



UNIVERSIDAD
DE MURCIA



Facultad
de Veterinaria

Evaluación de la longitud telomérica relativa leucocitaria en bovinos nacidos por reproducción asistida

Trabajo Fin de Máster (TFM) del Máster “Biología y Tecnología
de la Reproducción en Mamíferos”

Curso 2024/2025

Autora:

Paula Andrés Zúñiga

Tutores:

Sonia Heras García

María Pilar Coy Fuster

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Paula Andrés Zúñiga con DNI 48833071T, autora del Trabajo de Fin de Máster del título Máster Universitario en “Biología y Tecnología de la Reproducción en Mamíferos”, declaro que el trabajo, en lo que a su autoría se refiere, es original y que todas las fuentes utilizadas para su elaboración han sido debidamente citadas.

Murcia, 7 de julio de 2025.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Paula', with a stylized, cursive script.

Fdo. Paula Andrés Zúñiga

RESUMEN

Situados en los extremos de los cromosomas, los telómeros constituyen una herramienta fundamental para proteger la integridad del material genético. Su secuencia es regenerada, tras cada división celular, mediante la enzima telomerasa y otros mecanismos moleculares, evitando la pérdida de información genética. Sin embargo, no todas las células pueden restablecer su longitud telomérica. Esto resulta en un acortamiento progresivo de los mismos que, al alcanzar una longitud crítica, induce en las células mecanismos de muerte celular. En la industria ganadera bovina, las técnicas de reproducción asistida ofrecen numerosas ventajas sobre la producción y las características genéticas de los animales. No obstante, se desconoce si estas técnicas podrían inducir y/o acelerar el acortamiento telomérico de los individuos derivados de las mismas.

Este estudio tuvo como objetivo analizar la posible influencia de las técnicas de reproducción asistida sobre la longitud telomérica relativa leucocitaria bovina, a lo largo de la vida de los animales. También se evaluó la relación entre esta longitud telomérica y el sexo y supervivencia de los individuos. Las muestras se obtuvieron de 19 vacas y toros, procedentes de un estudio anterior. La longitud telomérica relativa leucocitaria se determinó mediante PCR cuantitativa, tras la extracción previa del ADN. Se diseñaron dos primers, uno para amplificar fragmentos teloméricos y otro para el gen de referencia de copia única GTF2I.

Se observó una influencia significativa de la técnica de reproducción asistida sobre la longitud telomérica relativa leucocitaria. En concreto, la transferencia de embriones producidos *in vitro*, con medio de cultivo suplementado con fluidos reproductivos, fue la técnica asociada con una mayor longitud telomérica. Al contrario, la inseminación artificial se relacionó con los valores de longitud telomérica más bajos. Sin embargo, no se encontraron asociaciones significativas entre la longitud telomérica y el sexo o supervivencia de los animales. Estos resultados sugieren que la longitud telomérica relativa leucocitaria parece estar influenciada por el tipo de técnica de reproducción asistida. No obstante, sería conveniente realizar investigaciones más amplias para complementar y validar las diferencias observadas y profundizar en su posible relación con el sexo y la longevidad.

Palabras clave: telómeros, reproducción asistida, longevidad, bovino.

SUMMARY

Located at the ends of chromosomes, telomeres are a fundamental tool for protecting the integrity of genetic material. Their sequence is regenerated after each cell division by the enzyme telomerase and other molecular mechanisms, preventing the loss of genetic information. However, not all cells can restore their telomere length. This results in their progressive shortening, which, upon reaching a critical length, induces cell death mechanisms in cells. In the cattle industry, assisted reproductive technologies offer many advantages in terms of animal production and genetic characteristics. Nevertheless, it is unknown whether these technologies could induce and/or accelerate telomere shortening in individuals derived from them.

The aim of this study was to analyse the possible influence of assisted reproductive technologies on relative telomere length in bovine leukocytes throughout the animals' lives. The relationship between telomere length and the sex and survival of the individuals was also evaluated. Samples were obtained from 19 cows and bulls from a previous study. Relative leukocyte telomere length was determined by quantitative PCR after DNA extraction. Two primers were designed, one to amplify telomeric fragments and the other for the single-copy reference gene GTF2I.

A significant influence of assisted reproductive technologies on relative leukocyte telomere length was observed. Specifically, the transfer of embryos produced *in vitro*, with culture medium supplemented with reproductive fluids, was the technique associated with longer telomere length. In contrast, artificial insemination was associated with the shortest telomere length values. However, no significant associations were observed between telomere length and the sex or survival of the animals. These results suggest that relative leukocyte telomere length appears to be influenced by the type of assisted reproductive technology. Yet, further research would be desirable to complement and validate the differences observed and to investigate their possible relationship with sex and longevity.

Keywords: telomeres, assisted reproduction, longevity, bovine.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Telómeros.....	1
1.2. Función de los telómeros.....	2
1.3. Problema de la replicación final.....	3
1.4. Mecanismos de alargamiento de telómeros.....	4
1.4.1. Telomerasa.....	4
1.4.2. Mecanismos moleculares de alargamiento alternativo de telómeros (ALT).....	5
1.4.3. Limitaciones de los mecanismos de alargamiento de los telómeros.....	6
1.5. Reproducción y telómeros.....	7
1.5.1. Longitud telomérica en gametos y embriones.....	7
1.5.2. Reproducción asistida y telómeros.....	7
2. Hipótesis y objetivos.....	8
3. Materiales y métodos.....	9
3.1. Animales.....	9
3.2. Obtención de muestras de sangre.....	10
3.3. Extracción de ADN.....	10
3.4. Evaluación de la calidad del ADNg.....	11
3.4.1. Integridad del ADNg.....	11
3.4.2. Concentración y pureza del ADNg.....	12
3.5. Limpieza de muestras de ADN.....	13
3.6. qPCR.....	13
3.6.1. Normalización de los valores de la qPCR.....	14
3.6.2. Análisis estadístico.....	14
4. Resultados.....	15
4.1. Longitud telomérica relativa leucocitaria y técnicas de reproducción asistida ...	15
4.2. Longitud telomérica relativa leucocitaria y sexo.....	17
4.3. Longitud telomérica relativa leucocitaria y supervivencia.....	18
5. Discusión.....	20
6. Conclusiones.....	23
7. Agradecimientos.....	24
8. Bibliografía.....	25
9. Declaración de actividad.....	30
10. Informe antiplagio.....	31

1. Introducción

1.1. Telómeros

Los extremos de los cromosomas lineales reciben el nombre de telómeros, unas estructuras nucleoproteicas de doble cadena presentes en las células de los organismos eucariotas. El biólogo y genetista estadounidense Hermann Muller fue uno de los primeros científicos que propuso la existencia de estas estructuras. En el año 1938 las denominó así a partir de las palabras griegas «telos» (final) y «meros» (parte), resultando el término «telómeros» (1). Los telómeros están conformados por repeticiones en tándem de un patrón de nucleótidos de ADN. A estas repeticiones se asocian un conjunto de proteínas denominadas “shelterina”, proteínas shelterinas o “telosoma” (2). Estas participan en el correcto funcionamiento de los telómeros, los estabilizan (3) e impiden que sean identificados como roturas de doble cadena por los mecanismos de reparación del ADN (4).

En vertebrados, el patrón repetido de nucleótidos de los telómeros consiste en la secuencia hexamérica (5'-TTAGGGn) (5) (**Fig. 1**). Sin embargo, el número de veces que se repite esta secuencia varía entre especies (6). Además, la longitud telomérica puede diferir entre individuos de la misma especie dependiendo de distintos factores, como la edad (7). En humanos, la longitud media es de unas 10 a 15 kilobases (1). De un valor parecido es la longitud telomérica de la vaca (6) y el perro (8), correspondiendo en ambas entre 12 y 23 kb. La mayoría de especies de ratón, como *Mus musculus*, poseen una longitud telomérica superior a 150 kb (9), mientras que la especie silvestre *Mus spretus* posee unos valores de entre 5 y 15 kb, más parecido a los telómeros humanos (10). Además, en aves la longitud telomérica suele ser de unas 5 a 20 kb (11). A pesar de estas diferencias, la longitud telomérica característica de cada especie se mantiene a lo largo de las distintas generaciones (12).



Figura 1. Representación esquemática de las repeticiones hexaméricas de los telómeros de vertebrados (5'-TTAGGGn). En la figura no se muestra el extremo 3' monocatenario. Imagen creada con BioRender.

Respecto a la estructura del final de los telómeros, en el extremo 3' se forma un saliente de cadena simple, de repeticiones TTAGGG (**Fig. 2**). Este saliente en vertebrados suele tener una longitud de entre 75 a 200 bp (13) y contiene proteínas shelterinas asociadas (1). En vertebrados, durante la elongación de la cadena por parte de la telomerasa, los telómeros adoptan una conformación lineal o “estado abierto”, siendo accesibles a la unión de la enzima. Esta conformación también aparece si hay alguna disfunción de las shelterinas (14) (**Fig. 2A**). Sin embargo, la mayor parte del tiempo los telómeros se encuentran en un “estado cerrado”. En esta conformación, el extremo se pliega formando un bucle denominado T-loop o bucle telomérico, en cuyo final, la cadena 5'→3' invade la doble hélice y se aparea con su secuencia complementaria 3'→5'. De esta manera se forma una segunda estructura denominada D-loop, más interna (15) (**Fig. 2B**).

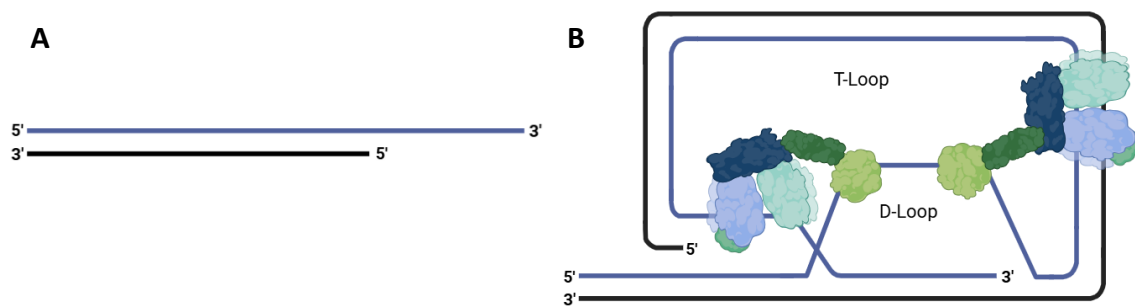


Figura 2. (A) Representación esquemática del “estado abierto” de los telómeros, accesible a la telomerasa (B) y del “estado cerrado”, inaccesible a la enzima. Vemos la estructura del T-Loop y D-Loop junto a proteínas shelterinas asociadas. En ambas figuras vemos representada esquemáticamente la cadena 3' monocatenaria. Imagen modificada de Oeseburg *et al.* (13).

