

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**REPROGRAMACIÓN DE CARIOPLASTOS CON EXTRACTOS
DE OVOCITOS COMO ESTRATEGIA DE PRODUCCIÓN
DE EMBRIONES POR HANDMADE CLONING EN *OVIS ARIES***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

Q U E P R E S E N T A

BIÓL. JOSÉ ROBERTO VAZQUEZ AVENDAÑO

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

ASESORES
DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCÍA
DRA. NORMA ANGELICA MORENO MENDOZA

Ciudad de México, Julio del 2016

Comité de Tutores

Directora

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

Departamento de Biología de la Reproducción
Laboratorio de Reproducción Animal Asistida
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa
carmenavarrro2006@yahoo.com.mx

Asesor Interno

Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Departamento de Biología de la Reproducción
Laboratorio de Reproducción Animal Asistida
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa
deme@xanum.uam.mx

Asesora Externa

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Departamento de Biología Celular y Fisiología
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
angelica@biomedicas.unam.mx

Jurado de Examen

Dr. Arturo Salame Méndez

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa
Laboratorio de Ecofisiología Animal
asam@xanum.uam.mx

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. Raymundo Rangel Santos

Departamento de Zootecnia
Universidad Autónoma Chapingo
rangelsr@correo.chapingo.mx

M. en C. José Ernesto Hernández Pichardo

Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco
Laboratorio Manejo de la Reproducción
mvzjehp@yahoo.com.mx

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.

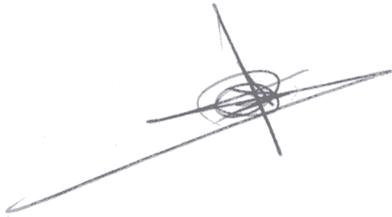
Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: 302855

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “**Reprogramación de carioplastos con extractos de ovocitos como estrategia de producción de embriones por Handmade cloning en *Ovis aries***” que presentó el Biólogo **José Roberto Vazquez Avendaño** el día 15 de Julio de 2016.

Presidente

Dr. Arturo Salame Méndez

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa



Secretario

Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Departamento de Biología de la
Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana,



Vocal

Dr. Mario Perez Martinez

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México



Vocal

M. en C. José Ernesto Hernández Pichardo

Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco



Agradecimientos

A mi mamá

Por el amor que me ha demostrado y la ayuda que me ha brindado durante toda la vida.

A mis hermanos

Mario, Raúl, Gabriel, Andrés y Luz que siempre me han apoyado y por el cariño que me tienen. También agradezco a mi cuñado Agustín por su apoyo.

A mis amigos

Verónica, Maricarmen y Cesar por todas las experiencias compartidas. A mis compañeros y amigos de laboratorio, Sarahí, Adriana, Karen, Enrique y José Luis por su amistad y ayuda. A mis compañeros de maestría, Ernesto, Nancy, José Luis, Itzel, Araceli, Aldo, Antonio, Ivonne y Víctor, por los gratos momentos compartidos. A mi amiga y compañera de laboratorio Sarahí que siempre me brindo su ayuda, conocimiento y confianza, gracias por las experiencias que nos tocó vivir en el laboratorio.

Agradezco a mi directora de tesis la Dra. María del Carmen Navarro Maldonado, por compartir conmigo su pasión por la preservación de especies silvestres a través de la clonación. Gracias por la confianza, el apoyo y la amistad que me ha brindado.

Al Dr. Demetrio Ambriz García por sus enseñanzas, bromas, apoyo, palabras de ánimo y amistad. Muchas gracias.

Al Dr. José Ernesto Hernández Pichardo por las observaciones, críticas y propuestas realizadas para mejorar mi trabajo y mi formación como investigador. Gracias por la ayuda brindada para el montaje y evaluación de mis muestras con los equipos de su laboratorio. También quiero agradecer al M.B.E. José Luis Rodríguez Suástegui por su apoyo y amistad.

A la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza y el Dr. Raymundo Rangel Santos por las observaciones y críticas realizadas a mi trabajo. También agradezco al Dr. Arturo Salame Méndez por las aportaciones y sugerencias realizadas a mi trabajo y por su disposición de ayuda.

Finalmente quiero agradecer a mis maestros de la maestría de quienes aprendí muchas cosas.

Este trabajo lo dedico con mucho cariño a mis sobrinas Fernanda, Dafne, Leslie, Aideé y Romina, esperando que sirva de motivación para que logren con esfuerzo y dedicación todo lo que se propongan.

