



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**GENERACIÓN DE EMBRIONES INTERESPECIE
CLONADOS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PIEL DE
BOVINO.**

T E S I S.

Para obtener el grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal.

P R E S E N T A.

MVZ. Iván Aguilar Chávez.

Ciudad de México, 2023.

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORA INTERNA

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

carmenavarrro2006@yahoo.com.mx

CO-DIRECTOR EXTERNO

Dr. Salvador Romo García

Laboratorio de Reproducción.

Departamento de Ciencias Pecuarias.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM

sromo_99@yahoo.com

ASESOR INTERNO

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

deme@xanum.uam.mx

JURADO DE EXAMEN

Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Departamento de Biología de la
Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa
Laboratorio de Reproducción Animal
Asistida

deme@xanum.uam.mx



Dr. Eduardo Casas Hernández

Departamento de Ciencias de la
Salud
Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa

dino@xanum.uam.mx



Dr. Filiberto Fernández Reyes

Departamento de Producción
Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana,
Xochimilco

freyes@correo.xoc.uam.mx



Dr. Rodolfo Canseco Sedano
Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia

Universidad Veracruzana

rcanseco@uv.mx





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

Fecha : 07/06/2023
Página : 1/1

CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL del alumno IVAN AGUILAR CHAVEZ, matrícula 2203801667, quien cumplió con los 192 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha ocho de junio del 2023 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

GENERACIÓN DE EMBRIONES INTERESPECIE CLONADOS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PIEL DE BOVINO.

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 232 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBADO

JURADO

Presidente

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

Secretario

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

Vocal

DR. FILIBERTO FERNANDEZ REYES

Vocal

DR. RODOLFO CANSECO SEDANO

RESUMEN.

El uso de células somáticas (fibroblastos) provenientes de piel, constituye un precedente sumamente importante para la obtención de cultivos celulares con fines reproductivos, de conservación y preservación de material genético proveniente de especies amenazadas, extintas o en peligro de extinción, especímenes cuyo potencial genético es superior al resto de la población promedio a la que pertenecen, apoyados de tecnologías de reproducción animal asistida como el la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). En el presente trabajo se utilizaron tres métodos de deriva celular (enzimático (E), mecánico (M) y mecánico-enzimático o mixto (M-E) para obtener fibroblastos de piel de bovinos adultos *post mortem* (tipo criollo) y vivos para producción de carne hembras y machos (razas Angus, Simbrah, Simmental y Tuli), y de bovino joven para producción de leche (Holstein). Como variables medibles se consideró el crecimiento y número de células obtenidas en cada uno de los pasajes celulares, siendo el método E superior ($p \geq 0.05$) para los cultivos primarios de deriva celular. Este método mostró un número de células en crecimiento ($\pm 50\%$) para el primer pasaje, reduciéndose hacia el segundo pasaje ($\pm 15\%$) y siendo aún menor en el último pasaje celular. El tiempo estimado de crecimiento en días de las colonias celulares fue en promedio de 10 ± 3.1 (M-E), 11 ± 3.5 (E), 12 ± 3.7 (M). Se demostró la eficiencia de los métodos empleados para obtener células de piel de oreja de bovinos productivos y llevarlas a los pasajes celulares necesarios para su uso como carioplastos en la transferencia nuclear de células somáticas interespecie (TNCSI). También se demostró la capacidad de crecimiento postcongelación de estas células, lo cual garantiza su almacenamiento en bancos de germoplasma. Respecto a la TNCSI, se utilizaron ovocitos de ovino doméstico como citoplastos receptores de los carioplastos de bovino hembra adulta raza Simbrah de la UANL. El máximo desarrollo alcanzado por los embriones clones de bovino Simbrah así reconstruidos, fue la etapa de mórula (16 células) con una tasa de eficiencia del 46%. Se seleccionó la hembra raza Simbrah porque fue el ejemplar de la que se obtuvieron las cuentas celulares más altas ($\pm 10\%$), en comparación con las razas Tuli, Simmental, Angus y Holstein, respectivamente, y porque fue campeona mundial en el 2020. Con lo cual se demostró la utilidad de esas células para la TNCSI. Estos resultados dan un importante precedente para llevar a cabo la TNCS utilizando el método manual (Handmade cloning o HMC), resta continuar evaluando otras fuentes de ovocitos como receptores de núcleo.

SUMMARY.

The use of somatic cells (fibroblasts) from the skin constitutes an extremely important precedent for obtaining cell cultures for the purposes of reproduction, conservation and demonstrated genetic material of threatened, extinct or endangered species, specimens whose genetic potential is superior. To the rest of the average population. To which they belong, supported by assisted animal reproduction technologies such as somatic cell nuclear transfer (SCNT). In the present work, three methods of cell drift (enzymatic (E), mechanical (M) and mechanical-enzymatic or mixed (ME)) were used to obtain live postmortem adult bovine skin fibroblasts (Creole type) for production. Of meat Females and males (Angus, Simbrah, Simmental and Tuli breeds), and young cattle for milk production (Holstein). As measurable variables, the growth and number of cells obtained in each of the cell passages were observed, the E method being higher ($p \geq 0.05$) for the primary cultures of cell drift. This method shows a growing number of cells ($\pm 50\%$) for the first passage, decreasing towards the second passage ($\pm 15\%$) and being even lower in the last passage. cell passage. The estimated growth time in days of the cell colonies was on average 10 ± 3.1 (ME), 11 ± 3.5 (E), 12 ± 3.7 (M). The efficiency of the methods used to obtain cells was demonstrated, of ear skin from productive bovines and extract the p-cell handles required for use as caryoplasts in interspecies somatic cell nuclear transfer (ISCNT). The post-freezing growth capacity of these cells was also increased, which guarantees their storage in germplasm banks. Regarding the ISCNT, oocytes from domestic sheep were used as receptor cytoplasts for the caryoplasts of adult female Simbrah bovines from the UANL. The maximum development reached by the cloned Simbrah bovine embryos thus reconstructed was the morula stage (16 cells) with an efficiency of 46%. The female Simbrah breed was selected for being the specimen from which the highest cell counts ($\pm 10\%$) will be acquired, compared to the Tuli, Simmental, Angus and Holstein breeds, respectively, and for being world champion in 2020. With which the utility of these cells will be exploited for ISCNT. These results set an important precedent for performing the SCNT by the manual method (Handmade cloning or HMC), it remains to continue evaluating other sources of oocytes such as nucleus recipients.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**, Unidad Iztapalapa y a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de esta misma institución, que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT con número de registro 003797.

Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: CVU 1099367

AGRADECIMIENTOS.

Por orden debo iniciar por el maestro Rafael Hernández pusiste tu granito de arena para que esto iniciara, junto con el M en C. Moisés Balderrama que me ayudaron después de muchos años fuera de un aula tuve que recurrir a Uds. y aquí estoy terminando.

Al Dr. Salvador Romo por su valiosa ayuda en los momentos cruciales del trabajo porque no hubiera sido posible obtener esas muestras valiosas y por sus comentarios acertados y sus palabras de aliento cuando fueron necesarias, nos seguiremos viendo Dr, a los Doctores Demetrio y Carmen por estar ahí.

Roberto Vázquez (Robert), probablemente cuando leas esto serán las cosas muy distintas a como fueron pero sabes, mucho de esto no fuera posible sin ti, el real director de esta tesis, mas todo lo aprendido, las pocas vivencias fuera del laboratorio y porque más allá de compañeros te considero un amigo, sabemos cuál es tu asignatura pendiente y ojala lo libres para poder dar el pequeño gran paso que falta, aquí se separan los caminos pero si en algún momento necesitas algo ahí estaré, compa Andrea pues creo todo lo que empezó como hacer equipo cada materia termino como buenos amigos ni modo esto nos tocó por andar creyendo en el mundo rosa, aunque también tuvimos buenos aprendizajes, fuera del laboratorio aprendí muchas cosas espero haber dejado buenas semillas, también agradecer resto de compañeros con lo que compartí el laboratorio: Diana, Dante y Esteban lo poco o mucho que convivimos hicimos muy llevaderos los días pesados, mejores los días buenos la amistad el compañerismo está presente aun fuera del laboratorio.

A las instituciones que hicieron el favor de prestar sus ejemplares para tomarles muestra. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, que bueno fue regresar a casa después de muchos años y a la UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON en especial al CIPA y al M en C. Nelson Manzanares Miranda por recibirme en sus instalaciones prestarme sus ejemplares y muestrearlos, esto por intervención del Dr. Romo que sin él no hubiera sido posible y no tuviera la relevancia que tiene este trabajo.

Por último y no menos importante agradecer a mi familia que estuvo alentándome de principio a fin, gracias primos, tíos, padres, hijos y a mi esposa sin su apoyo y sus palabras no hubiera sido posible lograrlo.

Al Dr. Juan Ruiz, por tomarse el tiempo de revisar de nuevo una tesis más, sus consejos hicieron que fuera un mejor escrito.

DEDICATORIAS

Esto va dedicado a MERY y EMI, en los cuales hemos sembrado la semilla de ser unos buenos profesionistas, espero escojan el camino correcto y estas palabras cuando las lean sean un aliciente para lograr todo lo que se propongan, recuerden que nunca es tarde para empezar, persigan sus sueños pase lo que pase nunca dejen de ser uds.

A mi esposa que después de todas las dificultades aquí seguimos luchando con todo y contra todo, espero esta vez sí sea esta la primer piedra de un mejor presente y que cambie el futuro, sé que sigues pensando que mucho es por suerte y si pero el resto me ha tocado tener que hacerlo, no queda más que dedicarte este trabajo que nos a costado mucho y si sigo siendo el mismo testarudo necio que conociste va por ti MITZEL, TE AMO, a pesar de todo aquí seguimos. No solo es para ti esta dedicatoria sino también agradecerte el apoyo incondicional ¡muchas gracias!

A mi padre y madre que a pesar de todo están ahí siempre apoyándome a su forma cuando lo necesito, a mi hermana que a pesar de todo sé que estás ahí a tu forma rara ojala en algún momento recapacites y vuelvas al camino.

A mis abuelos pues no queda más que decirles que espero estén orgullosos de mí.

Carnal a ti te toca en esta parte porque a la distancia siempre estas apoyándome y echándome porras, sé que estas orgulloso de todo GRACIAS por alentarme

In hoc signo vinces.

ÍNDICE.

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	7
3. MARCO TEORICO.....	10
3. 1. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS.....	10
3. 2. LA TNCS COMO BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA.....	11
3. 3. LA TNCSI COMO ALTERNARTIVA DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES.....	13
3. 4. ASPECTOS CLAVE DE LA TNCS.....	14
3. 4. 1. CULTIVOS CELULARES.....	16
3. 4. 2. FIBROBLASTOS COMO CÉLULAS DONANTES DE NÚCLEO.....	16
3. 4. 3. EL OVOCITO COMO RECEPTOR DE NUCLEOS DURANTE LA TNCSI.....	20
3. 5. CRIOCONSERVACIÓN DE CELULAS SOMATICAS.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	25
6. HIPÓTESIS.....	26
7. OBJETIVO GENERAL.....	27
7.1. OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S).....	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
8. 1. BIOPSIAS DE TEJIDO AURICULAR DE BOVINO.....	28
8. 1. 1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	29
8. 1. 2. DERIVA DE FIBROBLASTOS DE PIEL EN CULTIVOS PRIMARIOS.....	30
8. 1. 3. CRIOCONSERVACIÓN.....	31
8. 2. OBTENCIÓN DE CITOPLASTOS.....	32
8. 2. 1. MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.....	33
8. 3. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS INTERESPECIE (TNCSI).....	35
8. 3. 1. PREPARACIÓN DE LOS CARIOPLASTOS.....	35

8. 3. 2. PREPARACIÓN DE LOS CITOPLASTOS.....	35
8. 4. ENUCLEACIÓN DE OVOCITOS.	37
8. 5. UNIÓN DE CITOPLASTOS DE OVINO Y CARIOPLASTOS DE BOVINO.....	37
8. 5. 1. FUSIÓN DE TRIPLETES MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS.....	38
8. 6. DESARROLLO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIONES CLONES DE BOVINO PORTNCSI.....	39
8. 7. DESARROLLO EMBRIONARIO.....	40
8. 8. EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS.	41
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
10. RESULTADOS.	43
10. 1. DERIVA CELULAR (CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS A PARTIR DE MUESTRAS DE PIEL DE OREJA DE BOVINOS).	43
10. 2. MÉTODOS PARA LA DERIVA CELULAR.	43
10. 3. MORFOLOGÍA CELULAR.....	47
10. 4. CRIOCONSERVACIÓN.....	48
10. 5. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS INTERESPECIE(TCNSI).	49
10. 5. 1. MIV	49
10. 5. 2. TNCSI	50
11. DISCUSIÓN.....	56
11. 2. CRIOCONSERVACIÓN.....	59
11. 3. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS INTERESPECIE(TNCSI).	61
12. CONCLUSIONES.	65
13. PERSPECTIVAS.	66
14. BIBLIOGRAFÍA.	67

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

- ADNmt:** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- CA:** Corriente alterna
- CD:** Corriente directa
- CIPA:** Centro de Investigación en Producción Agropecuaria
- CMM:** Células Madre Mesenquimales
- COC:** Complejos Cúmulo Ovocito / cumulus oophorus
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium / Medio Eagle Modificado de Dulbecco.
- DMSO:** Dimetilsulfoxido
- DPBS:** Dulbecco's Phosphated Buffered Saline / Solución Salina de Dulbecco amortiguada con fosfatos.
- EGF:** Epidermal Growth Factor / Factor de crecimiento epidérmico
- EPM:** Extrusión de placa metafásica
- FES-C:** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
- HMC:** Handmade cloning / Clonación manual
- MII:** Meiosis II
- MIV:** Maduración *in vitro*.
- RPM:** Revoluciones por minuto.
- SOF-1:** Synthetic Oviductal Fluid / Fluido Oviductal Sintético.
- SSF:** Solución Salina Fisiológica.
- T10:** TCM-199 suplementado con 10% de SFB
- T2:** TCM-199 suplementado con 2% SFB
- T20:** TCM-199 suplementado con 20% SFB
- TCM-199:** Tissue Culture Medium 199/ Medio de Cultivo Tisular 199.
- TNCS:** Transferencia Nuclear de Células Somáticas.
- TNCSI:** Transferencia Nuclear de Células Somáticas Interespecie.
- TRA:** Técnicas de reproducción asistida.
- UANL:** Universidad Autónoma de Nuevo León.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

DIV: Desarrollo *in vitro*.

WOW: Well of the Well, o celda sobre celda.

1. INTRODUCCIÓN.

Ante la posibilidad de pérdidas de los recursos zoogenéticos (fauna utilizada para obtener un beneficio alimentario, económico o cultural) debido a epidemias, conflictos bélicos, cambio climático, resistencia a patógenos, cruzamientos indiscriminados, escaso control de la endogamia; por mencionar algunos de los factores de erosión genética, surge la necesidad de disponer de material genético “*ex situ*” e “*in vitro*”, conservado en bancos de germoplasma y cuya finalidad es la colección de material genético (espermatozoides, ovocitos, embriones, células somáticas), para evitar que se afecten los sistemas de producción pecuaria y se reduzcan las poblaciones silvestres (Castro, 2007; FAO, 2010; Sponenberg, 2012; Zavala, 2021).

En el ámbito de la producción ganadera, la conservación de material genético perteneciente a razas puras y/o autóctonas, puede resultar en futuras soluciones de investigación biológica siendo un ejemplo de esto la resistencia frente a parásitos que presentan determinadas razas de bovinos, teniendo en cuenta que la pureza racial sirve para asegurar un nivel de uniformidad genética de la población. Ello prevé un comportamiento productivo más eficiente y homogéneo. A esto se le ha denominado conservación de los recursos zoogenéticos (considerando en ello a la fauna utilizada para obtener un beneficio alimentario, económico y cultural), priorizando el uso sustentable de los mismos (Illmensee, 2002; Lin *et al.*, 2009; Sponenberg, 2012; AMBI, 2017; Zavala, 2021).

Desde el punto de vista productivo, diversas naciones actualmente trabajan en la conservación de razas puras y/o autóctonas de animales productivos y domésticos, con la finalidad de conservar sus recursos zoogenéticos, priorizando el uso sustentable. Tal es el caso de España, que cuenta con bancos de germoplasma promovidos por las asociaciones de criadores de razas puras autóctonas locales, al igual que EE.UU y México por mencionar algunas naciones (FAO, 2010; Sponenberg, 2012; AMBI, 2017; Zavala, 2021).

Con este concepto de utilización y máximo aprovechamiento de los recursos al alcance de la investigación y, con la finalidad de obtener resultados benéficos para la conservación y preservación de las especies, se han desarrollado biotecnologías de la reproducción animal asistida, como la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS). En ella, una célula somática es transferida en un ovocito enucleado y fusionada con él mediante impulsos eléctricos, el embrión resultante será una réplica genética de la especie que se desea reproducir. Esto es hoy una opción real y con fines de conservación aplicables (Jiang *et al.*, 2011; Seaby *et al.*, 2013; Saini *et al.*, 2018; Galli *et al.*, 2021).

La TNCS engloba una serie de variantes cuyo propósito es mejorar la eficiencia de la técnica original. De ahí surge la clonación manual (Handmade cloning o HMC, en inglés), variante que, en términos de mejora, es más simple al evitar el uso de micromanipuladores, volviéndola más redituable y eficiente (Vajta 2007; Verma *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2018; Galli *et al.*, 2021).

Ante la necesidad de rescatar genéticamente algunas poblaciones animales, en 1999 Dominko y col, realizaron un procedimiento de transferencia nuclear de células somáticas interespecie (TNCSI), en el que tomaron células somáticas de mono, borrego, cerdo, conejo y rata, para fusionarlas con ovocitos enucleados de vaca. Ésta es una potencial herramienta para el rescate de especies tanto domésticas como silvestres en peligro de extinción. En esencia, consiste en tomar una célula somática de la especie que se desea clonar, introduciéndola en un ovocito enucleado de una especie de diferente orden e, incluso, taxón (Loi *et al.*, 2011; Lagutina *et al.*, 2013; Yelisetti *et al.*, 2015; Mrowiec *et al.*, 2021).

Sin embargo, se conoce que el desarrollo de los embriones clonados por TNCSI más exitoso, será aquel entre especies estrechamente relacionadas. Con este proceso se busca que, una vez activados, los embriones reconstruidos puedan desarrollarse *in vitro* hasta la etapa de blastocisto (etapa final del desarrollo previo a la implantación), demostrando así la capacidad que tiene el ovocito enucleado de reprogramar el núcleo de la célula somática con el que es fusionado. Es decir que,

el ovocito cuenta con la información que hace posible desdiferenciar a una célula somática y reprogramarla para producir un embrión (Jiang *et al.*, 2011; Seaby *et al.*, 2013; Saini *et al.*, 2018; Galli *et al.*, 2021).

El utilizar las biotecnologías reproductivas como herramienta de expansión de poblaciones animales pequeñas, es de especial importancia cuando se tiene un número crítico y reducido de individuos pertenecientes a estas poblaciones y/o para conservar individuos cuyas características rebasan la media de sus congéneres (Lagutina *et al.*, 2013; Galli *et al.*, 2021; Mrowiec *et al.*, 2021).

2. ANTECEDENTES.

La preservación de ejemplares con genética superior, poblaciones en riesgo reproductivo o pequeñas poblaciones, mediante la aplicación de la TNCS, ha demostrado ser una técnica sobresaliente en la obtención de copias genéticas, a pesar de los bajos rendimientos que presenta en relación con otras Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) (Roa, 2006; Malpotra, *et al.*, 2022; Malin *et al.*, 2022).

En bovinos, la TNCS se reportó por primera vez por Wells *et al.* (1998), con la finalidad de conservar al único ejemplar bovino, una hembra (cuya raza no es mencionada) endémica de la Isla de Enderby en Ecuador, acostumbrada a condiciones subantárticas. A partir de células de la granulosa se generaron cultivos celulares y tras fusionarlas con ovocitos enucleados mediante impulsos eléctricos, lograron obtener una primera generación de blastocistos calidad embrionaria 1 a 3. Resultado de la transferencia de 22 embriones clones, lograron el nacimiento de dos terneras vivas, de las que sobrevivió solo una. La similitud genética entre las terneras recién nacidas se confirmó mediante un análisis de ADN.