Estos dos bucles tienen una función muy importante protegiendo a los telómeros de la erosión y evitando la fusión de los extremos de los cromosomas u otras interacciones perjudiciales (16). Además, también impiden la unión de la telomerasa, de modo que regulan la elongación de los telómeros (17). Las shelterinas presentes en esta estructura ayudan y permiten la formación de estos bucles. La longitud del T-loop varía según la especie e incluso dentro de una misma especie (18).

1.2. Función de los telómeros

Los telómeros son imprescindibles para el comportamiento normal de las células ya que abarcan numerosas funciones, tanto en animales como en plantas o levaduras (19). Su función principal consiste en asegurar la integridad de los extremos del ADN (20).

Además, tienen un papel importante en las divisiones celulares. Por un lado, facilitan el apareamiento de los cromosomas homólogos durante la profase I de la meiosis, ayudando en la formación de los quiasmas (21). Por otro lado, evitan errores en la segregación de los cromosomas durante la meiosis y mitosis celular, colaborando en la formación del huso acromático y en la correcta alineación de los cromosomas (17). También ayudan a anclar los cromosomas a la envoltura nuclear durante la replicación del material genético (22). De esta manera participan en la correcta propagación del contenido nuclear, generación tras generación celular, durante el envejecimiento natural del organismo.

1.3. Problema de la replicación final

La replicación del ADN no es perfecta ya que, debido al “problema de la replicación final”, la información genética de las células eucariotas no puede ser copiada íntegramente. Esto es debido a la ADN polimerasa, la cual necesita partir de un extremo 3'-OH libre para sintetizar la nueva cadena en dirección 5'→3'. Esta condición impide que la cadena rezagada sea replicada de forma continua, al encontrarse en sentido 5'→3'. Para solventar este problema, la replicación de esta cadena se realiza por segmentos, denominados “fragmentos de Okazaki”. Conforme avanza la horquilla de replicación, los primers se van uniendo a la cadena, actuando como punto de partida para la síntesis de cada fragmento (**Fig.3**). Cuando los primers se eliminan, los tramos que estos ocupaban terminan de replicarse partiendo del extremo 3'-OH del fragmento de ADN anterior (23).

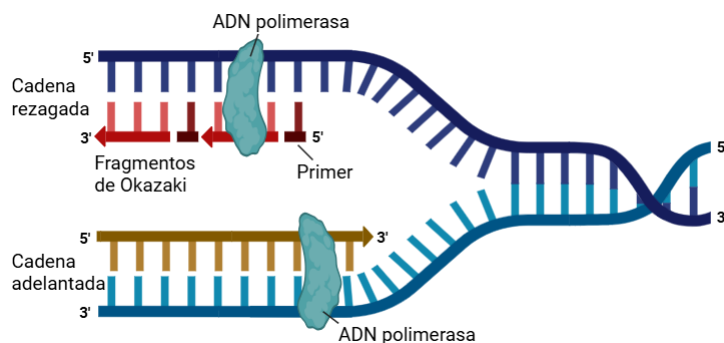


Figura 3. Esquema del mecanismo de replicación del ADN. Imagen creada con BioRender.

Sin embargo, el tramo del último primer no puede replicarse al no haber un fragmento de ADN previo. Esto supone la pérdida de una pequeña porción de nucleótidos en cada replicación, causando un acortamiento progresivo de los telómeros (4). En las células somáticas de muchos mamíferos se pierden entre 50 y 200 pb en cada división celular (7).

1.4. Mecanismos de alargamiento de telómeros

Para evitar esta pérdida de información genética, dentro de las células existen distintas moléculas y mecanismos que restauran la longitud telomérica.

1.4.1. Telomerasa

La telomerasa es una holoenzima ribonucleoproteica con actividad transcriptasa inversa capaz de restaurar la longitud de los telómeros tras cada división celular. Esto lo hace añadiendo *de novo* las repeticiones teloméricas características de cada organismo, al final del ADN, durante la replicación (16). Está formada por dos componentes. Uno es la parte catalítica proteica, denominada telomerasa transcriptasa inversa (TERT), que añade nucleótidos para elongar la cadena de ADN. El otro componente está conformado por una secuencia de ARN (TERC) que actúa como molde para TERT (24). Ambos componentes se mantienen muy conservados entre los mamíferos (6).

El mecanismo de acción consiste en la unión del complejo TERT-TERC a la cadena de ADN recién replicada. Primero, el molde de ARN (TERC) se acopla al extremo 3' de la cadena madre. A continuación, TERT, mediante su actividad transcriptasa inversa, transcribe el fragmento de ARN, y tras varios ciclos de extensión, la cadena madre queda más larga. Esto permite la unión de un primer y la actuación de la ADN polimerasa para completar la replicación del extremo perdido del cromosoma (14) (**Fig. 4**).

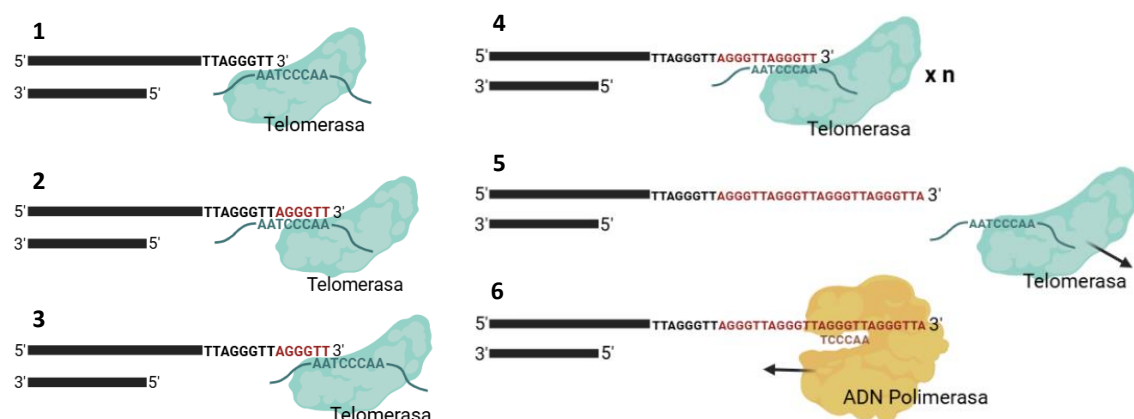


Figura 4. Esquema simplificado del mecanismo de acción de la telomerasa. Imagen modificada de Nicholls *et al.* (14).

Además, las proteínas shelterinas también influyen sobre la acción de la telomerasa ya que su actividad enzimática está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa que mantiene la longitud telomérica lo más estable posible (3).

No obstante, el gen que codifica la telomerasa no se expresa igual en todos los tipos celulares. El ovocito presenta una muy baja actividad enzimática (25), pero esta se activa tras la fecundación, a partir de la fase de mórula (6). Más tarde durante el desarrollo embrionario su actividad se detiene en la mayoría de tejidos y tras el nacimiento, se mantiene únicamente en unos pocos tipos celulares (26). Esta enzima está principalmente activa en las células de la línea germinal, en las células madre y en las células somáticas con alta capacidad proliferativa, como las células epiteliales y gastrointestinales (4). Sin embargo, la mayoría de las células somáticas carecen de su actividad (7).

1.4.2. Mecanismos moleculares de alargamiento alternativo de telómeros (ALT)

La elongación de los telómeros también es posible mediante sistemas independientes de la telomerasa. Estos son los mecanismos moleculares de alargamiento alternativo de telómeros (ALT), en los que los telómeros se replican usando como molde los de su cromátida hermana o los de otro cromosoma (27). Un tipo concreto de ALT es el intercambio telomérico entre cromátidas hermanas (2), basado en la recombinación homóloga en los extremos cromosómicos. De esta manera, una cromátida usa como molde la secuencia telomérica de su cromátida hermana para sintetizar nuevo material genético, compensando así la pérdida de información y alargando los telómeros (**Fig. 5**).

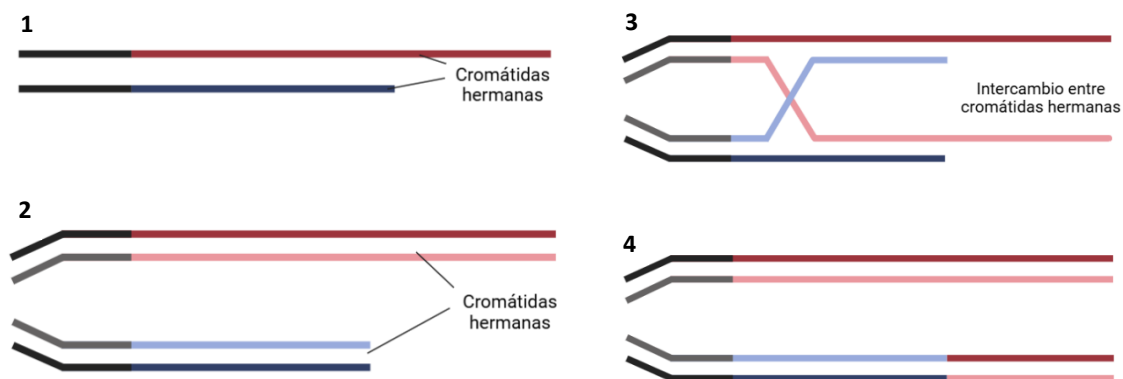


Figura 5. Esquema del mecanismo de intercambio telomérico de cromátidas hermanas. Imagen modificada de Nicholls *et al.* (4).

Los mecanismos ALT no están presentes en todos los tipos celulares, siendo muy escasos en la mayoría de las células somáticas (25). Sin embargo, algunas células tumorales, cuando no consiguen adquirir actividad telomerasa, activan estos mecanismos para elongar sus telómeros y asegurar su supervivencia (4). Además, en etapas tempranas del embrión, antes de la fase de mórula, los telómeros se alargan mediante mecanismos ALT.

1.4.3. Limitaciones de los mecanismos de alargamiento de los telómeros

En las células carentes o con muy bajos niveles de mecanismos de alargamiento telomérico, los telómeros se acortan progresivamente con cada división celular (12). Cuando alcanzan una longitud crítica, se activa una respuesta al daño del ADN que detiene el ciclo celular e impide nuevas divisiones (28). Esto suele provocar fenómenos como la senescencia replicativa, un estado en el que la célula deja de proliferar y dividirse, o la apoptosis o muerte celular programada, que elimina las células de forma controlada (21). La pérdida de función de los telómeros fomenta la aparición de alteraciones, las cuales aceleran el envejecimiento del individuo (16). Aumenta la inestabilidad genómica, las anomalías cromosómicas (22) y la frecuencia con la que los telómeros son reconocidos como roturas de cadena, lo que activa mecanismos de reparación de bases o provoca fusiones intercromosómicas (20). Todo ello puede conducir al desarrollo de enfermedades crónicas, degenerativas e incluso la transformación celular neoplásica y aparición de tumores (29).

