
<i>HPRT1</i>	0,933	0,969	1	0,981	1	0,962	0,743	1	0,688
<i>PPIA</i>	0,527	0,929	1	0,791	1	0,626	0,553	1	0,512
<i>SDHA</i>	0,706	1	0,975	0,997	1	0,994	0,652	1	0,607
<i>SF3A1</i>	0,821	0,942	1	0,987	0,974	1	0,929	1	0,860
<i>YWHAZ</i>	0,525	1	1	0,998	1	0,997	0,906	1	0,758

**Cuadro 12.** Valores de los datos linealizados por el método delta Ct en las diferentes técnicas de producción *in vitro* de embriones, fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y partenogénesis (PA) para cada gen de referencia candidato.

	FIV1	FIV2	FIV3	ICSI1	ICSI2	ICSI3	TNCS1	TNCS2	TNCS3	PA1	PA2	PA3
<i>ACTB</i>	0,285	0,186	1	0,953	1	0,225	0,941	1	0,885	0,833	0,890	1
<i>eEF1A2</i>	1	0,592	0,551	0,872	0,495	1	0,646	0,686	1	1	0,602	0,301
<i>GAPDH</i>	0,669	0,244	1	1	0,869	0,937	0,472	1	0,223	0,301	1	0,248
<i>H2A</i>	0,231	0,149	1	1	0,762	0,564	0,973	0,947	1	0,596	1	0,067
<i>HMBS</i>	0,712	0,468	1	1	0,873	0,698	0,723	1	0,523	0,845	0,981	1
<i>HPRT1</i>	1	0,424	0,759	0,509	1	0,239	0,766	0,587	1	0,879	1	0,191
<i>PPIA</i>	0,614	0,101	1	0,657	0,857	1	0,818	1	0,669	0,218	1	0,199
<i>SDHA</i>	0,946	0,127	1	0,502	1	0,426	0,906	1	0,821	0,445	1	0,090
<i>SF3A1</i>	0,921	0,420	1	0,234	0,414	1	0,947	1	0,897	0,785	1	0,297
<i>YWHAZ</i>	1	0,325	0,570	0,279	1	0,719	0,730	0,533	1	1	0,421	0,195

**Cuadro 13.** Valores de los datos linealizados por el método delta Ct considerando en conjunto las diferentes técnicas de producción *in vitro* de embriones, fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y partenogénesis (PA) para cada gen de referencia candidato.

	<b>FIV1</b>	<b>FIV2</b>	<b>FIV3</b>	<b>ICSI1</b>	<b>ICSI2</b>	<b>ICSI3</b>	<b>TNCS1</b>	<b>TNCS2</b>	<b>TNCS3</b>	<b>PA1</b>	<b>PA2</b>	<b>PA3</b>
<b><i>ACTB</i></b>	0,285	0,186	1	0,504	0,529	0,119	0,018	0,019	0,016	0,833	0,890	1
<b><i>eEF1A2</i></b>	0,745	0,441	0,410	0,872	0,495	1	0,604	0,641	0,934	1	0,602	0,301
<b><i>GAPDH</i></b>	0,384	0,140	0,574	0,356	0,309	0,333	0,472	1	0,223	0,301	1	0,248
<b><i>H2A</i></b>	0,223	0,143	0,962	0,383	0,292	0,216	0,973	0,947	1	0,596	1	0,067
<b><i>HMBS</i></b>	0,601	0,395	0,844	0,620	0,541	0,432	0,723	1	0,523	0,772	0,896	0,913
<b><i>HPRT1</i></b>	0,710	0,301	0,539	0,400	0,785	0,187	0,766	0,587	1	0,879	1	0,191
<b><i>PPIA</i></b>	0,161	0,026	0,262	0,190	0,247	0,289	0,818	1	0,669	0,197	0,905	0,180
<b><i>SDHA</i></b>	0,159	0,021	0,168	0,142	0,283	0,120	0,906	1	0,821	0,443	0,996	0,089
<b><i>SF3A1</i></b>	0,352	0,161	0,382	0,234	0,414	1	0,686	0,725	0,650	0,785	1	0,297
<b><i>YWHAZ</i></b>	0,150	0,049	0,085	0,201	0,720	0,517	0,730	0,533	1	1	0,421	0,195

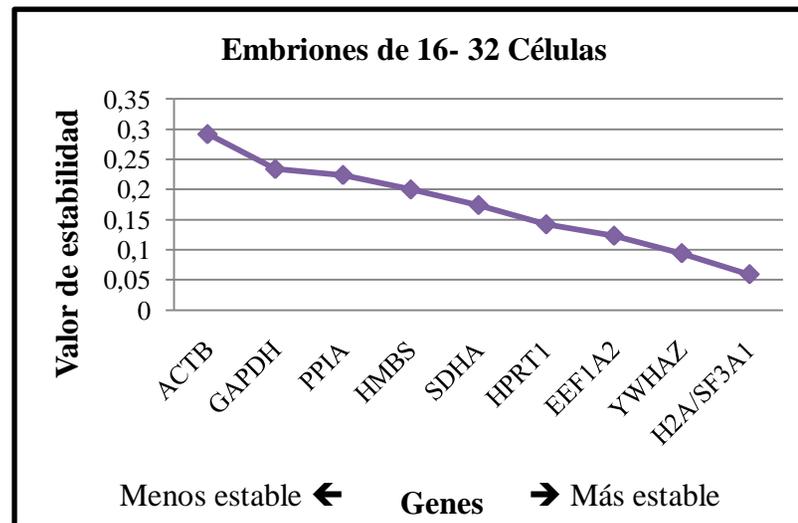
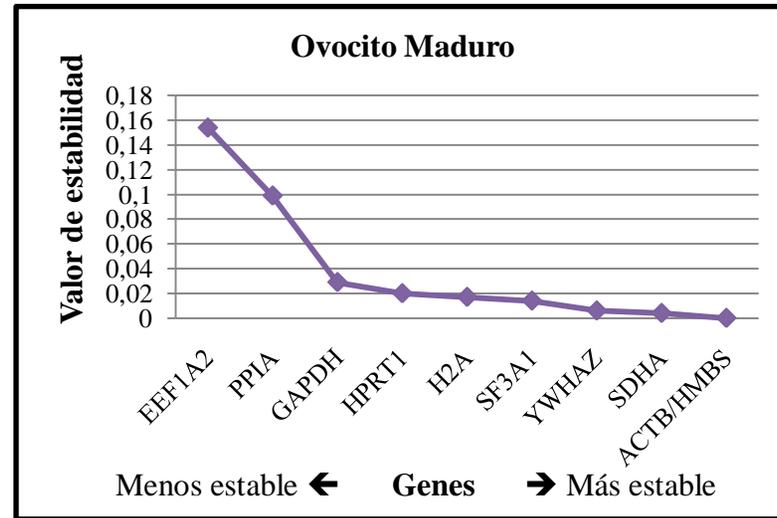
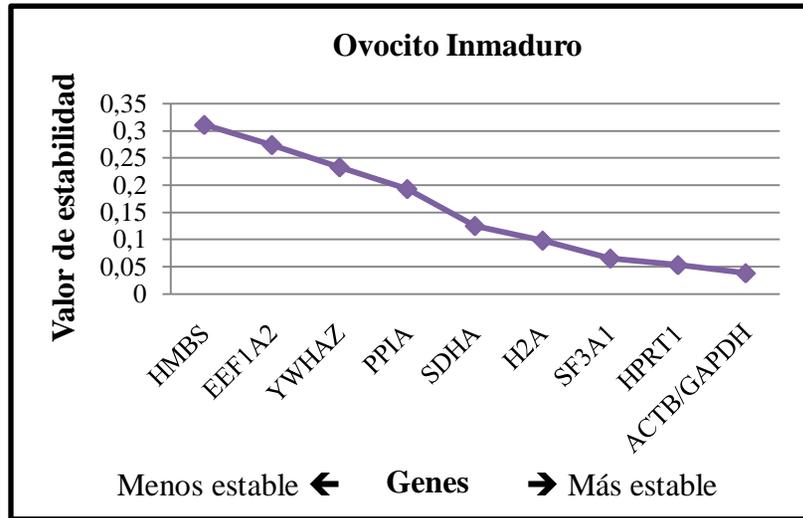
## 6.7 Determinación de genes de referencia

Para analizar la estabilidad e idoneidad de los genes de referencia candidatos *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ* para su uso como genes normalizadores en estudios de expresión génica en embriones bovinos producidos *in vitro* se analizaron los datos obtenidos de la transformación de los valores Ct mediante los programas geNorm (Vandensompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004).

**6.7.1 geNorm.** Los datos de la expresión no normalizada de los genes de *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ* obtenidos de la transformación lineal se pusieron a prueba para determinar la estabilidad de expresión mediante la comparación de dos parámetros; la etapa y el método de producción *in vitro* de embriones a través del programa geNorm, el cual se basa en la media geométrica de múltiples genes de referencia, así como en la variación entre parejas de un gen en particular con todos los otros candidatos en un determinado conjunto de muestras. El primer experimento fue diseñado para comparar la estabilidad de la expresión de dichos genes candidatos entre tres etapas diferentes, de este modo se compararon ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células. Estos resultados se presentan según el valor M obtenido por cada gen en el cuadro 14, donde se observa que en la etapa de ovocito inmaduro la mejor combinación fue para los genes *ACTB* y *GAPDH* con un valor M de 0,038, mientras que *HMBS* y *ACTB* fueron los genes con mayor estabilidad en ovocito maduro. En el caso del estadio 16-32 células los genes *H2A* y *SF3A1* mostraron el menor valor M 0,059, correspondiendo a los genes con mayor estabilidad en su expresión. Asimismo el gen *ACTB* se posicionó en los primeros lugares en ovocito inmaduro y maduro, mientras que *eEF1A2* se ubicó en los últimos lugares de la clasificación para estas etapas. Además, todos los genes de referencia estudiados mostraron bajos valores M de menos de 0,31, encontrándose muy por debajo del límite establecido por el programa geNorm (Vandensompele *et al.*, 2002), por lo tanto todos los genes de referencia tienen una estabilidad similar en las etapas estudiadas (Figura 7).

**Cuadro 14.** Clasificación generada por el programa geNorm de los genes de referencia candidatos en ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células, respectivamente.

Ovocito inmaduro		Ovocito maduro		Embriones de 16-32 células	
Gen	Valor	Gen	Valor	Gen	Valor
<i>GAPDH</i>	0,038	<i>HMBS</i>	0	<i>H2A</i>	0,059
<i>ACTB</i>	0,038	<i>ACTB</i>	0	<i>SF3A1</i>	0,059
<i>HPRT1</i>	0,053	<i>SDHA</i>	0,004	<i>YWHAZ</i>	0,094
<i>SF3A1</i>	0,065	<i>YWHAZ</i>	0,006	<i>eEF1A2</i>	0,123
<i>H2A</i>	0,098	<i>SF3A1</i>	0,014	<i>HPRT1</i>	0,142
<i>SDHA</i>	0,125	<i>H2A</i>	0,017	<i>SDHA</i>	0,174
<i>PPIA</i>	0,193	<i>HPRT1</i>	0,02	<i>HMBS</i>	0,2
<i>YWHAZ</i>	0,233	<i>GAPDH</i>	0,029	<i>PPIA</i>	0,224
<i>eEF1A2</i>	0,274	<i>PPIA</i>	0,099	<i>GAPDH</i>	0,234
<i>HMBS</i>	0,311	<i>eEF1A2</i>	0,154	<i>ACTB</i>	0,292
<b>Más estable <i>GAPDH-ACTB</i></b>		<b>Más estable <i>HMBS-ACTB</i></b>		<b>Más estable <i>H2A-SF3A1</i></b>	



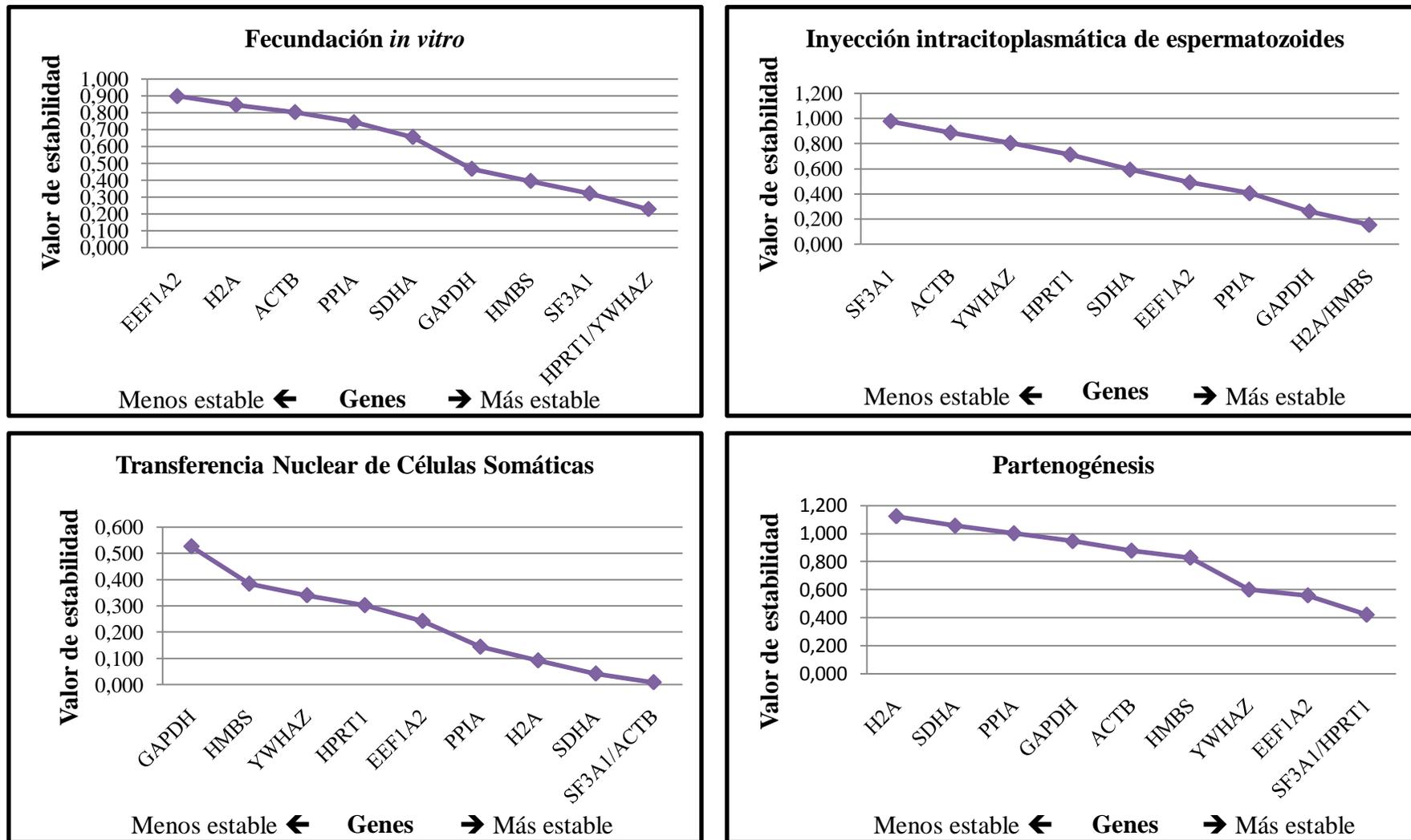
**Figura 7.** Gráficos de los valores de estabilidad de expresión (M) de los genes de referencia candidatos en las etapas de ovocito inmaduro, ovocito maduro y 16-32 células generado por el programa geNorm. Se observan los valores M de izquierda a derecha de los más altos a los más bajos, es decir, de los genes menos a más estables.