Meses más tarde (1999), el mismo grupo de investigadores se propuso generar nuevamente cultivos de células totipotenciales a partir de células de la granulosa, pero ahora a partir de una hembra Holstein Friesian cuyas características genéticas eran elegibles para su preservación. Lograron obtener una primera generación de mórulas para posteriormente transferir los blastocistos, resultando el nacimiento y

sobrevivencia de 10 terneras. Éstas nacieron bajo procedimiento quirúrgico debido al elevado peso que registraron, llegando a ser superior a los 40 Kg en promedio.

Mediante un análisis de microsatélites de ADN realizado en 16 locus se confirmó la similitud genética de la donadora de células de la granulosa, al tiempo que se descartó que existiera alguna relación genética con la donadora de ovocitos.

Lanza *et al.* (2000), reportaron por primera vez la clonación por transferencia nuclear de células somáticas interespecie (TNCSI), de una especie en peligro de extinción, el Gaur (*Bos gaurus*), el bisonte indio. Obtuvieron células somáticas *post mortem* a partir de biopsias de piel de Gaur, las cuales fusionaron con ovocitos de vacas domésticas obteniendo 18% de fetos. Luego de 202 días de gestación, se presentó un aborto tardío en el último feto que no presentaba anomalías morfológicas externas y se comprobó su parentesco genético mediante un análisis del cariotipo de células de Gaur. Un par de años más tarde, Srirattana *et al.* (2012) lograron el nacimiento de una cría de esta especie, aunque desafortunadamente moriría días después.

El uso de fibroblastos para la TNCS se reporta por Cibelli *et al.* (1998). Obtuvieron fibroblastos de un feto macho de bovino de 55 días de edad, produciendo 276 embriones clones con 33 blastocistos (12%) después de 7 días de cultivo. De éstos, 28 fueron transferidos, 6 de 11 hembras quedaron gestantes (55%), 4 parieron terneros vivos y solo un abortado al día 249 de gestación, resultado de hipertensión pulmonar.

La generación satisfactoria de embriones por TNCSI está expuesta a factores intrínsecos y extrínsecos, estos resultados son en su mayoría esfuerzos para la recuperación de la vida silvestre, dejando así una posible solución a la problemática que conlleva la obtención de ovocitos especie-específicos, en especies cuyo manejo reproductivo es difícil o las muestras puedan ser escasas. Es así como pueden obtenerse embriones viables y transferibles provenientes de células de

especies silvestres, con ovocitos obtenidos de especies domésticas (Stroud *et al.*, 2013; González-Grajales *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016; Saini *et al.*, 2018; Aiman *et al.*, 2023). El antecedente de la generación de embriones por TNCSI, en México se reportó por Navarro-Maldonado, *et al.*, 2016, al obtener y criopreservar embriones clon de Borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) – ovino doméstico (*Ovis aries*), siendo al momento el único trabajo reportado, sin embargo al momento no se han tenido registros de crías vivas nacidas a partir de la TNCS.

3. MARCO TEORICO.

3. 1. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS.

Las Técnicas de Reproducción asistida (TRA), incluyen un conjunto de herramientas que aumentan la eficiencia reproductiva en las especies animales, sobre todo en especies domésticas. Ello permite el mejoramiento genético, la fácil propagación de genes deseables, la conservación, transporte y almacenamiento de los recursos genéticos, dando una solución inmediata y eficiente para la producción animal. En México, desde hace casi cinco décadas, las TRA que han tenido mayor impacto en la productividad son: la inseminación artificial (IA), la posterior mejora con el semen sexado y el análisis espermático asistido por computadora, la superovulación de hembras, la obtención de ovocitos por vía transvaginal (OPU), la producción de embriones *in vitro* (PIV), y la transferencia de embriones (MOET, por sus siglas en inglés), finalmente la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) o clonación. (Romo, 1993; Castro, 2007; Lin *et al.*, 2009; Ramón, 2014).

La finalidad de utilizar las TRA, es su aplicación en poblaciones animales reducidas, debido al número crítico de individuos pertenecientes a la élite en riesgo latente de desaparecer. Además de conservar individuos cuyas características rebasan la media de sus congéneres. (FAO, 2010; Lagutina *et al.*, 2013; Galli *et al.*, 2021; Mrowiec *et al.*, 2021).

La lista de estas biotecnologías es extensa, dando paso a las demás generaciones después de haber sido provista de mejoras, iniciando desde las técnicas para la manipulación de la cópula, hasta la manipulación del material genético (Figura 1). La clonación tiene su importancia no solo desde el aspecto de conservación de material genético de individuos especiales y/o seleccionados sino que posee un gran potencial para el campo de la biología de células madre y la terapéutica. Estudios recientes indica la posibilidad de que los blastocistos generados por TNCS se puedan usar para la deriva de células madre pluripotentes, similar a la deriva de células madres de origen embrionario o ESC de transferencia nuclear (ESCtn), readicando su importancia en que al ser células isogénicas para los pacientes

donantes, podrían usarse en el trasplante de células y el modelado de enfermedades, Matoba *et al.*, 2018.

GENERACIÓN	Primera	1908
	Evitar infecciones durante copula	Inseminación artificial Test de progenie
	Segunda	1970
	Control hormonal de la ovulación	Transferencia de embriones congelación, división 714 356 embriones / año
	Tercera	1980
Sexado de embriones y espermatozoides (1983)	Producción <i>in vitro</i> de embriones (1987)	
Cuarta	1990	
Clonación con células somáticas (1997)		
Quinta	2000	
Transgénesis, Gene Farming		

Figura 1. Tomada de Thibier (1990), muestra las generacionales de las TRA.

3. 2. LA TNCS COMO BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA.

La TNCS o “clonación” deriva de la raíz griega *κλών* “retoño”, indica una serie de procesos cuya finalidad es producir copias genéticamente idénticas de un ente biológico, esencialmente es insertar el núcleo de una célula somática donadora (carioplasto) en un ovocito enucleado que funge como receptor (citoplasto). A fines de la década pasada la técnica tenía como objetivo aprovechar los avances en genética molecular y análisis del genoma que pudieran implementarse en los sistemas de crianza animal, por lo que es una tecnología de gran interés mundial en la actualidad, aunque los índices de eficiencia siguen siendo moderados comparados con otras TRA (Niemann *et al.*, 2012; Vajta 2018; Galli *et al.*, 2021).

Mediante el uso de un micromanipulador, es posible la enucleación de ovocitos y la transferencia en ellos del núcleo y/o el total de la célula somática, para luego, mediante impulsos eléctricos, acoplar estas células, para así lograr el desarrollo

embrionario. A esto se le llama “clonación tradicional”, que ha permitido el nacimiento de distintas especies domésticas y silvestres (Rojas *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2018).

Lu, *et al.* (2005), Roa (2006) y Liu *et al.* (2011), señalan que mediante la TNCS diversos grupos de investigación han logrado el nacimiento de 23 especies de mamíferos: oveja (Wilmut *et al.*, 1997), ratón (Wakayama *et al.*, 1998), bovinos Kato *et al.*, 1998), cerdo (Polejaeva *et al.*, 2000), conejo (Chesne, *et al.*, 2002) equino (Galli *et al.*, 2003), gato (Shin *et al.*, 2002), rata (Zhou *et al.*, 2003), perro (Lee *et al.*, 2005), y anfibios (Tecirlioglu *et al.*, 2006). Paralelo a este proceso, diversos investigadores desarrollaron la TNCS para la producción de embriones, partiendo de diferentes tipos de células, entre ellas, los fibroblastos (Keefer *et al.*, 2001) y las células de la granulosa (Wells *et al.*, 1999; Cortez *et al.*, 2017).

Debido a la dificultad que representa el uso de micromanipuladores para la enucleación del citoplasto en la clonación tradicional, es que se crea una variante conocida como “clonación libre de zona pelúcida (ZP) o clonación manual (HMC, por sus siglas en inglés Handmade Cloning)”. Esta técnica provee de ovocitos libres de ZP enucleados mediante disección manual con una micro-navaja de metal. Tatham *et al.* (1995), plantean el primer enfoque conocido de transferencia nuclear con ovocitos libres de ZP, sin lograr el nacimiento de terneros. Vajta *et al.* (2001) perfeccionaron la técnica, utilizando hojas metálicas afiladas para la bisección de ovocitos libres de ZP bajo un microscopio estereoscópico (Verma *et al.*, 2015; Galli *et al.*, 2021).

La HMC es un proceso simplificado en el que el uso de instrumentos especializados se ve reducido a equipos más fáciles de utilizar, desarrollada por (Vajta *et al.*, 2001). La descendencia de animales clonados por HMC se logró por primera vez en bovinos (Tecirlioglu *et al.*, 2006; Vajta *et al.*, 2003), porcinos (Du *et al.*, 2005), equinos (Lagutina *et al.*, 2007) y búfalos (Selokar *et al.*, 2011).

La TNCS tiene como principal atribución la reprogramación de una célula somática a una célula pluripotente, la cual es capaz de proliferar y auto renovarse

indefinidamente bajo ciertas condiciones del microambiente celular y tisular. Estas células pueden diferenciarse a otros tipos celulares especializados morfológica y funcionalmente (Arévalo, 2007; Cerón *et al.*, 2016; Domínguez *et al.*, 2020). Mientras se mantengan en un estado de indiferenciación artificial, se podrán comprender los mecanismos de conducción hacia la reprogramación durante el desarrollo, característica que las vuelve un tipo celular ideal para aplicaciones terapéuticas y reproductivas (Mogollón *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2015; Gouveia *et al.*, 2020; Galli *et al.*, 2021).

3. 3. LA TNCSI COMO ALTERNATIVA DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES.

Originalmente, la TNCS se llevó a cabo en anfibios para luego extrapolarla a mamíferos, logrando así que Wilmut *et al.* (1997), obtuvieran el nacimiento de la oveja “Dolly”. Con esto se demostró que el genoma de una célula somática adulta mantiene la totalidad de su información genética a pesar de ser un tipo celular especializado, es decir que, a pesar de las restricciones en el genoma durante el desarrollo y los cambios durante la diferenciación celular, éstos son reversibles, ya que se deben a modificaciones epigenéticas y no a cambios permanentes en el genoma (Chaparro *et al.*, 2009; Mogollón *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2015; Gouveia *et al.*, 2020; Galli *et al.*, 2021).

La TNCS posee un gran potencial desde el punto de vista de la conservación de especies animales en peligro de extinción, exóticas o incluso especies extintas, siempre y cuando se cuente con células somáticas de dichas especies. Ante la reducida o nula disponibilidad de ovocitos de animales silvestres, se evaluó la fusión del citoplasto del receptor con el carioplasto del donante, obtenidos de diferentes especies. A esto se le llamó transferencia nuclear de células somáticas interespecie (TNCSI). En mamíferos, esta técnica presenta una mayor eficiencia cuando las células del donante y el citoplasto receptor se originan de especies relacionadas en su fisiología reproductiva, duración de la gestación y tipo de placentación (Melo *et al.*, 2022). Por su parte, Lagutina *et al.* (2013), observaron que las especies animales que se hibridan naturalmente tienen más probabilidades de funcionar en la TNCSI (Mrowiec *et al.*, 2021).

Esta variante, consiste en la transferencia de un núcleo celular de una especie en un citoplasto (ovocito enucleado) de otra especie. Al fusionarlas y cultivarlas *in vitro*, se desarrollará un embrión clon en la etapa de blastocisto (Beyhan, *et al.*, (2007); Tecirlioglu *et al.*, 2006).

Rojas *et al.* (2005), mencionan algunas especies que han sido clonadas mediante TNCSI: el Gaur (*Bos gaurus*) (Lanza *et al.*, 2000), el Banteng (*Bos javanicus*) y la Bucardo (*Capra pirenaica pirenaica*). En estos casos, el citoplasma del ovocito utilizado para formar el embrión derivó de especies domésticas comunes como *Bos taurus* (vaca) y *Capra hircus* (cabra).

Miyamoto (2019) y Melo *et al.* (2022), mencionan que la TNCSI fue utilizada en la obtención de embriones de pez esturión y dieron a conocer que este proceso está guiado por factores maternos ovocitarios, los cuales podrían estar presentes en la reprogramación celular de diferentes especies animales, incluidos los mamíferos.

El desarrollo de embriones clones tanto intraespecies como interespecies, presenta tasas moderadas de éxito (Gomendio *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009; Ramón, 2014; Miyamoto, 2019; Melo *et al.*, 2022). Melo *et al.* (2022), proponen conocer a profundidad los productos biotecnológicos, los factores moleculares y epigenéticos que afectan la eficiencia en la TNCS, centrándose en la fuente de energía nuclear de las células donantes.

3. 4. ASPECTOS CLAVE DE LA TNCS.

La TNCS involucra pasos clave, de los cuales dependerá su eficiencia. Estos incluyen: A) La eliminación del material genético de un ovocito en Metafase II (MII) (enucleación) por aspiración o disección, para así obtener el citoplasto receptor de núcleo; B) La obtención de la célula somática donante del núcleo (carioplasto), previamente tratado para su reprogramación Efectuando de 5 a 9 pasajes celulares, o reduciendo el aporte proteico en el cultivo (es decir de suero fetal o de albúmina sérica) para que su ciclo celular se sincronice en la fase G₀; C) La transferencia del

carioplasto en el citoplasto y su fusión, para lo cual ambas células se colocan en

estrecho contacto y mediante un impulso eléctrico se fusionan para dar paso a la formación del nuevo embrión, y . D) La activación del embrión así formado y su cultivo para el desarrollo *in vitro* (Nagai *et al.*, 2007; Mogollón *et al.*, 2014; Galli *et al.*, 2021; Polejaeva, 2021).

3. 4. 1. CULTIVOS CELULARES.

Fue en los años 30 cuando se derivaron por primera vez células somáticas (mesenquimales o fibroblastos) procedentes de fragmentos de tejidos, adheridas al fondo de cajas de Petri. Una década después, se amplió la aplicación de la técnica a fragmentos de tejidos enzimáticamente disociados. Con ello pudieron aislarse y cultivarse células individuales, probando el acondicionamiento del medio, experimentando en tubos capilares inicialmente y, posteriormente, en una serie de cultivos y la disgregación mediante el empleo de enzimas como la tripsina (tripsinización) repetidos (pasajes celulares), dando así comienzo a la auténtica era del cultivo celular (Saverio 2000; Miguel y Herrero, 2003; Freshney, 2010; Beltrán *et al.*, 2016).

El cultivo de fibroblastos para la TNCS es ideal debido a que, en condiciones fisiológicas, son las células más abundantes en el tejido conectivo de la piel y son responsables de la producción y depósito de los componentes de la matriz extracelular, tales como: colágeno, fibronectina, laminina, y proteoglicanos (Arévalo *et al.*, 2007; Tavira *et al.*, 2009; *et al.*, 2016; Echeverry 2019; Aydogdu *et al.*, 2021).

3. 4. 2. FIBROBLASTOS COMO CÉLULAS DONANTES DE NÚCLEO.

Inicialmente, las investigaciones para la generación de un individuo a partir de células somáticas tuvieron limitaciones biológicas, tal como menciona Cortez *et al.*, (2021): “las células somáticas son completamente diferenciadas, con patrones de expresión génica que se correlacionan con la función del tejido del cual se originaron, de ahí que surge la necesidad de encontrar una célula “ideal” que pueda ser reprogramada de forma eficiente en el citoplasto receptor y aumentar la eficiencia de la clonación somática”.

Los fibroblastos, al ser el tipo celular más abundante del tejido conectivo, pueden aislarse a partir de tejidos corporales; del tejido conectivo su obtención se logró a partir de sangre proveniente del cordón umbilical en neonatos, además se han aislado de la pulpa dental y del ligamento periodontal, su aislamiento se ha logrado también a partir de órganos como: hígado, páncreas, músculo y de tejido epitelial: piel específicamente de la dermis) (Tschumperlin, 2013; Sriram *et al.*, 2015).

Los fibroblastos dérmicos presentan un tamaño menor en relación con los fibroblastos de otro origen, tienen una capacidad de respuesta a estímulos externos y un ciclo celular lento; estas características los hacen similares a las células madre. Presentan diferencias morfológicas (célula fusiforme o estrellada, es decir, con prolongaciones citoplasmáticas cortas y anchas, o largas delgadas y ramificadas), cuya forma es elíptica y contorneada. La cromatina es escasa y está finamente granulada (tinción Hematoxilina-Eosina), y el retículo endoplásmico (liso y rugoso) está bien desarrollado (Roa, 2006; García, 2007; Fonseca *et al.*, 2010; Tschumperlin, 2013; Sriram *et al.*, 2015; Lynch y Watt, 2018).

Con los fibroblastos se han generado exitosamente embriones y nuevos individuos mediante la TNCS (Mucci *et al.*, 2011; Lagutina *et al.*, 2013; Saini *et al.*, 2018; Cortez *et al.*, 2021).

Los fibroblastos de origen dérmico tienen la capacidad de diferenciarse hasta en 18 linajes mesenquimales y neuroectodérmicos; entre ellos: neuronas, células de la glía, músculo liso y adipocitos, conjuntándose con el desarrollo ontogénico de Células Madre Mesenquimales (CMM), células no especializadas que presentan una forma fibroblastoide. Éste, en ambas líneas celulares es paralelo y coordinado, de ahí que los fibroblastos presenten una característica denominada “plasticidad fenotípica”, la cual se describe como la capacidad de una célula (genotipo), para diferenciarse hacia tejidos de distintas capas embrionarias, como el ectodermo y el endodermo, en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Esto permitirá clasificarlas en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales,

oligopotenciales y unipotenciales (Jong *et al.*, 2002; Arévalo *et al.*, 2007; *et al.*, 2016; Echeverry 2019).

Al adquirir la condición pluripotencial, estas células presentan cambios a nivel molecular y funcional, determinantes a la hora de modificar su “destino celular”. Es decir que será un proceso en el que una célula diferenciada será llevada a un estado de pluripotencialidad (definida como la capacidad de una célula para dar origen a todas las células del embrión y en su etapa adulta). En la naturaleza, encontramos que este proceso está presente durante el desarrollo normal de los mamíferos en los blastómeros de embriones en etapas tempranas previo a la implantación. Esta capacidad se mantiene momentáneamente en células de la masa celular interna (MCI) del blastocisto y en el epiblasto del embrión y la pérdida de la pluripotencialidad provoca la diferenciación en determinados linajes mediante el silenciamiento de genes que codifican para factores de transcripción claves para mantener la pluripotencia (Chaparro *et al.*, 2009; Matoba *et al.*, 2018).

Para ser consideradas como CMM, las células deben cumplir con los siguientes criterios: 1) Adherencia cuando son sometidas a cultivo. 2) Expresión de los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B. 3) Plasticidad fenotípica hacia diversos linajes celulares *in vitro* (Arévalo *et al.*, 2007; Socarrás *et al.*, 2013).

La reprogramación celular consiste en la alteración de un perfil genético expresado en un determinado tipo celular, dando paso a que genes no expresados tengan la oportunidad de expresarse, y modificar así la morfología, función y biología de esta “célula reprogramada”, adquiriendo así un nuevo potencial de diferenciación y duplicación, eventualmente podrá diferenciarse en cualquiera de los tipos celulares que componen el organismo. “Se puede borrar la memoria epigenética de una célula, con lo que una vez devuelta a su estado embrionario, la célula puede diferenciarse a un tipo celular totalmente diferente”, a partir de este descubrimiento se sabe que es posible no recurrir a células madre de origen embrionario, porque

es posible crearlas a partir de una célula adulta (Chaparro *et al.*, 2009; Mostajo y Ferreira, 2012; Cruz, 2013).

Durante la reprogramación, el núcleo celular sufre cambios en su conformación, tales como: aumento de tamaño, descondensación de la cromatina, modificación de la expresión genética y de la metilación del ADN (este proceso constituye un marcador epigenético que identifica la cadena molde durante la replicación del ADN y el origen parental de regiones improntadas, regula los transposones, la impronta genómica y la expresión génica), aunado a los aumentos de la polimerasa II y la histona B4. Esto evidencia que las células maduras diferenciadas, conservan toda la información genética codificada en las moléculas de ADN, el genoma y que esta diferenciación se asocia a cambios reversibles de la expresión genética (cambios epigenéticos) (Rodríguez *et al.*, 2004; Mostajo *et al.*, 2012; Cruz, 2013).

No se conoce totalmente la influencia de los ovocitos de una especie para reprogramar los carioplastos de otra especie, aunque se sabe que la activación de genes puede ser inducida, incluso en la reprogramación interespecie, debido a que se comparten factores y mecanismos de reprogramación comunes entre las diferentes especies. El desarrollo de embriones clones interespecie, no ha sido muy exitoso, debido al desconocimiento de las causas que provocan fallas en el desarrollo (Tamada y Kikyo , 2004; Miyamoto, 2019).