Además, las células que presentan telomerasa pueden perder el control de su expresión y sufrir un acortamiento telomérico progresivo (19). Por el contrario, muchas células cancerígenas modulan y activan esta enzima para mantener sus telómeros y asegurar su supervivencia (30). Se ha detectado actividad telomerasa en el 80-90 % de los tumores (31). Asimismo, se ha visto que existe una relación inversa entre el tamaño de la especie y la cantidad de telomerasa en sus células somáticas (32). Este fenómeno puede deberse a una adaptación evolutiva para disminuir el riesgo de cáncer en organismos con un gran número de células ya que presentan un mayor riesgo de malignización celular (33).

1.4.3.1. Otras causas de acortamiento de telómeros

Otras razones por las que se acortan los telómeros son los factores ambientales como una mala alimentación (20), la exposición a agentes tóxicos o el estrés (1). Un estudio mostró que mujeres sometidas a un estrés prolongado poseían una longitud telomérica similar a la de mujeres 10 años mayores sin estrés (34). Además, los telómeros de los mamíferos son muy susceptibles a la oxidación por las especies reactivas de oxígeno, resultantes del metabolismo celular. Esto se debe a que su secuencia es rica en guanina, una base nitrogenada fácilmente oxidable, que al oxidarse se convierte en moléculas como la 8-oxoguanina. Esta molécula puede generar roturas en el ADN afectando a la estabilidad de los telómeros (35).

1.5. Reproducción y telómeros

1.5.1. Longitud telomérica en gametos y embriones

Aunque las restricciones éticas limitan la experimentación con gametos y embriones humanos, hay trabajos que han contribuido al conocimiento de su longitud telomérica. Turner *et al.*, mediante hibridación fluorescente *in situ*, observaron una longitud media de $11,41 \pm 0,81$ kb en ovocitos humanos inmaduros y de $8,79 \pm 0,86$ kb en ovocitos maduros (36). Keefe *et al.* reportaron resultados similares de $7,5 \pm 1,17$ kb en ovocitos maduros (17). Estos resultados sugieren un acortamiento progresivo de los telómeros durante la maduración ovocitaria. Sin embargo, tras la fecundación, la longitud telomérica se incrementa, primero por mecanismos ALT y después por la telomerasa (25). En ratón, los telómeros aumentan de 16 kb en ovocitos a unas 23–27 kb en las primeras etapas del embrión (37), y en mórulas bovinas la longitud es de unas 12 kb (26). Además, los telómeros de los ovocitos se acortan con la edad de la mujer, ya que se forman antes del nacimiento y permanecen décadas detenidos en la meiosis I, acumulando estrés oxidativo (38). Por otro lado, la longitud telomérica de los espermatozoides ha sido ampliamente estudiada, situándose entre 10 y 14 kb en humanos (39) y alrededor de 12 kb en bóvidos (40). Numerosas revisiones señalan que los espermatozoides de hombres fértiles presentan telómeros más largos que los de hombres infértiles (41). Sin embargo, al contrario que los ovocitos, en los espermatozoides la longitud telomérica aumenta con la edad. Esto ocurre porque se sintetizan continuamente a partir de espermatogonias, que expresan telomerasa, lo que favorece el alargamiento progresivo de los telómeros (42).

1.5.2. Reproducción asistida y telómeros

La aparición de las técnicas de reproducción asistida (TRAs) ha permitido abordar los problemas de infertilidad de una forma exitosa. Procedimientos como la fecundación *in vitro* (FIV), la inseminación artificial (IA) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides constituyen en la actualidad herramientas básicas para conseguir una correcta concepción. Además, las TRAs no solo se utilizan en humanos, sino que existe un gran número de laboratorios donde se estudian y emplean estas técnicas en animales, tanto a nivel experimental como comercial. En la industria ganadera, son esenciales para responder a la creciente demanda de productos de origen animal (43). La inseminación artificial favorece la mejora genética mediante la selección de semen y reduce los riesgos sanitarios. Asimismo, la transferencia embrionaria, aparte de aumentar el número de

animales de interés genético, facilita el transporte y almacenamiento de los embriones (44). Aunque las TRAs ofrecen grandes beneficios, los problemas en el establecimiento del embarazo o la aparición de complicaciones durante su desarrollo son más comunes que en los casos de reproducción natural, en humanos y animales fértiles (45).

Es de especial interés cuestionarse si los problemas asociados a las TRAs podrían deberse, en parte, a alteraciones en la longitud telomérica. Existen evidencias que avalan esta teoría. En 2022, un estudio mostró que el cultivo *in vitro* disminuía, hasta suprimir, la actividad de la telomerasa en blastocistos murinos a día de desarrollo 3,5. También se observó que la longitud telomérica leucocitaria de ratones nacidos por transferencia en estadio de blastocisto era más corta que en los transferidos en estadio de cleavage. En humanos, este estudio determinó que los niños nacidos por TRAs presentaban telómeros más cortos que los concebidos de forma natural (46). Además, otros estudios han asociado el acortamiento telomérico con dificultades para establecer el embarazo. Keefe *et al.* descubrieron que los ovocitos sobrantes de mujeres que no lograron el embarazo tras la FIV mostraban telómeros más cortos que los de mujeres que sí lo habían conseguido. Además, ninguna de las mujeres con ovocitos sobrantes de longitud telomérica inferior a 6,32 kb consiguió una fecundación exitosa (17).

A partir de lo expuesto, se puede deducir que el acortamiento telomérico podría desempeñar un papel negativo dual, actuando tanto como una posible consecuencia de las TRAs, como un factor implicado en las complicaciones durante la fecundación y el embarazo. No obstante, la escasez de estudios impide establecer con certeza el impacto real de los distintos tipos de TRAs sobre la dinámica y la longitud de los telómeros.

2. Hipótesis y objetivos

El presente trabajo plantea la hipótesis de que la aplicación de técnicas de reproducción asistida en el ganado bovino afecta a la longitud telomérica leucocitaria de estos animales, así como a la velocidad de acortamiento de los telómeros. Por todo ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la longitud telomérica relativa leucocitaria (LTRL), a partir de muestras de sangre, en una colonia de animales de la especie *Bos Taurus*, desde su nacimiento hasta los 5 años de edad, mediante PCR cuantitativa.

- 2) Evaluar la relación entre la LTRL de estos individuos y el tipo de técnica de reproducción asistida empleada para obtenerlos, concretamente la inseminación artificial y la transferencia de embriones producidos *in vitro*.
- 3) Determinar si existe alguna relación entre la LTRL de estos individuos y el sexo.
- 4) Determinar si la LTRL puede utilizarse como valor predictivo de la supervivencia de estos animales.

3. Materiales y métodos

3.1. Animales

Los animales incluidos en el estudio fueron generados y cuidados siguiendo la Política Española de Protección Animal RD 53/2013, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 2010/63/UE. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el CEEA (Comité Ético de Experimentación Animal) de la Universidad de Murcia (España) y autorizados por la Dirección General de Agricultura, Ganadería, Pesca y Acuicultura de la Región de Murcia (nº A13170705).

Para este estudio se utilizaron un total de 19 individuos de la especie *Bos Taurus*, 13 machos y 6 hembras, los cuales fueron generados anteriormente para su uso en otro estudio (47). Desde su nacimiento, fueron alojados en la Granja Veterinaria de la Universidad de Murcia (España). Todos los animales se generaron mediante técnicas reproductivas, 12 por transferencia de embriones producidos *in vitro* y 7 por inseminación artificial (IA). Los 12 ejemplares del grupo de embriones producidos *in vitro* se generaron a partir de ovarios obtenidos de vacas de matadero (cruce de razas Charolais y/o Limousin). Los embriones producidos *in vitro* se transfirieron a vacas receptoras de raza Holstein. Además, a 5 de ellos, 1 hembra y 4 machos (grupo RF-IVP), se les añadieron fluidos reproductivos (fluido oviductal del día 1 al 4 y fluido uterino del día 4 al 8) al medio de cultivo embrionario, mientras que a los otros 7, 3 hembras y 4 machos (grupo C-IVP), se les añadió albúmina de suero bovino, como única fuente de proteínas en el medio de cultivo embrionario. Por su parte, los ejemplares del grupo IA, 2 hembras y 5 machos (grupo AI), se generaron mediante sincronización e inseminación artificial de vacas Holstein. En todos los casos se utilizó el semen del mismo toro (raza Asturiana de los Valles).

Respecto a su alimentación, hasta los 3 meses de edad, los terneros fueron alimentados a base de pienso de lactancia y heno *ad libitum*. A partir de los 3 meses se les dio una mezcla de grano y heno y a partir de los 6 meses pienso y paja. El agua siempre se suministró *ad libitum*.

3.2. Obtención de muestras de sangre

La extracción de sangre se realizó a través de la vena yugular, en animales menores de 6 meses y de la vena caudal, en animales mayores de 6 meses. La sangre se introdujo en tubos BD Vacutainer con heparina de litio como anticoagulante. Todas las muestras de sangre se mantuvieron en congeladores a -80°C hasta la extracción del ADN.

Las extracciones de sangre de los 19 animales incluidos en el estudio se realizaron entre agosto de 2018 y diciembre de 2023, en el momento del nacimiento, en intervalos de 3 días hasta los 15 días de edad, cada 15 días hasta el año de edad y cada de 6 meses a partir del año de edad. No a todos los ejemplares se les realizó el mismo número de extracciones sanguíneas ya que varios murieron o fueron sacrificados a lo largo del estudio, llegando hasta el final del estudio 9 individuos.

3.3. Extracción de ADN

Entre las muestras de sangre disponibles, se extrajo ADN genómico (ADNg) a los días 3, 15, 30, 45, 85, 180, 300, 360, 550, 800, 1000, 1100, 1300, 1500, 1700 y 1800 de edad, aproximadamente, según el animal. No todas las muestras de ADNg extraído pasaron los controles de calidad para ser consideradas en el estudio. La tabla con la edad exacta de las muestras incluidas en el estudio para cada animal se recoge en el **Anexo I (Tabla 1)**.

Para la extracción de ADNg a partir de sangre completa anticoagulada con heparina, primero se lisaron los eritrocitos usando Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche, 11814389001). Para ello, se mezclaron 600 µl de la solución de lisis con 200 µl de sangre descongelada a 4°C y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente (15-20°C). Luego se centrifugaron 30 segundos a 14000 g (Eppendorf® Centrifuge 5418R) y se eliminó el sobrenadante, dejando solo el pellet con los leucocitos y unos 10 µl de líquido residual.