Por otra parte, se evaluó la estabilidad de la expresión de dichos genes en blastocistos producidos por diferentes métodos *in vitro*, en los que se incluyeron la fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis. Una exclusión gradual de los genes de referencia menos estables permitió establecer a *YWHAZ* y *HPRT1* como la pareja más estable para embriones producidos por fecundación *in vitro*, mientras que para embriones generados por el método de ICSI se establecieron a *HMBS* y *H2A* con un valor M de 0,155 como los genes de referencia más estables. En el caso de la técnica de TNCS los genes que mostraron un menor valor M fueron *ACTB* y *SF3A1* considerándose como la combinación más estable para esa condición, mientras que *HPRT1* y *SF3A1* fueron los genes de referencia candidatos más estables para blastocistos producidos por partenogénesis. De modo general se pueden observar los valores obtenidos para cada gen candidato en los diferentes métodos *in vitro* analizados en el cuadro 15. Por otra parte todos los genes de referencia analizados lograron estabilidades de expresión altas con valores M de menos de 1,1, valor que está por debajo del límite determinado por el programa de geNorm de 1,5 (Figura 8). Considerando lo anterior, se evaluó de manera conjunta la estabilidad de los genes candidatos en blastocistos generados por FIV, ICSI, TNCS y PA, en donde *GAPDH* y *HMBS* se ubicaron en los primeros lugares en la clasificación con un valor M de 0,59, mientras que *ACTB* mostró la menor estabilidad en éste análisis (Cuadro 16; Figura 9).

Adicionalmente este programa permitió calcular los factores de normalización para determinar el número de genes de referencia necesarios para una normalización precisa en cada una de las etapas estudiadas, así como también para blastocistos producidos por diferentes métodos *in vitro*. En el primer caso los resultados mostraron valores  $V_{2/3}$  de 0,019, 0,002 y 0,036 para ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células respectivamente (Figura 10a), valores inferiores al punto de corte de 0,15 establecido por Vandesomepele *et al.*, (2002). Del mismo modo, en blastocistos producidos por FIV, ICSI y TNCS evidenciaron valores  $V_{2/3}$  de 0,12, 0,10 y 0,02 respectivamente, mientras que para embriones generados por partenogénesis se obtuvo un valor  $V_{2/3}$  superior al punto de corte como se muestra en la figura 10b. En el caso, del análisis realizado con los métodos de producción *in vitro* de manera conjunta se obtuvieron valores de  $V_{2/3}$  de 0,251 (Figura 10c).

**Cuadro 15.** Clasificación generada por el programa geNorm de los genes de referencia candidatos en blastocistos producidos por fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y partenogénesis (PA) respectivamente.

FIV		ICSI		TNCS		PA	
Gen	Valor	Gen	Valor	Gen	Valor	Gen	Valor
<i>YWHAZ</i>	<b>0,229</b>	<i>HMBS</i>	<b>0,155</b>	<i>ACTB</i>	<b>0,009</b>	<i>HPRT1</i>	<b>0,421</b>
<i>HPRT1</i>	<b>0,229</b>	<i>H2A</i>	<b>0,155</b>	<i>SF3A1</i>	<b>0,009</b>	<i>SF3A1</i>	<b>0,421</b>
<i>SF3A1</i>	<b>0,322</b>	<i>GAPDH</i>	<b>0,261</b>	<i>SDHA</i>	<b>0,042</b>	<i>eEF1A2</i>	<b>0,559</b>
<i>HMBS</i>	0,396	<i>PPIA</i>	0,406	<i>H2A</i>	0,092	<i>YWHAZ</i>	0,6
<i>GAPDH</i>	0,468	<i>eEF1A2</i>	0,492	<i>PPIA</i>	0,144	<i>HMBS</i>	0,828
<i>SDHA</i>	0,657	<i>SDHA</i>	0,593	<i>eEF1A2</i>	0,242	<i>ACTB</i>	0,878
<i>PPIA</i>	0,745	<i>HPRT1</i>	0,713	<i>HPRT1</i>	0,302	<i>GAPDH</i>	0,946
<i>ACTB</i>	0,805	<i>YWHAZ</i>	0,805	<i>YWHAZ</i>	0,34	<i>PPIA</i>	1,002
<i>H2A</i>	0,848	<i>ACTB</i>	0,887	<i>HMBS</i>	0,384	<i>SDHA</i>	1,056
<i>eEF1A2</i>	0,9	<i>SF3A1</i>	0,978	<i>GAPDH</i>	0,526	<i>H2A</i>	1,124
<b>Más estable <i>YWHAZ-HPRT1</i></b>		<b>Más estable <i>HMBS-H2A</i></b>		<b>Más estable <i>ACTB-SF3A1</i></b>		<b>Más estable <i>HPRT1-SF3A1</i></b>	

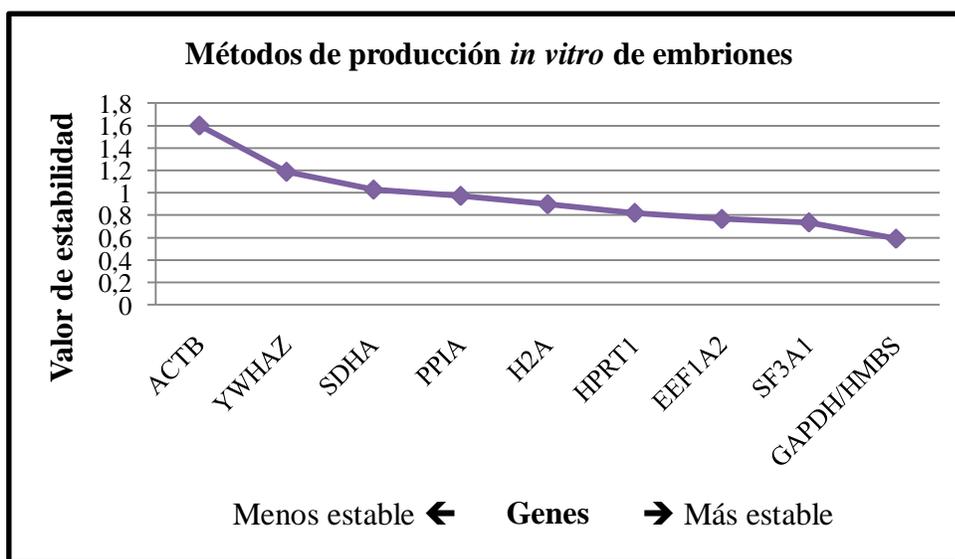


**Figura 8.** Gráficos de los valores M de estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos en blastocistos producidos por fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis respectivamente generado por el programa geNorm. Se observan los valores M de izquierda a derecha de los más altos a los más bajos, es decir, de los genes menos a los más estables.

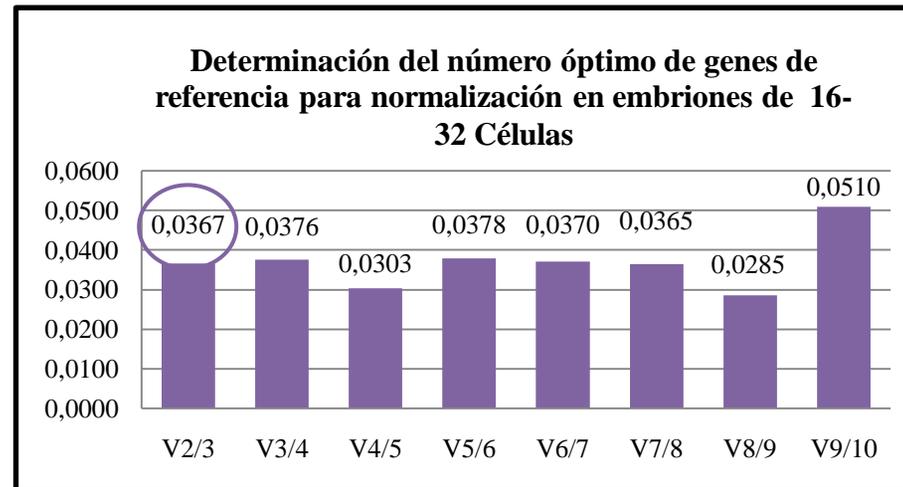
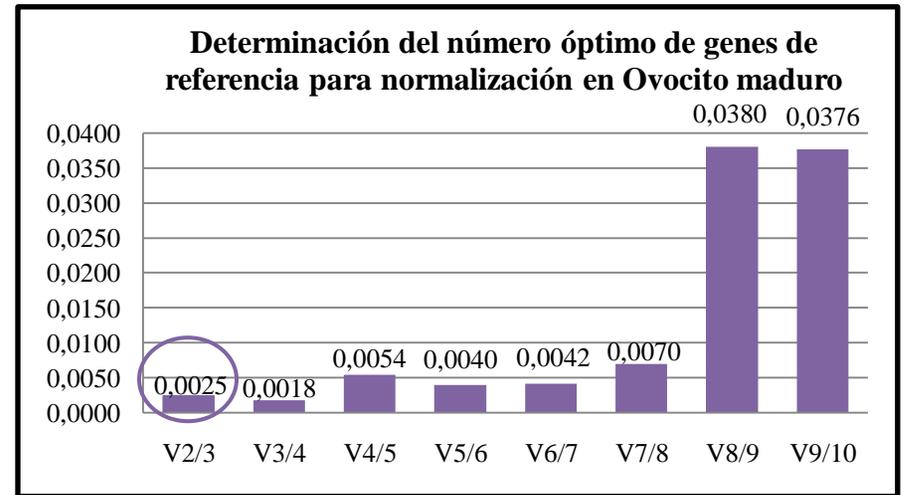
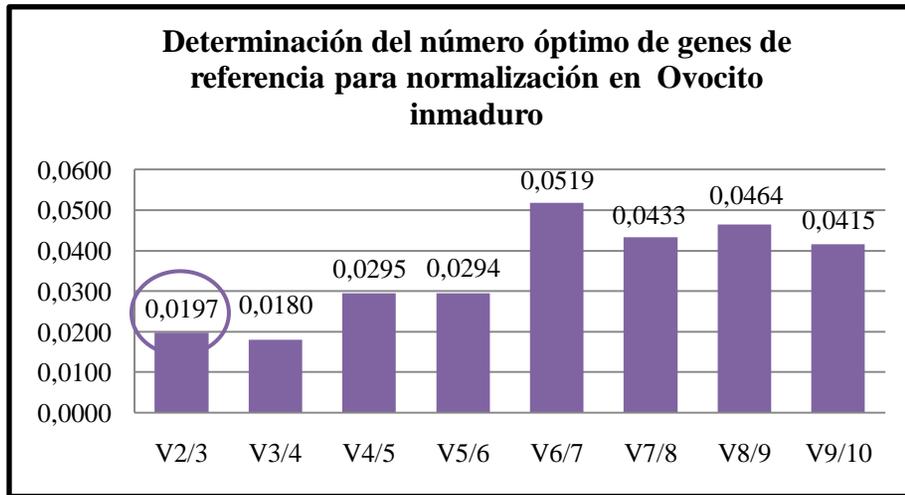
**Cuadro 16.** Clasificación de los genes de referencia candidatos evaluando de manera conjunta los métodos de producción *in vitro*: fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis generada por el programa geNorm.

<b>Métodos de producción <i>in vitro</i> de embriones</b>	
<b>Gen</b>	<b>Valor</b>
<i>GAPDH</i>	<b>0,590</b>
<i>HMBS</i>	<b>0,590</b>
<i>SF3A1</i>	<b>0,736</b>
<i>eEF1A2</i>	0,766
<i>HPRT1</i>	0,820
<i>H2A</i>	0,898
<i>PPIA</i>	0,973
<i>SDHA</i>	1,029
<i>YWHAZ</i>	1,188
<i>ACTB</i>	1,602

**Más estable *GAPDH-HMBS***

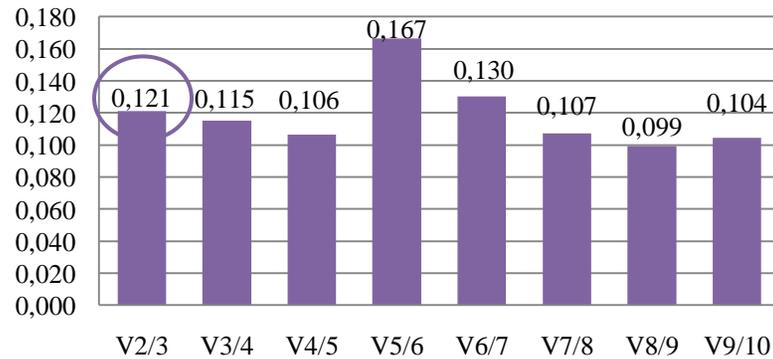


**Figura 9.** Gráfico de los valores de estabilidad de expresión obtenidos por geNorm para los genes de referencia candidatos evaluando de manera conjunta los métodos de producción *in vitro*: fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis.

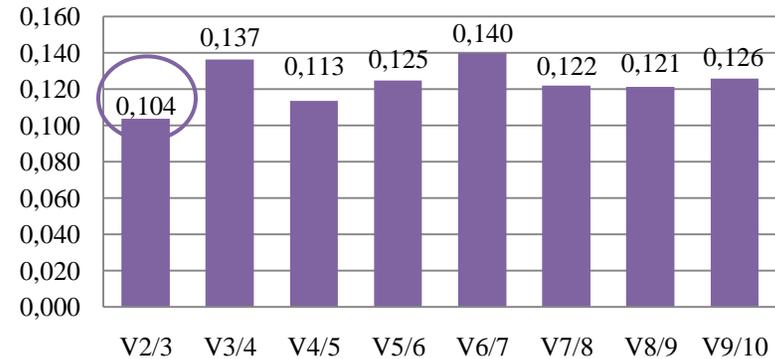


**Figura 10a.** Determinación del número óptimo de genes de referencia necesario para la normalización. Análisis de variación de a pares entre los factores de normalización, en las etapas de ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células respectivamente.