La investigación para reprogramar células somáticas (conferir pluripotencialidad a las células) ha llevado a diversificar los métodos de investigación, incluyendo la TNCS, la exposición de células somáticas a extractos de células embrionarias, la fusión celular, recientemente, la utilización de factores de transcripción específicos, metilación del ADN, impronta genética, modificaciones de histonas y la regulación de la longitud de los telómeros (Tamada *et al.*, 2004; Chaparro *et al.*, 2009; Matoba *et al.*, 2018; Miyamoto, 2019). La reprogramación depende de las modificaciones en las histonas y otros componentes estables de los cromosomas, siendo totalmente independiente del ARN presente en el núcleo trasplantado, pero con dependencia

de sus proteínas. La remoción de las proteínas nucleares borra la memoria del origen de la célula diferenciada, aumentando la transcripción de genes involucrados en la reprogramación, como los factores de transcripción Oct3/Oct4. La proteína MacroH2A, perteneciente a la cromatina, ayuda a explicar la resistencia a la reprogramación, dado que su eliminación favorece la transcripción de factores reprogramadores, mientras que WAVE-1 se requiere para la reprogramación. La histona (H1) de las células somáticas es reemplazada por la histona (B4) del ovocito, requerida para la activación de genes. La polimerización de la actina nuclear mejora la transcripción y su participación, junto con la polimerasa II, es necesaria para la activación del gen del factor de transcripción Oct3/4. Este mismo proceso se puede observar durante la fertilización, donde los ovocitos presentan una serie de factores maternos necesarios para reprogramar el núcleo de los espermatozoides (Chaparro *et al.*, 2009; Matoba *et al.*, 2018; Miyamoto, 2019; Galliet *al.*, 2021).

3. 4. 3. EL OVOCITO COMO RECEPTOR DE NUCLEOS DURANTE LA TNCSI.

Gurdon y Wilmuit, (2011), señalan que a partir de células que provienen de una línea germinal (femenina), la cual es la formadora de óvulos (hembras), presentan una característica reproductiva peculiar la cual es el dar paso a “todas las células del cuerpo, incluidas las células germinales tanto de machos como de hembras, esta característica confiere totipotencialidad, a los óvulos para que pueden desarrollarse con normalidad aun en presencia de un núcleo proveniente de una célula somática, sustituyendo así la información genética dada por los propios cromosomas del óvulo y los provenientes del núcleo del espermatozoide.

Durante la enucleación del ovocito que será utilizado como citoplasto o receptor de núcleos en la TNCS, la pérdida de su citoplasma puede ser trascendental en el desarrollo de los embriones clones. En bovinos, se ha observado que la extracción citoplasmática del 50% de los ovocitos enucleados, produce una baja tasa de blastocistos. Esto se explica por el reducido contenido mitocondrial que queda remanente en los citoplastos, el cual, a través de la línea germinal materna,

transmite el ADNmt necesario para la producción de energía y el metabolismo celular. Esto puede ser fundamental en la obtención de un mayor número de blastocistos y en la calidad de éstos, para lo cual se han generado técnicas de suplementación para revertir estos posibles daños a los embriones (Keefe *et al.*, 2015; Srirattana *et al.*, 2022).

Para la TNCS es imprescindible la enucleación del ovocito para la eliminación del huso acromático. Inicialmente, en los protocolos para la enucleación se debía identificar los husos acromáticos mediante la tinción con fluorocromos de los cromosomas y, posteriormente, ser expuestos a luz ultravioleta (UV). Gouveia *et al.* (2020) y Cervera *et al.* (2012), determinaron que la exposición de los ovocitos a la luz ultravioleta podría ser perjudicial en el sentido de que se comprometía el desarrollo de los embriones clones. Esta detección del huso acromático en especies productivas como bovinos, búfalos y porcinos, se vuelve apenas visible debido al alto contenido de lípidos en el citoplasma de los ovocitos en MII, para lo cual se identifican mediante el uso de tinción de fluorescencia (Hoechst 33342) y se visualizan bajo luz ultravioleta caso contrario sucede en ratas y ratones, en que es visible en el microscopio de contraste de fases (Kyogoku *et al.*, 2018; Srirattana *et al.*, 2022).

El proceso de transferir un núcleo ajeno al de la célula receptora, implica una serie de eventos a desarrollarse en la nueva célula que se está formando. La TNCSI demostró que, en cuestiones de biología reproductiva, los modelos animales nos brindan la posibilidad de estudiar y conocer los efectos que pueda tener el citoplasma sobre el desarrollo de los embriones clones, y su interacción con las estructuras del núcleo insertado (González-Grajales *et al.*, 2016).

Para que la TNCSI sea exitosa, es necesario que los carioplastos donadores y el citoplasma receptor provengan de especies relacionadas estrechamente, que compartan su fisiología reproductiva (período de gestación y tipo de placenta) y que puedan hibridar naturalmente. Cuando donantes y receptores presentan una relación taxonómica distante (interclase, interorden, interfamilia e intergénero), la

técnica solo logra el desarrollo temprano de los embriones clones (Lagutina *et al.*, 2013; Mrowiec *et al.*, 2021).

Schultz (1993), señala que los embriones producidos por TNCSI, tendrán un desarrollo independiente al núcleo del donante pero dependiente del ovocito receptor, desarrollándose hasta la etapa en que ocurra la transición materno-embrionaria (MET) específica de la especie. Esto es que, dependiendo de la especie animal que se trate, el desarrollo embrionario se detendrá en diferentes etapas de la segmentación, por ejemplo: en ratón, se detendrán en la etapa de dos células; en porcino, en la etapa de 4 a 8 células; en ovino y bovino, en la etapa de 8 a 16 células. Concluyendo que el desarrollo embrionario está bajo control materno.

3. 5. CRIOCONSERVACIÓN DE CELULAS SOMATICAS.

La crioconservación de células en la actualidad es de importancia debido a que, existe la tendencia a generar bancos de recursos genéticos (bancos de germoplasma), como medida de conservación de células y gametos de importancia genética. Así se contará con la infraestructura adecuada para identificar y adquirir germoplasma de las principales razas de ganado. Estos programas se llevan a cabo en diversos países, aunque presentan ciertas limitantes, debido a la falta de asociaciones de razas, escasas bases de datos que incluyan datos genotípicos y fenotípicos, además de que requieren de protocolos óptimos para la recolección de muestras en campo para los diversos tipos de germoplasma (Pereira y Marques, 2008; Gomez *et al.*, 2014; Purdy *et al.*, 2016).

Resulta crucial el mantenimiento y conservación de las células como recursos zogenéticos. Todas las células tienden a sufrir daños morfológicos y funcionales durante su procesamiento y crioconservación. Pereira y Marques, (2008) señala que la extensión del daño, así como las diferencias en las tasas de supervivencia y desarrollo, pueden variar según la especie, la etapa de desarrollo y el origen de la muestra. Así mismo, se busca utilizar técnicas de crioconservación adecuadas al tipo celular que se pretende preservar, además de la continua búsqueda de agentes

que, adicionados a los medios de preservación o medios de cultivo, disminuyan los efectos adversos del proceso.

De acuerdo con Ramos (2014), La criopreservación “es el uso de bajas temperaturas para preservar células vivas estructuralmente intactas. Las células que sobreviven al viaje termodinámico desde la incubadora a 37 °C hasta el tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido a -196 °C, están libres de la influencia del tiempo. Por lo tanto, la criopreservación es un componente crítico de los protocolos de cultivo y fabricación de células”.

La criopreservación está basada en la correcta y adecuada aplicación de protocolos de congelación del material biológico, con la finalidad de asegurar la viabilidad y funcionalidad celular a bajas temperaturas. Este proceso debe procurar inducir un menor número de variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas que pudieran alterar las membranas celulares, los organelos y la interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Ávila-Portillo *et al.*, 2006; Aydogdu *et al.*, 2021).

Los métodos de criopreservación dependen de la velocidad de congelamiento y descongelamiento, es decir que, dependiendo el tipo de células, se utilizarán protocolos de congelación lenta-descongelación lenta y de congelación lenta-descongelación rápida, en los cuales la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente (Naaldijk *et al.*, 2016; Aydogdu *et al.*, 2021).

4. JUSTIFICACIÓN.

Dado que los ovinos pertenecen a la misma familia *Bovidae* y que, al igual que los bovinos son rumiantes, en este trabajo se evaluará la utilización de los ovocitos de ovino doméstico como citoplastos receptores de carioplastos procedentes de bovino durante la fusión, así como la eventual producción y desarrollo *in vitro* de embriones clones por TNCSI, como una alternativa de reproducción y conservación de ejemplares de relevancia en la producción animal.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Qué efecto tendrá el uso de citoplastos de ovino en la fusión con carioplastos bovinos sobre la producción y desarrollo *in vitro* de embriones por TNCSI?

6. HIPÓTESIS.

Dado que el ovocito contiene toda la información necesaria para la producción de un embrión, el uso de citoplastos de ovino permitirá la fusión, activación y desarrollo *in vitro* de embriones clonados por TNCSI, a partir de carioplastos de bovino adulto.

7. OBJETIVO GENERAL.

Generar embriones clones de bovino mediante la TNCSI, a partir de citoplastos de ovino y carioplastos de bovino.

7.1. OBJETIVO(S) ESPECÍFICO(S).

1. Comparar diferentes métodos para deriva de fibroblastos de piel de bovino.
2. Formar un banco de fibroblastos criopreservados de piel de bovinos de alta calidad genética como fuente de carioplastos.
3. Evaluar la capacidad de crecimiento de fibroblastos de piel de bovino post congelación.
4. Evaluar la utilidad de los citoplastos de ovino como receptores de carioplastos provenientes de bovinos en la TNCSI en la formación y desarrollo de embriones *in vitro*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

A menos que se señale lo contrario, para la colecta de tejidos la solución de transporte y el medio de cultivo celular consistió en DMEM suplementado (88% DMEM, 10% SFB, 2% Antifun-Antibac, pH 7). La solución de lavado consistió en DPBS (solución salina amortiguada por fosfatos de Dulbecco, sin calcio ni magnesio (In Vitro, S. A.), suplementado con 2% de antibiótico y antimicótico 100X (10,000 UI/mL de Penicilina G Sódica, 10,000 µg/mL de Sulfato de Estreptomina y 25 µg/mL de Anfotericina B solubilizada, In Vitro, S. A.) a diferentes concentraciones. Para el transporte de los ovarios se utilizó solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% adicionada con antibiótico (Antibac-Antifun con 10,000 unidades de Penicilina, 10 mg de Sulfato de Estreptomina y 25 µg de Anfotericina B por mL) a una concentración de 1% (Vázquez-Avendaño, *et al.*, 2017).

Las condiciones de incubación fueron las siguientes: temperatura de 38.5°C, mezcla gaseosa de 5% de CO₂ en 95% de aire y humedad a saturación, las cuales fueron empleadas en todos los procedimientos que se llevaron a cabo, tanto para el cultivo de células, como para los embriones generados por TNCSI (Vázquez-Avendaño, *et al.*, 2017).

8. 1. BIOPSIAS DE TEJIDO AURICULAR DE BOVINO.

Las muestras de piel de oreja de bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*), provinieron de tres instancias distintas: un grupo de muestras se obtuvieron de animales destinados al consumo (*post mortem*) provenientes de un rastro local, otro grupo de muestras provenientes de ejemplares vivos pertenecientes a la FES Cuautitlán de la UNAM (razas Angus de 5 años y Holstein de 1 año, ambas hembras) y finalmente ejemplares pertenecientes al Centro de Investigación en Producción Animal (CIPA) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (razas Simbrah de 5 años y Tuli de 1 año, hembras, además de un ejemplar macho de raza Simmental de 6 años).

8. 1. 1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.

De cada ejemplar se rasuró un área de 1 cm² de la parte posterior de la oreja, en la zona distal, posteriormente se lavó con una solución de clorhexidina al 2% y desinfectó con alcohol al 70% por 3 minutos. Mediante un “punch” (dispositivo para la obtención de biopsias), se efectuó una muesca y la biopsia de 0.3 cm² se colocó en un tubo Falcon de 15 mL con solución de transporte para su conservación, se guardó en un termo con geles refrigerantes hasta su traslado al laboratorio, de cada ejemplar se obtuvieron 4 muestras con las características descritas (Figura 2) (Tovar *et al.*, 2008; Jena *et al.*, 2012; Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

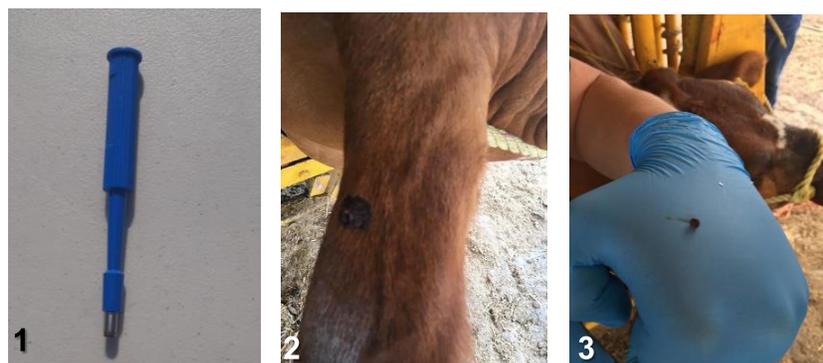


Figura 2. 1. Dispositivo “punch” para toma de biopsias de piel. 2. Área (1 cm²) posterior de la oreja, ya rasurada donde se colectaron las biopsias de piel. 3. Biopsia de piel colectada de 0.3 cm³. 4

Las biopsias fueron llevadas al laboratorio de Reproducción Animal Asistida (W-210) de la UAM-I, a temperatura de 4°C. Una vez ahí las biopsias se lavaron cuatro veces (Figura 3) (Jena *et al.*, 2012; Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

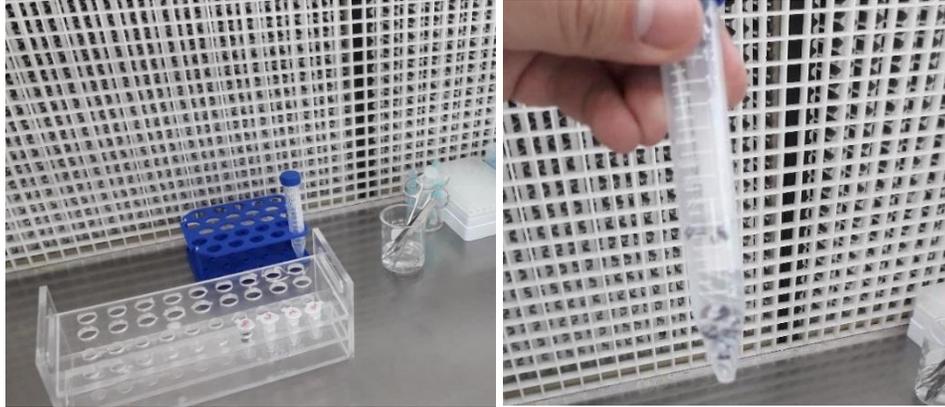


Figura 3. Materiales utilizados para el procesamiento de las biopsias de piel, se observan materiales de disección, en la gradilla se observan tubos con solución de lavado.

8. 1. 2. DERIVA DE FIBROBLASTOS DE PIEL EN CULTIVOS PRIMARIOS.

Se evaluaron 3 tratamientos para la deriva celular: 1. Por disgregación mecánica, 2. Por disgregación enzimática y 3. Por combinación de ambas (mecánica- enzimática M-E).

Para la disgregación mecánica, la biopsia se fragmentó utilizando un bisturí (hoja no. 22) hasta obtener fragmentos menores a 1 mm^2 de diámetro (explantes), sembrados de esta forma para su adherencia a la caja de Petri en medio de cultivo para la deriva celular.

Para la disgregación enzimática, el tejido se fragmentó de la misma forma ya descrita y posteriormente se colocó en un tubo Falcón con Colagenasas tipo I (17100-017, Gibco) y tipo II (17101-015, Gibco) a una concentración de 0.02% y se incubó 2 a 3 horas a $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscilación constante (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

La disgregación M-E, consistió en tomar el sobrenadante resultante de la disgregación enzimática y someterlo al procedimiento descrito para la disgregación mecánica.

En los 3 métodos de deriva celular, a las cajas de Petri de 35mm se les agregaron 3 mL de medio de cultivo adicionado con 1 ng/mL de EGF (Epidermal Growth Factor, por sus siglas en inglés) (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

Las muestras se incubaron en las condiciones antes descritas y fueron monitoreadas a las 24 y 48 h después de su siembra, posterior a esto se evaluaron cada 72 h con la finalidad de verificar que no se contaminaran, y determinar el estado de adherencia y crecimiento de las colonias celulares, además de la reposición o cambio de medio de cultivo. Se mantuvieron en las condiciones señaladas hasta alcanzar la confluencia (población con más del 90% de células adheridas a la base de la caja de cultivo) proceso ocurrido a partir del día 7 y hasta el día 20 después de su siembra.

Una vez confluentes, las células fueron despegadas de su matriz extracelular y de la base de la caja de Petri utilizando 1mL de Tripsina-Verseno (0.05%/0.05%) por 8-10 minutos, en condiciones de incubación. Transcurrido este tiempo, bajo el microscopio se verificó que las células se hubieran despegado de la matriz extracelular en su totalidad (Figura 4) y se detuvo la acción de las enzimas adicionando 1mL de DPBS con 10% de SFB. Posteriormente fueron observadas al microscopio y se colocaron en criotubos para ser centrifugadas a 150 G (1800 rpm). El sobrenadante se retiró y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de DMEM suplementado, se homogenizó para ser resembrado en una caja de Petri, adicionando 2 mL de medio suplementado. Los pasajes celulares se efectuaron cada 7 -10 d, para lo cual se despegaron las células y se resembraron según los métodos ya descritos. La población celular se dividió en dos, una fue resembrada para continuar con el proceso de cultivo celular de cada pasaje, de forma continua durante 3 pasajes, algunas muestras fueron crioconservadas al segundo pasaje y el resto fue sometido a este procedimiento a partir del 4° pasaje.

8. 1. 3. CRIOCONSERVACIÓN.

El proceso de crioconservación de las células consistió en almacenarlas en criotubos sumergidos en Nitrógeno líquido a -196°C, para su uso posterior. Para ello, las células se despegaron de su matriz extracelular y de la base de la caja, y se evaluaron como ya fue descrito. Se colocaron en criotubos de 1.5 mL conteniendo medio de congelación a base de dimetilsulfóxido (DMSO 7%, SFB 15%

en Medio Mínimo Esencial o DMEM, In Vitro, S.A.), el volumen celular se determinó al tomar muestras y hacer los conteos en la cámara de Neubauer con 10 μl de esta suspensión. Los criotubos fueron sometidos a congelación de la siguiente forma: enfriados a 4 °C durante 1 hora, posteriormente a -80°C por 54 días y después a -196°C por un período de 30-90 días hasta su uso (Navarro-Maldonado *et al.*, 2016). Al llegar a dicho momento, los criotubos fueron descongelados en baño María a 38°C por 3 minutos, depositando el contenido en tubos de fondo cónico y centrifugándolos a 150 G (1800 rpm) por 5 minutos para retirar el medio de congelación. Se adicionó 1 mL de medio de cultivo para resuspender el paquete celular que luego se vació en una caja de Petri con 2mL de medio de cultivo celular, para completar 3 mL. Finalmente se incubaron en las condiciones descritas. En cada pasaje se determinó la concentración celular utilizando la cámara de Neubauer (Figura 4).

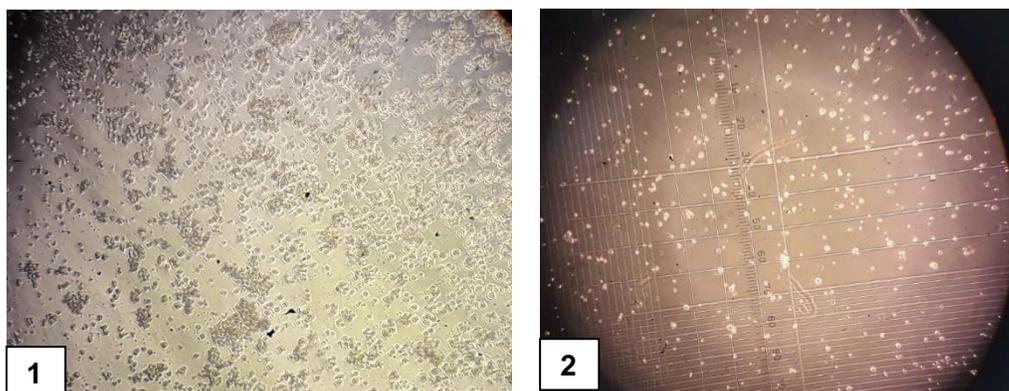


Figura 4. 1. Células en suspensión después de la acción de la Tripsina/Verseno, las células comienzan a despegarse de la matriz extracelular y de la base de la caja de Petri, quedando suspendidas en el medio. 2. Vista de la cámara de Neubauer en microscopio invertido (Aumento a 4X). Se tomó una muestra de 10 μL de las células para el conteo.