La extracción de ADNg se realizó mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, 69506) siguiendo el protocolo del fabricante. A los tubos con el pellet se les añadió 90 µl

de PBS (pH 7.2, 12,5 mM KH_2PO_4 (P5655, Sigma-Aldrich), 37,5 mM K_2HPO_4 (P3786, Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl (S5886, Sigma-Aldrich)). A continuación, se añadieron 20 μl de Proteinasa K y 200 μl del buffer de lisis AL. Los tubos se incubaron 10 minutos a 56°C con agitación (SI30H Hybridization Shaking Incubator, Stuart), se realizó un vórtex de 10 segundos y se dejaron en el horno otros 5 minutos. Después, a cada tubo se añadió 200 μl de etanol puro (493546-1L, Sigma-Aldrich) y se les aplicó vórtex. La mezcla se incorporó a las columnas DNeasy Mini Spin Columns y se centrifugó 1 minuto a 6000 g. A continuación, se realizaron dos lavados con 300 μl de tampón AW1, centrifugando 1 minuto a 6000 g y dos lavados con 300 μl de tampón AW2, centrifugando 3 minutos a 16900 g. Para eliminar cualquier resto de tampones de lavado, se realizó una centrifugación adicional de 3 minutos a 16900 g. Para la elución, las columnas se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 200 μl de tampón de elución AE, incubándose 3 minutos a 56°C y centrifugándose 1 minuto a 6000 g. Para aumentar la concentración de las muestras, el líquido eludido se reincorporó en las columnas, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 6000 g. Finalmente, se tomó una alícuota del ADN extraído para evaluar su pureza, integridad y concentración y el resto se almacenó a -80°C hasta su análisis por qPCR.

3.4. Evaluación de la calidad del ADNg

Tras la extracción del ADNg leucocitario se evaluó la pureza, la integridad y la concentración de cada muestra. Solo aquellas muestras que cumplieron con los requisitos, descritos a continuación, fueron analizadas mediante qPCR.

3.4.1. Integridad del ADNg

La integridad del ADNg se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se prepararon geles al 0,5% de agarosa (A9539, Sigma-Aldrich), en tampón Tris acetato EDTA (TAE; B49, ThermoScientific). El colorante utilizado para la visualización del ADN fue RedSafe™ (21141, iNtRON). Las muestras fueron previamente mezcladas con el tampón de carga (ThermoScientific™ 6X, 11541575). Como marcador de peso molecular se usó DirectLoad™ 1 kb DNA Ladder (DPLUS-1K, Sigma-Aldrich). A cada gel se le aplicó una corriente eléctrica de 100 voltios durante 45 minutos (Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, Bio-Rad). La visualización de las bandas se realizó mediante el Transiluminador UV UView™ Mini Transilluminator (Bio-Rad) (**Fig. 6**).

En base a la integridad de la banda, a cada muestra se le otorgó un valor de calidad, en una escala del 1 al 5, como describieron Seeker *et al.* (48). El valor 1 corresponde a bandas de ADN nítidas y compactas, sin estela. El valor 2 a bandas nítidas claramente distinguibles de la pequeña estela. El valor 3 se le atribuye a la presencia de una estela de ADN indistinguible de la banda, pero con la mayoría del ADN a la misma altura que las bandas de valor 1 y 2. El valor 4 corresponde a una estela de ADN, sin presencia de banda. Y el valor 5 a una migración del ADN muy marcada con estela difusa del ADN y sin banda. Se seleccionaron solo las muestras con un valor de calidad de banda de 1 o 2.

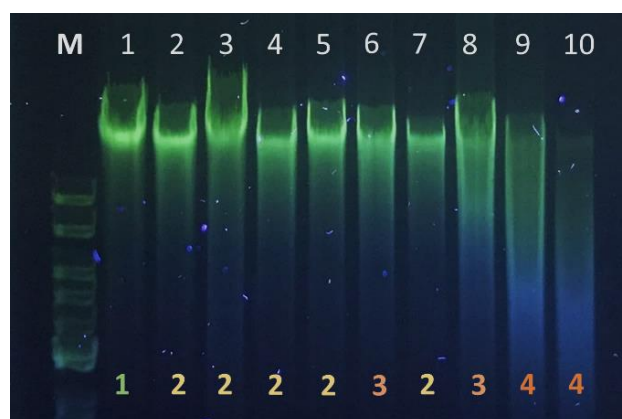


Figura 6. Ejemplo de uno de los geles de agarosa del estudio. M: marcador de pesos moleculares. Números del 1 al 10 en la fila superior: número del pocillo con su correspondiente muestra. Números entre el 1 y el 4 en la fila inferior: valor de calidad asociado a cada banda.

3.4.2. Concentración y pureza del ADNg

La concentración y pureza del ADNg extraído se valoró utilizando el espectrofotómetro de micromuestra Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific). La concentración se determinó mediante el valor de absorbancia obtenido a 260 nm. Además, la relación de absorbancia a 260nm/280nm se utilizó para detectar contaminación por compuestos aromáticos como proteínas y fenoles, o incluso ARN y la relación de absorbancia a 260nm/230nm para comprobar contaminación por sales, fenoles y otros contaminantes. Se utilizaron solo aquellas muestras con una relación $A_{260/280} > 1,7$ y una relación $A_{260/230} > 1,7$.

La concentración de las muestras seleccionadas para la qPCR que cumplieron con los criterios de integridad y pureza, se midió mediante el dispositivo de cuantificación Qubit (Thermo Fisher Scientific). Con este dispositivo se obtuvieron valores más precisos de concentración ya que puede diferenciar entre dsDNA, ssDNA y RNA. Esto se debe a su método de colorimetría basado en fluorescencia, con el cual detecta solamente moléculas específicas, a diferencia del Nanodrop que mide toda absorción a 260 nm.

3.5. Limpieza de muestras de ADN

Las muestras que superaron el control de integridad, pero obtuvieron valores fuera de los límites de la relación de absorbancia A260/280 y A260/230, fueron sometidas a un proceso de limpieza. Este se realizó utilizando el kit OneStep PCR Inhibitor Removal (D6030, Zymo Research), basado en el filtrado del ADN, por centrifugación, a través de una matriz situada en una columna de limpieza. Tras la limpieza, se midió de nuevo la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific).

3.6. qPCR

La longitud telomérica relativa leucocitaria se determinó mediante qPCR. Como gen de referencia se utilizó el gen de copia única GTF2I. Se analizaron 160 muestras de ADN genómico bovino. Se diseñaron primers específicos para la secuencia telomérica y el gen de copia única. Las secuencias de los primers, directos e inversos, las temperaturas de alineamiento y los tamaños de los amplicones se detallan en el **Anexo II (Tabla 2)**.

Para cada reacción de amplificación de la secuencia telomérica y del gen de copia única, se utilizó 5 µl de mezcla Power up SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de ADN genómico, a una concentración de 1 ng/µl y una concentración de 100 nM de cada uno de los primers directo e inverso. El volumen total final para cada muestra fue de 10 µl. Cada muestra se analizó por triplicado en placas de 384 pocillos y cada gen se analizó en placas independientes. Tanto los telómeros como el gen de copia única se amplificaron en unas condiciones de reacción similares, con alguna variación. Se comenzó con una etapa inicial de desnaturalización de 2 minutos a 95°C, seguida de 42 ciclos que consistieron en una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y un alineamiento-extensión a 62°C durante 1 minuto, para los telómeros y a 64°C durante 1 minuto, para el gen de copia única. La medición de las señales fluorescentes se realizó durante la etapa de alineamiento-extensión. A continuación, se generó la curva de disociación, con un aumento progresivo de la temperatura desde 60°C hasta 95°C en incrementos de 0,075°C/s con adquisición continua de la señal. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando el equipo QuantStudio 5 (Applied Biosystem).

Dado el gran número de muestras, se emplearon 2 placas para cada gen, por ello se incluyeron las mismas 3 muestras en las dos placas para corregir la variación entre placas. Para determinar la eficiencia de la reacción se elaboró una curva de calibración estándar,

de 5 puntos, para cada placa, a partir de diluciones seriadas 1/10 de una muestra estándar de ADN genómico bovino, con concentraciones estándar de 16 ng/μl para telómeros y 30 ng/μl para el gen de copia única. Los resultados mostraron que las eficiencias de la PCR oscilaron entre el 95% y el 105% y el coeficiente de correlación (R^2) se ubicó en el rango de 0,997 a 0,998.

3.6.1. Normalización de los valores de la qPCR

Los valores de LTRL se calcularon como describió Hellemans *et al.* (49).

$$LTRL = \left(\frac{E_{TEL}^{Cq_{TEL\text{ calibrador}} - Cq_{TEL\text{ muestra}}}}{E_{GTF2i}^{Cq_{GTF2i\text{ calibrador}} - Cq_{GTF2i\text{ muestra}}}} \right) / \text{Factor de calibración}$$

LTRL es la longitud telomérica relativa leucocitaria. E es la eficiencia, obtenida mediante la curva de calibración estándar incluida en cada placa. Cq es el número medio de ciclos en el que se detecta la señal fluorescente de ADN para cada muestra. El calibrador se calcula a partir del promedio de todos los valores Cq de las muestras incluidas en una misma placa. Se calculó un calibrador distinto para cada placa. El factor de calibración es la media geométrica de los valores normalizados de las tres muestras que fueron repetidas en todas las placas. Este valor normalizado corresponde a

$$\frac{E_{TEL}^{Cq_{TEL\text{ calibrador}} - Cq_{TEL\text{ muestra}}}}{E_{GTF2i}^{Cq_{GTF2i\text{ calibrador}} - Cq_{GTF2i\text{ muestra}}}}.$$

3.6.2. Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó mediante el software estadístico R (versión 4.1.1). Se evaluó la normalidad y homogeneidad de varianzas mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Para analizar las diferencias en la LTRL según la técnica de reproducción asistida y el sexo, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA), realizando la prueba post-hoc de Tukey en el caso de comparaciones múltiples. Para evaluar la relación entre la supervivencia y la longitud telomérica, tanto inicial como al año y a los 2,5 años de edad, realizaron dos tipos de análisis, un análisis de regresión de Cox de riesgos proporcionales, usando la LTRL como variable continua, y un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier tras dividir las medidas de LTRL en tres grupos (“Corta”, “Media” y “Larga”). La prueba Log-Rank se aplicó para evaluar la significancia de estas

categorías. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Longitud telomérica relativa leucocitaria y técnicas de reproducción asistida

Para evaluar la relación entre la longitud telomérica relativa leucocitaria y las técnicas de reproducción asistida, se agruparon las muestras en 8 rangos de edad, abarcando desde el nacimiento hasta los 1195 días. A partir de esa edad el número de muestras era insuficiente como para realizar cálculos estadísticos. Los rangos establecidos fueron: primer grupo (2–13 días), segundo grupo (26–57 días), tercero (2,7–3 meses), cuarto (5,5–6 meses), quinto (9–12 meses), sexto (1,5–2,1 años), séptimo (2,4–2,8 años) y octavo (2,9–3,3 años).

Por lo general, el grupo de técnicas de reproducción asistida que obtuvo los mayores valores de LTRL fue RF-IVP. Observamos una longitud telomérica significativamente superior en el grupo RF-IVP respecto a AI en varios de los rangos de edad analizados. Concretamente el tercero ($n = 19$, $p = 0,03$) (**Fig. 7C**), el cuarto ($n = 13$, $p = 0,00$) (**Fig. 7D**) y el quinto ($n = 15$, $p = 0,03$) (**Fig. 7E**). Aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, también observamos una tendencia hacia una longitud telomérica mayor en el grupo RF-IVP comparado con C-IVP en dos rangos de edad, el primero ($n = 19$, $p = 0,08$) (**Fig. 7A**) y el tercero ($n = 19$, $p = 0,05$) (**Fig. 7C**).

