

BOT-126 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 282-283, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc126>**Mir-449b improves the epigenetic status of buffalo transgenic embryos produced by hand-made cloning****Gaurav Tripathi, Sonal Gupta, Ram Parsad, Tanya Gupta, Naresh L. Selokar, Manoj Kumar Singh****Embryo Biotechnology Lab, Animal Biotechnology Division
ICAR- National Dairy Research Institute, Karnal-132001,
India**Corresponding author: Singh, Manoj Kumar (manoj.singh@icar.gov.in).**ABSTRACT**

The current study aimed to explore the effects of miR-449b on the epigenetic status of transgenic embryos (containing human insulin gene) produced through handmade cloning. For this, *in vitro* matured oocytes were enucleated by microblade, and two demi-oocytes were fused with a somatic cell (transgenic cells) by electrofusion and after 1 h of electrofusion, the fused embryos (reconstructs) were incubated in 40 nM miR-449b mimic/inhibitor by lipofection method for 1 h at 38.5°C in a CO₂ incubator. After incubation, transfected zygotes were chemically activated and subjected to *in vitro* culture in RVCL (Cook®) medium for 8 days at 38.5°C in 5% CO₂ in air, 90-95% relative humidity condition. Transfection of mi-449b was confirmed through the red fluorescence produced by miR-449b [tagged with 5 carboxytetramethylrhodamine (TAMARA) fluorescence dye] and the effect of miR-449b on epigenetic status was studied by immunofluorescence and qPCR. The transgenic embryos showed a similar development pattern as control embryos. The global level of 5-methyl cytosine was compared among three groups of buffalo transgenic cloned embryos produced by treatment of reconstructed embryos with miR-449b control, mimic, and inhibitor. It was found that the mean pixel intensity was significantly reduced ($p < 0.05$) when reconstructed embryos were cultured for 2 h with miR-449b mimic as compared to control (mimic 7.92 ± 0.34 vs control 16.15 ± 0.50).

Mir-449b mejora el estado epigenético de embriones transgénicos de búfalo producidos mediante clonación artesanal

Gaurav Tripathi, Sonal Gupta, Ram Parsad, Tanya Gupta, Naresh L. Selokar, Manoj Kumar Singh**Laboratorio de Biotecnología de Embriones, División de
Biotecnología Animal
ICAR- Instituto Nacional de Investigación Láctea,
Karnal-132001, India**Autor de correspondencia: Singh, Manoj Kumar (manoj.singh@icar.gov.in).**RESUMEN**

El presente estudio tuvo como objetivo explorar los efectos de miR-449b sobre el estado epigenético de embriones transgénicos (que contienen el gen de la insulina humana) producidos mediante clonación hecha a mano. Para esto, se enuclearon ovocitos madurados *in vitro* mediante microcuchilla, se fusionaron dos demi-ooocitos con una célula somática (células transgénicas) mediante electrofusión y después de 1 h de electrofusión, los embriones fusionados (reconstrucciones) se incubaron en 40 nM de miR-449b imitador/inhibidor por método de lipofección durante 1 h a 38,5°C en una incubadora de CO₂. Después de la incubación, los cigotos transfectedos se activaron químicamente y se sometieron a cultivo *in vitro* en medio RVCL (Cook®) durante 8 días a 38,5 °C en 5% de CO₂ en aire y condiciones de humedad relativa de 90-95%. La transfección de mi-449b se confirmó a través de la fluorescencia roja producida por miR-449b [etiquetada con tinte fluorescente de 5 carboxitetrametilrodamina (TAMARA)] y el efecto de miR-449b sobre el estado epigenético se estudió mediante inmunofluorescencia y qPCR. Los embriones transgénicos mostraron un patrón de desarrollo similar al de los embriones del grupo control. Se comparó el nivel global de 5-metilcitosina entre tres grupos de embriones clonados transgénicos de búfalo producidos mediante el tratamiento de embriones reconstruidos con

At the same time, it was not significantly higher ($p>0.05$) when reconstructed embryos were exposed to miR-449b inhibitor as compared to control (Inhibitor 17.18 ± 0.88 vs control 16.15 ± 0.50). The relative expression level of *HDAC1* and *DNMT1* were significantly reduced ($p<0.05$), up to 0.33 ± 0.39 fold and 0.16 ± 0.74 fold, respectively, compared to control when treated with miR-449b mimic. At the same time, in the case of miR-449b inhibitor, the expression level of *HDAC 1* gene was significantly higher ($p<0.05$) up to 4.89 ± 0.39 fold compared to the control. However, in the case of *DNMT1*, there was no significant difference ($p<0.05$) 1.17 ± 0.66 fold compared to control embryos. This study revealed that miR-449b mimic reduces the global methylation level of buffalo transgenic cloned embryos, hence improving developmental competence and quality.

Keywords: buffalo, miR-449b, handmade cloning, embryo, epigenetics.

control, imitador e inhibidor de miR-449b. Se encontró que la intensidad media de los píxeles se redujo significativamente ($p<0,05$) cuando los embriones reconstruidos se cultivaron durante 2 h con un imitador de miR-449b en comparación con el control (imitado $7,92 \pm 0,34$ frente a control $16,15 \pm 0,50$). Al mismo tiempo, no fue significativamente mayor ($p>0,05$) cuando los embriones reconstruidos se expusieron al inhibidor de miR-449b en comparación con el control (inhibidor $17,18 \pm 0,88$ frente al control $16,15 \pm 0,50$). El nivel de expresión relativo de *HDAC1* y *DNMT1* se redujo significativamente ($p<0,05$), hasta $0,33 \pm 0,39$ veces y $0,16 \pm 0,74$ veces, respectivamente, en comparación con el control cuando se trató con el imitador de miR-449b. Al mismo tiempo, en el caso del inhibidor de miR-449b, el nivel de expresión del gen *HDAC1* fue significativamente mayor ($p<0,05$) hasta $4,89\pm 0,39$ veces en comparación con el control. Sin embargo, en el caso de *DNMT1*, no hubo diferencia significativa ($p<0,05$) arrojando $1,17\pm 0,66$ veces en comparación con los embriones del grupo control. Este estudio reveló que el imitador de miR-449b reduce el nivel de metilación global de los embriones clonados transgénicos de búfalo, mejorando así la competencia y la calidad del desarrollo.

Palabras clave: búfalo, miR-449b, clonación artesanal, embrión, epigenética.