8. 2. OBTENCIÓN DE CITOPLASTOS.

Los ovocitos se obtuvieron a partir de ovarios de ovejas domésticas adultas (*Ovis aries*) colectados de un rastro ubicado en el Estado de México. Se transportaron al laboratorio W-210 de la UAM- I en SSF a una temperatura entre 30° y 35°C, en un

lapso de 1 a 2 horas. A su llegada al laboratorio se les realizaron 3 lavados con SSF isotérmica (Figura 5).

8. 2. 1. MADURACIÓN IN VITRO DE OVOCITOS.

De acuerdo con Martínez *et al.* (2019), la colecta de los complejos cúmulos ovocitos (COC) se efectuó mediante la punción/aspiración de folículos ováricos (de 2 a 5 mm de diámetro) utilizando una aguja hipodérmica (calibre 18). Los COC fueron aspirados (con jeringas de 10 mL con 0.5 a 1 mL de medio de colecta) en TCM-199 (In Vitro, S.A.) con HEPES (4-(2-hidroxietil) -1-ácido piperazinetanosulfónico) y 100 UI/mL de heparina a 30°C (Figuras 5 y 6). Se evaluaron y seleccionaron para la MIV los COC tipo I y II. Fueron seleccionaron ovocitos cuya capas de células del cumulus fueran mayor de 4 capas, con un ooplasma oscuro, finamente granulado y homogéneo (Figura 6). Yadav, *et al*, 1997; Bo & Mapletoft 2013.

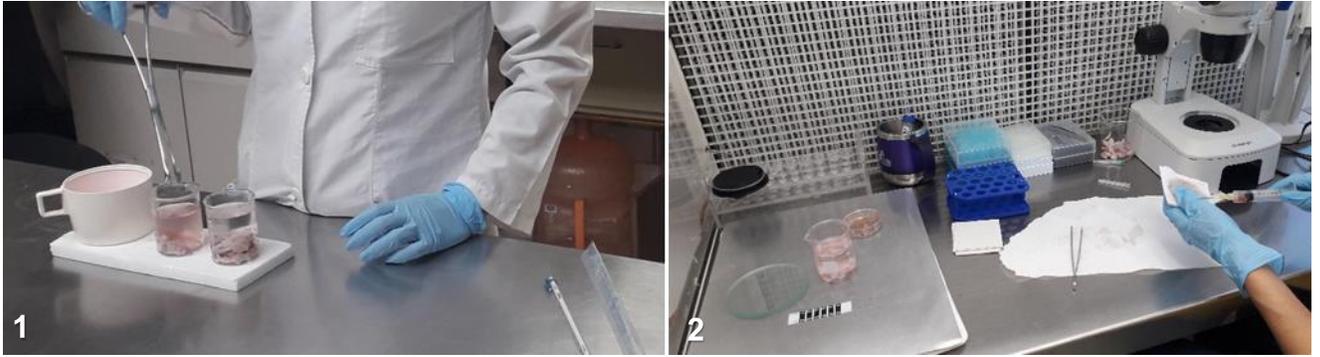


Figura 5. 1. Procedimiento de lavado de ovarios. 2. Colecta de COC. En todo momento se conserva la temperatura para evitar daños en los ovocitos.

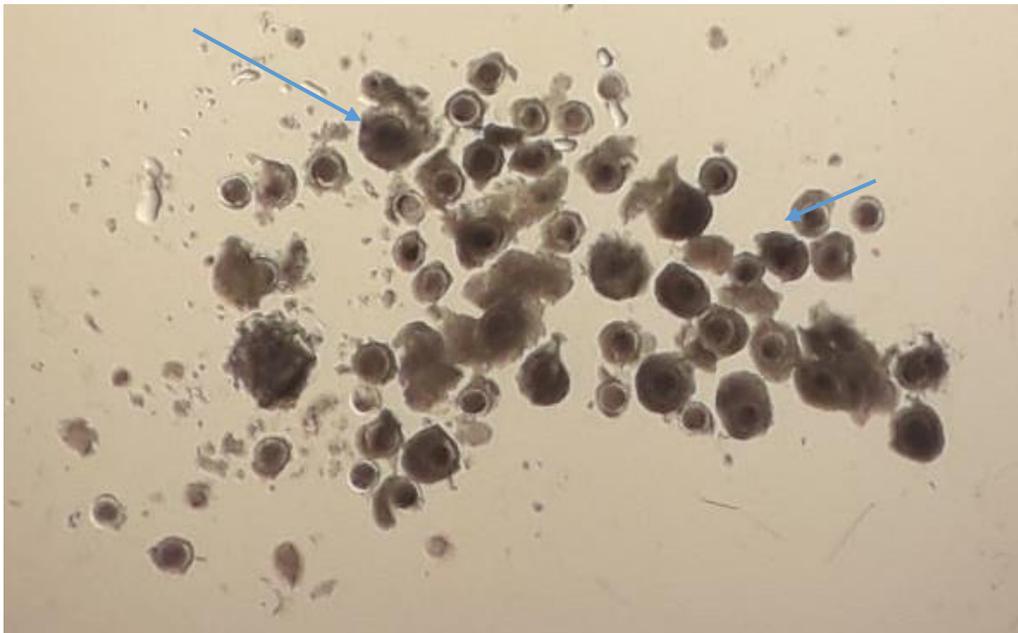


Figura 6. Complejos cúmulo ovocitos (COC) obtenidos después de la punción de los folículos ováricos, paso previo a la selección, con flechas se muestran los COC, con abundante células del cúmulus. Microscopio estereoscópico a aumento 10X.

El procedimiento de maduración *in vitro* (MIV) se llevó a cabo utilizando TCM - 199 adicionado con 10% de SFB (Microlab), 1% de EGF, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hormona folículo estimulante (Folltropin-V, Bioniche), gonadotropina coriónica equina (eCG) 5 UI/mL (Loeffler) y antibióticos al 0.6%. Posteriormente, se cultivaron grupos de 30 COC en una caja de cuatro pozos con 500 μL de medio de MIV cubiertos con 200 μL de

aceite mineral, durante 20 horas en las condiciones de incubación previamente descritas (Vázquez-Avendaño, *et al.*, 2017).

8. 3. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

INTERESPECIE (TNCSI).

8. 3. 1. PREPARACIÓN DE LOS CARIOPLASTOS.

Para la TNCSI se siguió la metodología descrita por Navarro-Maldonado *et al.* (2016). Siete días previos a la TNCSI, los fibroblastos derivados de piel de oreja de bovino del cuarto pasaje fueron descongelados y resembrados después de su crioconservación. Para ello, el criotubo con los fibroblastos (preservado a -196°C) se descongeló en baño María a 38°C durante 3 minutos, el contenido del tubo fue colocado en un tubo cónico y centrifugado a 1800 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de DMEM suplementado, se homogenizó para ser resembrado en una caja de Petri de 35 mm con 2 mL de medio suplementado y se llevó a condiciones de incubación, hasta alcanzar la confluencia. De este modo, alcanzaron el quinto pasaje.

El día de la TNCSI se evaluó la confluencia celular, las células del quinto pasaje se despegaron de la matriz extracelular y del fondo de la caja de Petri adicionándoles Tripsina-Verseno (0.05%/0.05%) por 8-10 minutos, en condiciones de incubación. Una vez despegadas las células e inactivadas las enzimas, se reservó una muestra de 50 µL y el restante fue resembrado en una caja de cultivo nueva. De este modo se obtuvieron los fibroblastos que habrían de utilizarse como carioplastos para ser fusionados con los ovocitos enucleados (citoplastos).

8. 3. 2. PREPARACIÓN DE LOS CITOPLASTOS.

Completada la MIV, los COC fueron desnudados. Para ello se colocaron en un tubo cónico con 500 µL de hialuronidasa a 0.5 mg/mL (Sigma-Aldrich) en medio TCM-199 y se pipetearon vigorosamente hasta eliminar la mayor cantidad de células del

cúmulo. Ya desnudados, los ovocitos se pasaron a una caja de Petri de 35 mm para hacer dos lavados en T2 (TCM-199 suplementado con SFB al 2%), e inactivar la acción enzimática y retirar las células de la granulosa. Se seleccionaron los ovocitos que presentaron extrusión del primer cuerpo polar (1er CP), es decir, aquellos que se arrestaron en la fase meiótica MII. Se preparó pronasa (2 mg/mL en TCM-199 con 10% de SFB) para la digestión de la zona pelúcida (ZP). Los ovocitos en MII se colocaron en medio MIV con demecolcina (0.5 µg/mL) y se incubaron durante 1 hora, para la protrusión del citoplasma que contenía al 1er CP y la placa metafásica. Mientras tanto, en una caja de Petri de 55 mm se colocaron microgotas de 30 µL de T2, T10 (TCM-199 suplementado con 10% de SFB), T20 (TCM-199 suplementado con 20% SFB) y pronasa (2 mg/mL en T10). Las microgotas se cubrieron con aceite mineral. Después de la exposición a demecolcina, los ovocitos se transfirieron a la microgota de T2 para prepararlos como citoplastos, es decir, para ser enucleados. Se colocaron en grupos de 20 a 30 ovocitos y así se fueron pasando a la gota de Pronasa por 3 minutos o hasta que la ZP se disgregara por completo. Inmediatamente después, los ovocitos libres de ZP se colocaron en la gota de T20 para inactivar la acción de la Pronasa

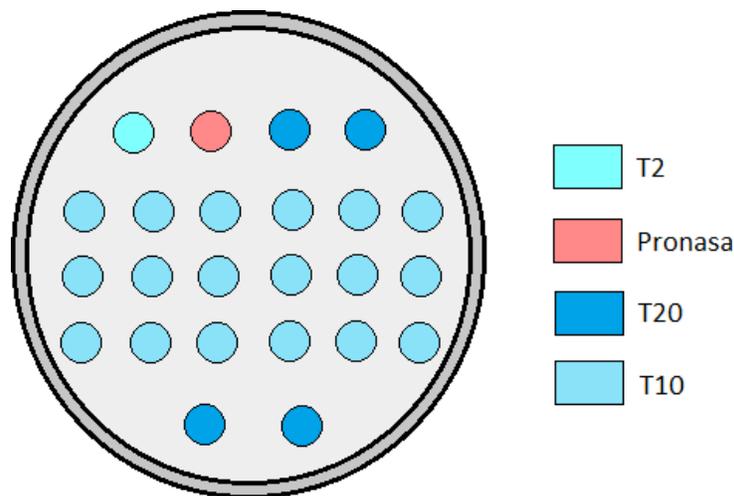


Figura 7. Disposición de las gotas de los diferentes medios para la preparación de los citoplastos. Tomado de Vazquez- Avendaño et al., 2016.

8. 4. ENUCLEACIÓN DE OVOCITOS.

Los ovocitos libres de ZP se distribuyeron en grupos de 20 en las microgotas de T10 y se prosiguió a su enucleación manual utilizando la técnica descrita por Vajta, *et al.*, (2001). Brevemente, se enuclearon con una micronavaja (Bioniche) bajo el microscopio estereoscópico (Olympus SZ61). Se eliminó la protuberancia del citoplasma que contenía el material genético del ovocito (1er CP y placa metafásica). Los citoplastos se recuperaron y se colocaron en gotas de T20 hasta que se reconstituyeron (es decir, que volvieron a tomar su forma esférica).

8. 5. UNIÓN DE CITOPLASTOS DE OVINO Y CARIOPLASTOS DE BOVINO.

Sobre la tapa de una caja de Petri de 35 mm, se colocaron microgotas de 15 μ L de la siguiente manera: Dos líneas horizontales de T20, Fitohemaglutinina (5 mg/mL en TCM-199 con Hepes, Sigma-Aldrich), T2 y medio de Fusión (0.3 M de D-Manitoly 1 mg/ mL de Polivinil Alcohol, Sigma-Aldrich).

Los citoplastos fueron colocados en las microgotas de T20, posteriormente se tomaron uno por uno y se fueron sumergiendo en la microgota de Fitohemaglutinina por 3 a 4 segundos, para luego ser transferidos a la microgota de T2 (previamente se depositaron algunos carioplastos en esta microgota). A continuación, se formaron los tripletes (es decir que se unió un carioplasto con dos citoplastos, colocando al primero entre los dos últimos). Se equilibraron en la microgota de medio de Fusión para su posterior transferencia a la cámara de fusión (BTX microslide, 0.5 mm de apertura, modelo 450).

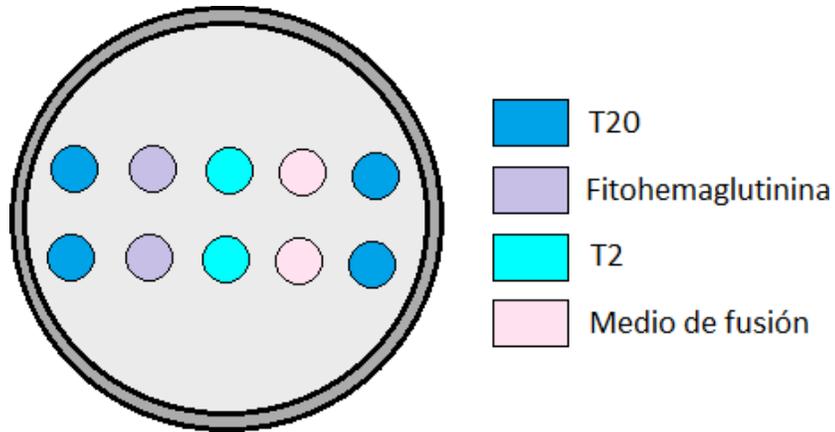


Figura 8. Disposición de las gotas de los diferentes medios para la fusión de carioplastos- citoplastos. Tomado de Vazquez- Avendaño, et al., 2016.

8. 5. 1. FUSIÓN DE TRIPLETES MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS.

Se sometió a los tripletes a un paso de 4 V de corriente alterna (CA) utilizando un electrofusionador (Cell Fusioner Instrument BSL, CF-150) con la finalidad de alinear las células al electrodo positivo, posteriormente la CA se aumentó a 9 V mientras se aplicaba un solo pulso de 100 V/mm de corriente directa (CD) por 9 μ seg. Ya fusionados, los tripletes se colocaron de nueva cuenta en microgotas de T20 en una platina térmica atemperada (Figura 9). Una vez que los tripletes formaron una sola célula, se incubaron 3 horas en medio Cleavage (Cook Medical) para la reprogramación nuclear de los embriones clones reconstruidos de bovino.

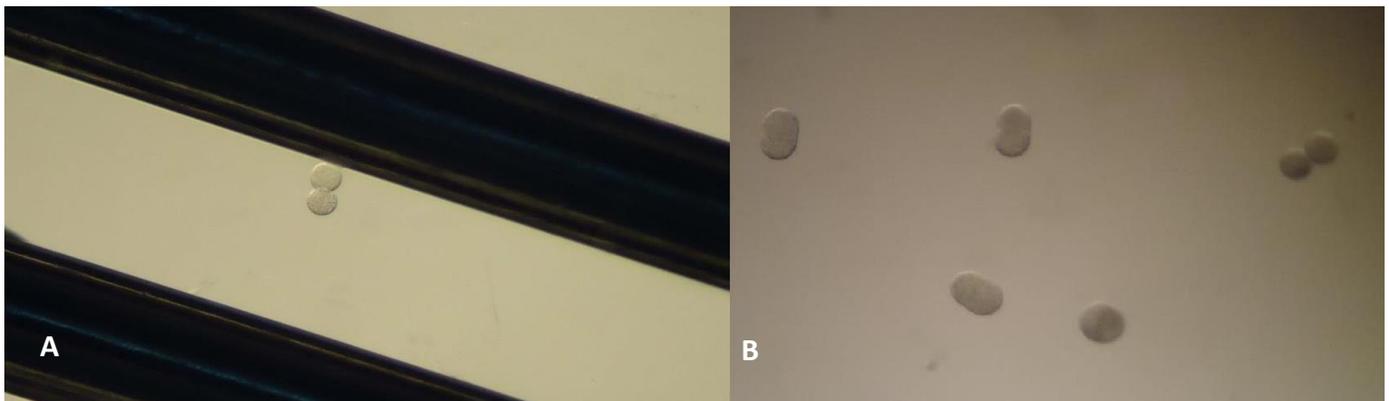


Figura 9. A). Triplete citoplasto-carioplasto-citoplasto entre los electrodos de la cámara de fusión B) Tripletes fusionados mediante pulsos eléctricos. Se observan diferentes estados desde los que están en proceso de

fusión hasta los que ya están completamente fusionados formando una sola célula embrionaria clon. Vistos en microscopio estereoscópico a un aumento de 10 X.

8. 6. DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES CLONES DE BOVINO POR TNCSI.

Los embriones clones reconstruidos de bovino se indujeron a activación química en T2 con 8 μ M de Ionóforo de Ca^{2+} A23187 (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos, en las condiciones de incubación descritas. Posteriormente, se lavaron tres veces en T20 y se colocaron individualmente en microgotas de 2 μ L de medio Cleavage cubiertas bajo aceite mineral, donde se incubaron durante 4 h. Transcurrido este tiempo, los embriones se lavaron tres veces en medio Cleavage.

Para su cultivo se utilizó el sistema celda sobre celda (en inglés Well of Well), que consistió en hacer micropozos en una de las celdas de una caja de cuatro celdas, de acuerdo con el número de clones formados por electrofusión (Navarro-Maldonado *et al.*, 2016). A cada celda se le agregaron 100 μ L de medio Cleavage cubiertas con aceite mineral y se equilibraron durante 4 horas. Los embriones clones de bovino se transfirieron de manera individual a cada uno de los micropozos, incubando en las condiciones ya descritas, durante 7 días (Figura 10).

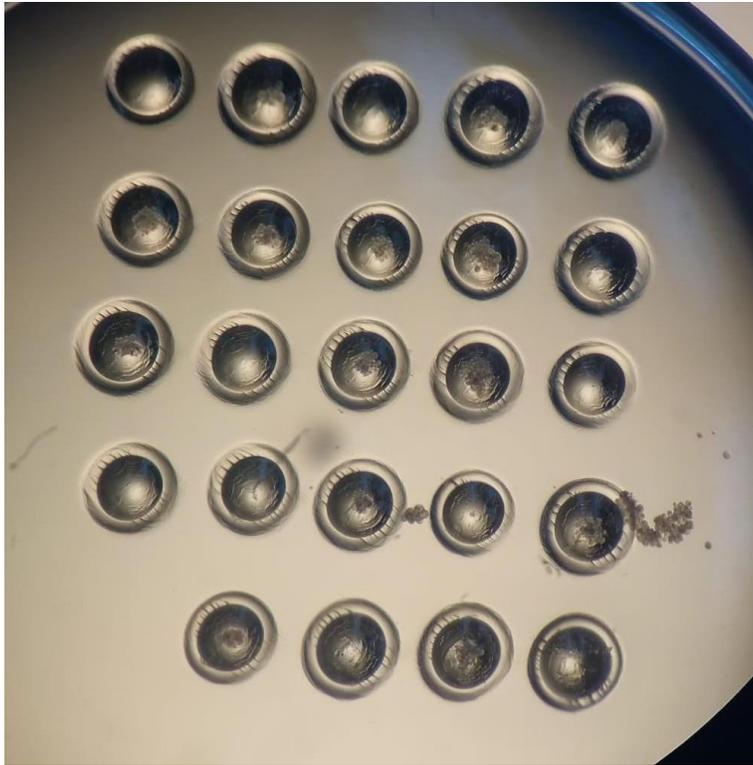


Figura 10. Sistema WOW, visto bajo microscopio estereoscópico a un aumento de 10 X. Se observa la disposición de los micropozos (24 WOW), en cuyo interior se depositaron los embriones clones de bovino obtenidos por TNCSI.

8. 7. DESARROLLO EMBRIONARIO.