Por otro lado, el grupo C-IVP resultó tener una LTRL significativamente superior comparado con AI en el cuarto rango de edad ($n = 13$, $p = 0,02$) (**Fig. 7D**) y en el octavo ($n = 13$, $p = 0,01$). Además, en este último rango, el grupo C-IVP también obtuvo una longitud telomérica significativamente mayor respecto al grupo RF-IVP ($p = 0,03$) (**Fig. 7H**).

Sin embargo, en el segundo ($n = 16$) (**Fig. 7B**), sexto ($n = 16$) (**Fig. 7F**) y séptimo ($n = 18$) (**Fig. 7G**) rango de edad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la longitud telomérica entre los tres grupos experimentales ($p > 0,05$).

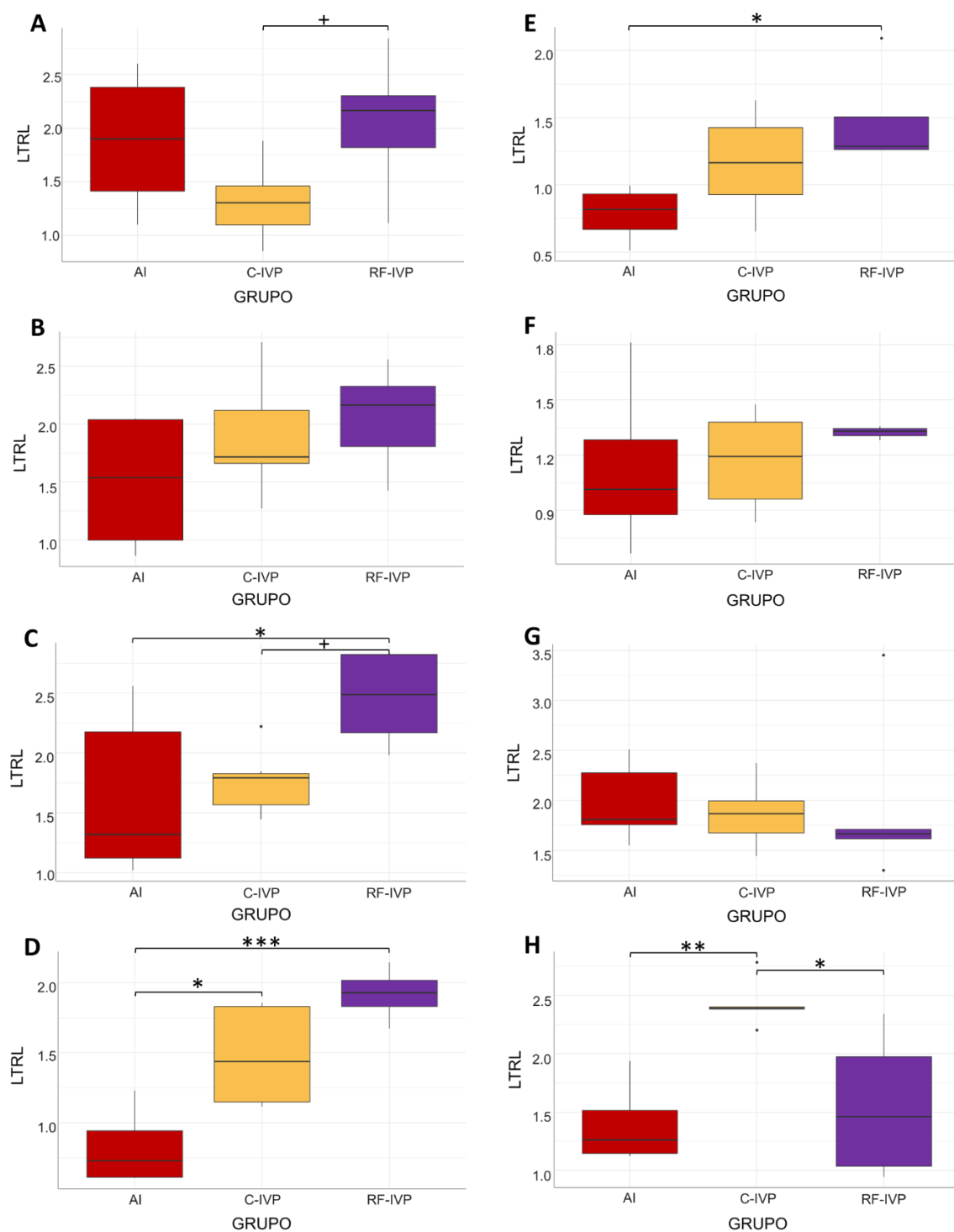


Figura 7. Boxplots de la longitud telomérica relativa leucocitaria (LTRL) según el grupo experimental (AI, C-IVP y RF-IVP) en ocho rangos de edad (**A-H**): A (2-13 días), B (26-57 días), C (2,7-3 meses), D (5,5-6 meses), E (9-12 meses), F (1,5-2,1 años), G (2,4-2,8 años) y H (2,9-3,3 años). El número de asteriscos indica el nivel de significación: * ($0,01 < p < 0,05$), ** ($0,001 < p \leq 0,01$) y *** ($p \leq 0,001$). El símbolo + ($0,05 \leq p \leq 0,10$) indica la tendencia.

4.2. Longitud telomérica relativa leucocitaria y sexo

La relación entre la longitud telomérica relativa leucocitaria y el sexo se evaluó de igual manera que con las TRAs, agrupando las muestras en los mismos 8 rangos de edad (**Fig. 8 A-H**). No se encontraron diferencias significativas en la LTRL entre machos y hembras en ningún tramo de edad. Solo en el tramo comprendido entre los 17,5 y los 25,2 meses de edad se observó una tendencia con las hembras presentando una longitud telomérica superior a los machos ($p = 0,05$).

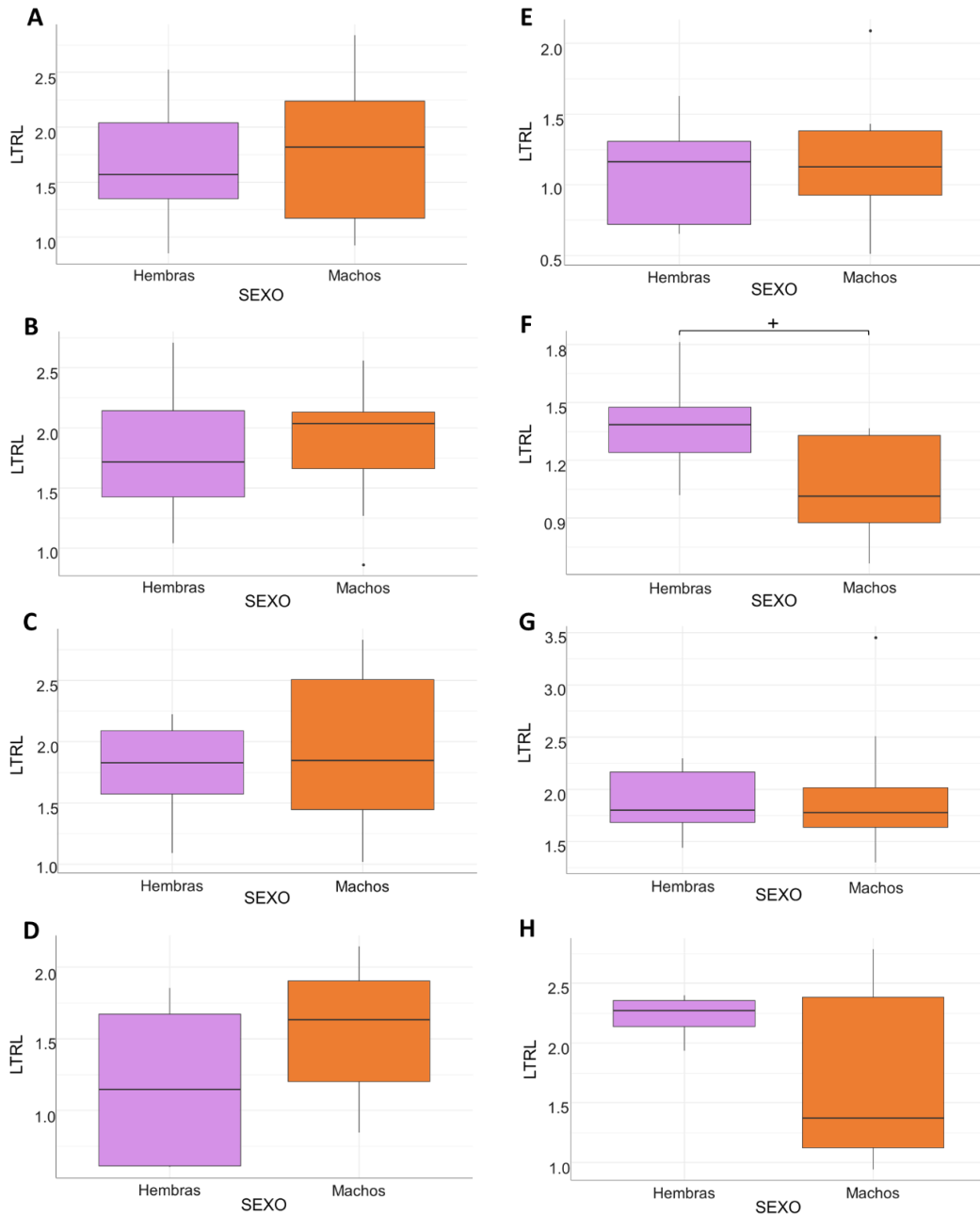


Figura 8. Boxplots de la longitud telomérica relativa leucocitaria (LTRL) según el sexo, en ocho rangos de edad (**A-H**): A (2-13 días), B (26-57 días), C (2,7-3 meses), D (5,5-6 meses), E (9-12 meses), F (1,5-2,1 años), G (2,4-2,8 años) y H (2,9-3,3 años). El símbolo + indica la tendencia ($0,05 \leq p \leq 0,10$).

4.3. Longitud telomérica relativa leucocitaria y supervivencia

La relación entre la longitud telomérica relativa leucocitaria y la supervivencia se evaluó para tres momentos distintos de la vida de los animales, al inicio, al año y a los 2,5 años de edad.

Se consideró como longitud telomérica inicial las medidas de las muestras sanguíneas obtenidas entre los 2 y 13 días de edad, según el animal ($n = 19$). En el análisis de supervivencia, el modelo de regresión de Cox indicó que la longitud telomérica relativa leucocitaria inicial no tuvo un efecto significativo sobre la probabilidad de supervivencia de los animales ($p = 0,16$). Del mismo modo, el análisis por terciles de longitud telomérica inicial tampoco mostró una asociación significativa con la supervivencia ($p = 0,43$) (**Fig. 9**).