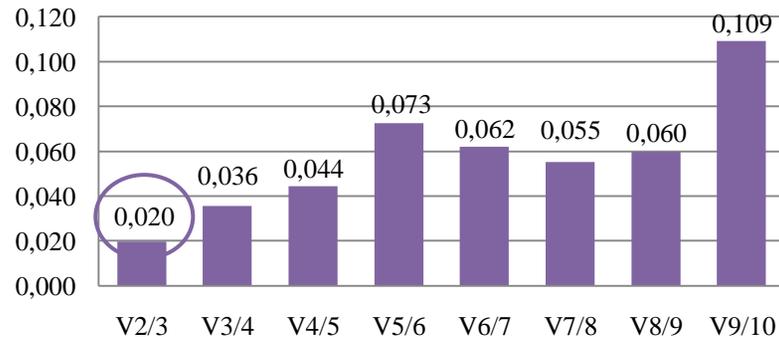
**Determinación del número óptimo de genes de referencia para normalización en Fecundación *in vitro***



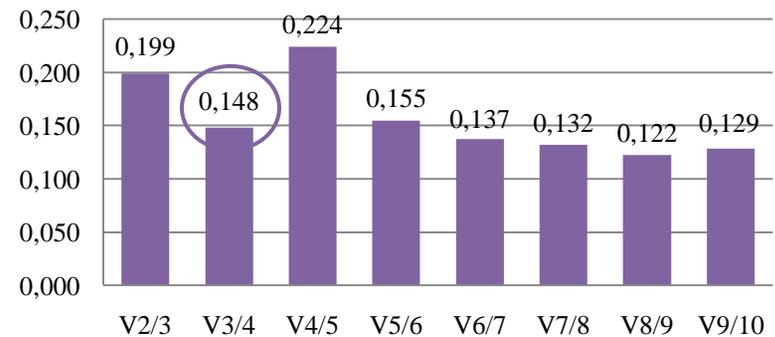
**Determinación del número óptimo de genes de referencia para normalización en Inyección intracitoplasmática de espermatozoides**



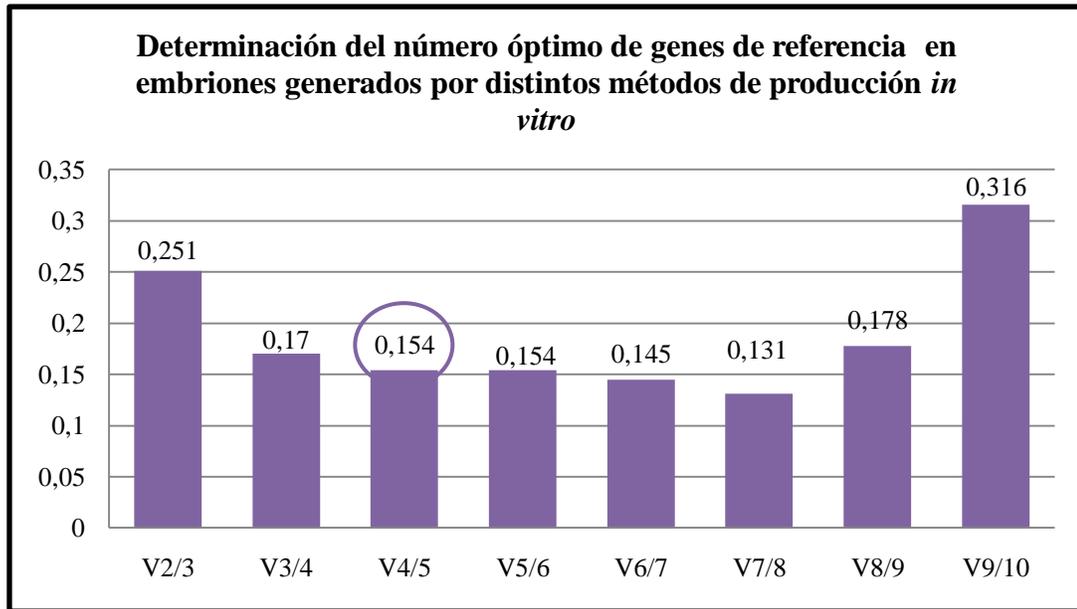
**Determinación del número óptimo de genes de referencia para normalización en Transferencia nuclear de células somáticas**



**Determinación del número óptimo de genes de referencia para normalización en Partenogénesis**



**Figura 10b.** Determinación del número óptimo de genes de referencia necesario para la normalización de datos en blastocistos producidos por fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis respectivamente.



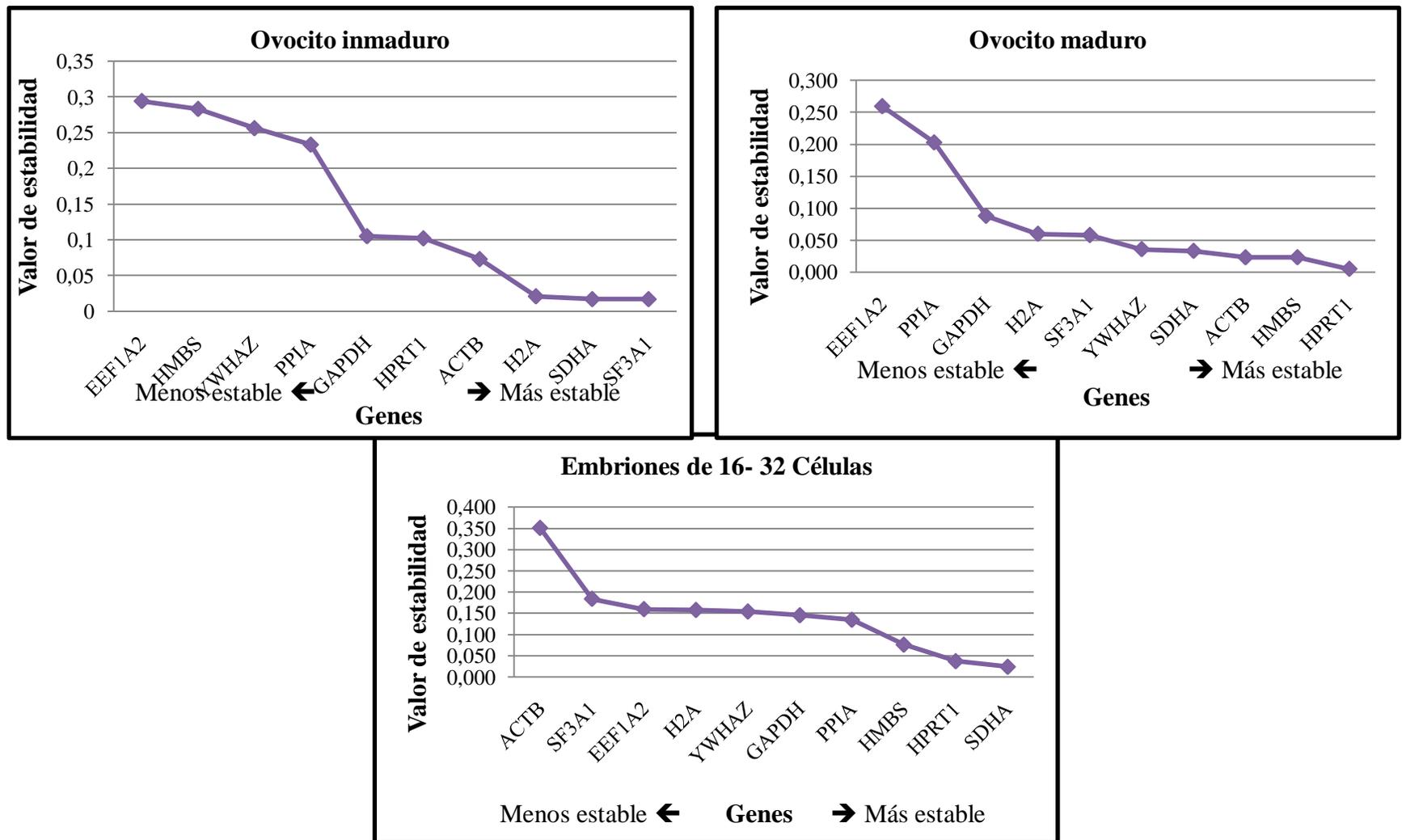
**Figura 10c.** Determinación del número óptimo de genes de referencia necesario para la normalización de datos en blastocistos generados mediante distintos métodos de producción *in vitro* de embriones.

**6.7.2. Análisis por NormFinder.** Este programa permite estimar las variaciones de la expresión general de los genes candidatos y la variación entre los subgrupos de las muestras. De acuerdo con el valor resultante de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos se realiza una clasificación de estos. En el primer experimento y según estos valores, los genes más estables para ovocito inmaduro corresponden a *SF3A1* y *SDHA* con un valor de estabilidad de 0,017. Mientras que en ovocito maduro *HPRT1* mostró el valor menor de 0,005 considerándose como el más estable en esa etapa en específico. En el caso de la etapa de 16-32 células se identificó a *SDHA* como el gen con mayor estabilidad en su expresión con un valor de 0,02, como se muestra en el cuadro 17. Del mismo modo, el gen *eEF1A2* se mantuvo entre los últimos lugares de la clasificación en todas las etapas embrionarias analizadas, evidenciando una baja estabilidad en su expresión en las etapas tempranas del desarrollo embrionario (Figura 11). Por otra parte, en el segundo experimento y como se observa en el cuadro 18 se evidenció un valor de estabilidad de 0,082 para el gen *SF3A1* en la expresión de blastocisto producidos por fecundación *in vitro*, mientras que el gen más estable para el método de inyección intracitoplasmática de espermatozoides correspondió a *HMBS*. En el caso del análisis utilizando embriones producidos por transferencia nuclear de células somáticas identificó a *ACTB* como el gen con expresión más constante para ser utilizado como referencia. El gen *SF3A1* mostró un valor de estabilidad 0,146 siendo el gen más estable para utilizarlo como gen normalizador en embriones generados por partenogénesis (Figura 12).

Adicionalmente a lo anterior, se evaluó la estabilidad de los diez genes de referencia candidatos considerando de manera conjunta los métodos de producción *in vitro* de fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis. Los resultados obtenidos se encuentran descritos en el cuadro 19, en donde se observa que el gen *SF3A1* fue el más estable para estas condiciones específicas, mostrando un valor de estabilidad de 0.316 (Figura 13).

**Cuadro 17.** Clasificación generada por el programa NormFinder de los genes de referencia candidatos en ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células, respectivamente.

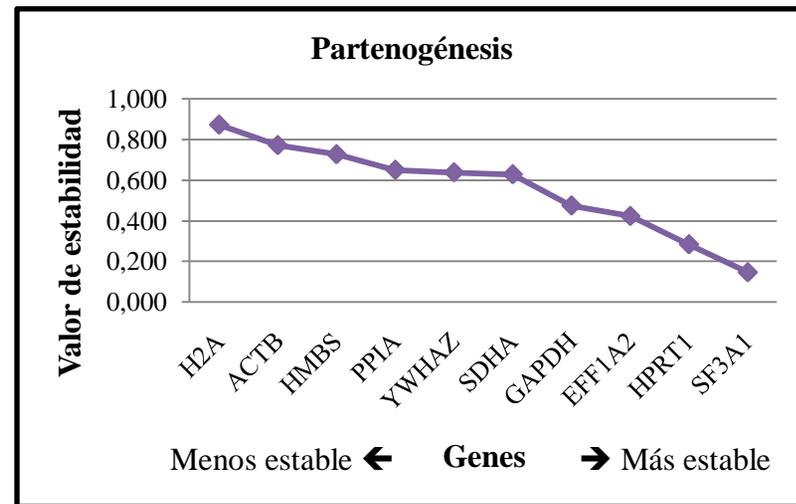
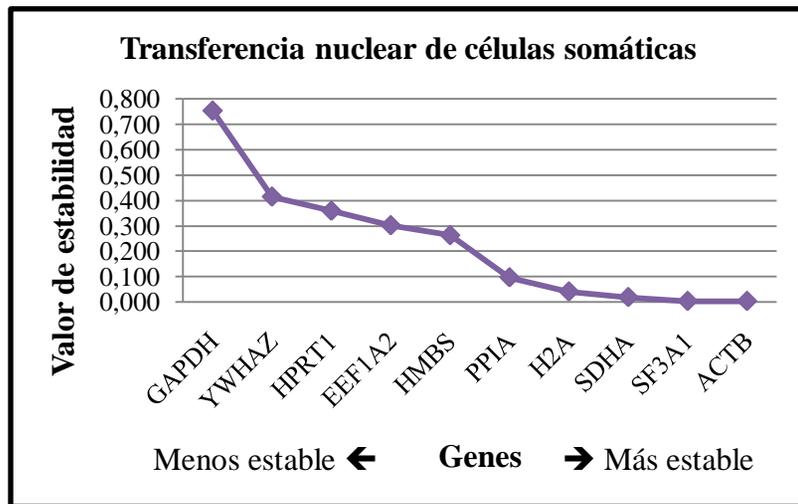
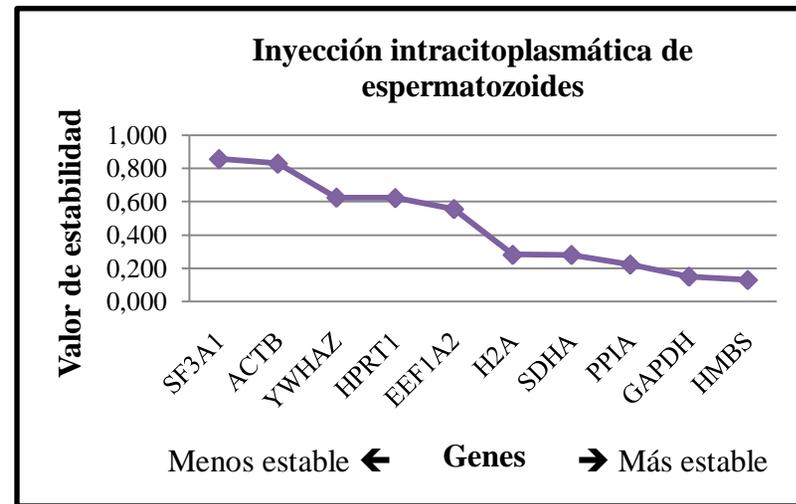
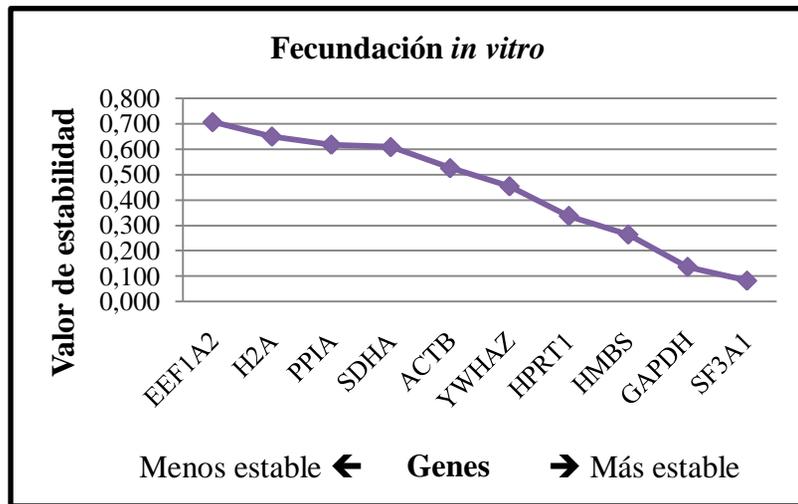
Ovocito inmaduro		Ovocito maduro		Embriones de 16-32 células	
Gen	Valor	Gen	Valor	Gen	Valor
<i>SF3A1</i>	<b>0,017</b>	<i>HPRT1</i>	<b>0,005</b>	<i>SDHA</i>	<b>0,024</b>
<i>SDHA</i>	<b>0,017</b>	<i>HMBS</i>	<b>0,023</b>	<i>HPRT1</i>	<b>0,037</b>
<i>H2A</i>	<b>0,021</b>	<i>ACTB</i>	<b>0,023</b>	<i>HMBS</i>	<b>0,076</b>
<i>ACTB</i>	0,073	<i>SDHA</i>	0,033	<i>PPIA</i>	0,134
<i>HPRT1</i>	0,102	<i>YWHAZ</i>	0,036	<i>GAPDH</i>	0,145
<i>GAPDH</i>	0,105	<i>SF3A1</i>	0,058	<i>YWHAZ</i>	0,154
<i>PPIA</i>	0,233	<i>H2A</i>	0,06	<i>H2A</i>	0,158
<i>YWHAZ</i>	0,256	<i>GAPDH</i>	0,088	<i>eEF1A2</i>	0,16
<i>HMBS</i>	0,283	<i>PPIA</i>	0,203	<i>SF3A1</i>	0,184
<i>eEF1A2</i>	0,294	<i>eEF1A2</i>	0,259	<i>ACTB</i>	0,351
<b>Más estable <i>SF3A1</i></b>		<b>Más estable <i>HPRT1</i></b>		<b>Más estable <i>SDHA</i></b>	



**Figura 11.** Gráficos de los valores promedio de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos obtenidos por NormFinder en ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células respectivamente. Partiendo por los valores más altos (izquierda) a los más bajos (derecha), es decir de menos a más estable.