Índice	Pág.
Índice de Abreviaturas	IX
Resumen	X
Abstract	XI
I. Introducción	1
II. Marco Teórico	2
1. Diferenciación y reprogramación celular.....	2
1.1 Factores de transcripción.....	3
1.2 MicroRNAs.....	3
1.3 Metilación del ADN.....	4
1.4 Modificaciones postraduccionales de las histonas.....	4
2. Transferencia nuclear de células somáticas.....	5
3. Handmade cloning.....	9
4. Alcances y limitaciones de la SCNT.....	10
5. La transferencia nuclear en la reproducción y conservación de mamíferos.....	11
6. Desarrollo embrionario temprano.....	12
7. Evaluación de la condición del estado de desarrollo embrionario.....	14
III. Antecedentes	15
IV. Justificación	19
V. Hipótesis	20
VI. Objetivos	21
VII. Materiales y Métodos	22
1. Colecta de tejido de piel de <i>Ovis aries</i>	22
2. Aislamiento de fibroblastos de oreja de feto de <i>Ovis aries</i> para cultivos primarios.....	22
3. Pasaje Celular.....	23
4. Criopreservación y descongelación de fibroblastos.....	24
5. Permeabilización de fibroblastos.....	24
6. Obtención y maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	25
7. Preparación de extractos de ovocitos.....	26

8. Clonación manual o Handmade cloning	27
8.1 Preparación de los citoplastos	27
8.2 Formación de tripletes y fusión de los cario-citoplastos	28
8.3 Activación	30
8.4 Cultivo <i>in vitro</i> de embriones en el sistema WOW.....	30
9. Evaluación del desarrollo embrionario	30
10. Evaluación de la condición del desarrollo embrionario	31
11. Análisis estadístico.....	32
VIII. Resultados.....	33
1. Estandarización de la clonación manual	33
1.1. Deriva de fibroblastos de <i>Ovis aries</i>	33
1.2. Obtención de citoplastos	33
1.3. Formación y desarrollo de embriones clonados.....	36
2. Determinación de la concentración idónea de Estreptolisina-O para la permeabilización de fibroblastos.....	37
3. Obtención de embriones clonados a partir de fibroblastos expuestos a extractos de ovocitos homólogos en MII.....	39
4. Evaluación de la condición del desarrollo de embriones clonados de <i>Ovis aries</i> mediante tinción de Hoechst.....	40
IX. Discusión	45
X. Conclusiones	54
XI. Aportaciones.....	55
XII. Perspectivas.....	55
XIII. Bibliografía	56
XIV. Anexos	69

Índice de Abreviaturas

EGF: Factor de crecimiento epidermal

FIV: Fecundación *in vitro*

FSH: Hormona Folículo Estimulante

hCG: Gonadotropina Coriónica humana

HMC: Handmade Cloning

IA: Inseminación artificial

ICSI: Inyección intracitoplásmica del espermatozoide

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas

LH: Hormona luteinizante

LOPU: Laparoscopic Oocyte Pick Up

LOS: Síndrome de crías grandes

MII: Metafase II

SCNT: Transferencia nuclear de células somáticas

VG: Vesícula germinal

WOW: Pozo en el pozo

Resumen

El ovocito tienen la capacidad inherente de reprogramar el núcleo espermático para generar un embrión, que finalmente originará un nuevo organismo; no obstante, también tiene la capacidad de reprogramar el núcleo de una célula somática diferenciada, como se ha demostrado en la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, de sus siglas en inglés). Se han utilizado extractos de ovocitos en vesícula germinal (VG) o metafase II (MII) para la reprogramación de células del cumulo o fibroblastos, utilizadas como carioplastos para la producción de embriones clonados de mamíferos, mejorando su tasa de desarrollo y calidad.

En este estudio se analizó el efecto de la exposición de fibroblastos de *Ovis aries* a extractos de ovocitos en MII homólogos, utilizados como carioplastos para la producción *in vitro* de embriones por clonación manual. Las etapas de desarrollo embrionario alcanzadas fueron de 3 a 8, 10 a 12 células y mórulas. No hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los grupos con respecto a la etapa de desarrollo embrionario; Sin embargo, al analizar la relación entre el número de núcleos y el número de blastómeros de los embriones, que presentaron fragmentación del citoplasma; se observó que los embriones clonados a partir de fibroblastos tratados con extractos de ovocitos en MII (0.58) mostraron una mejor relación en comparación con aquellos no tratados (0.45) y partenogénicos (0.38).