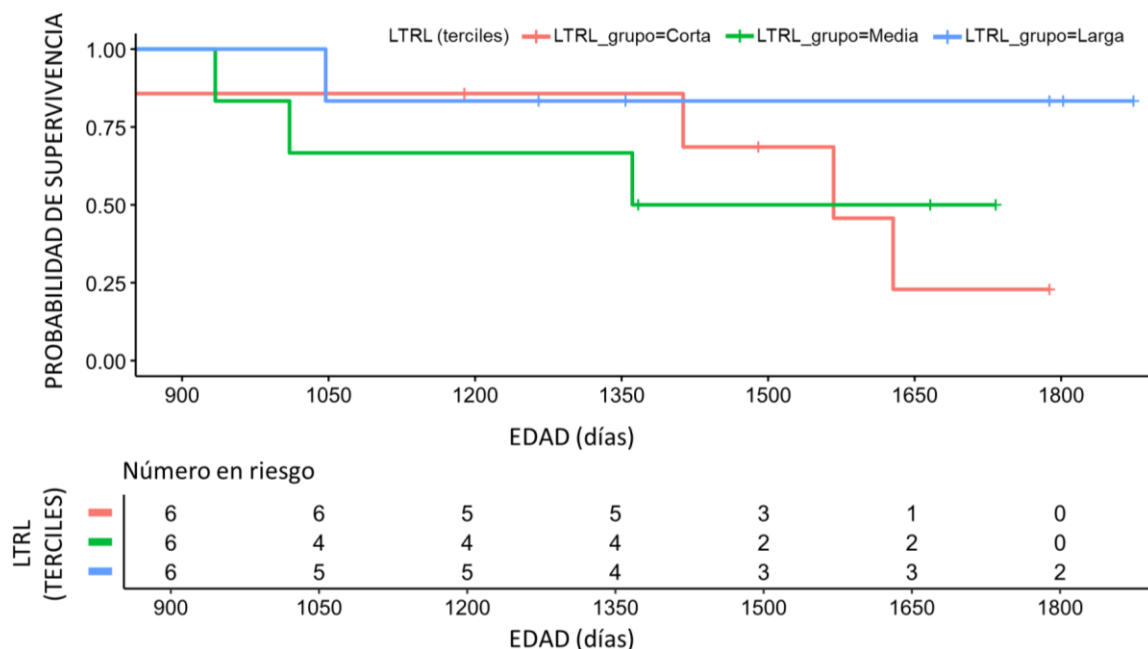


Figura 9. Representación gráfica de los tres grupos definidos por terciles de LTRL inicial. Separamos la longitud telomérica inicial en 3 grupos: “Corta”, “Media” y “Larga”. Los puntos de corte de los terciles son: Corta $< 1,3$; Larga $> 1,9$.

Tampoco se halló una relación significativa entre la supervivencia y la longitud telomérica leucocitaria al año de vida de los animales. Como longitud telomérica al año de edad se utilizaron aquellos valores obtenidos entre los días 300 y 360, dependiendo del animal ($n = 15$). El modelo de regresión de Cox reveló un valor de $p = 0,28$. Además, el análisis por terciles de longitud telomérica al año de vida tampoco mostró una asociación significativa con la supervivencia ($p = 0,18$) (**Fig. 10**).

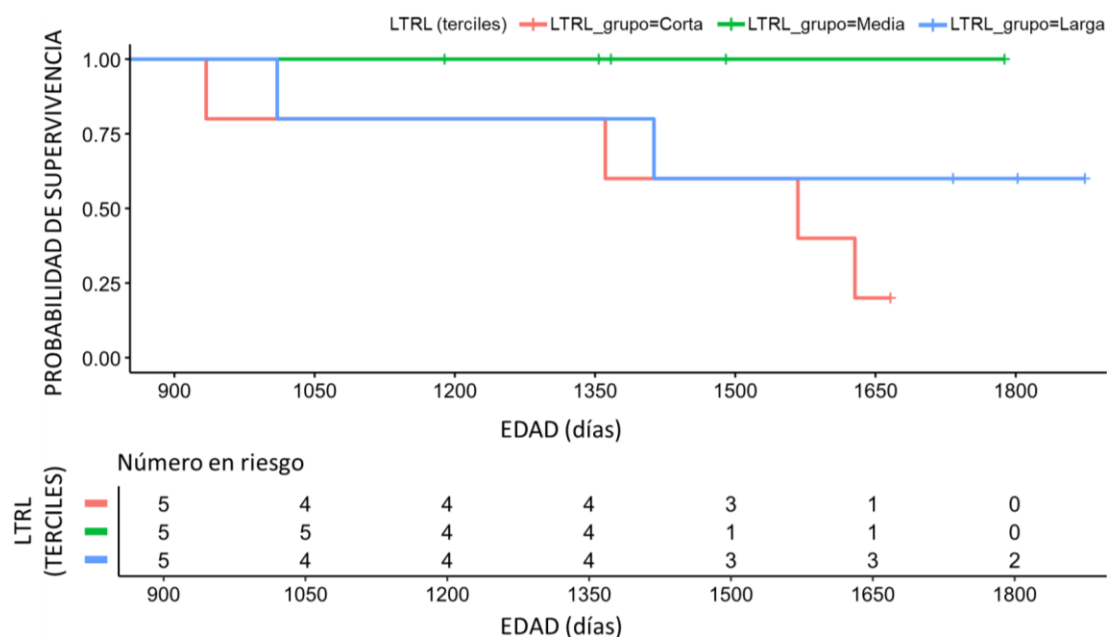


Figura 10. Representación gráfica de los tres grupos definidos por terciles de LTRL al año de vida. Separamos la longitud telomérica al año de vida en 3 grupos: “Corta”, “Media” y “Larga”. Los puntos de corte de los terciles son: Corta < 0,95; Larga > 1,28.

Por último, no se halló una asociación significativa entre la supervivencia y la LTRL a los 2,5 años de vida. Como longitud telomérica a esta edad se usaron los valores obtenidos entre los días 877 y 991, según el animal ($n = 17$). Se obtuvo una $p = 0,56$ en el modelo de regresión de Cox. Tampoco se reveló una relación significativa con la supervivencia en el análisis por terciles de longitud telomérica a los 2,5 años ($p = 0,89$) (**Fig. 11**).

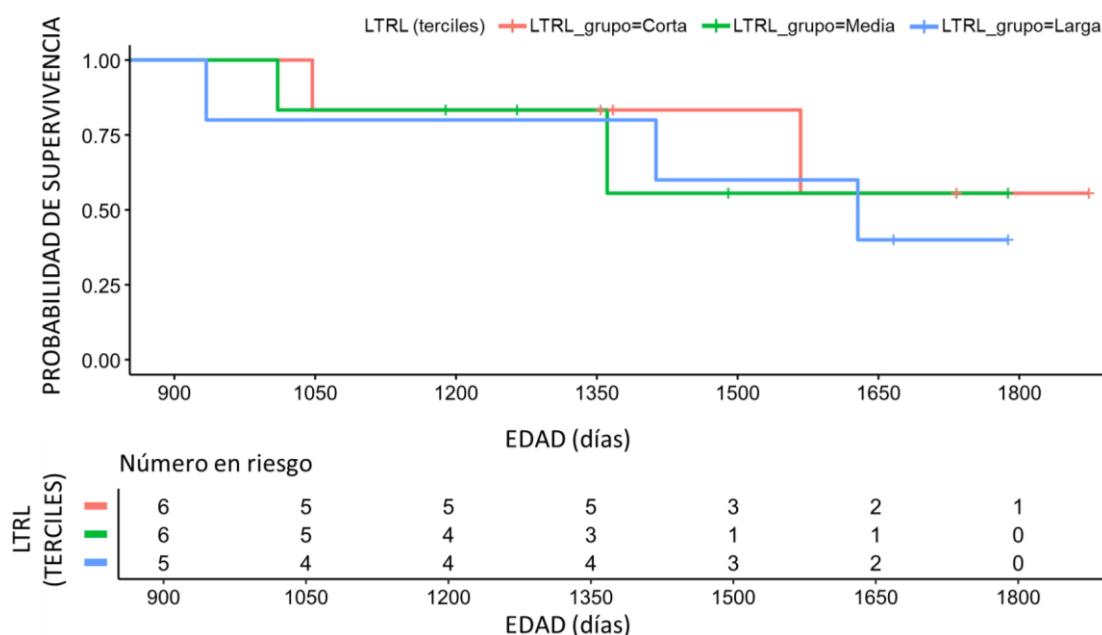


Figura 11. Representación gráfica de los tres grupos definidos por terciles de LTRL a los 2,5 años de vida. Separamos la longitud telomérica a los 2,5 años de vida en 3 grupos: “Corta”, “Media” y “Larga”. Los puntos de corte de los terciles son: Corta < 1,72; Larga > 1,92.

5. Discusión

En este trabajo se utilizó la técnica de qPCR para medir y comparar la longitud telomérica relativa leucocitaria a lo largo de la vida de 19 animales de la especie bovina concebidos mediante diferentes técnicas de reproducción asistida. Se determinó que la transferencia de embriones producidos *in vitro*, con fluidos reproductivos como suplemento para el medio de cultivo, generaba animales con las mayores longitudes teloméricas. Sin embargo, no se hallaron asociaciones significativas entre la longitud telomérica y el sexo ni la supervivencia de los individuos.

Las técnicas de reproducción asistida se llevan aplicando en el ganado bovino desde hace varias décadas. A partir del 1970 la transferencia embrionaria bovina se implementó a nivel comercial. Desde entonces, se han perfeccionado y explotado otros métodos reproductivos, como la criopreservación y la fecundación *in vitro*, los cuales consolidan la base actual de la producción ganadera bovina en todo el mundo (50). Bien es sabido que, a pesar de sus beneficios, las TRAs están asociadas a distintas complicaciones y defectos durante el desarrollo embrionario (51). Estos efectos han sido estudiados en numerosos modelos bovinos. En un artículo del 2019 se describió como el uso de las TRAs no solo podía afectar al desarrollo embrionario sino también a la salud de la descendencia (52). Además, el uso de TRAs en la especie bovina provoca defectos epigenéticos, alterando la impronta genética y los patrones de metilación del ADN e histonas (53). Sin embargo, todavía no sabemos con exactitud qué tecnologías específicas generan un mayor o menor impacto en los telómeros. Este estudio busca identificar cuál de estas técnicas afecta en mayor medida a la longitud telomérica, lo cual podría relacionarse con una mayor predisposición a alteraciones en la descendencia.