**Cuadro 18.** Clasificación generada por el programa NormFinder de los genes de referencia candidatos en fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y partenogénesis (PA) respectivamente.

FIV		ICSI		TNCS		PA	
Gen	Valor	Gen	Valor	Gen	Valor	Gen	Valor
<i>SF3A1</i>	<b>0,082</b>	<i>HMBS</i>	<b>0,131</b>	<i>ACTB</i>	<b>0,003</b>	<i>SF3A1</i>	<b>0,146</b>
<i>GAPDH</i>	<b>0,137</b>	<i>GAPDH</i>	<b>0,151</b>	<i>SF3A1</i>	<b>0,003</b>	<i>HPRT1</i>	<b>0,284</b>
<i>HMBS</i>	<b>0,264</b>	<i>PPIA</i>	<b>0,223</b>	<i>SDHA</i>	<b>0,019</b>	<i>eEF1A2</i>	<b>0,423</b>
<i>HPRT1</i>	0,338	<i>SDHA</i>	0,281	<i>H2A</i>	0,041	<i>GAPDH</i>	0,475
<i>YWHAZ</i>	0,455	<i>H2A</i>	0,282	<i>PPIA</i>	0,097	<i>SDHA</i>	0,629
<i>ACTB</i>	0,526	<i>eEF1A2</i>	0,557	<i>HMBS</i>	0,263	<i>YWHAZ</i>	0,638
<i>SDHA</i>	0,609	<i>HPRT1</i>	0,623	<i>eEF1A2</i>	0,302	<i>PPIA</i>	0,65
<i>PPIA</i>	0,619	<i>YWHAZ</i>	0,625	<i>HPRT1</i>	0,359	<i>HMBS</i>	0,727
<i>H2A</i>	0,651	<i>ACTB</i>	0,829	<i>YWHAZ</i>	0,415	<i>ACTB</i>	0,772
<i>eEF1A2</i>	0,708	<i>SF3A1</i>	0,857	<i>GAPDH</i>	0,754	<i>H2A</i>	0,873
<b>Más estable <i>SF3A1</i></b>		<b>Más estable <i>HMBS</i></b>		<b>Más estable <i>ACTB</i></b>		<b>Más estable <i>SF3A1</i></b>	

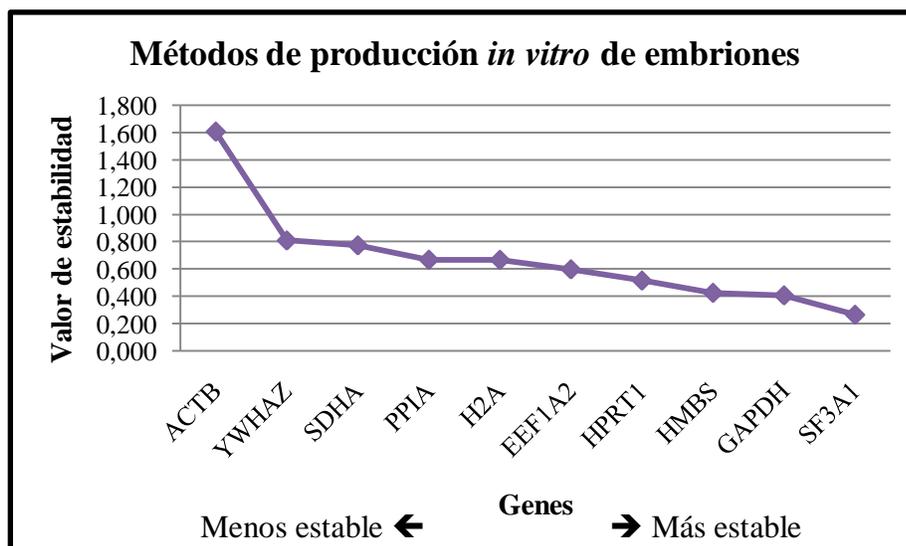


**Figura 12.** Gráficos de los valores promedio de la estabilidad de expresión de los genes de referencia candidatos generados por NormFinder, partiendo por los valores más altos (izquierda) a los más bajos (derecha) en blastocistos producidos por fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis respectivamente.

**Cuadro 19.** Clasificación de los genes de referencia candidatos evaluando de manera conjunta los métodos de producción *in vitro*: fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides y transferencia nuclear de células somáticas generada por el programa NormFinder.

<b>Métodos de producción <i>in vitro</i> de embriones</b>	
Gen	Valor
<i>SF3A1</i>	<b>0,265</b>
<i>GAPDH</i>	<b>0,407</b>
<i>HMBS</i>	<b>0,426</b>
<i>HPRT1</i>	0,516
<i>eEF1A2</i>	0,598
<i>H2A</i>	0,668
<i>PPIA</i>	0,668
<i>SDHA</i>	0,774
<i>YWHAZ</i>	0,810
<i>ACTB</i>	1,608

**Más estable *SF3A1***



**Figura 13.** Gráfico de los valores de estabilidad de expresión obtenidos por NormFinder para los genes de referencia candidatos evaluando de manera conjunta los métodos de producción *in vitro*: fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides y transferencia nuclear de células somáticas.

## 7. DISCUSIÓN

El uso de genes de referencia para la normalización es un método comúnmente utilizado en la mayoría de los experimentos de análisis de expresión génica (Schmittgen y Zakrajsek, 2000) y se sugiere su validación para cada condición experimental (Bustin, 2002; Goossens *et al.*, 2005; Huggett *et al.*, 2005; Morse *et al.*, 2005), debido a que el uso de un gen de referencia inadecuado, puede conducir a la normalización errónea de los datos de PCR en tiempo real y, por tanto, una malinterpretación del significado biológico de los resultados obtenidos (Bas *et al.*, 2004; Haller *et al.*, 2004). En mamíferos se ha tratado de identificar los genes de referencia más adecuados para el análisis de expresión en ovocitos y embriones preimplantacionales, demostrando que los genes más utilizados para validar los datos de expresión varían durante el desarrollo temprano del embrión (Robert *et al.*, 2002; Goossens *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2005; Bettegowda *et al.*, 2006; Kuijk *et al.*, 2007; Mamo *et al.*, 2007; Vigneault *et al.*, 2007).

Considerando que la identificación de genes de referencia se ve aún más dificultada en muestras de embriones, debido al menor tamaño y a que el número de células se encuentran en constante cambio, es que en esta tesis se implementó un protocolo optimizado para la extracción de ARN a partir de muestras biológicas con bajo nivel de expresión, y se incorporó métodos de control adecuados para el análisis de expresión génica, lo cual permitió generar resultados confiables para su uso en RT-PCR en tiempo real. En particular, el método de extracción de ARN ha sido recomendado previamente por Goossens *et al.*, (2005) y Ross *et al.*, (2010), quienes concuerdan con la efectividad de las columnas de sílice, en desmedro de otros métodos de extracción particularmente para estudios en embriones bovinos producidos *in vitro*. Por otra parte, se debe destacar la importancia de la calidad de los embriones producidos *in vitro* para ser usados como muestras en los análisis de la expresión génica, considerando que el uso de embriones incompetentes causa diferencias en los niveles de expresión, influyendo directamente en la selección del gen de referencia (Donnison y Pfeffer, 2004; Fair *et al.*, 2004; Gardner y Lane, 2005), razón por la cual en nuestro estudio sólo se incluyeron grupos (n= 30 y n=5) de ovocitos y

embriones con buenas características morfológicas con el fin de reducir al mínimo la influencia de este factor en la expresión de los genes de referencia evaluados.

El sistema de detección de la fluorescencia utilizado para la reacción de PCR en tiempo real (SYBR Green) resultó eficiente para la amplificación y análisis de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos, mostrando curvas de disociación confiables y reproducibles, equivalentes a otros estudios (Goosens *et al.*, 2005; Kuijk *et al.*, 2007; Mamo *et al.*, 2007; Smits *et al.*, 2009) utilizando muestras de embriones de bovinos, porcinos, murinos y equinos, respectivamente. Así mismo, el coeficiente de correlación y la eficiencia de la PCR fueron utilizados como control de calidad, para excluir posibles muestras contaminadas, con el fin de reducir la variabilidad del ensayo así como también el sesgo (Cikos *et al.*, 2007; Ruijter *et al.*, 2009).

Recientemente, dos grupos (Gossens *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2010) publicaron el hallazgo de los genes de referencia más adecuados para ovocitos y embriones de bovinos en la fase de preimplantación. A pesar de las valiosas contribuciones de Gossens *et al.*, (2005) en la evaluación de los efectos del aislamiento de ARN y selección de genes de referencia, sus conclusiones en relación a esto último se vio limitada por el número de genes que incluyó en la comparación, las etapas de desarrollo embrionario y los métodos de producción *in vitro* de embriones, siendo imprescindible tener en cuenta más opciones para llegar a recomendaciones significativas. Por otra parte, se ha utilizado ampliamente PCR en tiempo real para analizar la expresión génica de embriones generados por métodos *in vitro*, sin embargo, su validación no se ha informado en muchas de estas técnicas. Nuestros resultados indican que los genes de referencia más utilizados en estos análisis pueden tener fluctuaciones significativas en la estabilidad de expresión no sólo cuando son analizados en las distintas etapas de maduración del ovocito y desarrollo embrionario, sino también cuando los embriones son generados por distintos métodos de producción *in vitro*. Si bien, los resultados obtenidos mediante geNorm (Vandensompele *et al.*, 2002) y NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) son bastantes similares, no son idénticos, lo que concuerda con lo informado en estudios realizados previamente en diferentes tejidos y especies

(Pfaffl *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2009; Hurtado del Pozo *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2010; Martínez-Beamonte *et al.*, 2011). Dichas discrepancias han sido atribuidas principalmente a los diferentes modelos matemáticos que cada programa utiliza para el cálculo de las estabildades (Andersen *et al.*, 2004). Por una parte, geNorm se basa en la evaluación de la variación promedio de a pares en donde secuencialmente se excluye a los genes con valores M más altos, terminando con la combinación que tiene el mayor grado de similitud del perfil de expresión, en contraste, NormFinder se basa en un modelo de aproximaciones en donde todos los genes de referencia candidato son evaluados individualmente por su variación inter e intragrupal. Así mismo, los genes de referencia posicionados en los últimos lugares de la clasificación son los mismos tanto para geNorm y NormFinder (Feng *et al.*, 2010), lo que coincide con lo obtenido en nuestro estudio (Anexo 5, 6 y 7), a excepción del estudio en la etapa de embriones de 16-32 células y blastocistos producidos por partenogénesis, en donde se evidenciaron las mayores diferencias entre la clasificación realizada por dichos programas. Teniendo en consideración que los resultados generados por NormFinder pueden ser afectados por ligeras diferencias en la cantidad inicial de templado, se prefirieron los resultados de geNorm por sobre los de NormFinder, a pesar de su menor sensibilidad a los genes expresados diferencialmente.

Un resultado interesante fue el encontrado con el gen *GAPDH*, que está presente en un gran número de estados fisiológicos, considerándose comúnmente como un gen de referencia inestable. Sin embargo, en contraste con lo anterior, en este estudio *GAPDH* se estableció como el mejor candidato para la etapa de ovocito inmaduro, concordando con lo obtenido por Gossens *et al.*, (2005) y Kuijk *et al.*, (2007), sin perjuicio de que este último no lo recomendó como un buen gen de referencia. Del mismo modo, *ACTB* mostró una alta estabilidad en ovocitos inmaduros y ovocitos maduros posicionándose en los primeros lugares de la clasificación por geNorm, contrariamente a lo reportado por Gossens *et al.*, (2005), en donde se identificó como el gen menos estable en embriones en fase de preimplantación. Cabe señalar además que los análisis de estabilidad fueron realizados de manera conjunta para todos los estadios, mientras que en nuestro estudio se evaluaron individualmente. Lo anterior concuerda con lo reportado por Wassarman, (1983); Bachvarova, (1985) y Paynton *et al.*, (1988), en donde evidenciaron una disminución de la cantidad de ARNm de *ACTB* en etapas posteriores a la fecundación, mientras

que en ovocitos presentaba una activa transcripción de dicho gen. Dicho mecanismo puede ser explicado tomando como base el proceso de maduración meiótica, durante el cual se produce la traducción de las proteínas por el ARNm materno presente en el ovocito y sólo a partir de la segunda división en el ratón y/o a partir de las 8-16 células en el bovino, dicho proceso está dirigido por el ARN del embrión (Flach *et al.*, 1982). Además, señalan la importancia de *ACTB* en una amplia gama de procesos celulares en la embriogénesis temprana, tales como la migración celular, la división celular y la regulación de la expresión. Por otra parte, en nuestro estudio se reveló una expresión estable del gen *SDHA* en el estadio de ovocito maduro, mientras que *YWHAZ* se mostró estable en ovocito maduro y embriones de 16-32 células.