La exposición de los fibroblastos a extractos de ovocitos en MII, mejoró la comunicación entre el núcleo y el citoplasma de los embriones clonados de *Ovis aries*; lo cual se reflejó en una mayor proporción de blastómeros con núcleos en los embriones fragmentados. Es importante mencionar que dependiendo de la magnitud de la fragmentación citoplasmática, puede o no comprometer la viabilidad del embrión en formación.

Abstract

The Oocyte have the inherent ability to reprogram the sperm nucleus to form an embryo, which result in a new organism; nevertheless, also it has the ability to reprogram the nucleus of differentiated somatic cell, as it has been shown in Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT). Cytoplasmic extracts of Germinal Vesicle oocytes (VG) and Metaphase II (MII) oocytes have been used for reprogramming of cumulus cells or fibroblasts, they used as karyoplasts for production cloning embryos of mammalian, improving the growth rate and embryos quality.

In this study, the effect fibroblast of *Ovis aries* exposure to homologues MII oocytes extracts, used as karioplasts for *in vitro* production of embryos by handmade cloning, The stages reached of embryos development was 3 to 8, 10 to 12 cells and morula. No significant difference ($P>0.05$) between groups with respect to the embryos development stage; however, to analyze the relationship between the number of nucleus and the number of blastomere of embryos, which showed cytoplasmic fragmentation; It was observed that cloned embryos from fibroblasts treated with MII oocytes extracts (0.58) showed better ratio compared to those untreated (0.45) and partenogenetic.

Exposure of fibroblasts to extracts MII oocytes, improved communication between the nucleus and cytoplasm from cloning embryos of *Ovis aries*; which was reflected in a higher proportion of blastomeres with nucleus in the fragmentation embryos. It is noteworthy that depending on the magnitude of cytoplasmic fragmentation may or may not compromise the viability of the embryo development.

I. Introducción

Existen diferentes técnicas para asistir la reproducción de humanos y animales domésticos o silvestres, entre estas se encuentran la Inseminación Artificial (IA), la Fecundación *In Vitro* (FIV), Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide (ICSI, por sus siglas en inglés) y la SCNT o clonación artificial. En esta técnica no se requiere la participación del espermatozoide, en su lugar se utiliza una célula somática diploide que, por ejemplo, se fusiona con un ovocito enucleado para originar un organismo “idéntico” al de la célula somática (Ogura *et al.*, 2012).

Se han clonado diferentes especies de animales a partir de diversos tipos celulares (fibroblastos, células de la granulosa, embrionarias, entre otras), no obstante, son pocos los animales clonados recién nacidos obtenidos, debido a varios factores entre los que se encuentra la falta o inadecuada reprogramación nuclear de la célula somática (Rodríguez-Osorio *et al.*, 2012).

Ante esta condición se han implementado diferentes métodos para reprogramar el nucleó de las células somáticas previo a su utilización en SCNT, entre estos métodos se encuentra la reprogramación celular con extractos de ovocitos homólogos o heterólogos, es decir, de la misma especie al de la célula somática o diferente a esta (Miyamoto *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2013) El citoplasma de los ovocitos posee distintas moléculas que intervienen en los procesos de reprogramación nuclear y que al ser expuestas al núcleo de una célula somática antes de la SCNT, puede mejorar el desarrollo de los embriones clonados (Shinagawa *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015).

II. Marco Teórico

1. Diferenciación y reprogramación celular

En los mamíferos el desarrollo embrionario comienza con el cigoto, embrión de una célula que experimenta varios ciclos de división mitótica que en conjunto se denomina proceso de segmentación. Las células resultantes de cada división se les nombran blastómeros, los cuales son totipotenciales durante las primeras etapas de desarrollo embrionario, es decir que por sí mismos tienen la capacidad de originar un individuo que puede crecer y reproducirse (Gilbert 2010; Rodríguez-Pardo, 2005; Senger, 2005). A medida que avanza el desarrollo embrionario, los blastómeros pierden gradualmente esta capacidad y adquieren características morfológicas y moleculares particulares que les permiten desempeñar funciones específicas de un tipo celular determinado, a dicho fenómeno se le denomina especialización celular. A partir de los procesos de diferenciación celular, en mamíferos se derivan alrededor de 230 tipos celulares que a partir de mecanismos de histomorfogénesis conformarán los tejidos y órganos de su cuerpo (Cockburn y Rossant, 2010; Hyttel *et al.* 2010).