Como se describió anteriormente, hallamos una asociación estadísticamente significativa entre el tipo de TRA y la LTRL, aunque no en todos los rangos de edad analizados. Esta evidencia nos acerca a nuestro objetivo y nos permite contrastar nuestros resultados con investigaciones anteriores, en las que se han evaluado, por ejemplo, los distintos resultados de la inseminación artificial y la producción *in vitro* de embriones a nivel reproductivo. Lafontaine *et al.*, evaluaron los efectos a largo plazo y hallaron que las vacas nacidas por IA presentaban mayor fertilidad en comparación con las nacidas por transferencia de embriones producidos *in vitro* (54). La IA se considera una técnica más natural ya que la maduración ovocitaria, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano ocurren *in vivo*, mientras que la transferencia de embriones producidos *in vitro*

implica la manipulación de los mismos en el laboratorio. Además, sabiendo que el uso de las TRAs aumenta el riesgo de fallos genéticos (45), la posible asociación entre estos procedimientos y las alteraciones en la longitud telomérica adquiere mayor consistencia. La relación entre estos dos parámetros ha sido objeto de estudio en diversos modelos animales y humanos. Wang *et al.* observaron un efecto negativo del cultivo *in vitro* prolongado en embriones murinos producidos *in vitro*, ya que se producía una reducción significativa de la actividad telomerasa en los embriones a día 3,5 de desarrollo. Además, los embriones transferidos en estadio de cleavage presentaron una longitud telomérica mayor que los transferidos en estadio de blastocisto, diferencia que se mantuvo al nacimiento y a los 6 meses de edad. En el mismo estudio también se trabajó con humanos y observaron que la longitud telomérica leucocitaria de niños de un año de edad concebidos mediante TRAs era menor que la de niños nacidos de forma natural (46). Estos resultados podrían contrastarse con los de nuestro estudio siempre que tengamos en cuenta que, en bovino, el modelo *in vivo* se representa mediante IA, ya que no suelen realizarse estudios con monta natural. Sin embargo, nuestros resultados muestran una LTRL significativamente menor en el grupo de IA que en los de transferencia de embriones producidos *in vitro*.

Cabe destacar que los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden en gran medida con los de un trabajo previo, en el que también se evaluó la longitud telomérica leucocitaria en bovinos y porcinos generados mediante distintas TRAs (55). En ambos trabajos, los animales obtenidos por transferencia de embriones producidos *in vitro*, con suplementación del medio de cultivo con fluidos reproductivos, presentaron la mayor longitud telomérica a lo largo del tiempo. Esta coincidencia, observada también en porcino, sugiere un posible efecto beneficioso de los fluidos reproductivos sobre el mantenimiento de la longitud telomérica, conservado entre especies. En el caso de los bovinos, las muestras de ambos trabajos procedieron de los mismos animales. Sin embargo, sus resultados solo alcanzaron el año de edad de los individuos, mientras que nosotros ampliamos las medidas hasta los 3,3 años, en algunos casos.

Por otro lado, en nuestro estudio observamos que, en el último rango de edad analizado, la longitud telomérica fue significativamente mayor en el grupo de transferencia de embriones producidos *in vitro* con medio de cultivo suplementado con albúmina (C-IVP) que con fluidos reproductivos (RF-IVP). Sin embargo, en el primer y tercer rango de edad, hallamos una tendencia hacia una longitud telomérica mayor en el grupo RF-IVP

respecto a C-IVP. Varios estudios indican que el uso de suero fetal bovino o sus derivados, en el cultivo *in vitro* de embriones bovinos, puede afectar negativamente al desarrollo embrionario e incluso al desarrollo fetal, produciendo un aumento de peso al nacer (56). Murillo-Rios *et al.* observaron que retirar la albumina de suero bovino del medio de cultivo y sustituirla por alcohol de polivinilo, reducía la tasa de aborto y mejoraba la supervivencia embrionaria (57). Este factor podría explicar por qué, en varios grupos, obtuvimos una tendencia hacia una diferencia, con mayores valores en el grupo de fluidos que en el de albúmina. Además, en el trabajo similar al nuestro previamente mencionado, los animales obtenidos de embriones cultivados con albúmina presentaron un mayor acortamiento telomérico que aquellos expuestos a fluidos reproductivos (55). No obstante, resultaría interesante contrastar nuestros resultados con datos obtenidos de otras poblaciones bovinas y ampliar el análisis a distintas especies para evaluar el efecto que ejercen los fluidos reproductivos y la albúmina sobre la longitud telomérica.

Asimismo, no se encontraron asociaciones significativas entre la LTRL y el sexo de los animales. Wang *et al.*, en el estudio mencionado anteriormente, reportaron una mayor longitud telomérica en niñas que en niños (46). Esta discrepancia podría atribuirse a las diferencias entre especies. Aun así, nuestros resultados coinciden con otros estudios en bovinos, los cuales tampoco reportan diferencias significativas entre sexos (57). Por todo ello, serían necesarias investigaciones comparativas más amplias y consistentes para esclarecer este aspecto.

Tampoco se halló una relación significativa entre la LTRL y la supervivencia de los animales al inicio, al año ni a los 2,5 años de vida. Esto sugiere que, en las condiciones de nuestro estudio, la longitud telomérica no afecta a la supervivencia. Se ha estudiado esta relación en distintos modelos animales. Seeker *et al.* realizaron un estudio muy similar al nuestro dónde observaron una asociación significativa al año y los 5 años de edad, pero no entre estas edades o al nacimiento (21). No obstante, el número de individuos de su estudio era mucho mayor al nuestro. En otro estudio sobre aves también se halló una relación significativa entre estos parámetros. Aquellos individuos que vivieron más tiempo presentaban una longitud telomérica superior en todas las medidas realizadas (58). Estos hallazgos indican que la relación entre la longitud telomérica y la supervivencia puede depender de la especie o la etapa de la vida analizada.

El estudio presentó algunas limitaciones, siendo la principal el reducido tamaño muestral. Aunque se analizaron 160 muestras de 19 animales, un mayor tamaño muestral puede que

hubiera permitido detectar diferencias significativas según el sexo y la supervivencia, y una mayor consistencia respecto al tipo de TRA. Además, la estación del año en el momento de la extracción sanguínea de los animales, pudo introducir cierta variabilidad en los resultados y debe considerarse al interpretar los datos.

En conclusión, mediante el presente estudio observamos que la TRA utilizada en la producción de los embriones parece tener influencia en la LTRL de los individuos. Además, el cultivo de embriones producidos *in vitro* con fluidos reproductivos, parece ejercer un efecto protector sobre los telómeros, ralentizando el acortamiento natural de los mismos durante el primer año de vida de los bovinos. En base a nuestros resultados, aconsejamos aumentar el tamaño muestral en las próximas investigaciones, con el fin de fortalecer el poder estadístico de los análisis.

6. Conclusiones

- En este estudio se consiguió medir la longitud telomérica relativa leucocitaria de 19 animales de la especie bovina generados mediante distintas técnicas de reproducción asistida, desde el nacimiento hasta los 5 años de edad, utilizando qPCR.
- Los resultados indican que el tipo de TRA puede influir sobre la LTRL a lo largo de la vida de los animales. Concretamente, la producción *in vitro* de embriones, con medio de cultivo suplementado con fluidos reproductivos, se asoció con los mayores valores de LTRL, hasta los 33 meses de edad. Por el contrario, la inseminación artificial presentó los valores de longitud telomérica más bajos.
- No se observaron diferencias significativas en la LTRL entre machos y hembras.
- La LTRL inicial, al año o a los 2,5 años de vida no puede ser utilizada como valor predictivo de la supervivencia de los animales.

7. Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis tutoras Sonia Heras y Pilar Coy por haberme guiado y apoyado durante el desarrollo de este trabajo. Gracias Sonia por toda la ayuda y los consejos durante las muchas horas que hemos pasado en el laboratorio.

Gracias también al personal del departamento de fisiología, alumnos, profesores y trabajadores por animarme y acompañarme todos los meses de trabajo. Gracias al grupo de Genómica del Instituto de Investigación Biomédica de Murcia (IMIB Pascual Parrilla) por su apoyo en la qPCR, y a Francisco Torres por su ayuda con el análisis estadístico.

Por supuesto, gracias a mis compañeros del máster, que son lo mejor que me llevo y a mis profesores, por su dedicación y enseñanzas.

Por último, a mi familia y amigos, por compartir conmigo la ilusión de estos dos años.

8. Bibliografía

1. Ozturk S, Sozen B, Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Molecular Human Reproduction*. 2014;20(1):15-30.
2. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2006;8(4):416-424.
3. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100-2110.
4. Durant ST. Telomerase-Independent Paths to Immortality in Predictable Cancer Subtypes. *J Cancer*. 2012;3:67-82.
5. Lansdorp PM. Telomeres and disease. *EMBO J*. 2009;28(17):2532-2540.
6. Iqbal K, Kues WA, Baulain U, Garrels W, Herrmann D, Niemann H. Species-Specific Telomere Length Differences Between Blastocyst Cell Compartments and Ectopic Telomere Extension in Early Bovine Embryos by Human Telomerase Reverse Transcriptase. *Biol Reprod*. 2011;84(4):723-733.
7. Jiang L, Carter DB, Xu J, Yang X, Prather RS, Tian XC. Telomere Lengths in Cloned Transgenic Pigs1. *Biol Reprod*. 2004;70(6):1589-1593.
8. Nasir L, Devlin P, Mckevitt T, Rutteman G, Argyle DJ. Telomere Lengths and Telomerase Activity in Dog Tissues: A Potential Model System to Study Human Telomere and Telomerase Biology. *Neoplasia*. 2001;3(4):351-359.
9. Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*. 1990;347(6291):400-402.
10. Smogorzewska A, Van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, et al. Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20(5):1659-1668.
11. Haussmann MF, Winkler DW, O'Reilly KM, Huntington CE, Nisbet ICT, Vleck CM. Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proc R Soc Lond B*. 2003;270(1522):1387-1392.
12. Ilska-Warner JJ, Psifidi A, Seeker LA, Wilbourn RV, Underwood SL, Fairlie J, et al. The Genetic Architecture of Bovine Telomere Length in Early Life and Association With Animal Fitness. *Front Genet*. 2019;10:1048.
13. Oeseburg H, De Boer RA, Van Gilst WH, Van Der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2010;459(2):259-268.
14. Nicholls C, Li H, Wang JQ, Liu JP. Molecular regulation of telomerase activity in aging. *Protein Cell*. 2011;2(9):726-738.