A pesar que *H2A* ha sido considerado como un buen gen de referencia en el desarrollo preimplantacional en la especie bovina y murina, debido a sus niveles constantes de ARNm (Robert *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2005; Mamo *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2010), en nuestro estudio se evidenció una baja expresión de este gen en ovocitos inmaduros y ovocitos maduros, mostrando un incremento en etapas embrionarias posteriores, específicamente en embriones de 16-32 células y blastocisto, lo que sugiere la existencia de cambios en la estructura de la cromatina y la reprogramación nuclear en estos estadios, considerando que *H2A* es una de las cinco principales histonas que están involucradas en la estructura de la cromatina (Bernstein *et al.*, 2006). Kuijk *et al.*, (2007) concuerda con nuestros resultados, al encontrar una expresión inconsistente de *H2A* en las primeras etapas de desarrollo embrionario en la especie porcina. Por otra parte, el gen *eEF1A2* mostró una baja estabilidad en las primeras etapas del desarrollo embrionario, revelando un aumento progresivo a lo largo de las distintas etapas evaluadas, lo que podría deberse a su rol como factor en el proceso de traducción, considerando que el genoma del embrión bovino está transcripcionalmente inactivo durante las primeras divisiones celulares hasta alcanzar la etapa de 8 a 16 células (Memili *et al.*, 1998). Por lo tanto, durante el crecimiento de los ovocitos, el ARN materno asegura la síntesis de proteínas (Bachvarova, 1992; Sirard *et al.*, 2005). Adicionalmente a lo anterior, Kanka *et al.*, (2009) evidenció en su estudio que los niveles de ARNm de los factores de iniciación eIF4E y eIF4A2 son reducidos significativamente en las etapas de ovocito maduro y en embriones de 4 células, considerando que no existe síntesis de ARNm nuevo. Asimismo, *SF3A1* se mantuvo con expresión constante en todas las etapas del

ovocito y embrionarias analizadas, ubicándose en las primeras posiciones de la clasificación por geNorm, lo que podría explicarse por su activa participación en el empalme del ARNm, considerando que el procesamiento de pre-ARNm representa un importante mecanismo para modificar el contenido celular de proteínas durante el desarrollo embrionario temprano. Es importante tomar en cuenta que los valores M obtenidos en la clasificación realizada por geNorm no superan los 0,3, lo que se encuentra muy por debajo de 1,5 propuesto como límite por Vandensompele *et al.*, (2002), demostrando la alta estabilidad de todos los genes de referencia candidatos analizados.

El análisis de expresión de los genes de referencia candidatos en blastocistos generados por diferentes métodos de producción *in vitro* de embriones, permitió observar diferencias significativas entre las distintas técnicas, concordando con lo propuesto por diversos autores, los que señalan que las condiciones diferenciales del cultivo *in vitro* afecta los patrones de expresión génica de mamíferos durante la embriogénesis (Niemann y Wrenzycki, 2000; Wrenzycki *et al.*, 2001; Lazzari *et al.*, 2002; Rizo *et al.*, 2002, Rinaudo y Schultz, 2004). En este estudio, se pudo establecer que *YWHAZ* y *HPRT1* son los genes más estables en blastocistos producidos por fecundación *in vitro*. No obstante, a pesar de la estabilidad observada para el gen *YWHAZ*, no recomendamos su uso como gen de referencia, debido a los bajos niveles de transcripción encontrados en embriones generados por dicha técnica. En blastocistos producidos por transferencia nuclear de células somáticas, la mejor combinación de genes correspondió a *ACTB* y *SF3A1*. Estos resultados contrastan con lo descrito recientemente por Ross *et al.*, (2010), quienes observaron una alta estabilidad en la expresión de los genes *PPIA* y *H2A* en embriones generados por estas técnicas. Sin embargo, estos autores no incluyeron los genes *YWHAZ*, *HPRT1* y *SF3A1* en su evaluación. Sin perjuicio de lo anterior y a pesar que el gen *PPIA* no se posicionó en los primeros lugares de la clasificación por geNorm, mostró los niveles de transcripción más abundantes en contraste con los otros genes candidatos del estudio en todos los métodos *in vitro* evaluados, evidenciando una alta expresión de este gen en embriones preimplantacionales bovinos.

Por otra parte, es interesante destacar que la estabilidad de *ACTB* en embriones clonados observado por Ross *et al.*, (2010) también se observó en este estudio, lo que podría explicarse por una ineficiencia del proceso de la transferencia nuclear de células somáticas atribuible a una reprogramación epigenética incompleta o anormal en las primeras etapas embrionarias, reflejando diferencias en la transcripción (Cibelli, 2007). Resultados similares fueron observados por Smits *et al.*, (2009) en blastocistos equinos generados *in vitro* e *in vivo*, recomendando estos autores la utilización de *ACTB* como gen normalizador para estudios de expresión en embriones de dicha especie (Smits *et al.*, 2009). Sin embargo, en la especie murina, *ACTB* era uno de los genes menos estables del grupo de genes analizados por estos autores, mientras que los genes más estables correspondieron a *HPRT1*, *H2A* y *PPIA* (Mamo *et al.*, 2007).

En embriones generados por partenogénesis se encontró que los genes más estables eran *HPRT1* y *SF3A1*, mientras que en embriones generados por la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides se determinó a los genes *HMBS* y *H2A* como la mejor combinación para ser usados como genes normalizadores. Adicionalmente, se pudo observar en la clasificación realizada por geNorm, valores M que no superan los 1,1 en embriones generados por partenogénesis y 0,90, 0,97 y 0,52 para embriones generados por fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides y transferencia nuclear de células somáticas, respectivamente, encontrándose por debajo del valor límite de 1,5 propuesto por el autor del programa, lo cual señalaría una buena estabilidad de los genes de referencia candidatos evaluados en este estudio. Considerando lo anterior, es importante destacar que los valores más altos de variabilidad (valores M) se encontraron en blastocistos producidos por partenogénesis, resultado que podría explicarse al considerar que dicha técnica genera embriones con una asimetría epigenética producto de una reproducción uniparental que causa una expresión no equivalente de los genes y, por ende, impide el desarrollo de los embriones a largo plazo (Brevini y Gandolfi, 2008). Esto permite concluir que la impronta génica de ambos parentales es indispensable para originar un embrión normal y viable.

En otro orden de ideas, parece necesario señalar que se observó un incremento considerable de la expresión del gen *eEF1A2* en la etapa de blastocisto generados por los

diferentes métodos evaluados, siendo posible presumir la activación del genoma del embrión, considerando su importante rol en el proceso de empalme del ARNm en la traducción. De la misma manera, el gen *SF3A1* mostró una expresión constante en los diferentes métodos de producción de embriones *in vitro*, posicionándose en los primeros lugares de la clasificación realizada por geNorm, exceptuando en inyección intracitoplasmática de espermatozoide en donde se ubicó en la última posición. Junto con lo anterior, es importante destacar que este gen no había sido examinado con anterioridad en muestras de embriones, por lo que esto constituye un importante hallazgo. Del mismo modo, sería interesante comprobar la reproducibilidad de la estabilidad del gen *SF3A1* en embriones de diferentes especies, puesto que existe la posibilidad que estos resultados tengan una aplicación más amplia, si tomamos en cuenta que los genes de referencia son independientes de las especies (Brinkhof *et al.*, 2006).

Los resultados de la evaluación de la estabilidad conjunta de los métodos de producción *in vitro* de embriones (ICSI, FIV, TNCS y PA), permitió identificar en dicho análisis a *GAPDH* y *HMBS* como la combinación más estable de genes de referencia para ser utilizada como genes normalizadores en estudios de expresión génica en embriones producidos *in vitro*, específicamente en la etapa de blastocisto (día 7), seguido del gen *SF3A1*. Del mismo modo, *ACTB* mostró los valores M más altos (1,6), valores que están muy por encima de lo obtenido por *GAPDH* y *HMBS*, por lo que para nuestras condiciones experimentales se concluye que no es un gen de referencia adecuado cuando se quiere realizar estudios de expresión en embriones generados por distintos métodos. Nuestros resultados concuerdan con Goosens *et al.*, (2005), quienes establecieron que *GAPDH* era el gen más estable en embriones preimplantacionales bovinos, mientras que *ACTB* fue considerado como un gen de referencia con expresión inestable. Así mismo, Bower *et al.*, (2007) también reportaron una expresión inestable del gen *ACTB* en un experimento de microarreglos al comparar su expresión en blastocistos generados por transferencia nuclear de células somáticas y fecundación *in vitro* (Bower *et al.*, 2007). No obstante, se observaron diferencias considerables con respecto a los genes *SDHA* e *YWHAZ*, ya que en nuestros resultados, estos genes se posicionaron en los últimos lugares de la clasificación dada por el programa geNorm, en contraste con el estudio antes señalado.

El uso de un único gen de referencia para normalizar datos de expresión génica no es suficiente para dicho análisis (Thellin *et al.*, 1999; Goidin *et al.*, 2001; Vandensompele *et al.*, 2002; Tricarico *et al.*, 2002; Dheda *et al.*, 2004; Jemiolo y Trappe, 2004; Huggett *et al.*, 2005), demostrándose previamente que el uso de dos a cuatro genes mejora la precisión de la cuantificación asegurando una interpretación más adecuada del significado biológico de los resultados obtenidos (Vandensompele *et al.*, 2002; Brinkhof *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2007). En tal sentido, los datos generados en este estudio permitieron establecer el número óptimo de genes de referencia necesarios para realizar una adecuada normalización de los datos de RT-PCR en tiempo real para estudios de expresión génica en embriones bovinos generados *in vitro*. Para estudios de expresión génica en diferentes etapas del desarrollo embrionario, cada una de las etapas mostró valores inferiores al punto de corte de 0,15, indicando que tres genes de referencia son suficientes para una normalización confiable de los datos (Vandensompele *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2008; Silver *et al.*, 2008). Asimismo, para estudios de expresión génica en blastocistos producidos por diferentes métodos, se estableció que es necesario considerar tres genes de referencia, exceptuando el caso de blastocistos producidos por partenogénesis, en donde cuatro genes de referencia son requeridos para una normalización precisa de los datos, ya que el valor de  $V_{2/3}$  se encontró por encima del valor de corte 0,15. Por otra parte, al considerar los métodos *in vitro* de embriones de manera conjunta se observa un valor  $V_{4/5}$  de 0,15 indicando que cinco genes de referencia son necesarios para los análisis de expresión génica en blastocistos.

## 8. CONCLUSIONES

Se optimizó e implementó un método de extracción de ARN libre de ADN genómico, así como también un diseño experimental de PCR en tiempo real preciso para la selección de los genes de referencia más adecuados para análisis de expresión en distintas etapas del desarrollo embrionaria temprana y maduración del ovocito en bovinos producidos *in vitro*.

Los genes de referencia candidatos *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ*, revelaron una alta estabilidad de expresión en las diferentes etapas del desarrollo embrionario y en los diferentes métodos de producción *in vitro* de embriones evaluados.

Se sugiere el uso de la media geométrica de *GAPDH*, *ACTB* y *HPRT1* para ovocitos inmaduros, *HMBS*, *ACTB* y *SDHA* para ovocitos maduros y *SF3A1*, *H2A* e *YWHAZ* para embriones de 16-32 células, mientras que para blastocistos producidos por diferentes métodos *in vitro* a *GAPDH*, *HMBS* y *SF3A1*. Sin perjuicio de lo anterior, debido al encarecimiento que significa el uso de tres genes de referencia en varias muestras, se recomienda el empleo de al menos 2 genes de referencia para dicho análisis.

Finalmente, se confirmó que los genes de referencia evaluados son muy específicos para cada situación experimental en particular, por lo que se requiere una evaluación y validación precisa de estos genes al momento de emprender un estudio de expresión génica en embriones bovinos.

## 9. RESUMEN

La PCR en tiempo real es una técnica sensible y eficiente para la estimación cuantitativa de los niveles de transcripción de los genes específicos de interés expresados en muestras que contienen pequeñas cantidades de ARNm, como es el caso de ovocitos y embriones en etapas tempranas del desarrollo embrionario. No obstante, el nivel de expresión de estos genes puede variar entre tejidos y/o células no sólo como resultado de la expresión diferencial, sino también, debido a diferentes factores, tal como la elección de genes de referencia para normalizar la expresión de los genes de interés, por lo que la selección de estos genes es fundamental para un estudio preciso de la expresión génica.

En esta tesis, se evaluó mediante la técnica de PCR en tiempo real, la estabilidad diferentes genes de referencia *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* e *YWHAZ*, en distintas etapas; las que incluyeron a ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16- 32 células, así como también en blastocistos generados por fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis, para su validación como genes normalizadores para estudios de expresión génica en embriones bovinos. Los datos fueron analizados mediante geNorm y NormFinder en donde se observaron diferencias entre los niveles de transcripción de los genes candidatos en las diferentes etapas del ovocito y embrionarias, y en los embriones generados por los distintos métodos de producción *in vitro* evaluados. De acuerdo a los resultados de estos análisis, se estableció que en blastocistos producidos *in vitro* los genes más estables son *HMBS*, *GAPDH* y *SF3A1*, por lo que se recomienda su uso como genes de referencia en análisis de expresión génica en embriones bovinos. Así mismo, se sugiere el uso de la media geométrica de los tres genes más estables como un factor de normalización más preciso para minimizar las variaciones experimentales.

**Palabras claves:** PCR en tiempo real, normalización, genes de referencia, expresión génica desarrollo embrionario temprano, geNorm, NormFinder.

## 10. SUMMARY

Real time RT-PCR is a sensitive and efficient technique for quantitative estimation of gene transcription levels, particularly useful in samples which contain minimal quantities of RNAm, as it is the case for oocytes and embryos on early stages of development. Nevertheless, the level of expression may vary between tissues and/or cells, not only as the result of the differential expression, but also due to different factors, including the adequate selection of reference genes in order to normalise the gene expression data. Therefore, the selection of these genes is fundamental for a precise analysis of the gene expression data.

In this study, a number of reference genes including *ACTB*, *eEF1A2*, *GAPDH*, *H2A*, *HMBS*, *HPRT1*, *PPIA*, *SDHA*, *SF3A1* and *YWHAZ*, widely used to normalise gene expression data in different stages of early bovine embryo development, were evaluated through the technique Real time RT-PCR, in order to assess their stability. Immature oocytes, mature oocytes and 16- 32 cell embryos, as well as blastocysts produced by *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis were used for this analysis. The data was analyzed by geNorm and NormFinder, which showed differences between the transcription levels of the candidates genes in the different embryonic stages and in the embryos generated by the different techniques. Based on the results of this study, it was found that in blastocysts produced *in vitro* the more stable genes are *HMBS*, *GAPDH* and *SF3A1*, and therefore these genes should be used to analyze gene expression data in bovine embryos. We also suggest the use of a geometric average of three of the most stable genes as a more precise normalizing factor in order to minimize experimental variations.

**Keywords:** real time PCR, normalization, reference genes, gene expression, early embryonic development, geNorm, NormFinder.

## 11. LITERATURA CITADA

**Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M.** (2001). A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19DNA, *Journal of Virological Methods*, 92: 183–191.

**Ahmadi A, Ng S, Liow S.** (1995) Intracytoplasmic sperm injection of mouse oocytes with 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  at different intervals. *Human Reproduction*, 10: 431-435.

**Andersen C, Jensen J, Ørntoft T** (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64: 5245-5250.

**Arias M, Sánchez R, Felmer R.** (2011). Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced in vitro. *Zygote*, 24:1-9.

**Bachvarova R.** (1985). Gene expression during oogenesis and oocyte development in the mammal. In *Developmental Biology. A Comprehensive Synthesis*, vol. 1. Oogenesis (ed. L. W. Browder), pp. 453-524.

**Bachvarova, R.** (1992). A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell* 69: 895–897

**Bär M, Bär D, Lehmann B** (2009). Selection and validation of candidate housekeeping genes studies of human keratinocytes—review and recommendation. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(3): 770-773.

**Barros C, Leal.** (1982). In vitro fertilization and its use to study gametes interactions, in vitro fertilization and embryo transfer. *International Medical Publishers*. pp. 37-49.

**Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom M.** (2004). Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59:566-573.

**Becker A, Reith A, Napiwotzki J, Kadebach B.** (1996). A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Analytical Biochemistry*, 237: 204-207.

**Bernstein B, Mikkelsen T, Xie X, Kamal M, Huebert D, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K.** (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125:315-326.