A excepción de los eritrocitos y los gametos, todas las células que conforman a un mamífero adulto poseen la misma información genética, sin embargo, cada tipo celular expresa un programa determinado de genes que establece su identidad, la cual determina las características particulares y funciones especializadas de un conjunto de células en particular. La identidad de las células diferenciadas se mantiene de una generación a otra, preservando el linaje celular (Rodríguez-Pardo, 2005).

La expresión de los genes, está regulada por mecanismos genéticos y epigenéticos, los cuales no alteran la secuencia de nucleótidos de los genes, pero si puede modificar su transcripción, así como a las proteínas, tales como, histonas que forman parte de la cromatina, que en conjunto alteran tanto la configuración de la cromatina como de la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a los

promotores de los genes resultando en la regulación de su expresión diferencial (Golbabapour *et al.*, 2011; Halley-Stott *et al.*, 2013).

La identidad de un tipo celular está designada por el programa de expresión de genes que posee, cambiar este programa por otro significa cambiar la identidad celular. A partir de esta idea se puede definir, la reprogramación celular como un cambio inducido sobre la identidad de las células, en donde la dirección del cambio suele ser a un estado menos diferenciado (Halley-Stott, 2015).

Durante el proceso de reprogramación celular están involucrados mecanismos epigenéticos que comprenden la acción de factores de transcripción y microRNAs, así como la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas.

1.1 Factores de transcripción

Son elementos que regulan la actividad transcripcional de los genes al unirse a la región del promotor e iniciar la transcripción de estos. Se han identificado factores de transcripción que inducen la reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes inducidas (iPSC) entre los que se encuentran Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (Takahashi *et al.*, 2007). Estos factores forman redes de retroalimentación donde se regulan unos a otros para mantener su expresión y por consecuencia el estado pluripotente de las células (Niwa, 2014). Por otra parte, también existen factores de transcripción específicos al tipo celular, que principalmente se unen a intensificadores distantes para dirigir la expresión de un programa específico de genes (van Oevelen *et al.*, 2013).

1.2 MicroRNAs

Son una clase de pequeños RNAs no codificantes de 18 a 25 nucleótidos que se encargan de regular la expresión génica a nivel del estado de la cromatina, transcripción, postranscripción y postraducción. Un solo microRNA puede unirse a

cientos de sitios blancos y regular diferentes procesos, entre los que se encuentran la inducción de la reprogramación, estabilización del estado pluripotente y la regulación del ciclo celular de las células madre embrionarias, por lo cual intervienen activamente durante el proceso de reprogramación celular (Wen-Ting *et al.*, 2014).

1.3 Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la incorporación de grupos metilo a las citosinas presentes en el ADN (genes), por medio de las DNA metiltransferasas, que utilizan a la S-adenosil metionina como donador de grupos metilo (Turek-Plewa y Jagodzinski, 2005). La metilación suele ser solamente en los promotores de los genes, impidiendo el acoplamiento de la maquinaria de transcripción y por lo tanto la expresión génica (Golbabapour *et al.*, 2011). Se han identificado cinco DNA metiltransferasas, de las cuales solo tres metilan ADN, DNMT1 mantiene el patrón de metilación durante la replicación del ADN mientras que DNMT3a y DNMT3b se encargan de la metilación *de novo* que es importante durante la diferenciación y reprogramación celular. La DNMT2 metila citosinas específicas del RNA de transferencia y DNMT3L es una enzima apagada catalíticamente (Ferrari *et al.*, 2013).

1.4 Modificaciones postraduccionales de las histonas

Actualmente se han identificado más de diez tipos de modificaciones postraduccionales sobre las histonas, por ejemplo, algunas afectan la carga electrostática de la cromatina modificando la interacción de las histonas con el ADN o las histonas sirven como sitios de acoplamiento de proteínas que a través de diferentes dominios pueden reconocer modificaciones específicas con distintiva selectividad (Ferrari *et al.*, 2013). Entre las modificaciones más estudiadas se encuentra la acetilación de los residuos de lisina presentes en las histonas, donde la adición y remoción del grupo acetil es catalizada por la acetil transferasa y desacetilación de histonas, respectivamente. El balance entre la acetilación y la

desacetilación de histonas juega un papel esencial en la regulación de la expresión de los genes (Peserico *et al.*, 2011).