15. Steinert S, Shay JW, Wright WE. Modification of Subtelomeric DNA. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(10):4571-4580.
16. Horikawa I, Chiang YJ, Patterson T, Feigenbaum L, Leem SH, Michishita E, et al. Differential cis-regulation of human versus mouse *TERT* gene expression *in vivo*: Identification of a human-specific repressive element. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(51):18437-18442.
17. Keefe DL, Liu L, Marquard K. Telomeres and meiosis in health and disease: Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(2):139-143.
18. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell*. 1999;97(4):503-514.
19. Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, et al. Telomeres and human reproduction. *Fertility and Sterility*. 2013;99(1):23-29.
20. O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online*. 2011;13(1):3.
21. Seeker LA, Ilska JJ, Psifidi A, Wilbourn RV, Underwood SL, Fairlie J, et al. Bovine telomere dynamics and the association between telomere length and productive lifespan. *Sci Rep*. 2018;8(1):12748.
22. Jeon HY, Hyun SH, Lee GS, Kim HS, Kim S, Jeong YW, et al. The analysis of telomere length and telomerase activity in cloned pigs and cows. *Molecular Reproduction Devel*. 2005;71(3):315-320.
23. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology*. 1992;225(4):951-960.
24. Garrels W, Kues WB, Herrmann D, Holler S, Baulain U, Niemann H. Ectopic Expression of Human Telomerase RNA Component Results in Increased Telomerase Activity and Elongated Telomeres in Bovine Blastocysts¹. *Biol Reprod*. 2012;87(4):95
25. Jeon H, Kang M, Kim J, Oh JS. TCTP overexpression reverses age-associated telomere attrition by upregulating telomerase activity in mouse oocytes. *Journal Cellular Physiology*. 2022;237(1):833-845.
26. Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(21):8034-8038.
27. Benetti R, García-Cao M, Blasco MA. Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat Genet*. 2007;39(2):243-250.
28. Schoeftner S, Blanco R, De Silanes IL, Muñoz P, Gómez-López G, Flores JM, et al. Telomere shortening relaxes X chromosome inactivation and forces global transcriptome alterations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(46):19393-19398.

29. Shamas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2011;14(1):28-34.
30. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. The Lancet. 2003;361(9355):393-395.
31. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere Shortening and Tumor Formation by Mouse Cells Lacking Telomerase RNA. Cell. 1997;91(1):25-34.
32. Gomes NMV, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, et al. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. Aging Cell. 2011;10(5):761-768.
33. Gorbunova V, Seluanov A. Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: From mice to beavers. Mechanisms of Ageing and Development. 2009;130(1-2):3-9.
34. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(49):17312-17315.
35. Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S. Site-Specific DNA Damage at the GGG Sequence by UVA Involves Acceleration of Telomere Shortening. Biochemistry. 2001;40(15):4763-4768.
36. Turner S, Hartshorne GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. Molecular Human Reproduction. 2013;19(8):510-518.
37. Liu L, Bailey SM, Okuka M, Muñoz P, Li C, Zhou L, et al. Telomere lengthening early in development. Nat Cell Biol. 2007;9(12):1436-1441.
38. Reichert S, Stier A. Does oxidative stress shorten telomeres *in vivo*? A review. Biol Lett. 2017;13(12):20170463.
39. Lange TD, Killery AM, Varmus HE. Structure and Variability of Human Chromosome Ends. MOL CELL BIOL. 1990;10(2):518-527.
40. Ribas-Maynou J, Llavenera M, Mateo-Otero Y, Ruiz N, Muiño R, Bonet S, et al. Telomere length in bovine sperm is related to the production of reactive oxygen species, but not to reproductive performance. Theriogenology. 2022;189:290-300.
41. Fattet AJ, Chaillot M, Kosciński I. Telomere Length, a New Biomarker of Male (in)Fertility? A Systematic Review of the Literature. Genes. 2023;14(2):425.
42. Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. Telomere instability in the male germline. Human Molecular Genetics. 2006;15(1):45-51.
43. Daly J, Smith H, McGrice HA, Kind KL, Van Wettere WHEJ. Towards Improving the Outcomes of Assisted Reproductive Technologies of Cattle and Sheep, with Particular Focus on Recipient Management. Animals. 2020;10(2):293.

44. Menchaca A. Assisted Reproductive Technologies (ART) and genome editing to support a sustainable livestock. *Anim Reprod.* 2023;20(2):e20230074.
45. Tire B, Ozturk S. Potential effects of assisted reproductive technology on telomere length and telomerase activity in human oocytes and early embryos. *J Ovarian Res.* 2023;16(1):130.
46. Wang C, Gu Y, Zhou J, Zang J, Ling X, Li H, et al. Leukocyte telomere length in children born following blastocyst-stage embryo transfer. *Nat Med.* 2022;28(12):2646-2653.
47. Lopes JS, Alcázar-Triviño E, Soriano-Úbeda C, Hamdi M, Cánovas S, Rizos D, et al. Reproductive Outcomes and Endocrine Profile in Artificially Inseminated versus Embryo Transferred Cows. *Animals.* 2020;10(8):1359.
48. Seeker LA, Holland R, Underwood S, Fairlie J, Psifidi A, Ilska JJ, et al. Method Specific Calibration Corrects for DNA Extraction Method Effects on Relative Telomere Length Measurements by Quantitative PCR. Criscuolo F, editor. *PLoS ONE.* 2016;11(10):e0164046.
49. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2):R19.
50. Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology.* 2014;81(1):152-169.
51. Ramos-Ibeas P, Gimeno I, Cañón-Beltrán K, Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Gómez E. Senescence and Apoptosis During in vitro Embryo Development in a Bovine Model. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:619902.
52. Ramos-Ibeas P, Heras S, Gómez-Redondo I, Planells B, Fernández-González R, Pericuesta E, et al. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction Devel.* 2019;86(10):1292-1306.
53. Urrego R, Rodríguez-Osorio N, Niemann H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics.* 2014;9(6):803-815.
54. Lafontaine S, Labrecque R, Blondin P, Cue RI, Sirard MA. Comparison of cattle derived from in vitro fertilization, multiple ovulation embryo transfer, and artificial insemination for milk production and fertility traits. *Journal of Dairy Science.* 2023;106(6):4380-4396.
55. García Cobarro C. Análisis de la longitud telomérica durante su primer año de vida en animales de la especie porcina y bovina generados por distintas tecnologías reproductivas [Trabajo Fin de Grado]. Murcia: Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria; 2021.
56. Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for

- Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression¹. *Biol Reprod.* 2003;68(1):236-243.
57. Murillo-Ríos A, Maillo V, Muñoz M, Gutiérrez-Adán A, Carrocera S, Martín-González D, et al. Short- and long-term outcomes of the absence of protein during bovine blastocyst formation in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 2017;29(6):1064.
58. Yudin NS, Igoshin AV, Romashov GA, Martynov AA, Larkin DM. Influence of breed and environment on leukocyte telomere length in cattle. *Vestn VOGiS.* 2024;28(2):190-197.
59. Heidinger BJ, Blount JD, Boner W, Griffiths K, Metcalfe NB, Monaghan P. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(5):1743-1748.

9. Declaración de actividad

Paula Andrés Zúñiga, con DNI 48833071T, autora del Trabajo Fin de Máster **“Evaluación de la longitud telomérica relativa leucocitaria en bovinos nacidos por reproducción asistida”** del título Máster Universitario en “Biología y Tecnología de la Reproducción en Mamíferos”, declaro que la actividad que he realizado para el desarrollo del presente trabajo ha consistido en: ayudar a mi cotutora en la extracción de ADN genómico a partir de leucocitos bovinos, realizar las electroforesis en gel de agarosa para todas las muestras extraídas y medir la concentración de las muestras de ADN mediante el espectrofotómetro de micromuestra Nanodrop. También ayudé a mi cotutora en la limpieza de ADN de las muestras que no alcanzaron los valores de pureza necesarios para ser incluidos en la qPCR y en la dilución y organización de las alícuotas de ADN genómico para enviar al centro donde se les realizó la qPCR. Además, también me encargué de recoger y organizar los valores y la información obtenida de cada técnica, así como de identificar cada una de las muestras utilizadas. Por último, también afirmo haber realizado la redacción y la búsqueda de información bibliográfica de este trabajo.

10. Informe antiplagio



Página 2 of 47 - Descripción general de integridad

Identificador de la entrega trn:oid::1:3291777300

14% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Coincidencias menores (menos de 8 palabras)

Fuentes principales

- 12%  Fuentes de Internet
- 6%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Lista de abreviaturas

ADNg	Ácido Desoxirribonucleico Genómico
ALT	Alargamiento Alternativo de Telómeros
ARN	Ácido Ribonucleico
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético (del inglés “Ethylenediaminetetraacetic Acid”)
FIV	Fecundación <i>In Vitro</i>
GTF2I	Factor de Transcripción General Ili (del inglés “General Transcription Factor Ili”)
IA	Inseminación Artificial
LTRL	Longitud Telomérica Relativa Leucocitaria
PBS	Tampón Fosfato Salino (del inglés “Phosphate-Buffered Saline”)
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (del inglés “Quantitative Polymerase Chain Reaction”)
TAE	Tampón Tris Acetato EDTA
TERC	Componente de ARN de la Telomerasa
TERT	Telomerasa Transcriptasa Inversa
TRAs	Técnicas de Reproducción Asistida

Anexo I: Edades a las que se realizaron las extracciones sanguíneas utilizadas en el trabajo

Tabla 1. Recopilación de la edad exacta (en días) de las extracciones de sangre que se realizaron a cada individuo.

C-IVP_1	C-IVP_2	C-IVP_3	C-IVP_4	C-IVP_5	C-IVP_6	C-IVP_7	RF-IVP_1	RF-IVP_2	RF-IVP_3	RF-IVP_4	RF-IVP_5	AI_1	AI_2	AI_3	AI_4	AI_5	AI_6	AI_7
MACHO	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	MACHO	MACHO	MACHO	MACHO	MACHO	HEMBRA	MACHO	MACHO	MACHO	HEMBRA
4	4	3	3	3	3	2	2	9	3	3	3	3	3	3	13	3	8	3
33	33	30	31	45	27	26	57	44	48	27	27	49			34		44	44
89	92	90	86	90	80	82	85	87	88	83	85	88	88	88	88	88	85	85
	176	173	168	173		182	167	168	172	183			172	172		172		185
342	341	284	280	306	360	351	279		293	321	359				299	299	367	361
	554	535	619	544					546			532	532	532	532	532		
					765	753				754	741						701	694
									822			808	808	808	808	808		
963	956	940	895	877	948	936	894			937	924	991	991	991	991	991	883	877
	1139	1123	1078	1060		1126	1077		1005	1127	1114						1073	
									1195					1181	1181	1181		
	1329	1313	1268	1250			1267											
						1366				1367	1354				1421			
		1553	1508	1490		1524	1507											
									1593						1579			
			1666			1733	1665											
							1874		1802					1788	1788			

La primera fila indica el nombre del animal. La segunda fila indica el género del animal. En el resto de filas se indica la edad exacta de los animales durante cada extracción sanguínea utilizada para el experimento.

Anexo II: Información de los primers

Tabla 2. Primers utilizados para la qPCR.

Primer	Secuencia del primer	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño del amplicón (bp)
<i>GTF2I</i>	F 5' -CCTCCACCTGCCAAGAGACCAA	64	90
	R 5' -CTCCCTCACTTCCGTTTGCCG	64	90
<i>Telómeros</i>	F 5' -CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT	62	76
	R 5' -GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT	62	76