La evaluación del desarrollo embrionario se llevó a cabo el día 5 de cultivo (Figura 11), para lo cual se consideró la etapa de segmentación en que se encontraban los embriones, mediante el número de blastómeros observados bajo el microscopio invertido (Navarro-Maldonado *et al.*, 2016).

Una vez transcurridos 5 días de DIV, se tomaron los embriones y se lavaron en 100 μ L de medio Cleavage durante 2 minutos. Después se fijaron en 400 μ L de paraformaldehído al 4% por 24 horas a 4°C. Para el montaje y tinción de cada embrión, se utilizó una gota sobre un portaobjetos, retirando el exceso de fijador y se adicionaron 2.5 μ L de dimidino-2-fenilindol (DAPI) en DPBS, y se cubrió con el cubreobjetos.

Para su observación se utilizó un microscopio de epifluorescencia con filtro UV de 405 nm (excitación) y de 330-380 nm de emisión, de los cuales se tomaron fotografías. Ya obtenidas las imágenes se analizaron los núcleos teñidos con DAPI.

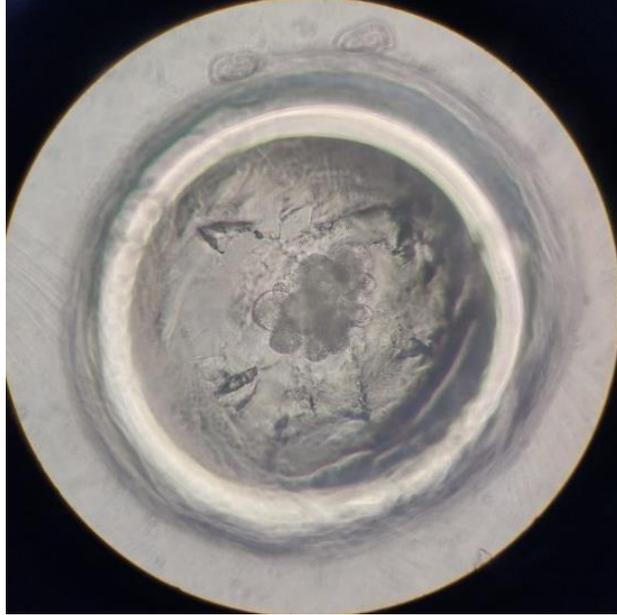


Figura 11. Sistema WOW a aumento de 20 X. En el interior del pozo se observan células embrionarias en el día 5 de su desarrollo post-electrofusión y activación, que corresponden a un embrión clon de bovino Simbrah hembra adulta. Se observan blastómeros simétricos.

8. 8. EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS.

Para tener control en el desarrollo de los embriones generados por TNCSI, se puso a la par un grupo de embriones generados partenogenéticamente, los cuales se indujeron a partir de ovocitos en MII con activación química en T2 con 8 μM de Ionóforo de Ca^{2+} A23187 (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos, en las condiciones de incubación descritas. Posteriormente, se lavaron tres veces en T20 y se colocaron individualmente en microgotas de 2 μL de medio Cleavage, 2 mM de 6- DMAP, cubiertas bajo aceite mineral, donde se incubaron durante 4 h. Transcurrido este tiempo, los embriones se lavaron tres veces en medio Cleavage para que ahí transcurriera su DIV durante 5 d.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la deriva celular, el análisis estadístico fue un comparativo entre los cultivos y pasajes de fibroblastos obtenidos en las biopsias de origen *post mortem e in vivo*. Esto se hizo utilizando la prueba de ANOVA con un nivel de confianza de <0.05 . En tanto que para las cuentas de fibroblastos se utilizó la prueba t-Student para datos pareados.

En cuanto al análisis empleado para el desarrollo de embriones clones producidos mediante la TNCSI, se utilizó una prueba de ANOVA.

10. RESULTADOS.

10. 1. DERIVA CELULAR (CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS A PARTIR DE MUESTRAS DE PIEL DE OREJA DE BOVINOS).

Se colectaron biopsias de piel del pabellón auricular de 2 bovinos *post mortem* procedentes de un rastro local), y 5 bovinos *in vivo* (2 ejemplares pertenecientes a la FES-Cuautitlán, UNAM y 3 ejemplares propiedad del CIPA de la UANL. En el caso de animales *post mortem*, las muestras se transportaron al laboratorio en 2 h, mientras que para los animales *in vivo* el tiempo de transporte fue de 8 a 13 h. De todas las muestras fue posible obtener células de piel en cultivos primarios, durante tres pasajes continuos, a partir del cuarto y quinto pasaje, se crioconservaron a -196°C la mitad de la población celular, mientras que la otra mitad sirvió para lograr el pasaje siguiente. Se seleccionaron para la TNCSI las células de quinto pasaje, obtenidas por el método enzimático, de una hembra adulta Simbrah, debido a que presentó los mejores resultados, aunado a que en 2020 fue campeona mundial de conformación de la raza Simbrah.

10. 2. MÉTODOS PARA LA DERIVA CELULAR.

Se utilizaron tres métodos para la deriva celular: mecánico (Figura 13), enzimático y mixto.

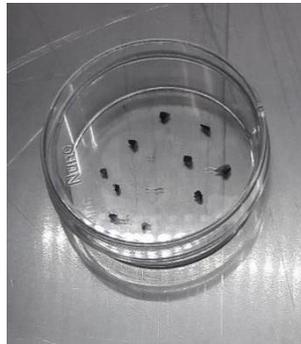


Figura 13. Fragmentos de piel de oreja que se utilizaron para deriva celular por el método mecánico.

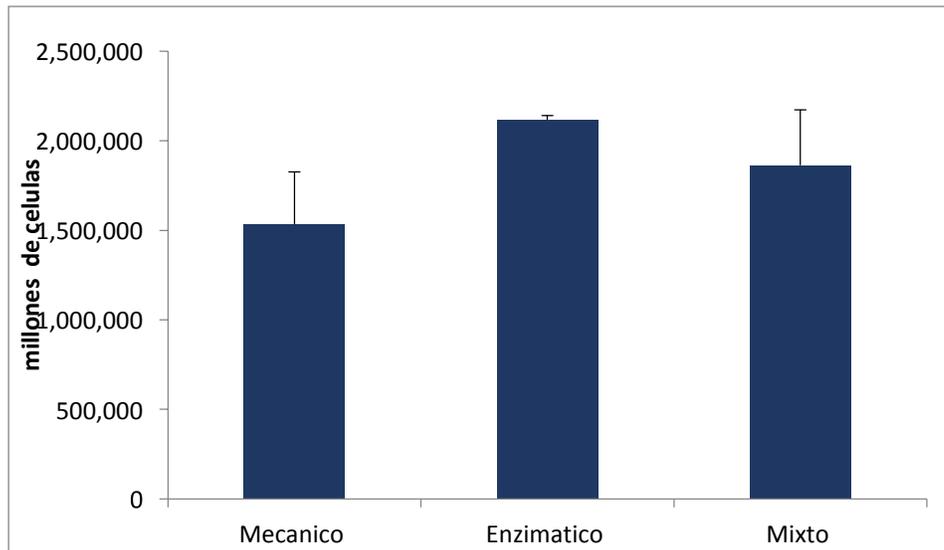
Con el método enzimático se obtuvo más del doble de fibroblastos que con los otros dos métodos (mecánico y mixto) durante el primer pasaje, aunque sin diferencias significativas entre grupos (Tabla 1). Para el segundo pasaje, el método con mayor número de fibroblastos volvió a ser el enzimático, seguido del mixto y finalmente el

mecánico, sin haber diferencias significativas entre métodos. Para el tercer pasaje el enzimático volvió a ser el método con mayor número de fibroblastos, sin haber diferencias significativas. En suma, el método enzimático tuvo la tendencia durante los tres pasajes de ser el que permite obtener el mayor número de fibroblastos, pero dado que no se alcanzaron diferencias significativas a través de la prueba de ANOVA ($p > 0.05$) los tres métodos pueden ser considerados por igual. Importante es también hacer la observación que la dispersión de datos (error estándar), por método es amplia, lo que ratifica que los distintos tratamientos de deriva de fibroblastos pueden ser considerados. Esto último se aprecia más claramente cuando obtenemos el valor promedio (\pm EE) de los primeros tres pasajes, pero, como se ha mencionado, al no alcanzar diferencias significativas, los tres métodos deben ser considerados por igual (Figura 14).

Tabla 1. Número de fibroblastos (promedio \pm EE) y pasajes celulares continuos, según los métodos utilizados para la deriva de fibroblastos (n=7).

Pasaje	Método empleado		
	Mecánico	Enzimático	Mecánico - Enzimático (Mixto)
1°	812,625 \pm 83,478	2,160,400 \pm 543,479	924,000 \pm 386,917
2°	1,424,500 \pm 479,199	2,927,320 \pm 1,010,312	2,400,200 \pm 299,137
3°	2,275,107 \pm 859,909	2,647,125 \pm 1,000,519	2,266,000 \pm 856,447

Figura 14. Concentración total de fibroblastos, obtenida al finalizar los pasajes continuos, (promedio \pm EE) según los métodos empleados en la deriva celular (n=7)



Una variable de interés metodológicas así como funcional de la calidad del cultivo de fibroblastos, es el tiempo que tardan en establecer la mayor población en el fondo de la caja Petri (confluencia), recordando que en este tipo celular, el crecimiento es en monocapa y cesa cuando tiene cercano contacto entre cada uno de los fibroblastos. Así, para alcanzar la confluencia, en el primer pasaje, el método mixto fue el que tuvo el menor tiempo (13.5 días, $p > 0.05$), seguido del enzimático y el mecánico (Tabla 2). En el segundo y tercer pasajes, los tiempos fueron similares entre métodos ($p > 0.05$). Al igual que en la variable anterior, las dispersiones del tiempo para confluencia entre cultivos fueron amplios y en ningún caso se alcanzaron diferencias significativas con prueba de ANOVA, lo que indica que los tres métodos deben de ser considerados por igual.

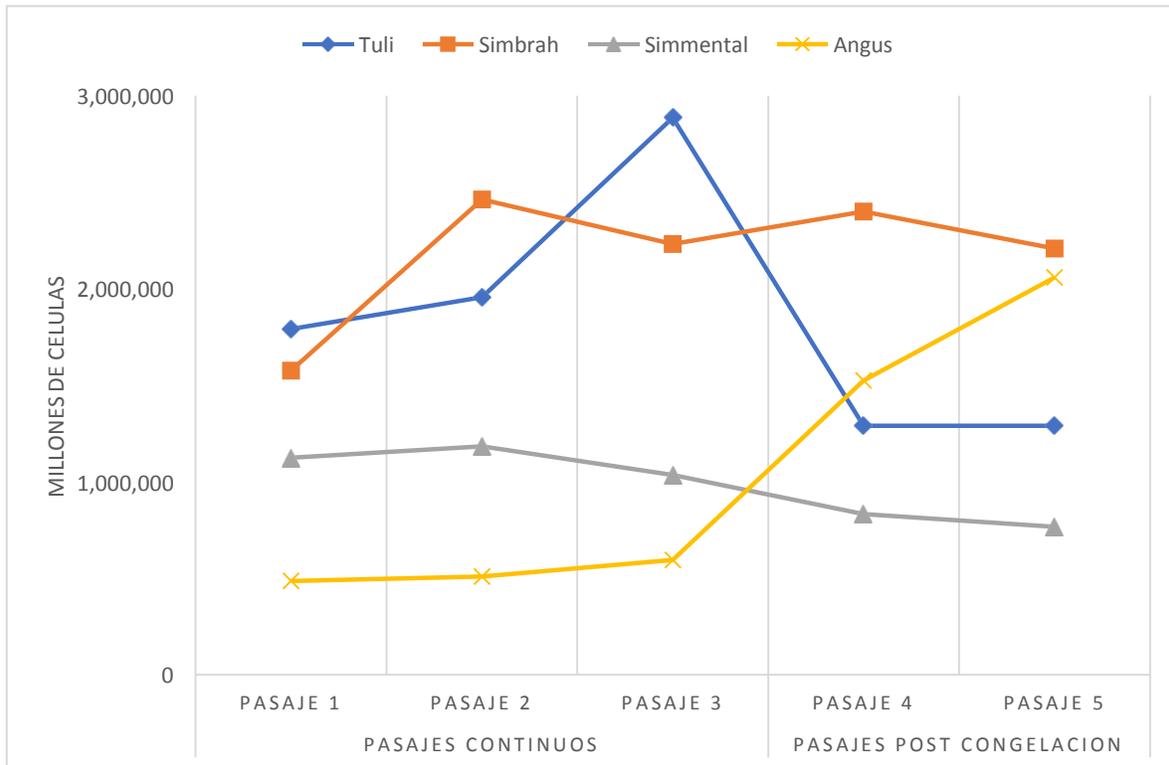
Tabla 2. (Promedio \pm DE) de días que tomo el crecimiento de las colonias de fibroblastos desde la siembra hasta la confluencia registrados en cada pasaje celular.

Pasaje	Método empleado		
	Mecánico	Enzimático	Mecánico –Enzimático
1°	21 \pm 7.5	18.6 \pm 6.3	13.5 \pm 8.6
2°	9.3 \pm 2.5	8.8 \pm 3.2	9.2 \pm 2.8
3°	6.8 \pm 0.2	7.2 \pm 2.1	7.5 \pm 3.1

La edad de los animales muestreados no mostró ser un factor determinante para el cultivo celular ni para que éstos logaran la confluencia celular, pues tanto los bovinos jóvenes (Tuli y Holstein de 1 año) como los adultos (Angus, Simbrah, de 5 años y Simmental de 6 años) hubo desarrollo y crecimiento celular (fibroblastos) la variación de los cultivos radicó en los conteos de fibroblastos donde se obtuvieron cuentas bajas como: 487,666 (1er pasaje), 509,666 (2do pasaje), 595,874 (3er pasaje) para el ejemplar Angus y la más alta de 3,255,000 (1er pasaje), 3,119,200 (2do pasaje) para el ejemplar Holstein y 2,887,500 del 3er pasaje para el ejemplar Tuli, sin diferencias significativas por pruebas pareadas con t-Student ($p > 0.05$).

En relación al crecimiento de fibroblastos por pasaje, se observan diversos comportamientos (Figura 15), por ejemplo, la raza Angus tuvo valores inferiores en relación al número de fibroblastos durante los tres pasajes iniciales con respecto a las demás razas, sin embargo luego de la criopreservación mostró los mayores aumentos. Por su parte el Simmental y la Tuli tuvieron disminuciones poblacionales de fibroblastos importantes luego de la criopreservación, Por su parte la Simbrah mostró un comportamiento homogéneo en cuanto al número de fibroblastos antes y después de la criopreservación. Es importante señalar que debido al tiempo y muestras disponibles para el presente trabajo de tesis, no fue posible aumentar el número de repeticiones para corroborar los comportamientos de crecimiento de fibroblastos referidos y para poder hacer análisis estadísticos robustos.

Figura 15. Crecimiento de los cultivos de fibroblastos obtenidos por cada una de las razas muestreadas, por pasaje celular del 1° al 5° pasaje celular antes y después de la congelación.



* Se hizo el seguimiento de solo 4 de las 7 biopsias debido a que no hubo respuesta positiva después de la crioconservación en 3 de ellas.

10. 3. MORFOLOGÍA CELULAR.

La morfología observada en los fibroblastos fue variable, dependiente del grado de confluencia. Así fue posible observar células fusiformes o estrelladas, con prolongaciones citoplasmáticas cortas y anchas (menor confluencia), o largas, delgadas y ramificadas en confluencia de más del 80% (Figura 16), siendo un proceso similar en todos los cultivos celulares.

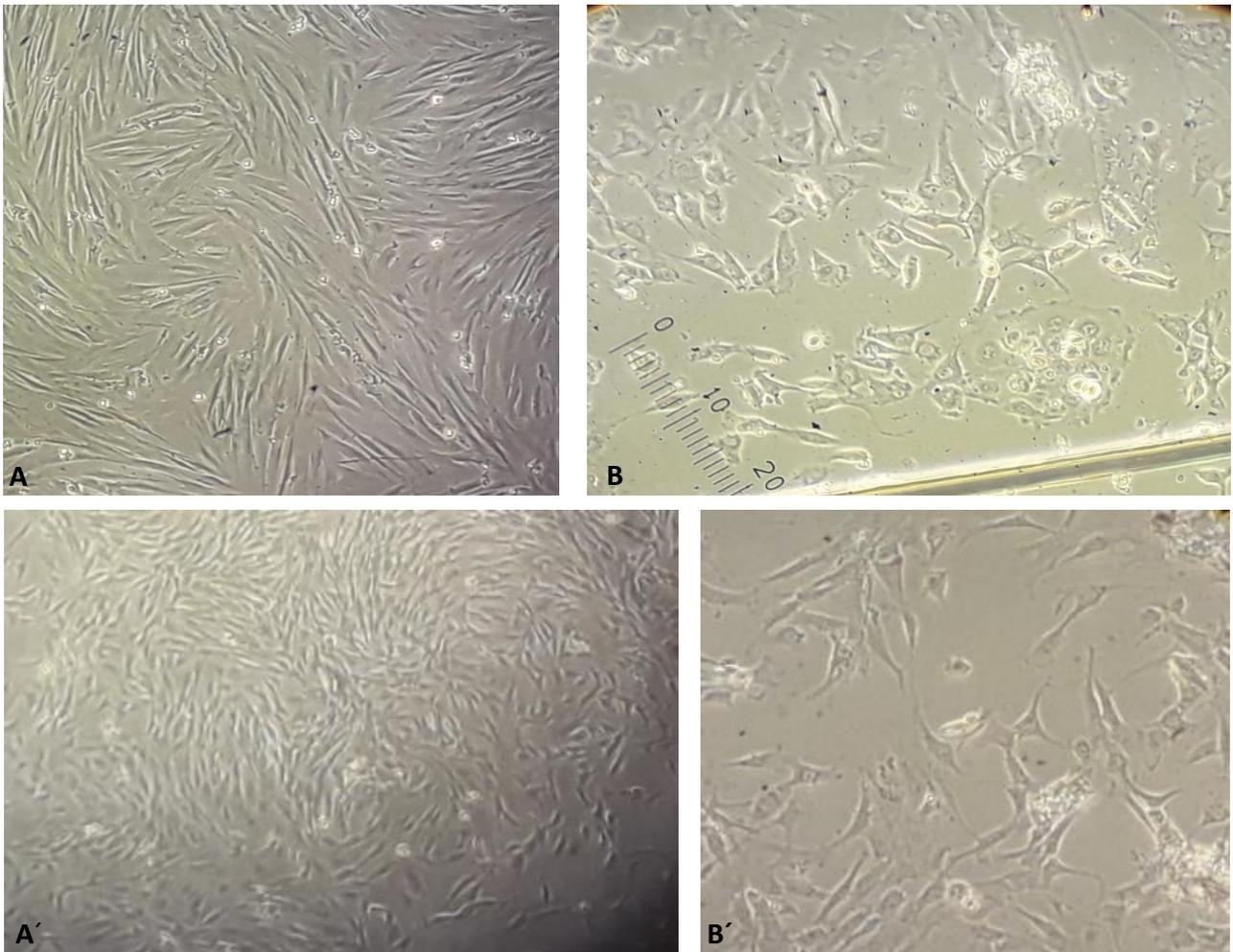


Figura 16. Fibroblastos obtenidos a partir de piel de oreja de bovino. A. cultivo de fibroblastos de hembra joven raza Tuli *in vivo* pertenecientes al 3° pasaje, su morfología es alargada (fusiformes) con extensiones del citoplasma (lamelipodios), confluencia cercana al 100%, (Aumento a 10X). B. Fibroblastos de bovino *post mortem*, con morfología engrosada, presentando las características de un fibroblasto, ambos cultivos se observan bajo el microscopio invertido (Aumento a 20X). A´ Fibroblastos de piel de bovino adulto macho raza Simmental del 2° pasaje celular, 90% de confluencia (Microscopio invertido, aumento a 40X). B´. Fibroblastos de piel de bovino adulto *post mortem* (Microscopio invertido, aumento a 40X).