Los residuos de arginina y lisina de las histonas pueden sufrir metilación, lo que conduce a la activación o represión de la expresión de genes, dependiendo del aminoácido y el nivel de metilación adquirido (Ferrari *et al.*, 2013).

2. Transferencia nuclear de células somáticas

La SCNT en mamíferos es una biotecnología con aplicación en diferentes campos, tales como, la reproducción. Consiste en transferir el núcleo de una célula somática, denominado carioplasto (núcleo donador), a un ovocito o a un cigoto al que se le ha retirado su material genético, llamado citoplasto (recipiente nuclear) (Solter, 2000). La transferencia del carioplasto se puede realizar por inyección directa a un citoplasto o por electrofusión entre el citoplasto con una célula completa. Una vez formado el complejo cario-citoplasto se induce la activación con agentes químicos o pulsos eléctricos (Wolf *et al.*, 2001), para que inicie el desarrollo de un embrión, del cual se desarrollará un individuo fenotípicamente idéntico al organismo donador del carioplasto (Navarro *et al.*, 2003).

A continuación se describen los pasos de la SCNT que comprenden la preparación de células somáticas, obtención de citoplastos (maduración *in vitro* de ovocitos y enucleación) fusión y activación.

Preparación de células somáticas

Los tipos celulares que se emplean como carioplastos son fibroblastos, células de la granulosa, células del cumulus, células NK (Natural Killer), células madre entre otras (Rodríguez-Osorio *et al.*, 2012; Pasque *et al.*, 2010). Estas células pueden provenir de animales adultos, fetos o embriones que en cultivo se multiplican tanto que pueden cubrir la superficie de la caja de cultivo (confluencia celular), y así formar

una monocapa. Como consecuencia del contacto intercelular, dejan de proliferar momentáneamente hasta que una fracción de la población celular se cultiva en otra caja con medio de cultivo nuevo. Este procedimiento se repite cada vez que las células están en confluencia y a cada uno de estos subcultivos se le llama pasaje celular (Phelan y May 2016). Resaltando que del 3° al 10° se utilizan para la SCNT (Tian *et al.*, 2003; Folch *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Jena *et al.*, 2012). Previo a su utilización, las células se sincronizan en etapa de G0 o G1 del ciclo celular por medio de restricción de nutrientes de las células en cultivo (Tian *et al.*, 2003) o al llevarlas a la confluencia celular (Solter, 2000; Verma *et al.*, 2015).

Obtención de carioplastos

Recuperación y maduración *in vitro* de ovocitos

Los ovocitos, que serán los citoplastos para el proceso de fusión; en mamíferos tales como rumiantes, roedores y primates se pueden obtener de ovarios de hembras vivas por punción folicular mediante laparoscopia (laparoscopic ovum pick-up, LOPU) (Ward *et al.*, 2000; Paramino e Izquierdo, 2014) o a partir de ovarios de hembras sacrificadas. En este caso los ovocitos se obtienen de los folículos por aspiran del líquido folicular con una aguja conectada a una jeringa o mediante un sistema de vacío (Abecia y Forcada, 2010). Otro método es usar la técnica de corte o slicing, que consiste en realizar múltiples cortes sobre la superficie de los ovarios para recuperar a los ovocitos contenidos en el líquido folicular (Abecia y Forcada, 2010).

In vitro, los ovocitos recuperados deben alcanzar la maduración nuclear y citoplasmática, el primer proceso se refiere a la competencia meiótica, que es la capacidad del ovocito para reanudar la meiosis y alcanzar la MII con la extrusión del primer cuerpo polar. La maduración citoplasmática involucra la acumulación de transcritos y otros factores necesarios para que el ovocito, una vez fecundado sea capaz de formar un embrión que se desarrolle a término y produzca una cría sana (Sánchez y Smitz, 2012). Sin embargo, no todos los ovocitos tienen la capacidad de

alcanzar la maduración nuclear y citoplasmática, por lo cual se seleccionan aquellos ovocitos que tengan el mayor número de capas de células de la granulosa y que posean un citoplasma homogéneo sin daño aparente (Ward *et al.*, 2000).