- Bettegowda A, Patel O, Ireland JJ, Smith GW** (2006). Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, Phosphoglycerokinase,  $\beta$ -glucuronidase, glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase,  $\beta$ -actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. *Molecular, Reproduction and Development*, 73: 267-278.
- Bhatia, P, Taylor, W.R, Greenberg A.H, Wright J.A.** (1994). Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Analytical Biochemistry*, 216: 223- 226.
- Bionaz M, Loor JJ** (2007). Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiological Genomics*, 29: 312-319.
- Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard J, Viegas-Pequignot E.** (2001). Delayed and incomplete reprogramming of chromosomemethylation patterns in bovine cloned embryos. *Current Biology*, 11:1542–1546
- Bower N, Moser R, Hill J, Lehnert1 S.** (2007). Universal reference method for real-time PCR gene expression analysis of preimplantation embryos. *BioTechniques*, 42:199-206
- Brevini T, Gandolfi F.**(2008). Parthenotes as a source of embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, 41: 20-30
- Briggs R, King T.** (1952). Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38:455–463
- Brinkhof B, Spee B, Rothuizen J, Penning L.** (2006). Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Analytical Biochemistry*, 356:36-43.
- Bustin S.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25:169-193
- Bustin S.** (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29: 23-39.
- Bustin S, Nolan T** (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse- transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*, 15: 155-166.
- Campbell K, Fisher P, Chen W, Choi I, Kelly R, Lee J, Xhu J.** (2007). Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology*, 685: S214– S231.
- Campbell K, McWhir J, Ritchie W, Wilmut I.** (1995). Production of live lambs following transfer of cultured embryonic disc cells. *Theriogenology*, 43:181.

- Capecchi M.** (2000). How close are we to implementing gene targeting in animals other than the mouse? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 956-957.
- Chang T, Juan C, Yin P, Chi C, Tsay H.** (1998). Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep.*, 5: 469-471
- Cibelli J, Cunniff K, Vrana K.** (2006). Embryonic stem cells from parthenotes. *Methods in Enzymology* 418 117–135.
- Cibelli J.** (2007). Developmental biology. A decade of cloning mystique. *Science*, 316: 990–992.
- Cikos S, Bukovska A, Koppel J,** (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8: 113
- Clegg R** (1992). Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymology*, 211: 353–388
- Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Pinto C, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke R.** (1998) Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 18, 736-740.
- Collins M, Zayati C, Detmer J, Daly B, Kolberg J, Cha T, Irvine B, Tucker J, Urdea M.** (1995). Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. *Analytical Biochemistry*, 226: 120.
- Daniels R, Hall V, Trounson A.O.** (2000) Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biology of Reproduction*, 63: 1034-1040
- De Boever S, Vangestel C, De Backer P, Croubels S, Sys S.** (2008). Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122: 312–317
- De Sousa P, Winger Q, Hill J, Jones K, Watson A, Westhusin M.** (1999). Reprogramming of Fibroblast Nuclei after Transfer into Bovine Oocytes. *Cloning*. 1: 63-69
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W.** (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:13734–13738.
- Deindl E, Boengler K, Van Royen N, Schaper W.** (2002). Differential expression of GAPDH and beta3-actin Bovine reference genes 371 in growing collateral arteries. *Molecular Cellular Biochemistry*, 236: 139–146.

**Dheda K, Huggett J, Bustin S, Johnson M, Rook G, Zumla A** (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37: 112-119.

**Dheda K, Huggett J, Chang J, Kim L, Bustin S, Johnson M, Rook G, Zumla A.** (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical Biochemistry*, **344**: 141–143.

**Donnison M, Pfeffer P.** (2004). Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their expression levels during development. *Biology Reproduction*, 71:1813-1321

**Duszevska A, Reklewski Z,** (2007). Uzyskiwanie zarodków zwierząt gospodarskich in vitro (Obtaining in vitro embryos from farm animals). In Polish, summary in English. *Medycyna Weterynaryjna*, 63: 1522-1525.

**Dworkin L, Gibler T, Van Gelder R.** (2002). Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. *Archives of Ophthalmology*, 120: 1534.

**El-Halawany N, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Tesfaye D, Schellander K** (2004). Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real polymerase chain reaction technology. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 753-762.

**Erkens T, Van Poucke M, Vandesomepele J, Goossens K, Van Zeveren A, Peelman LJ** (2006). Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. *BMC Biotechnology*, 6: 41.

**Fair T, Murphy M, Rizos D, Moss C, Martin F, Boland M, Lonergan P.** (2004). Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction Development*, 67:136-144.

**Felmer R, Arias M.** (2008). Advances in the development of a noninvasive embryo model for the evaluation of the quality of cloned embryos subjected to different treatments. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11:5

**Felmer R, Arias M, Muñoz G, Rio J.** (2011). Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction Development*, 78(6):403-14.

- Feng X, Xiong Y, Qian H, Lei M, Xu D, Ren Z.** (2010). Selection of reference genes for gene expression studies in porcine skeletal muscle using SYBR green qPCR. *Journal of Biotechnology*, 150: 288–293
- Finot L, Marneta P, Dessauge F** (2010). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization: Application in the caprine mammary gland. *Small Ruminant Research* 95: 20–26.
- First N, Parrish J.** (1987). *In vitro* fertilization of ruminants. *Journal Reproduction Fertility*, 34: 151-170.
- Flach G, Johnson M, Braude P, Taylor R, Bolton V.** (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO Journal*, 1:681-686.
- Forsberg E, Strelchenko N, Augenstein M, Betthausen J, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Koppang R, Lange G, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Voelker G, Watt S, Bishop M.** (2002). Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biology Reproduction*, 67:327–333
- Foss D, Baarsch M, Murtaugh M.** (1998). Regulation of hypoxanthine phosphoribosyl transferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Animal Biotechnology*, 9: 67 78.
- Freeman T, Lee K, Richardson P.** (1999). Analysis of gene expression in single cells. *Current Opinion in Biotechnology* 10(6): 579–582.
- Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y.** (2002). A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Molecular Cellular Probes*, 16(2): 99–110.
- Fu J, Li D, Xia S, Song H, Dong Z, Chen F, Sun X, Tang Z.** (2009). Absolute quantification of plasmid DNA by real-time PCR with genomic DNA as external standard and its application to a biodistribution study of an HIV DNA vaccine. *Analytical Sciences*, 25: 675.
- Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y, Ohsaki K** (1992). Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation. *Molecular Reproduction Development*, 33:357–62
- Fulka J, Loi P, Ptak G, Fulka H, John J.** (2009). Hope for the Mammoth? *Cloning and Stem Cells*. 1-4.
- Fundele R, Norris M, Barton S, Fehlau M, Howlett S, Mills W, Surani M.** (1990). Temporal and spatial selection against parthenogenetic cells during development of fetal chimeras. *Development*, 108: 203-211

- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G.** (2003). Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424:635
- Garcia-Crespo D, Juste R, Hurtado A** (2005). Selection of ovine housekeeping genes for normalization by real-time RT-PCR; analysis of Prp gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Veterinary Research*, 1: 3.
- García-Vallejo J, Van het Hof B, Robben J, VanWijk J, Van Die I, Joziase D, Van Dijk K.** (2004). Approach for defining endogenous reference genes in gene expression experiments. *Analytical Biochemistry*, 329: 293–299.
- Gardner D, Lane M** (2005). Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproduction, Fertility, Development*, 17: 361-370
- Garry F, Adams R, McCann J, Odde K.** Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning (1996). *Theriogenology*, 45:141–152
- Gibson U, Heid C, Williams P** (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6: 995.
- Glare E, Divjak M, Bailey M, Walters E.** (2002). Beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 57: 765–770.
- Godornes C, Leader B, Molini B, Centurion-Lara A, Lukehart S.** (2007). Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine*, 38: 1.
- Goidin, D, Mamessier A, Staquet M, Schmitt D, Berthier-Vergnes O.** (2001). Ribosomal 18S rRNA prevails over glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase and b-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and non- invasive human melanoma cell subpopulations. *Analytical Biochemistry*. 295: 17–21.
- Goossens K, Van Poucke M, Van Soom A, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman L** (2005). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Developmental Biology*, 5: 27.
- Goossens K, Van Soom A, Van Poucke M, Vandaele L, Vandesompele J, Van Zeveren A, Peelman L.** (2007). Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. *BMC Developmental Biology*, 7: 64.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K.** (1990) Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Veterinary Record*, 127, 517-520.

**Gurdon J, Laskey R, Reeves O.** (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal Embryology and experimental Morphology*, 34:93–112

**Haller F, Kulle B, Schwager S, Gunawan B, von Heydebreck A, Sültmann H, Füzesi L.** (2004) Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Analytical Biochemistry*, 335:1-9.

**Hamalainen H, Tubman J, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington J, Lahesmaa R.** (2001). Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Analytical Biochemistry*, 299: 63–70.

**Hatakeyama M, Sawa M, Oishi K.** (1994) Fertilization by microinjection of cryopreserved sperm in the sawfly, *athalia rosae* (Hymenoptera). *Journal of Insect Physiology*, 40, 909-912.

**Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986–994.

**Hendriks-Balk M, Michel M, Alewijnse A.** (2007): **Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data.** *Basic research in cardiology*, **102**: 195-197.

**Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, Martinovich C, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Fanton J, Jacob D, Monteith D, Neuringer M, Battaglia D, Simerly C, Schatten G** (1999). Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nature Medicine*, 5: 431–433.

**Higashibata, A, Szewczyk N, Conley C, Inamizo-Sato M, Higashitani A, Ishioka N.** (2006). Decreased expression of myogenic transcription factors and myosin heavy chains in *Caenorhabditis elegans* muscles developed during spaceflight. *Journal of Experimental Biology*, 209: 3209–3218

**Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, and Griffith R** (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413–417.

**Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026–1030.

**Hill J, Roussel A, Cibelli J, Edwards J, Hooper N, Miller M, Thompson J, Looney C, Westhusin M, Robl J, Stice S** (1999). *Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies).* *Theriogenology*, 51:1451–1465.

**Hod Y.** (1992). *A simplified ribonuclease protection assay.* *Biotechniques*, 13: 852–854.

**Hoshi H.** (2003). *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59: 675-685.

**Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A.** (1988) Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. (Abstr. 331). In *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*.

**Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A** (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6: 279-284.

**Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander E, Golub T, Jaenisch R.** (2002). Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:12889– 12894.

**Hurtado del Pozo C, Calvo R, Vesperinas-García G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Corripio-Sánchez R, Rubio M, Obregon M.** (2010). IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*, 18:897-903

**Ingerslev H, Pettersen E, Jakobsen R, Petersen C, Wergeland H.** (2006). Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar* L), *Molecular Immunology*. 43: 1194–1201.

**Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma Y.** (1995). Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Analytical Biochemistry*, 229 (2): 207–213.

**Janovick Guretzky N, Dann H, Carlson D, Murphy M, Loor J, Drackley J.** (2007). Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake, and dietary treatment. *Journal of Dairy Science* 90: 2246–2252.

**Jemiolo B, Trappe S.** (2004). Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320: 1043–1050.

**Jeong Y, Choi H, Shin H, Cui X, Kim N, Gerton G, Jun J (2005):** Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 17: 284-289.

**Kadegowda A, Bionaz M, Thering B, Piperova L, Erdman R, Loor J.** (2009). Identification of internal control genes for quantitative polymerase chain reaction in mammary tissue of lactating cows receiving lipid supplements. *Journal of Dairy Science* 92, 2007–2019.

- Kaiz P.** (2000) The PCR plateau phase- towards an understanding of its limitations. *Biochimica of Biophysica Acta*, 1494: 23-27
- Kang Y, Koo D, Park J, Choi Y, Chung A, Lee K, Han Y,** (2001). Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetic*, 28:173–177.
- Kanka J, Kepkova K, Nemcova L.** (2009) Gene expression during minor genome activation in preimplantation bovine development. *Theriogenology*, 72: 572–583.
- Ke L, Chen Z, Yung W** (2000). A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards. *Molecular and Cellular Probes*, 14: 127–135.
- Keefer C, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau A, Zhou J, Leduc M, Downey B, Lazaris A, Karatzas C.** (2001). Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biology Reproduction*, 64:849–856.
- Kessler Y, Helfer-Hungerbuehler A, Cattori V, Meli M, Zellweger B, Ossent P, Riond B, Reusch C, Lutz H, Hofmann-Lehmann R.** (2009). Quantitative TaqMan real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues. *BMC Molecular Biology*, 10: 106.
- Khurana NK, Niemann H** (2000): Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, 62: 847-856.
- Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin, S.** (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132: 1049–1061.
- Kono T, Obata Y, Wu Q, Niwa K, Ono Y, Yamamoto Y, Park E, Seo J, Ogawa H.** (2004) Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 428:860–4.
- Kubista M, Andrade J, Bengtsston M, Foorotan M, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Sthåhlberg A, Zoric N.** (2006). The real- time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125.
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X.** (2000). Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 973:990– 995
- Kues W, Niemann H.** (2004). The contribution of farm animals to human health. *Trends in Biotechnology*, 22:286-294
- Kuijk E, Du Puy L, Van Tol H, Haagsman H, Colenbrander B, Roelen B.** (2007). Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. *BMC Development Biology*, 7: 58.

- Lanza R, Cibelli, J, West, M.** (1999). Human therapeutic cloning. *Nature Medicine*. 5: 975–977 (1999).
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Dichi R, Kruij T, Niemann H, Galli C.** (2002). Cellular and molecular deviation in bovine in vitro produced are related to the large offspring syndrome. *Biology reproduction*, 67: 767-775.
- Lee B, Kim M, Jang G, Oh H, Yuda F, Kim H, Shamim M, Kim J, Kang S, Schatten G, Hwang W,** (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436:641.
- Lee C, Kim J, Shin S, Hwang S.** (2006). Absolute and relative qPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli. *Journal Biotechnology*, 123: 273.
- Leong D, Gupta A, Bai H, Wan G, Yoong L, Too H, Chew F, Hutmacher D.** (2007). Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials*, 28: 203–210.
- LightCycler Relative Quantification Software** (2001) Version 1.0, Roche Molecular Biochemicals.
- Lisowski P, Pierzchala M, Goscik J, Pareek, C, Zwierzchowski, L,** (2008) Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. *Journal of Applied Genetics*, 49: 367–372.
- Liss B.** (2002) Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res.*, 30, E89
- Liu W, Saint D.** (2002 a). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2): 347-353
- Liu W, Saint D.** (2002 b). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry*, 302(1): 52-59
- Livak K.** (1997 & 2001) ABI Prism 7700 Sequence detection System User Bulletin #2 Relative quantification of gene expression. *ABI company publication*.
- Livak K, Flood S, Marmaro J, Giusti W, Deetz K** (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications*, 4: 357–362.
- Livak K, Schmittgen T** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods*, 25: 402- 408.