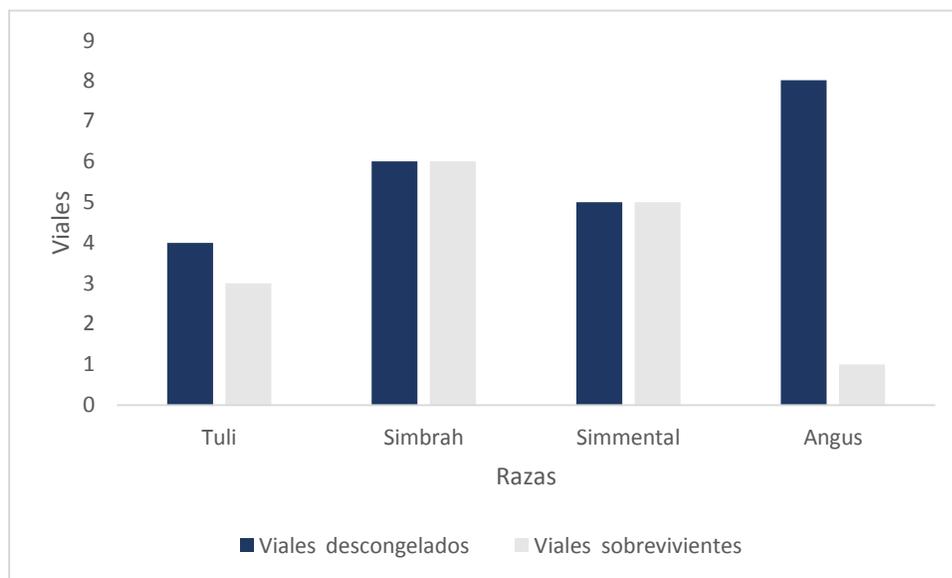
10. 4. CRIOCONSERVACIÓN.

Las células se congelaron en nitrógeno líquido a -196°C por 48 días (Figura 18). Se obtuvieron 18 viales con fibroblastos de piel de oreja de bovino del cuarto pasaje, 15 viales del tercer pasaje y 14 viales del segundo pasaje.

Con respecto a la sobrevivencia de fibroblastos durante el cultivo, se tomó en cuenta la raza y la relación con el número de viales descongelados, de manera que la raza Simbrah y Simmental tuvieron 100% de sobrevivencia (Figura 17) aún y

cuando el conteo celular (Figura 15) se haya conservado o disminuido ligeramente. Por otro lado la raza Tuli, tuvo una sobrevivencia del 75% (Figura 17), sin embargo con una caída importante de sus poblaciones de fibroblastos en cultivo, puesto que en tercer pasaje tenían cerca de 3 millones y en pasajes 4 y 5 (postcriopreservación) alcanzó solo poblaciones de un poco más de 1 millón, en suma, mostró una importante afectación de sus poblaciones de fibroblastos (Figura 15) y finalmente la raza Angus fue la que mostró menor sobrevivencia (1 tubo de 8 que se descongelaron, 12.5%, Figura 17), sin embargo fue la raza que mostró el mejor crecimiento de fibroblastos postdescongelación, pasando de 500 mil en tercer pasaje a 1 millón en el cuarto (postdescongelación) y de ahí a 1.5 millones en el quinto pasaje (Figura 15).

Figura 17. Relación de viales descongelados y aquellos cuyas células sobrevivieron a la descongelación, por raza.



10. 5. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

INTERESPECIE(TCNSI).

10. 5. 1. MIV

Se hicieron tres repeticiones, utilizando un total de 254 ovarios provenientes de borregas adultas sacrificadas en un rastro local, de los cuales se obtuvieron 355 ovocitos (1.4 ovocitos/ovario), de los que 273 (77%) eran de calidades I y II

(ASEBIR, 2015). De éstos, 135 ovocitos mostraron extrusión del primer cuerpo polar, dando una tasa de MIV del 50%. Los ovocitos madurados fueron tratados para obtener citoplastos y con ellos fue posible formar 60 tripletes.

10. 5. 2. TNCSI

Los 60 tripletes fueron fusionados y activados para su desarrollo *in vitro*. A los 2 y 5 días de cultivo se evaluaron, observándose que más del 50% segmentaron, además que hubo también altas tasas de fragmentación (Tabla 5).

Tabla 5. Tasa de segmentación de embriones clones de bovino producidos por TNCSI y de partenogénéticos ovinos (n=60).

	Embriones N	Tasa de segmentación n (%)	Tasa de fragmentación n (%)
TNCSI	60	33 (55%)	27 (45%)
Partenogénéticos	55	36 (65%)	19 (35%)

Como control del sistema de cultivo, se emplearon embriones partenogénéticos de ovino (n=55) de los cuales hubo desarrollo embrionario en un 65%. En la Tabla 6 se muestra el desarrollo obtenido con los embriones clones de bovino generados por TNCSI, en comparación con los embriones partenogénéticos de ovino. Para los embriones clones, la etapa máxima lograda del desarrollo embrionario fue de mórula de más de 16 células (46%), mientras que los partenogénéticos llegaron hasta la etapa de blastocisto en un 54%.

En la Figura 18 se observa el sistema de micropozos o WOW, con células formadoras de embriones de bovino adulto hembra de raza Simbrah en cada micropozo, en diferentes etapas de la segmentación.

Tabla 6. Tasa de desarrollo de embriones clones de bovino producidos por TNCSI (n=33) y partenogenéticos de ovino n=24 (5 días de cultivo *in vitro*).

	N Embriones	4-6 células n (%)	8 – 10 células n (%)	12 - 14 células n (%)	Mórulas >16 células n (%)	Blastocistos n (%)
TNCSI	33	5 (15%)	6 (18%)	7 (21%)	15 (46%)	0 (0%)
Partenogenéticos	36	4 (11%)	2 (5%)	5 (14%)	6 (16%)	19 (54%)

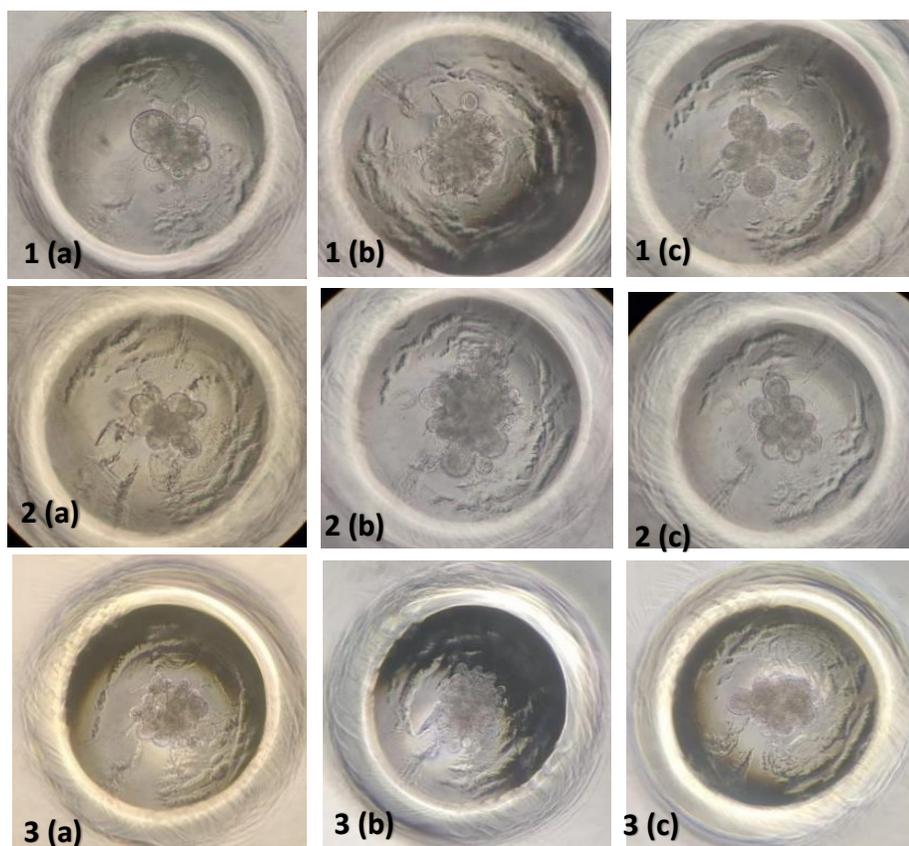


Figura 18. Embriones clones de bovino adulto (hembra raza Simbrah) obtenidos por TNCSI en sistema WOW. 1. Desarrollo embrionario a las 2 d de cultivo. 2. A los 4 d de cultivo. 3. A los 5 d de cultivo. (a) Embriones con blastómeros asimétricos. (b) Embrión fragmentado. (c) Mórula de 16 células, se observan los blastómeros simétricos bien definidos desde el inicio hasta el final del cultivo. Vistos bajo microscopio invertido a un aumento de 20X.

En cuanto a los embriones partenogénéticos, 19 (54%) que llegaron a blastocisto, 5 (26%) fueron tempranos, 4 (21%) tardíos, 4 (21%) en eclosión y 6 (32%) eclosionados, con la cual validó el sistema de cultivo y de DIV.

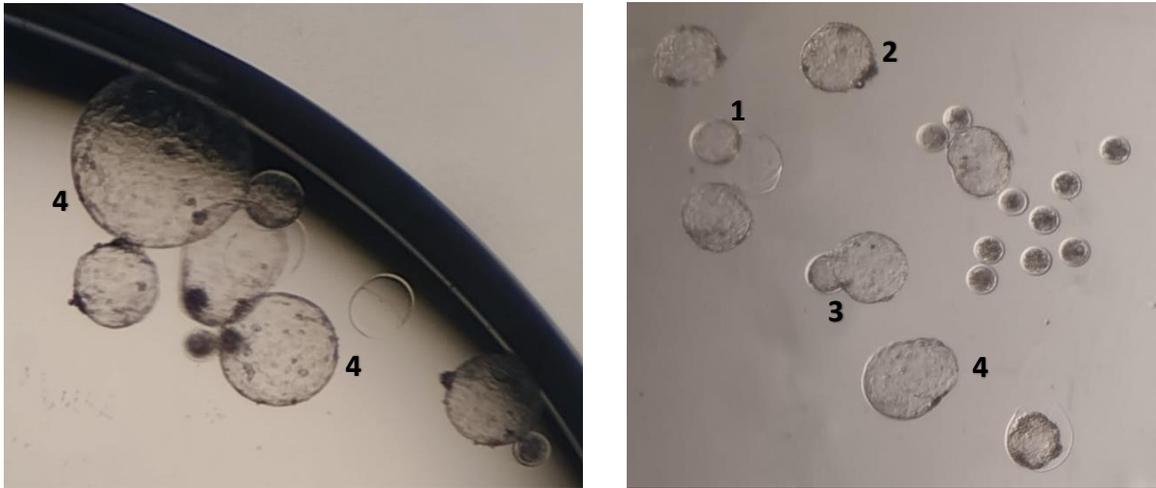


Figura 19. Embriones partenogenéticos de oveja al día 7 de cultivo. Se observan (1) blastocistos tempranos, (2) tardíos, (3) en eclosión y (4) eclosionados. Vistos en microscopio estereoscópico a un aumento de 10X.

Se efectuó la tinción DAPI para observar los núcleos de los blastómeros de los embriones clones (Tabla 7 y Figura 19). De los 15 embriones clones en estado de mórula 8 (53%) tuvieron 12 blastómeros con núcleo, 3 (20%) tuvieron 14 blastómeros y 4 (27%) 16-18 blastómeros.

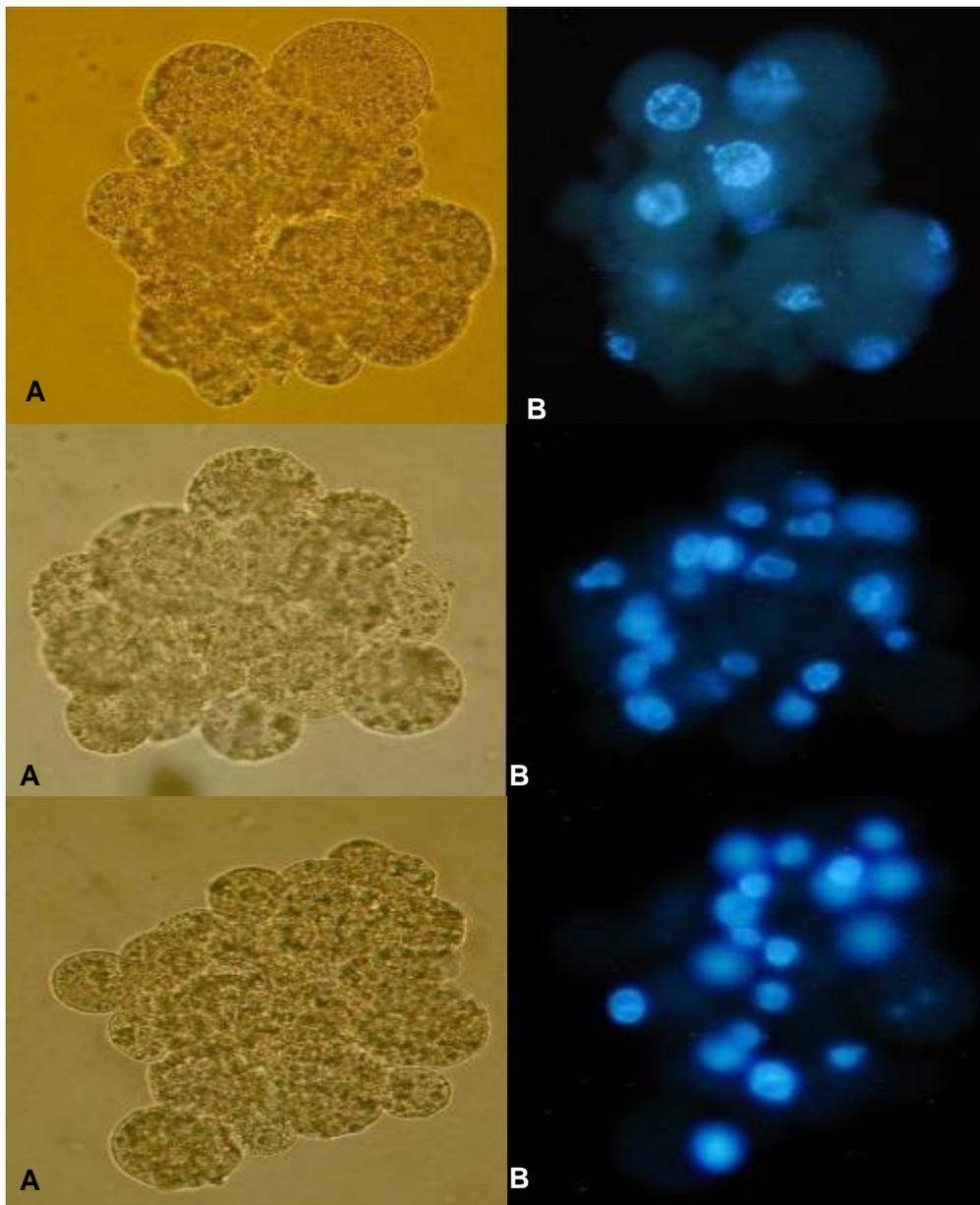


Figura 20. Embriones clones de hembra adulta raza Simbrah con tinción de núcleos con DAPI. Vistos en microscopio de epifluorescencia con filtro UV-2^a, longitud de onda 330-380 nm A) Embrión clon en campo claro. B) aumento a 400X. El número de núcleos (1), es acorde al número de blastómeros que tienen.

La tinción DAPI sirvió para evidenciar el grado de fragmentación de embriones clones, mostrando la presencia de blastómeros anucleados y multinucleares, (Figura 21), confirmando que de los 27 (45%) embriones fragmentados: 8 (30%)

tuvieron presencia de blastómeros polinucleares, 15 (55%) estaban con núcleos picnóticos y 4 (15%) anucleados.

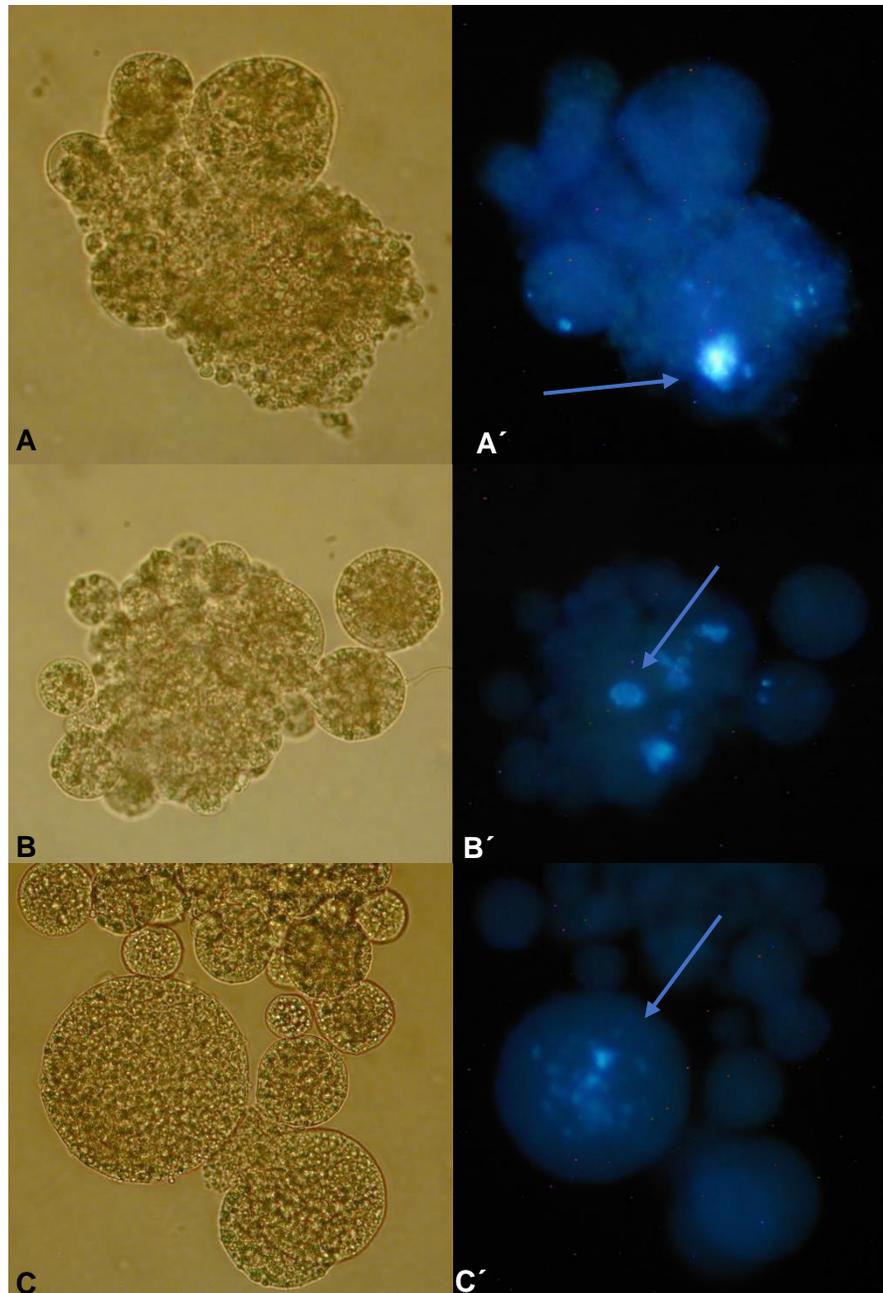


Figura 21. Embriones clones de hembra adulta raza Simbrah fragmentados. Vistos en microscopio de epifluorescencia con filtro UV-2^a, longitud de onda 330-380 nm (A, B y C) Embriones en campo claro. A').Embrión con blastómeros en proceso de picnosis , B') Embrión clon con blastómeros polinucleares C') Embrión clon con blastómeros anucleados, aumento a 400X.

11. DISCUSIÓN.

La implementación de técnicas de Biotecnologías de la Reproducción Animal Asistida pareciera estar debidamente estandarizada en la literatura especializada en relación a su reproducibilidad y homogeneidad de resultados, sin embargo, cuando esto se traslada a un laboratorio, aparecen variables que es necesario ubicar y controlar. Además de que el objetivo central de este trabajo fue obtener cultivos primarios de fibroblastos bovinos cuya calidad genética puede utilizarse con fines de clonación de embriones. Para ello fue necesario generar experiencia desde la obtención de muestras y su procesamiento a partir de biopsias de pabellón auricular, iniciando con animales destinados para abasto cuyas muestras fueron obtenidas en un rastro local, con la finalidad de conocer cómo se comportan muestras de este tipo de especies. Posteriormente se realizaron muestreos con ganado vivo, en la FES- UNAM, de ahí se obtuvo experiencia con el manejo del ganado (Angus y Holstein) en cuanto al uso del sacabocados “punch” para toma de biopsias “in vivo”, así como su manejo y transporte hasta su procesamiento en el laboratorio (24-48 horas), con lo cual se pudo obtener cultivos primarios de fibroblastos de forma eficiente. Establecido y probado este protocolo se procedió a la toma de biopsias de ejemplares en la UANL, con el correspondiente traslado (vía aérea) desde el CIPA en el municipio de Linares, en Nuevo León hasta el Laboratorio ubicado en la UAM-I en Ciudad de México (48-96 horas).