- Lockey C, Otto E, Long Z** (1998) Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques*, 24: 744–746.
- Loi P, Beaujean N, Khochbin S, Fulka J, Ptak G** (2008) Asymmetric nuclear reprogramming in somatic cell nuclear transfer? *Bioessays*, 30: 66–74.
- Long C, Walker S, Tang R, Westhusin M.** (2003). New commercial opportunities for advanced reproductive technologies in horses, wildlife, and companion animals. *Theriogenology*, 59:139–149
- Mackay I, Arden K, Nitsche A.** (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30: 1292–1305.
- Mamo S, Arpad Baji G, Szilard B, Andras D.** (2007). Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC developmental biology*, 7: 14
- Marten N, Burke E, Hayden J, Straus D.** (1994). Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB Journal*, 8: 538-544.
- Martin M.** (2000). Development of In Vivo-Matured Porcine Oocytes Following Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biology of Reproduction*, 63, 109–112
- Martínez-Beamonte R, Navarro M, Larraga A, Strunk M, Barranquero C, Acín S, Guzman M, Iñigo P, Osada J.** (2011). Selection of reference genes for gene expression studies in rats. *Journal Biotechnology*, 151:325-34.
- McCurley A, Callard G.** (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology*, 9: 102.
- McGraw S, Robert C, Massicotte L, Sirard M** (2003) Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biology of reproduction*, 68: 383-389.
- Meijerink J, Mandigers C, Van de Locht L, Tonnissen E, Goodsaid F, Raemaekers J** (2001) A novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real-time PCR. *Journal Molecular Diagnostic*, 3(2): 55-61
- Melo E, Canavessi A, Franco M, Rumpf R.** (2007). Animal transgenesis: state of the art and applications. *Journal of Applied Genetics*, 48(1):47-61

**Memili E, Dominko T, First N.** (1998) Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction Development*, 51:36-41

**Meuwissen T.** (1998). Optimizing pure line breeding strategies utilizing reproductive technologies. *Journal of Dairy Science*, 81(Suppl 2): 47-54.

**Moisyadi S, Kaminski J, Yanagimachi R.** (2009) Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32: 47–6.

**Moore K, Rodríguez-Sallaberry C, Kramer J, Johnson S, Wroclawska E, Goicoa S, Niasari-Naslaji A.** (2007). In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology* 68: 1316–1325

**Moreira P, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jimenez A, Montoliu L.** (2004). Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biology Reproduction* 71(6):1943–7.

**Morse D, Carroll D, Weberg L, Borgstrom M, Ranger-Moore J, Gillies R.** (2005). Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 342:69-77.

**Mullis K, Faloona F.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymology*, 155: 335–350.

**Mullis K.** (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262: 56 – 61.

**Munsie M, Michalska A, O'Brien C, Trounson A, Pera M, Mountford.** (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Current Biology*, 10: 989-992.

**Nagaraj T, Vasanth J, Desai A, Kamat A, Madhusudana S, Ravi V.** (2006). Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real-time and conventional RT-PCR techniques. *Journal of Clinical Virology*, 36: 17– 23.

**Natale D, Westhusin M, Watson A.** (1998). Characterization of differentially expressed mRNAs in bovine preattachment embryos cultured in defined and serum-supplemented/co-culture systems. *Theriogenology*,

**Niemann H, Wrenzycki C.** (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 53:21-34

- Niesters H.** (2001). Quantification of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* 25: 419- 429.
- Nolan T, Hands R, Bustin SA** (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1: 1559-1582.
- Nygaard A, Jorgensen C, Cirera S, Fredholm M.** (2007). Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Molecular Biology*, 8: 67.
- Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M,** (2005). Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization. *Journal of Molecular Medicine*, 83: 1014- 1024.
- Olsvik P, Lie K, Jordal A, Nilsen T, Hordvik I** (2005). Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*, 6: 21.
- Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M.** (1998). Developments in quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36: 255–269.
- Paffoni A, Brevini TA, Gandolfi F, Ragni G.** (2008). Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta* 29:121–5.
- Pal S, Baiocchi R, Byrd J, Grever, Jacob S, Sif S.** (2007). Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO Journal*, 26:3558–3569
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A,** (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17–18.
- Parker R, Barnes N** (1999). mRNA: detection by in situ and northern hybridization. *Methods in Molecular Biology*, 106: 247–283.
- Paynton B, Rempel R, Bachvarova R.** (1988). Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Developmental Biology*, 129:304-314
- Peccoud J, Jacob C.** (1996). Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophysical Journal* 71: 101-108.
- Peccoud J, Jacob C.** (1998). Statistical estimation of PCR amplification. In *Gene Quantification*, ed. F. Ferré, Birkhäuser, Boston.
- Perez R, Tupac-Yupanqui I, Dunner S.** (2008). Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. *BMC Molecular Biology*, 9: 79.

**Perry A, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y.** (1999) Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 284(5417):1180–3.

**Pfaffl M, Georgieva T, Georgiev I, Ontsouka E, Hageleit M, Blum J** (2002) Realtime RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology*, 22(2): 91–102.

**Pfaffl M, Hageleit M** (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology letters*, 23: 275–282.

**Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T.** (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26: 509-515.

**Pfaffl, M, Horgan G, Dempfle L.** (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9): e36.

**Polejaeva I, Campbell K,** (2000). New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*, 53: 117–126.

**Polejaeva I, Chen S, Vaught T, Page R, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares D, Colman A, Campbell K.** (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407:86–90

**Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Long F, Douglas S, Field S, Bell S, Combaret V, Puisieux A, Mighell A, Robinson P, Inglehearn C, Isaacs J, Markman A.** (2003). Real Time PCR based on SYBR Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplification and microgen deletions. *BMC Biotechnology*, 3: 3-18.

**Primakoff P, Myles D.** (2002). Penetration: adhesion, and fusion in mammalian sperm– egg interaction. *Science*, 296:2183-5.  
R. *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45

**Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A** (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real- time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313: 856-862.

**Rajeevan M, Vernon S, Taysavang N, Unger E.** (2001). Validation of array based gene expression profiles by real-time kinetic RT-PCR. *Journal of Molecular Diagnostics* 3: 26–31.

- Rasmussen R.** (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K. Rapid cycle real-time PCR, *Methods and applications*. Springer Press, Heidelberg 21-34.
- Reisch U, Linde H, Lehn N, Landt O, Barratt K, Wellinghausen N.** (2002) Direct detection of Legionella spp and Legionella pneumophila in clinical specimens by dual-color real time PCR and melting curve analysis. *Clinical Microbiology*, 40: 3814-7.
- Reischl U, Kochanowski B. (1995).** Quantitative PCR. A survey of the present technology. *Molecular Biotechnology*, 3(1): 55-71.
- Ren Z, Shin A, Cai Q, Shu X, Gao Y, Zheng W.** (2007). IGFBP3 mRNA expression in benign and malignant breast tumors. *Breast Cancer Research*, 9: R2
- Rinaudo P, Schultz R.** (2004). Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction*, 128:301-311.
- Rizos D, Lonergan P, Boland M, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A.** (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. *Biology Reproduction*, 66:589-595
- Robert C, McGraw S, Massicotte L, Pravetoni M, Gandolfi F, Sirard MA** (2002). Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, 67: 1465-1472.
- Robinson T, Sutherland I, Sutherland J.** (2007). Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115: 160-165.
- Robl J.** (1999). New life for sperm-mediated transgenesis?. *Nature Biotechnology*. 7636-7.
- Rose'Meyer R, Mellick A, Garnham B, Harrison G, Massa H, Griffiths L.** (2003). The measurement of adenosine and estrogen receptor expression in rat brains following ovariectomy using quantitative PCR analysis. *Brain Research Protocol*, 11: 9.
- Ross P, Wang K, Kocabas A, Cibelli J.** (2010) Housekeeping Gene Transcript Abundance in Bovine Fertilized and Cloned Embryos. *Cellular reprogramming*, 12: 6.
- Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M.** (2005). Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Molecular and Cellular Probes* 19: 101-109.
- Ruddock N, Wilson K, Cooney M, Korfiatis N, Tecirlioglu R, French A.** (2004). Analysis of imprinted messenger RNA expression during bovine preimplantation development. *Biology Reproduction*, 70:1131-5.

**Ruijter J, Ramakers C, Hoogaars W, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff M, Moorman A.** (2009) . Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 045.

**Rzucidlo S, Gibbons J, Stice S.** (2001) Comparison by restriction fragment differential display RT-PCR of gene expression pattern in bovine oocytes matured in the presence or absence of fetal calf serum. *Molecular Reproduction Development*, 59:90-6.

**Saccomanno C, Bordonaro M, Chen J, Nordstrom J.** (1992). A faster ribonuclease protection assay. *Biotechniques*, 13: 846–850.

**Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350 –1354.

**Schmid H, Cohen C, Henger A, Irrgang S, Schlöndorff D, Kretzler M.** (2003). Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney International*, 64: 356–360.

**Schmittgen T, Zakarajsek B.** (2000): Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real- time quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 46: 69-81.

**Schmittgen T, Zakrajsek B, Mills A, Gorn V, Singer M, Reed M.** (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry*, 285(2): 194–204.

**Schnell S, Mendoza C.** (1997). Theoretical description of the polymerase chain reaction. *Journal theoretical Biology*, 188: 313-318.

**Selvey S, Thompson E, Atthaei M.** (2001).  $\beta$ -actin an unsuitable internal control for RT-PCR. *Molecular Cellular Probes*, 15(5): 307-311.

**Selvin P** (1995). Fluorescence resonance energy transfer. *Methods in Enzymology*, 246: 300–334.

**Simpson D, Feeney S, Boyle C, Stitt A.** (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR, *Molecular Vision*, 6: 178–183.

**Sirard M, Dufort I, Vallée M, Massicotte L, Gravel C, Reghenas H, Watson A, King W, Robert C.** (2005). Potential and limitations of bovine-specific arrays for the analysis of mRNA levels in early development: preliminary analysis using a bovine embryonic array. *Reproduction Fertility Development*, 17:47-57.

**Smith C, Berg D, Beaumont S, Standley, Wells D, Pfeffer P.** (2007). Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction*, 133: 231-242.

**Smits K, Goossens K, Van Soom<sup>1</sup> A, Govaere<sup>1</sup> J, Hoogewijs<sup>1</sup> M, Vanhaesebrouck<sup>1</sup> E, Galli C, Colleoni S, Vandesompele J, Peelman L.** (2009). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts. *BMC Research Notes*, 2:246

**Solter D.** (1998). Dolly is a clone- and no longer alone. *Nature*, 394: 315-316

**Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P.** (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 21: 280–285.

**Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M** (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 50: 509–15.

**Steptoe P, Edwards R.** (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo (Letter). *Lancet*, ii, 366.

**Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Brenner CA** (1999): Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Molecular Human Reproduction*, 5: 1034-1039.

**Stice S.** (1998). Opportunities and challenges in domestic animal embryonic stem cell research. In: *Animal Breeding: Technology for the 21st Century*. AJ. Clark, ed. Harwood Academic Press, Switzerland, pp 64-71.

**Stolovitzky G, Cecchi G.** (1996). Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93(23):12947-12952.

**Strube C, Buschbaum S, Wolken S, Schnieder T** (2008), Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate protein disulfide isomerase transcription pattern in the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Gene* **425**: 36-43.

**Surani M.** (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, 414: 122-128

**Suzuki T, Higgins P, Crawford D.** (2000), Control selection for RNA quantitation, *Biotechnique* 29: 332–337.

**Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb W, Love D.** (2007). Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, **39**: 384–390.

**Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Gristar T, Igout A, Heinen E** (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, 75: 291-295.

**Tichopad A, Didier A, Pfaffl M** (2004). Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Molecular and Cellular Probes*, (18): 45-50.

**Tichopad A, Dzidic A, Pfaffl M** (2003). Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechnology Letters* 2003, 24: 2053-2056.

**Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C** (2002). Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*, 309: 293-300.

**Tyagi S, Kramer F.** (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14: 303–308.

**Valasek M, Repa J.** (2005). The power of real-time. *Advances in Physiology Education*, 29:151-159.

**Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002). Accurate normalization of Real-Time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3: 34.

**VanGuilder H, Vrana K, Freeman W.** (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44 (5): 619–626.

**Vigneault C, Gilbert I, Sirard M.** (2007). Using the histone H2a transcript as an endogenous standard to study relative transcript abundance during bovine early development. *Molecular Reproduction Development* 74: 703–715.

**Vireque A, Camargo L, Serapiao R, Rosa e Silvia A, Watanabe Y, Ferreira E, Navarro P, Martins W, Ferriani R.** (2009). Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. *Theriogenology*, 71: 620-627.

**Wakayama T, Perry A, Zuccotti M, Johnson K, Yanagimachi R.** (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394:369–374

**Walker C, Meier S, Mitchell M, Roche J, Littlejohn M.** (2009). Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *BMC Molecular Biology* 10: 100.

**Walker N.** (2002). A technique whose time has come. *Science*, 296: 557–559.

- Warrington J, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M.** (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiology Genomics* 2:143–147.
- Wassarman P.** (1983). Oogenesis: Synthetic events in the developing mammalian egg. In *Mechanism and Control of Animal Fertilization* (ed. J. F. Hartmann), pp. 1-53.
- Watson J, Hopkins N, Roberts J, Steitz J, Weiner A.** (1987). *Molecular biology of the gene*. 4 edición.
- Whelan J, Russell N, Whelan M.** (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal Immunology Methods*, 278: 261.
- Whitcombe D, Theaker J, Guy S, Brown T, Little S.** (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, 17: 804–7.
- Wilmot I, Schnieke A, McWhir J, Kind A, Campbell K.** (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385:810–813.
- Winer J, Jung C, Shacke I, Williams P.** (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical Biochemistry*., 270(1): 41-49, 1999.
- Wittwer C, Garling D.** (1991) Rapid cycle DNA amplification: Time and temperature optimization. *BioTechniques*, 10: 76-83, 1991.
- Wittwer C, Herrmann M, Moss A, Rasmussen R.** (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22: 130–1.
- Wong M, Medrano J,** (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75–85.
- Wood S, Clements D, McEwan N, Nuttall T, Carter S.** (2008). Reference genes for canine skin when using quantitative real-time PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126: 392–395.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath J, Niemann H.** (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction Development*. 53(1):8-18.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H** (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reproduction, Fertility and Development*, 17: 23-35.

**Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H** (2001). Nuclear Transfer protocol affects Messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biology of Reproduction*, 65: 309–317.

**Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T.** (2002). Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biology Reproduction*, 67(2):534–9

**Yanagimachi R.** (2005) Intracytoplasmic injection of spermatozoa and spermatogenic cells: its biology and applications in humans and animals. *Reproduction Biomedical Online*, 10(2):247–88.

**Yang X, Presicce G, Moraghan L, Jiang S, Foote R.** (1994). **Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes**, *Theriogenology*, 41: 395–403

**Zhang X, Ding L, Sandford A.** (2005): Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 6: 4.

**Zhu J, He F, Song S, Wang J, Yu J** (2008): **How many human genes can be defined as housekeeping with current expression data?** *BMC genomics*, **9**: 172.

**Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzhum F.** (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, *Nucleic Acids Research*, 32: 1-10.