La técnica para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos así como los sucesivos pasajes fue posible en todo los individuos procesados, independiente de su raza, sexo, edad y lugar de procedencia, demostrando la viabilidad de la técnica empleada, tal como lo mencionan Takashima (1998) y Selokar *et al.* (2011), quienes reportaron, para diferentes especies de mamíferos, incluyendo a los bovinos, que la obtención de cultivos primarios de fibroblastos a partir de biopsias provenientes de orejas de individuos adultos es factible y relativamente de fácil obtención. Lo que pone de manifiesto que es una técnica adecuada con la finalidad de la clonación de embriones.

Con respecto a la concentración obtenida de fibroblastos, resultó evidente que existió una gran dispersión de valores (EE), lo que significa la dificultad inicial para la estandarización de esta técnica y pone en relevancia las variables relacionadas ya mencionadas, diferentes raza, sexo y edad (Tabla 1). Por otro lado es de destacar que de los métodos empleados el enzimático fue el que permitió obtener el mayor número de fibroblastos durante los primeros tres pasajes celulares evaluados con respecto a los otros dos métodos, el mecánico y el M-E, sin embargo, es importante señalar que el método enzimático fue también el que presentó la mayor cantidad de dispersión (EE), por ejemplo durante el segundo pasaje, este método tuvo 1,010,312 vs 479,199 y 299,137 respectivamente, aun con ello y por el tamaño de muestra ($n=7$) no fue posible encontrar diferencias significativas.

Durante el tercer pasaje celular, las cantidades promedio de fibroblastos por los tres métodos fueron relativamente cercanos, lo que indica que independientemente del método de deriva celular, en dicho pasaje las condiciones de cultivo y el comportamiento celular van homogenizándose (2, 647,125 vs 2, 275,107 y 2, 266,00 respectivamente).

Al promediar los tres pasajes celulares (Figura 12) resultó notorio que la tendencia de obtener el mayor número de fibroblastos es a través del método enzimático, sin embargo, dadas las grandes dispersiones (EE) no fue posible obtener diferencias significativas ($p>0.05$). Después del método enzimático siguió, el M-E y finalmente el mecánico. Es importante señalar que lo esperado fisiológicamente en una necesidad de auto reparación del cuerpo (por ejemplo ante una herida) será la salida de los fibroblastos a partir de tejido aledaño y/o circundante, lo que significaría la bondad del método mecánico, ante ello, sería importante evaluar no solo la cantidad de los fibroblastos obtenidos (como aquí se hizo) sino también algunos otros aspectos o variables relacionadas a su calidad fisiológica, pues de ello dependerá el que sean seleccionados para obtener una mejor calidad como carioplastos en la técnica de clonación de embriones. Al momento esto no estuvo al alcance de este trabajo.

Por otro lado Lin *et al.* 2009, generaron cultivos primarios de fibroblastos de bovinos de raza Simmental, a partir de 1 cm² de piel, la cual fragmentaron hasta alcanzar un tamaño de 2mm² (método mecánico, obteniendo cuentas celulares correspondientes a 1.5x10⁴ debido a utilizaron un método de micropozos sin definir el tamaño específico. En contraste en el presente trabajo se utilizaron cajas Petri de 35mm de diámetro, lo que suponemos son de una superficie mayor y en correspondencia con el número de fibroblastos obtenidos.

Por su parte Takashima en 1998, reportó un total de fibroblastos en confluencia de 1.2 x 10⁶ por caja de cultivo de 35 mm, mientras que Seluanov *et al.*, en 2010 reportaron una concentración de 5 x 10⁶ fibroblastos confluentes en caja cultivo de 10 cm de diámetro. Estos datos son coincidentes con lo encontrado en el presente trabajo de tesis donde la concentración más baja reportada fue de 0.9 x 10⁶ y la más alta de 2.9 x 10⁶ utilizando cajas Petri de cultivo de 35 mm de diámetro.

Con respecto al tiempo necesario en cada pasaje celular para que los fibroblastos alcanzaran la confluencia (Tabla 2) es importante observar como durante el primer pasaje el tiempo es especialmente mayor, en comparación a los pasajes segundo y tercero. Es posible que el proceso de adaptación de los fibroblastos a las condiciones del cultivo *in vitro*, así como al tiempo de traslado y de procesamiento en el laboratorio influye en este resultado. El menor tiempo obtenido en el primer pasaje fue con el método M-E con 13.5 días en promedio, en tanto que con los otros dos métodos (enzimático y mecánico), el tiempo fue un poco más del 50% superior. A partir del segundo pasaje los tiempos entre métodos son menores a los iniciales y son homogéneos entre métodos, por ejemplo en el segundo pasaje fueron de 8.8, 9.3 y 9.2 para los métodos mecánico, enzimático y M-E. Y para el tercer pasaje fueron de 7.2, 6.8 y 7.5 respectivamente. Por otro lado Takashima en 1998, reportó que con el método enzimático hay inicio de crecimiento de fibroblastos a partir del día 3 en biopsias de diferentes mamíferos, mientras que Seluanov *et al.*, en 2010, reportaron crecimiento de fibroblastos (2-5 días), después de la siembra por el método mecánico en biopsias de humanos. Sin embargo ambos trabajos

contrastados no precisan el tiempo a llegar a la confluencia, ni reportaron lo sucedido en pasajes celulares posteriores.

Con respecto a la morfología de los fibroblastos, en el presente trabajo, se encontró que ésta depende de la condición de confluencia. Si la confluencia es evidente, la formación alargada es notoria, sin embargo si la confluencia aún no se ha establecido, y existen amplios espacio entre fibroblastos, la morfología es poliédrica a este respecto hay coincidencia con lo reportado por Takashima en 1998, Seluanov *et al.* en 2010, y Bolaños, 2017 todos ellos trabajando con fibroblastos obtenidos de piel de oreja de bovinos y otros mamíferos, las describieron como células grandes con núcleo esférico u ovoide, que presentan lamelipodios, (prolongaciones de la membrana celular producidas por la acción de microfilamentos de actina), con la característica de crecer en monocapa, adquiriendo un aspecto fusiforme al llegara la confluencia.

Además de ello Takashima (1998) precisó que casi el 90% de los fibroblastos cultivados, presentaron una morfología normal, basándonos en el tamaño, simetría, ausencia de cuerpos picnóticos y/o vacuolas, siendo estos cultivos de fibroblastos aptos para su uso como carioplastos en la TNCSI.

11. 2. CRIOCONSERVACIÓN.

Otro de los objetivos trascendentales del presente trabajo consistió en verificar el efecto de la criopreservación de los fibroblastos luego del tercer pasaje celular. Crioconservarlos un tiempo cortó y posteriormente descongelarlos para verificar su crecimiento en los pasajes cuatro y cinco. Cabe mencionar que estos pasajes son (especialmente el cinco) los más recomendados para la utilización de los carioplastos en la TNCS. Además es importante señalar que se debe sincronizar este pasaje celular con respecto a los citoplastos que se usaran como receptores de estos fibroblastos para la clonación de embriones, es decir en cada ensayo de clonación (fusión) deben existir fibroblastos en el quinto pasaje. Además el criopreservar fibroblastos de pasajes iniciales, provee un banco cuya finalidad es

contener material genético para en posteriores oportunidades pueda descongelarse y multiplicarse (Naaldijk *et al.*, 2016).

Con respecto a los resultados aquí obtenidos, en los pasajes de fibroblastos luego de la crioconservación (Figura 13), el comportamiento fue diferente dependiendo de la edad y de las condiciones específicas en cada cultivo. De modo que en tanto que algunas razas mejoraron el cultivo de fibroblastos luego de la criopreservación (Simbrah y Angus), otras fue sensible su disminución en número poblacional de fibroblastos (Tuli y Simmental). Es importante realizar más estudios al respecto para conocer si existe alguna variable de importancia entre las raza de los aquí utilizadas con la capacidad de desarrollo de los fibroblastos en cultivo postcongelación o si esto se debe a alguna variable presente en los individuos. Las concentraciones de fibroblastos en estas razas de bovinos, en los pasajes cuatro y cinco estuvieron cercanas a $1 - 2 \times 10^6$, lo cual es adecuado para proveer citoplastos para la TNCS.

Con respecto a medio crioprotectores se encontraron algunas diferencias con otros autores tal como Chang-Qing *et al*, 2011, quienes reportaron buenos resultados en la criopreservacion de fibroblastos de bovino utilizado un medio de congelación con 10% de DMSO, 50% SFB y 40% de DMEM mientras que en el presente trabajo usamos 7 % de DMSO y 15% de SFB por ser los más eficientes en la congelación de fibroblastos de ovino, resultando tener una eficiencia similar en la congelación de células provenientes de cultivos primarios de bovino.

Con respecto al total de viales congelados y descongelados así como posterior desarrollo de los fibroblastos en cultivo, en el caso del Simbrah y Simmental se tuvo éxito en el 100 % de los viales descongelados, en tanto que el del Tuli fue del 75%. Si sumamos los resultados de estas tres razas en promedio obtendríamos un 90 % de sobrevivencia, lo que es coincidente con lo reportado por Lin *et al*, en 2009, quienes señalaron un 91% de sobrevivencia en fibroblastos de bovino post descongelación utilizando 10% de DMSO, 50% de SFB y 40% de DMEM. En el

caso de lo sucedido con la raza Angus, con apenas 15.5 % de sobrevivencia, pudo deberse a algún error metodológico o alguna variable no considerada. Finalmente comentar que Almeida *et al*, 2019, confirmaron que con una tasa de sobrevivencia en cultivo del 90% de los fibroblastos post descongelación se garantiza la permanencia de aspectos morfológicos y fisiológicos saludables de fibroblastos para ser utilizados como carioplastos en la TNCS.

11. 3. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS

INTERESPECIE(TNCSI).

En este trabajo y exclusivamente con la finalidad de experimentación, se aprovechó la técnica montada en el laboratorio de MIV de ovocitos de ovino así como el DIV de embriones clones ovinos, considerando la limitación en tiempo derivado de las adaptaciones y el enfoque que se fue creando durante la realización del presente trabajo, esto debido a que la obtención de ovocitos bovinos y el desarrollo metodológico en esta especie hubiera llevado mayor tiempo el dominio de la técnica, por lo que se recurrió a emplear la variante ala técnica, es decir, la TNCSI con ovocitos de ovino (citoplastos) y carioplastos de bovino (fibroblastos), que en la literatura

En relación a la MIV ésta fue más bajo que lo obtenido por Vázquez Avendaño et al., 2016) con 75%, para el empleo de la TNCSI (*Ovis candensis-Ovis aries*). Esto obedeció a que siendo el ovino una especie estacional con una época reproductiva en invierno, pudo haber influido en este aspecto, dado que los muestreos en estuvieron fuera de época reproductiva. Con respecto al control efectuado con ovocitos activados (partenogénéticos) se tuvieron tasas de segmentación similares a lo obtenido por Vázquez Avendaño et al., 2016 (65-70%).

Como era de esperarse las tasas de embriones clones así como de partenogénéticos con fragmentación fueron elevadas, hasta 45%, lo cual es

coincidente con lo reportado por Vázquez-Avendaño 2016. Esto es debido a que las metodologías para la clonación así como la de embriones partenogénéticos, incluyen pasos que forzan el desarrollo embrionario. Mrowiec *et al*, 2021; Adams *et al*, 2022 han señalado que la fragmentación es elevada durante la clonación de embriones, debido a que esta supone la asincronía en el desarrollo y división tanto nuclear como citoplasmático, dando como consecuencia blastómeros anucleados o polinucleados (Figura 18 y 19).

Como era esperado en el presente trabajo, el DIV de los embriones clones fue limitado, al respecto Tecirlioglu *et al*, 2006 y Lagutina *et al*, 2011, reportaron que, la máxima etapa de desarrollo alcanzada por embriones clones obtenidos mediante TNCSI a partir de citoplastos de ovino y carioplastos de bovino, es la mórula de 16 células, tal y como se obtuvo en el presente trabajo.

En relación a esta detención del desarrollo embrionario que presentan los embriones clones (mórula de mínimo 16 células) Jiang *et al*, (2011) y Selokar *et al*, (2011), lo explican a través de que el mantenimiento del genoma mitocondrial recae sobre una de las dos especies participantes en la clonación, por lo que, la fusión, activación y desarrollo de células pertenecientes a dos especies divergentes genéticamente tiene necesariamente un desarrollo embrionario bajo, debido a la disminución en la producción de ATP, con la inexistencia de la interacción de las subunidades codificadas por ADNmt con los polipéptidos codificados en el núcleo de la cadena de transferencia de electrones.

Pero además Ishino *et al*, (2018), Mrowiec *et al*, (2021) Adams *et al*, (2022); Melo *et al*, (2022), coincidieron en que la baja eficiencia de la TNCSI, fue resultado de una reprogramación incompleta del núcleo donante que generó modificaciones epigenéticas anormales, afectando así la expresión génica de los embriones en genes claves del desarrollo embrionario temprano tales como: OCT4 (regulador de la pluripotencialidad), T-FAM (responsable de la estabilidad, mantenimiento y control transcripcional del ADNmt), BAX (pro-apoptótico), BCL-2 (anti-apoptótico) y

GJA1 (proteína principal de unión comunicante que se expresa en las células del cúmulo granuloso).

Por otro lado Malin *et al*, 2022, mencionaron que, cuando entre las células donadoras de núcleo y los ovocitos receptores en la TNCSI hay una relación taxonómica muy distante (entre clase, orden, familia y género de especie), solo se consiguen desarrollos embrionarios en etapas iniciales y precisan que el paso es contrario cuando las especies donadoras y receptoras del carioplasto, son de una cercanía taxonómica en la fisiología reproductiva, tipo de placentación y tiempos de gestación, es decir el desarrollo embrionario esperado será hasta blastocisto

Por lo anterior la TNCSI, se sigue estudiando ampliamente, puesto que en muchos de los casos la obtención de los citoplastos resulta ser más accesible con una especie que con la que se obtienen los carioplastos. Un ejemplo es en especies animales silvestres donde la obtención de una biopsia de piel para el cultivo primario de fibroblastos es factible y no así la obtención de los ovocitos para recibir los carioplastos. Sin lugar a dudas se requiere de más investigación al respecto, en cuanto aspectos de reprogramación nuclear, sobre todo en especies con relación taxonómica distante, cuya única forma de conservación se encuentra en la generación de embriones clones por TNCSI, la reducción de estos aspectos es crucial en la posibilidad de generación de blastocistos viables, transferibles o preservables.

Finalmente, Hua *et al*, 2008, reportaron un 42.6% de desarrollo de embriones obtenidos por TNCSI (carioplasto de bovino citoplasto de ovino), en la etapa de mórula (8 a 16 células), similar a lo obtenido en el presente estudio. También se sigue estudiando en este campo la posibilidad de utilizar citoplastos de animales de bioterio (roedores), los cuales podrían obtenerse en gran número y de manera accesible, incluso con maduración in vivo, para ser receptores de carioplastos de otra especie, ejemplo Selokar *et al*, 2011 lograron obtener mórulas de 32 células,

tras unir carioplastos de rata con citoplastos de búfalo de agua, obteniendo hasta 82% de embriones clones por TNCSI.

Es de relevancia considerar que aunque con la TNCSI no se logren obtener blastocistos transferibles, esta biotecnología reproductiva puede ayudar a producir líneas de células madre embrionarias, las cuales se sabe que pueden a su vez servir para la reclonación Mrowiec *et al.*, 2021

12. CONCLUSIONES.

Los métodos aquí empleados para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos (mecánico, enzimático y M-E) de piel fueron eficientes, para tener poblaciones abundantes de estas células debido a que su obtención es de relativa facilidad debido a la abundancia que presentan en la piel de los organismos, la factibilidad de los métodos de obtención de muestras, los requerimientos mínimos para el transporte y la relativa facilidad de los cultivos desde la siembra hasta los pasajes celulares y de la alta sobrevivencia de colonias celulares post descongelación, posibilita que su uso como carioplastos para la técnica de TNCS y la posterior obtención de embriones clones. Se encontró que es posible la generación de cultivos primarios de fibroblastos de bovino, con mínimas variaciones a las técnicas ya establecidas para otros mamíferos siendo este un hallazgo que podría sentar las bases para obtener cultivos de otros mamíferos especialmente y cuyas variaciones serían mínimas, además se probó que el transporte de células es un punto crucial para un buen cultivo debido a que mientras la piel sea provista de nutrientes las células no presentaran procesos apoptóticos severos posibilitando el rescate de células y su adaptación *in vitro*.

La crioconservación resultó efectiva en un porcentaje elevado de las muestras, aunque consideramos que debe ser mejorada en base al requerimiento celular.

La actividad fisiológica de las células obtenidas "*in vitro*", en cuanto a la característica de totipotencialidad quedó expuesta mediante la TNCSI llevada a cabo, a pesar de que no son células especie específicas pudimos constatar que su funcionalidad y posibilidad de empleo en la técnica es viable, comportándose de la misma manera las células de los rumiantes empleados (bovino y ovino), aunque para conocer el comportamiento de las células requiere del uso de citoplastos y carioplastos especie específicos en este caso de bovino para lograr embriones transferibles y con ello conservar el material genético de ejemplares seleccionados.

13. PERSPECTIVAS.

Aumentar la experiencia en esta biotecnología reproductiva con esta especie para lograr los embriones transferibles y en un corto o mediano plazo lograr gestaciones y/o el nacimiento de individuos genéticamente iguales, lo cual sería un parteaguas en el país logrando así utilizar y desarrollar esta biotecnología reproductiva en beneficio de la ganadería y la preservación de material genético de individuos seleccionados.

El acercamiento y la interacción con actores interesados en este objetivo, tal es el caso de la FESC-UNAM, la UANL y ganaderos interesados en la aplicación de la TNCS, representa una oportunidad de crecimiento.

La aplicación de la TNCS (específica cómo interespecífica), representa en la actualidad una posibilidad de mantener material genético de especies silvestres, a pesar de la limitante de no ser una técnica de disseminación genética, se presenta como una posibilidad de preservación.

14. BIBLIOGRAFÍA.

- Adams, L; Liu, Y; Durrant, B; Ruggeri, E; Young, C; Krisher, R; Polejaeva, I (2022). **Use of Bisection to Reduce Mitochondrial DNA in the Bovine Oocyte.** *J Vis Exp.* 6;(185).
- Aiman, A; Ammari, A; ALGhadi, M; Amran, R, Malahi, N; Alhimaidi, A (2023). **Interspecific Nuclear Transfer Blastocysts Reconstructed from Arabian Oryx Somatic Cells and Domestic Cow Ooplasm.** *Vet. Sci.,* 10, 17.
- Almeida E; Ricarliany Medeiros de Oliveira, L; Silva, M; Azevedo, A; Oliveira V; Rodrigues, H; de Oliveira, F; Rodrigues, A; Fernandes, A (2019) **Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca*.** *Cryobiology* 88 15–22.
- Arévalo J; Páez D; Rodríguez V (2007). **Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas.** *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* (5)8: 101-212.
- Ávila-Portillo, L; Madero, J; López C; Acosta M; Gómez, C; Delgado G; Gómez C (2006). **Fundamentos de criopreservación.** *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología,* 57 (4), 291-300.
- Aydogdu, N; Nehir, O; Karaoz, E (2021) **Isolation, Culture, Cryopreservation, and Preparation of Skin-Derived Fibroblasts as a Final Cellular Product under Good Manufacturing Practice–Compliant Conditions.** *Methods in Molecular Biology* 2286: 85–94.
- Beltrán N; González C (2016). **Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos,** *Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa,* 199 p.
- Beyhan, Z; Iager, E; Cibelli, J (2007). **Interspecies Nuclear Transfer: Implications for Embryonic Stem Cell Biology.** *Cell Stem Cell* 1.
- Bo, G; Mapletoft R (2013). **Evaluation and classification of bovine embryos.** *Anim. Repro.* 10 (3): 344-348.
- Bolaños, C (2017). **Estandarización de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de células primarias de fibroblastos de piel de neonato de rata in vitro.** Tesis de Licenciatura, *Instituto Colombiano*

Estudios Superiores de Incolda Cali, Colombia 53 p

- Castro, R (2007). **Establecimiento de un banco genético de células fibroblásticas de un ejemplar Güiña (*Oncifelis guigna*)**. Tesis de licenciatura Universidad de Chile, *Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinaria*, Santiago, Chile. 72p.
- Cerón, W; Lozada, I; Ventocilla, K; Jara, S; Pinto, M; Cabello, M; Aguilar, J (2016). **Células tronco mesenquimales: definiciones, cultivo y aplicaciones potenciales**. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*; 33(4):758-71.
- Cervera, P.; Mitalipov, S (2012). **Primate and human somatic cell nuclear transfer**. In **Biology and Pathology of the Oocyte: Role in Fertility, Medicine, and Nuclear Reprogramming**, 2nd ed.; *Cambridge University Press: Cambridge, UK*; pp. 274–284.E
- Chang-Qing, L; Guo, Y; Wei-Jun, G; Yue-Hui, M (2011). **Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Mongolian sheep**, *Animal Science Journal* **82**, 215–2224
- Chaparro, O; Beltrán, O (2009). **Reprogramación nuclear y células pluripotentes inducidas**. *Rev Med*, 17 (2), 252-263.
- Chesne, P; Adenot, P; Viglietta, C; Baratte, M; Boulanger, L; Renard J (2002). **Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells**. *Nat. Biotechnol*; 20:366–9.
- Cibelli J; Stice L; Golueke J; Kane J; Jerry J; Blackwell C; Ponce de Leon A; Robl M (1998). **Cloned transgenic calves produced from non quiescent fetal fibroblasts**. *Science* 280:1256–1258.
- Cortez, J; Murga, N; Segura, G; Rodríguez, L; Vásquez, H; Maicelo-Quintana, J(2017). **Capacidad de Dos Líneas Celulares para la Producción de Embriones Clonados mediante Transferencia Nuclear de Células Somáticas**. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(4), 928-938.

- Cortez, J; Segura, T; Murga, L (2021). **Impacto de la reprogramación celular (células de fibroblastos y cúmulos) en la producción de clones bovinos.** *Rev. Vet* 32 (2): 216-220.
- Cruz, L (2013). **Descubrimientos sobre reprogramación nuclear merecen el Premio Nobel en 2012.** *Gac. Méd Caracas*; 121 (3):199-208.
- Domínguez L; Fiore E; Mazzolini G (2020). **Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina.** *Medicina*; 80: 696-702.
- Echeverry, D (2019). **Plasticidad de células felinas diferenciadas y su transición a mayores niveles de potencia.** Tesis doctoral, *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.* Chillán. -Chile, 135 p.
- FAO (2010). **La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la Agricultura,** editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma (disponible en <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>).
- Fonseca I; Guerini J; Gramática L.; Piccinni D; Avila R; Spitale L (2010). **Expresión inmunohistoquímica de vimentina, CD 34 y c-Kit (CD 117) en tumores estromales gastrointestinales (GISTs).** *Int. J. Morphol.*, 28(2):453- 459.
- Freshney, I (2010). **Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications,** 6th ed. United States of America, 676p
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N,(2003). **A cloned horse born to its dam twin.** *Nature* 424:635.
- Galli, C, Lazzari, G (2021). **25th. Anniversary of cloning by somatic-cell nuclear transfer: Current applications of SCNT in advanced breeding and genome editing in livestock.** *Reproduction*; 162(1):F23-F32.
- García C (2007). **Fibroцитos circulantes. Descubrimiento, características y relevancia clínica** *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex*, 20 (2): 132-141.
- González-Grajales L; Favetta L; King W; Mastromonaco G (2016). **Lack of effects of ooplasm transfer on early development of interspecies**

somatic cell nuclear transfer bison embryos. *BMC Developmental Biology* 16:36

- Gouveia C; Huyser C; Egli D; Pepper M (2020) **Lessons Learned from Somatic Cell Nuclear Transfer.** *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2314;
- Gurdon, J; Wilmut, I. (2011). **Transfer to Eggs and Oocytes.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* June 2011;3:a002659
- Hua S; Zhang Y; Songb K; Songa, J; Zhang Z; Zhang L; Zhang C; Caoa J; Maa L (2008). **Development of bovine–ovine interspecies cloned embryos and mitochondria segregation in blastomeres during preimplantation.** *Animal Reproduction Science* 105: 245–257
- Illmensee K (2002). **Biotechnology in reproductive medicine.** *Differentiation* 69:167–173.
- Ishino T; Hashimoto M; Amagasa M; Saito N; Dochi O; Kirisawa R; Kitamura H (2018). **Establishment of protocol for preparation of gene-edited bovine ear-derived fibroblasts for somatic cell nuclear transplantation.** *Biomedical Research*39 (2) 95–104,
- Jena, M; Malakar D; De S, A; Akshey, Y; Dutta, R; Sahu, S; Mohanty,A; Kaushik, J (2012). **Handmade cloned and parthenogenetic goat embryos – A comparison of different culture media and donor cells.** *Small Ruminant Res.*
- Jiang Y, Kelly R, Peters A, Fulka H, Dickinson A, Mitchell DA, St John J (2011). **La transferencia nuclear de células somáticas entre especies depende del ADN mitocondrial compatible y de factores de reprogramación.** *Más uno*; 6(4):e14805.
- Jiang Y; Kelly R; Peters A; Fulka H, Dickinson A; Mitchell D; St. John, J (2011). **Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer Is Dependent on Compatible Mitochondrial DNA and Reprogramming Factors.** *Plos One* 6(4): e14805.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, (1998). **Eight calves cloned from somatic cells of a single adult.** *Science*; 282:2095–8.

- Keefe D; Kumar, M; Kalmbach, K (2015). **Oocyte competency is the key to embryo potential.** *Fertility and Sterility*®,. 103 (2): 317-322.
- Keefer L; Baldassarre H; Keyston R; Wang B; Bhatia B; Bilodeau A; Zhou J (2001). **Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes.** *Biol Reprod* 64: 849-856.
- Kyogoku, H., Yoshida, S., & Kitajima, T. S. (2018). **Cytoplasmic removal, enucleation, and cell fusion of mouse oocytes.** *Methods in Cell Biology*, 459–474.
- Lagutina I, Fulka H, Lazzari G, Galli C (2013). **Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems.** *Cell Reprogram.* 15(5):374-384.
- Lagutina I; Lazzari G; Duchi R; Turini P; Tessaro I; Brunetti D; Colleoni S (2007). **Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep.** *Theriogenology* 67: 90-98.
- Lagutina, I; Zakhartchenko, V; Fulka, H; Colleoni, S; Wolf, E; Fulka, J; Lazzari, G; Galli, C (2011). **Formation of nucleoli in interspecies nuclear transfer embryos derived from bovine, porcine, and rabbit oocytes and nuclear donor cells of various species.** *Reproduction* 141 453–465.
- Lanza, P; Cibelli, B; Diaz, F; Moraes, T; Farin, W; Farin, E; Hammer, J; West, D; Damiani, P (2000). **Cloning of endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer.** *Cloning*; 2 (2):79-90.
- Lin L; Hua Y; Jianzhang M; Wei-jun G; Yue-hui M (2009) **Establishment and characterization of a fibroblast line from Simmental cattle.** *Cryobiology* 59: 63–68.
- Liu C; Guo Y; Guan W; Ma Y (2011). **Establishment and characterization of a fibroblast cell line derived from Mongolian sheep.** *Animal Science Journal* 82, 215–222.

- Loi P, Modlinski J, Ptak G (2011). **Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid.** *Theriogenology*. 15; 76(2):217-228.
- Loo J (2011). **Manual de genética de la conservación. Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica,** *Comisión Nacional Forestal, 1ª Ed., México., 196 p.*
- Lu, F; Shi, D; Wei, J; Yang, S; Wei, Y (2005). **Development of embryos reconstructed by interspecies nuclear transfer of adult fibroblasts between buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle (*Bos indicus*).** *Theriogenology* 64: 1309–1319.
- Lynch M; Watt F (2018). **Fibroblast heterogeneity: implications for human disease.** *Journal of Clinical Investigation*, 128 (1): 26-35.
- Malin, K; Witkowska, O; Papis, K (2022). **The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals.** *Theriogenology* 189: 246e254.
- Malpotra S, Goel P, Shyam S, Singh MK, Palta P (2022). **Global DNA methylation profiles of buffalo (*Bubalus bubalis*) preimplantation embryos produced by handmade cloning and in vitro fertilization.** *Sci Rep*. Mar 25;12(1):5161.
- Martínez J; Espinoza E; Rangel R; Ambriz, D; Navarro-Maldonado M (2019). **Effect of resveratrol on the in vitro maturation of ovine (*Ovis aries*) oocytes and the subsequent development of handmade cloned embryos.** *Veterinaria México OA*, 5(4).
- Matoba S; Yi Zhang- Yi (2018). **Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming Mechanisms and Applications.** *Cell Stem Cell* 23 (4): 471-485.
- Melo, L; Silva, S; Magalhaes, L; Cortez, J; Kumar, S; Duarte, J; Rola, L; Chaves, M; Freitas, V (2022). **The use of somatic cell nuclear transfer to obtain interspecific cloned embryos from brown brocket deer karyoplast and bovine cytoplast: Embryo development and nuclear gene expression.** *Theriogenology Wild* 1: 100001.

- Miguel, M; Herrero, E (2003). **Desarrollo de las Técnicas de Cultivos Celulares.**, 1 Ed. *Escuela de Gestión Sanitaria.*, España, p 72.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio (AMBI) (2017). **Programa de conservación de animales de razas puras**, en <https://revistaalimentaria.es/opinion/bebidas/programa-de-conservacion-de-animales-de-razas-puras>.
- Miyamoto, K (2019). **Various nuclear reprogramming systems using egg and oocyte materials.** *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 65 (3):203-208.
- Mogollón, E; Bourg, Marco; Burla, A (2014). **Clonación de embriones bovinos a partir de células somáticas.** *Orinoquia*, vol. 18, no. 1, -, 2014, págs. 95-104.
- Mostajo M; Ferreira L (2012). **Cambiando la Identidad celular para crear una verdadera medicina personalizada.** *Gac Med Bol* v.35 n.2
- Mrowiec, P; Bugno, M; Młodawska, W (2021). **The perspective of the incompatible of nucleus and mitochondria in interspecies somatic cell nuclear transfer for endangered species.** *Reprod Domest Anim*; 56(2):199-207.
- Mucci, N; Mutto, A; Kaiser, G (2011). **El primer bovino transgénico del mundo.** *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, (37) 2:112-117.
- Naaldijk, Y; Johnson, A; Friedrich-Stöckigt, A Stolzing, A (2016). **Cryopreservation of dermal fibroblasts and keratinocytes in hydroxyethyl starch–based cryoprotectants.** *BMC Biotechnology* 16:85
- Nagai T; Kikuchi K; Imai K; Fahrudin M (2007). **Handmade Somatic Cell Cloning and related studies in farm animals.** *J. Mamm. Ova Res.* Vol. 24, 99-106.
- Navarro-Maldonado, M; Hernández, S; Martínez J; Vázquez, R; Ambríz, D; Rangel, R; Vajta G (2016). **Clonación de Embriones de *Ovis aAries* utilizando fibroblastos criopreservados durante 14 meses.** *Revista Iberoamericana de Ciencias.* Vol. 3 No. 4., pp 45-53.

- Navarro-Maldonado, M; Hernández, S; Vázquez, R; Martínez, L; Zavala, L; Vargas, B; Rivera, A; Ambríz, D (2015). **Deriva de células epiteliales de tejido de piel descongelado de *Ovis canadensis mexicana* para la formación de un banco de germoplasma.**, *Acta Zoológica Mexicana* (N.S), 31(2), pp., 275-282.
- Niemann H; Lucas-Hahn A (2012). **Somatic Cell Nuclear Transfer Cloning: Practical Applications and Current Legislation.**, *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 5), 2–10.
- Pereira M; Marques C (2008). **Animal oocyte and embryo cryopreservation.** *Cell Tissue Bank.* 9(4):267-77.
- Polejaeva I (2021). **Generation of genetically engineered livestock using somatic cell nuclear transfer.** *Reproduction*; 162 F11–F22.
- Polejaeva, I; Chen, S; Vaught, T; Page, R; Mullins, J; Suyapa, B (2000). **Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells.** *Nature*; 407:86–90.
- Purdy P. H., Wilson C. S., Spiller S. F., Blackburn H. D. (2016) **Biobanking genetic resources: challenges and implementation at the USDA National Animal Germplasm Program.** *Reproduction, Fertility and Development* 28, 1072-1078.
- Ramón, J (2014). **Biotechnologías reproductivas para el siglo XXI.** *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 48, núm. 1, pp. 33-34.
- Ramos, TV, Mathew, AJ, Thompson, ML y Ehrhardt, RO (2014). **Criopreservación estandarizada de células primarias humanas.** *Protocolos Actuales en Biología Celular.*, A.3I.1–A.3I.8.
- Roa, J (2006). **Desarrollo de embriones bovinos clonados por transferencia nuclear a partir de fibroblastos fetales y adultos de ambos géneros.** Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Guadalajara, México, p. 104.
- Rojas, M; Venegas F; Servey J; Guillomot M (2004). **Clonación, producción de quimeras y células pluripotenciales.** *International Journal of Morphology*, 22(4), 343-350.

- Rojas, M; Venegas, F; Montiel, E; Servely, J; Vignon, J; Guillomot, M (2005). **Attempts at Applying Cloning to the Conservation of Species in Danger of extinction.** *International Journal of Morphology*, 23(4): 329-336.
- Romo, S (1993). **Biotecnología reproductiva: Avances en ganado bovino.** *Vet. Méx.*, vol. 24:3. 177-184.
- Saini, M; Selokar, N; Palta, P; Chauhan, M; Manik, R; Singla, S (2018). **An update: Reproductive handmade cloning of water buffalo (*Bubalus bubalis*).** *Animal Reproduction Science*.
- Saverio, A (2000). **La Clonación.** *Cuadernos de Bioética. 1ª Ed, pp., 48-55.*
- Seaby R, Alexander B, King W, Mastromonaco G (2013). **Desarrollo in vitro de embriones de bisonte mediante transferencia nuclear de células somáticas entre especies.** *Reprod Doméstico Anim.* 48 (6): 881-887.
- Selokar, N; George, A; Saha, A; Sharma, R; Muzaffer, M; Shah, R; Palta, P; Chauhan, M; Manik, S ; Singla S (2011). **Production of interspecies handmade cloned embryos by nuclear transfer of cattle, goat and rat fibroblasts to buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes.** *Animal Reproduction Science* 123: 279–282
- Seluanov, A; Vaidya, A; Gorbunova, V (2010). **Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents.** *J. Vis. Exp.* (44), e2033, DOI : 10.3791/2033
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, (2002). **A cat cloned by nuclear transplantation.** *Nature*; 415:859.
- Socarrás B; del Valle L; de la Cuétara K; Marsán V; Sánchez M; Macías C (2013). **Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa.** *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(1): 16-23.
- Sponenberg D (2012). **La pureza racial y la conservación de recursos criollos en los Estados Unidos.** *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 2: 35-41.

- Sriram G; Bigliardi, L; Bigliardi, M (2015). **Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro.** *European Journal of Cell Biology.* 94: 483-512.
- Srirattana K, Kaneda M, Parnpai R (2022). **Strategies to Improve the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer.** *International Journal of Molecular Sciences.* 23(4):1969.
- Stroud, T; Xiang, T; Romo, S; Kjelland, M (2013) **38 Rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*) embryos produced using somatic cell nuclear transfer.** *Reproduction, Fertility and Development.* 26, 133-133.
- Takashima, A (1998). **Establishment of fibroblast cultures.** *Current protocols in cell biology,* 2(1), 1–12.
- Tamada H; Kikyo N (2004). **Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning,** *Cytogenet Genome Res.* 105:285–291.
- Tavira C; Ortega A; Dávila I; Estrada S; Meneses A (2009). **Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica.** *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas,* 40(4): 35-46.
- Tecirlioglu, T; Gu, J; Trounson A (2006). **Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer and Preliminary Data for Horse-Cow/Mouse iSCNT.** *Stem Cell Reviews,* 2(4): 277-287.
- Thibier M (1990). **New technologies in cattle reproduction. Proceedings of 7th FAVA Congress,** Pattaya (Thailand), 512-524.
- Tovar H; Navarrete F; Rodríguez L; Skewes O; Castro, F (2008). **Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of primary culture cell lines.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim,* 44(8-9), 309–320.
- Tschumperlin D (2013). **Fibroblasts and the Ground They Walk On.,** *Physiology (Bethesda)* 28: 380–390.
- Vajta G (2007). **Handmade cloning: the future way of nuclear transfer?.** *Trends in Biotechnology.* Vol.25 No.6

- Vajta G., Lewis I., Hyttel P., Thouas G., Trounson A. (2001) **Somatic cell cloning without micromanipulators**, *Cloning*, 3(2): 89-95.
- Vajta, G (2018). **Cloning: A Sleeping Beauty Awaiting the Kiss?**. *Cellular Rreprogramming*. 20 (3): 145-156
- Vajta, G; Lewis, I; Trounson, A; Purup, S; Maddox-Hyttel, P; Schmidt, M; Gervi H; Pedersen, Greve, T; Callesen H (2003). **Handmade Somatic Cell Cloning in Cattle: Analysis of Factors Contributing to High Efficiency In Vitro**. *Biology of Reproduction* 68, 571–578
- Vázquez-Avendaño, R (2016). **Reprogramación de carioplastos con extractos de ovocitos como estrategia de producción de embriones por handmade cloning en *Ovis aries***, Tesis de Maestria, Universidad Autonoma Metropolitana, Ciudad de México, 86p.
- Vázquez-Avendaño, R; Hernández-Martínez, S; Hernández-Pichardo, E; Rivera-Rebolledo A; Ambriz-García, D; Navarro-Maldonado, M (2017). **Efecto del uso de medio secuencial humano en la producción de blastocistos de hembra ovis canadensis mexicana por clonación manual**. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 33(2), 328–338.
- Verma, G; Arora, J; Sethi, R; Mukhopadhyay, C; Verma, R (2015). **Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls**. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6:43.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. (1998). **Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei**. *Nature*; 394:369–74.
- Wells D; Misica M; Pavla M; Tervit R; Vivanco H (1998). **Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cxattle breed**. *Reprod Fertil Dev.*, 10:369-378.
- Wells D; Pavla M; Misica, M; Tervit, R (1999). **Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells.**, *Biology of Rreproduction*. 60, 996–1005.

- Wilmut, I; Schnieke, AE; McWhir, J; Kind A; Campbell, K (1997). **Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.** *Nature* 385: 810–813.
- Yadav, B; Katiyar, K.; Chauhan, S.; Madan, L (1997). **Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes.** *Theriogenol.* 47. 943-951.
- Yelisetti, U; Komjeti Y; Komjeti S Charan V; Sisinthy K; Sisinthy S; Rao S (2015). **Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion ear piece collected postmortem as donor cells and rabbit oocytes as recipients.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Animal.* 52(6):632-45
- Yu M; Muteti C; Ogugo M; Ritchie W; Raper J; Stephen K (2016) **Cloning of the African indigenous cattle breed Kenyan Boran.** *Stichting International Foundation for Animal Genetics*, 47, 510–515.
- Zavala M (2021). **Los recursos zoogenéticos, ¿Qué son y cuál es su importancia?** en <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/14-numero-2/30-los-recursos-zoogeneticos-ique-son-y-cual-es-su-importancia.html>.
- Zhou, Q; Renard, J; Le Friec, G; Brochard, V; Beaujean, N; Cherifi, Y (2003). **Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation.** *Science*; 302:1179.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00115

Matrícula: 2203801667

GENERACIÓN DE EMBRIONES INTERESPECIE CLONADOS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PIEL DE BOVINO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 8 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA
DR. FILIBERTO FERNANDEZ REYES
DR. RODOLFO CANSECO SEDANO
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: IVAN AGUILAR CHAVEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

Identification card for Ivan Aguilar Chavez, including a photo and a signature.

Signature of Mtra. Rosalia Serrano de la Paz, Directora de Sistemas Escolares.

Signature of Dr. Jose Luis Gomez Olivares, Director de la División de CBS.

Signature of Dr. Demetrio Alonso Ambriz Garcia, Presidente.

Signature of Dr. Filiberto Fernandez Reyes, Vocal.

Signature of Dr. Rodolfo Canseco Sedano, Vocal.

Signature of Dr. Eduardo Casas Hernandez, Secretario.