## 12. ANEXOS

### **Anexo 1.** Protocolo de Extracción de ARN Picopure RNA isolation kit (Arcturus)

#### **Materiales y equipos requeridos:**

- Kit Picopure RNA isolation kit (Arcturus)
- Enzima ADNasa (Fermentas)
- Microcentrífuga (con regulador de temperatura)
- Termoblock
- Micropipetas ajustables
- Puntas estériles, libres de nucleasas
- Vortex
- Tubos microcentrifuga 0,5 ml

#### **Lisis Celular e inicio de la extracción:**

1. Lavar los embriones en PBS conteniendo PVA 0,1% (3 gotas 30-60 segundos y una gota PBS para evitar que queden pegajosos).
2. Con la ayuda de una lupa poner los embriones al fondo de un tubo eppendorf de 1,5 ml libre de ARNasa y ADNasa (en 2 a 3  $\mu$ l de de medio). Luego remover todo el medio que se pueda (en general queda menos de 1 $\mu$ l)
3. En otro tubo agregar 40  $\mu$ l buffer de extracción XB para grupos de 5 o 10 embriones.
4. Incubar a 42 °C. durante 30 minutos. Centrifugar a baja velocidad para bajar el contenido de las paredes (Ej: 3.000 x g. x 2 minutos) y guardar a -80 °C., hasta el día de la extracción de ARN (o bien continuar inmediatamente con el protocolo).

#### **Extracción final y purificación del ARN:**

5. Preacondicionar la columna de extracción del kit agregando 250  $\mu$ l de buffer de acondicionamiento CB en la membrana y dejar incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugar la columna con el tubo de recolección a 16.000 xg por 1 minuto.

6. Agregar 40  $\mu$ l de etanol al 70% al tubo que contiene el ARN en buffer XB. Mezclar por pipeteo suave.
7. Colocar la mezcla anterior directamente sobre la membrana de la columna preacondicionada y centrifugar por 2 minutos a 100 xg (para unir el ARN). Inmediatamente centrifugar a 16.000 x g. por 30 segundos.
8. Adicionar a la columna 100  $\mu$ l. de buffer de lavado 1 (WB1) y centrifugar a 8000 x g. durante 1 minuto.

**Tratamiento ADNasa:**

- Pipetear 5  $\mu$ l de ADNasa en 35  $\mu$ l del buffer respectivo. Mezclar suavemente.
  - Pipetear estos 40  $\mu$ l directamente sobre la membrana de la columna, incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
  - Adicionar 40  $\mu$ l de buffer WB1 sobre la membrana de la columna. Centrifugar a 8000 x g. por 15 segundos.
9. Agregar 100  $\mu$ l de buffer de lavado 2 (WB2) en la columna de purificación y centrifugar a 8.000 x g. por 1 minuto.
  10. Adicionar nuevamente 100  $\mu$ l de buffer WB2 en la columna de purificación y centrifugar a 16.000 x g. por 2 minutos.
  11. Chequear la columna por cualquier residuo de lavado que permanezca. Re-centrifugar de ser necesario por 1 minuto.
  12. Transferir la columna de purificación a un nuevo tubo de 0,5 ml.
  13. Agregar directamente 12  $\mu$ l de buffer de elución EB sobre la membrana de la columna (cuidadosamente topar la membrana con la punta del tip mientras dispensa el contenido sobre ésta).
  14. Incubar la columna 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 1.000 x g por 1 minuto para distribuir el EB en la membrana. Centrifugar a 16.000 x g por 1 minuto para eluir el ARN.
  15. Dejar en hielo para análisis posterior o guardar a -80 °C.

**Anexo 2.** Protocolo Síntesis de ADNc RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

**Materiales y equipos requeridos:**

- Kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas)
- Termoblock
- Micropipetas ajustables
- Puntas estériles, libres de nucleasas
- Vortex
- Tubos eppendorf

1. Una vez finalizada la extracción del ARN total agregar al tubo 1  $\mu$ l de random hex para cada reacción, formando un volumen final de 12  $\mu$ l.

<b>Compuesto</b>	<b>1 reacción</b>
ARN	11 $\mu$ l
Random Hex	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	0 $\mu$ l
<b>V<sub>f</sub> Reacción</b>	<b>12 <math>\mu</math>l</b>

2. Luego de preparar las reacciones todos los tubos se mezclaron suavemente y se centrifugaron por 15 segundos.
3. Luego se incubaron por 5 minutos a 70 °C (Golpe de frío)
4. Se preparó un mix con los siguientes reactivos y volúmenes:

<b>Compuesto</b>	<b>1 Reacción</b>
5x Buffer	4 $\mu$ l
Ribolock	1 $\mu$ l
10 mM.	2 $\mu$ l

5. Adicionar 7  $\mu$ l del mix a cada tubo y mezclar suavemente.

6. Incubar por 5 minutos a 25°C.
7. Agregar 1  $\mu$ l de enzima Revertaid MMuLv RT
8. **Reacción:** Incubar por 10 minutos a 25°C
9. Incubar por 60 minutos a 42°C
10. Detención reacción: Incubar por 10 minutos a 70°C. (Golpe de frío)

### Anexo 3. Protocolo Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

#### Materiales y equipos requeridos:

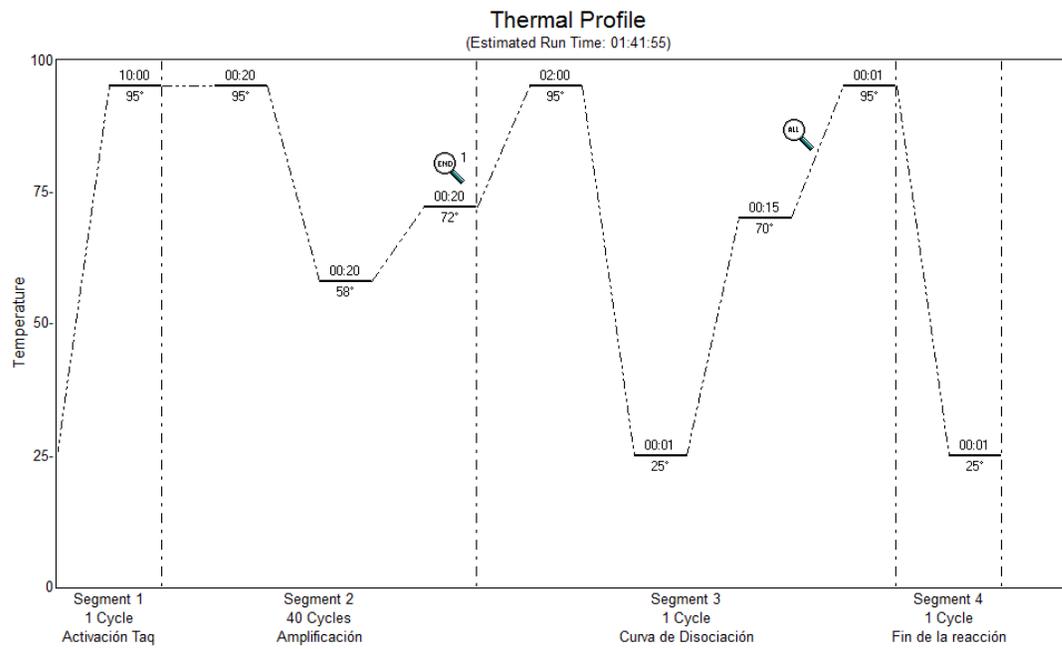
- 2x Brilliant<sup>®</sup> II SYBR green QPCR mix Agilent
- Partidores para cada gen de referencia candidate
- Agua libre de nucleasas
- ADNc de las muestras de embriones
- Equipo Stratagene 3000MP
- Centrifuga
- Vortex
- Micropipetas ajustables
- Puntas para micropipetas esteriles, libres de nucleasas
- Tubos eppendorf

1. Preparar la mezcla maestra (master mix) para RT- PCR para cada gen de referencia candidato, según se detalla a continuación:

Compuesto	Concentración	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l)
Master Mix	10x	5X	10 $\mu$ l
Partidor 1	3 $\mu$ M	300 mM	2 $\mu$ l
Partidor 2	3 $\mu$ M	300 mM	2 $\mu$ l
H2O			2 $\mu$ l
ADNc			4 $\mu$ l
<b>Volumen final (<math>\mu</math>l)</b>			20 $\mu$ l

**\*Partidor 1:** partidor sentido 5<sup>^</sup>-3<sup>^</sup>; **Partidor 2:** partidor antisentido 3<sup>^</sup>- 5<sup>^</sup>

2. Programar en el termociclador Stratagene 3000P las condiciones para el perfil térmico de PCR en tiempo real.



#### **Anexo 4.** Protocolo electroforesis de ADN en gel de agarosa

##### **Materiales y equipos requeridos:**

- Cámara de electroforesis
- Agarosa
- Buffer TAE 1X
- Marcador de Peso
- Buffer de carga
- Bromuro de etidio
- Transiluminador
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas

1. Pesar la agarosa de acuerdo al volumen final de la reacción y mezclar con buffer TAE 1x. Calentar la solución en baño de agua hirviendo o en un microondas hasta que la agarosa se disuelva completamente.

<b>% de Agarosa</b>	<b>Resolución óptima (pb)</b>
0,3	5.000 – 60.000
0,6	1.000 – 20.000
0,8	800 – 10.000
1,0	500 – 7.000
1,2	400 – 6.000
1,5	200 – 3.000
2	100 – 2.000
3	< 100

2. Verter la solución una vez enfriada en un molde previamente preparado.

3. Esperar entre 20 a 40 minutos la solidificación de la agarosa y cargar las muestras con buffer de carga 6x.
4. Correr la electroforesis en buffer TAE 1x durante 45 minutos a 80 volts.
5. Una vez finalizada la corrida, sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio (0,5  $\mu$ l/ml) durante 10 a 15 minutos.
6. Observar el gel en un transluminador con luz ultravioleta (250-330 nm).

**Anexo 5.** Cuadro resumen de las posiciones obtenidas por la clasificación mediante los programas geNorm y NormFinder para los genes de referencia en ovocito inmaduro, ovocito maduro y embriones de 16-32 células.

Gen	Ovocito inmaduro		Ovocito maduro		Embriones de 16-32 células	
	geNorm	NormFinder	geNorm	NormFinder	geNorm	NormFinder
<i>GAPDH</i>	<b>0,038 (1)</b>	0,105 (6)	0,029 (8)	0,088 (8)	0,234 (9)	0,145 (5)
<i>ACTB</i>	<b>0,038 (2)</b>	0,073 (4)	<b>0 (2)</b>	<b>0,023 (3)</b>	0,292 (10)	0,351 (9)
<i>HPRT1</i>	<b>0,053 (3)</b>	0,102 (5)	0,02 (7)	<b>0,005 (1)</b>	0,142 (5)	<b>0,037 (2)</b>
<i>SF3A1</i>	0,065 (4)	<b>0,017 (1)</b>	0,014 (5)	0,058 (6)	<b>0,059 (1)</b>	0,184 (9)
<i>H2A</i>	0,098 (5)	<b>0,021 (3)</b>	0,017 (6)	0,06 (7)	<b>0,059 (2)</b>	0,158 (7)
<i>SDHA</i>	0,125 (6)	<b>0,017 (2)</b>	<b>0,004 (3)</b>	0,033 (4)	0,174 (6)	<b>0,024 (1)</b>
<i>PPIA</i>	0,193 (7)	0,233 (7)	0,099 (9)	0,203 (9)	0,224 (8)	0,134 (4)
<i>YWHAZ</i>	0,233 (8)	0,256 (8)	0,006 (4)	0,036 (5)	<b>0,094 (3)</b>	0,154 (6)
<i>eEF1A2</i>	0,274 (9)	0,294 (10)	0,154 (10)	0,259 (10)	0,123 (4)	0,16 (8)
<i>HMBS</i>	0,311 (10)	0,283 (9)	<b>0 (1)</b>	<b>0,023 (2)</b>	0,2 (7)	<b>0,076 (3)</b>

**Anexo 6.** Cuadro resumen de las posiciones obtenidas por la clasificación mediante los programas geNorm y NormFinder para los genes de referencia en blastocistos generados por fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y partenogénesis (PA) respectivamente.

Gen	FIV		ICSI		TNCS		PA	
	geNorm	NormFinder	geNorm	NormFinder	geNorm	NormFinder	geNorm	NormFinder
<i>YWHAZ</i>	<b>0,229 (1)</b>	0,455 (5)	0,805 (8)	0,625 (8)	0,34 (8)	0,415 (9)	0,6 (4)	0,638 (6)
<i>HPRT1</i>	<b>0,229 (2)</b>	0,338 (4)	0,713 (7)	0,623 (7)	0,302 (7)	0,359 (8)	<b>0,421 (1)</b>	<b>0,284 (2)</b>
<i>SF3A1</i>	<b>0,322 (3)</b>	<b>0,082 (1)</b>	0,978 (10)	0,857 (10)	<b>0,009 (2)</b>	<b>0,003 (2)</b>	<b>0,421 (2)</b>	<b>0,146 (1)</b>
<i>HMBS</i>	0,396 (4)	<b>0,264 (3)</b>	<b>0,155 (1)</b>	<b>0,131 (1)</b>	0,384 (9)	0,263 (6)	0,828 (5)	0,727 (8)
<i>GAPDH</i>	0,468 (5)	<b>0,137 (2)</b>	<b>0,261 (3)</b>	<b>0,151 (2)</b>	0,526 (10)	0,754 (10)	0,946 (7)	0,475 (4)
<i>SDHA</i>	0,657 (6)	0,609 (7)	0,593 (6)	0,281 (4)	<b>0,042 (3)</b>	<b>0,019 (3)</b>	1,056 (9)	0,629 (5)
<i>PPIA</i>	0,745 (7)	0,619 (8)	0,406 (4)	<b>0,223 (3)</b>	0,144 (5)	0,097 (5)	1,002 (8)	0,65 (7)
<i>ACTB</i>	0,805 (8)	0,526 (6)	0,887 (9)	0,829 (9)	<b>0,009 (1)</b>	<b>0,003 (1)</b>	0,878 (6)	0,772 (9)
<i>H2A</i>	0,848 (9)	0,651 (9)	<b>0,155 (2)</b>	0,282 (5)	0,092 (4)	0,041 (4)	1,124 (10)	0,873 (10)
<i>eEF1A2</i>	0,9 (10)	0,708 (10)	0,492 (5)	0,557 (6)	0,242 (6)	0,302 (7)	<b>0,559 (3)</b>	<b>0,423 (3)</b>

**Anexo 7.** Cuadro resumen de las posiciones obtenidas por la clasificación mediante los programas geNorm y NormFinder para los genes de referencia en blastocistos considerando los métodos de producción *in vitro* de fecundación *in vitro*, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, transferencia nuclear de células somáticas y partenogénesis en conjunto.

---

**Métodos de producción *in vitro* de embriones**

---

<b>Gen</b>	<b>geNorm</b>	<b>NormFinder</b>
<i>GAPDH</i>	<b>0,59 (1)</b>	<b>0,407 (2)</b>
<i>HMBS</i>	<b>0,59 (2)</b>	<b>0,426 (3)</b>
<i>SF3A1</i>	<b>0,736 (3)</b>	<b>0,265 (1)</b>
<i>eEF1A2</i>	0,766 (4)	0,598 (5)
<i>HPRT1</i>	0,82 (5)	0,516 (4)
<i>H2A</i>	0,898 (6)	0,668 (6)
<i>PPIA</i>	0,973 (7)	0,668 (7)
<i>SDHA</i>	1,029 (8)	0,774 (8)
<i>YWHAZ</i>	1,188 (9)	0,81 (9)
<i>ACTB</i>	1,602 (10)	1,608 (10)

---