El “medio de maduración” está constituido por un medio de cultivo base que aporta nutrientes tanto a los ovocito como a las células de la granulosa, así como contener hormonas y factores de crecimiento. Por ejemplo, un medio de maduración puede contener gonadotropinas (FSH, LH y hCG), suero como fuente de vitaminas, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento (EGF, Epidermal Growth Factor e IGF-I, Insulin-Like Growth Factor), así como albúmina sérica bovina como fuente de proteínas y fluido folicular el cual contiene moléculas involucradas en la maduración nuclear y citoplasmática del ovocito (Abecia y Forcada, 2010; Paramino e Izquierdo, 2014; de Souza-Fabjan *et al.*, 2014).

Para el caso de pequeños rumiantes, los ovocitos *in vitro* se maduran en grupos de 50 y se incuban a una temperatura de 38°C, 5% de CO₂ en aire y humedad relativa entre 22 y 27 horas (de Souza-Fabjan *et al.*, 2014).

Enucleación

La obtención de citoplastos a partir de ovocitos en MII, se realiza por enucleación física o química. El primer método se basa en la orientación del primer cuerpo polar del ovocito, el cual se retira junto con una porción de citoplasma en donde se encuentra la placa metafásica. En este tipo de enucleación se suelen utilizar fluorocromos específicos para el ADN como el Hoechst, que permite visualizar los cromosomas al exponerlos a luz ultravioleta y de esta manera asegurarse de su completa eliminación (Iuso *et al.*, 2013; Westhusin *et al.*, 1992).

En la enucleación química se utilizan “relajantes” del citoesqueleto, como la demecolcina que destruye la configuración tridimensional de los microtúbulos del huso, ocasionando que los cromosomas de la placa metafásica se externalicen formando una protuberancia a nivel de membrana plasmática, lo cual permite su fácil

eliminación con la menor cantidad de citoplasma del ovocito (Gao *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2002).

Fusión

Una vez obtenido tanto el carioplasto como el citoplasto se realiza el proceso de fusión, el cual puede llevarse a cabo por electrofusión. Como primer paso, está el de mantener en estrecho contacto las membranas plasmáticas del complejo cario-citoplasto, y como segundo paso es aplicar un pulso eléctrico a las membranas del complejo para que inicie el proceso de fusión. Para el primer paso, se utiliza un campo eléctrico alterno débil que induce el contacto entre las membranas celulares por medio de un fenómeno llamado dielectroforesis; en el segundo paso, se aplican pulsos eléctricos de corta duración que permeabilizan la membrana plasmática en determinadas zonas de la superficie celular, bajo este estado las membranas celulares tienden a fusionarse entre sí y formar una sola célula (Abidor y Sowers, 1992; Ramos y Teissié, 2000).

Activación

La fertilización del ovocito por el espermatozoide desencadena una serie de eventos necesarios para el comienzo del desarrollo embrionario, entre los que se encuentra la activación del ovocito. En el caso de los complejos cario-citoplastos se induce artificialmente por agentes físicos o químicos que interactúan en diferentes niveles de la cascada de señalización de la activación, algunos de estos agentes promueven el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular como la estimulación por pulsos eléctricos o por agentes químicos tales como la inomicina, ionóforo de calcio, estroncio y etanol. Otros inhiben la síntesis de proteínas como la ciclohexamida ó inhiben la fosforilación de proteínas como el 6-dimetil amino purina (Kharche y Birade *et al.*, 2013; Alberio *et al.*, 2001; Williams, 2002).

La estimulación de los ovocitos para su activación varía entre las diferentes especies de mamíferos, por esta razón se utilizan combinaciones de agentes físicos y químicos según la especie para conseguir el mayor porcentaje de ovocitos activados (Kharche y Birade *et al.*, 2013).

3. Clonación Manual

La SCNT conlleva una serie de pasos, dentro de los que se encuentra la enucleación de ovocitos en MII o cigotos para la generación de citoplastos y la transferencia del núcleo donador o carioplasto, dichos pasos se realizan por medio de micromanipuladores como en la clonación convencional (Willadsen, 1986). Sin embargo, se han desarrollado métodos que no requieren del uso de micromanipuladores, como es el caso de la técnica de Handmade cloning (HMC) o clonación manual (Vajta *et al.*, 2001), debido a que no se utilizan equipos como el micromanipulador para efectuar, por ejemplo, la enucleación, la transferencia de núcleos o separación de células.

La “clonación manual” (HMC) se caracteriza por varios aspectos metodológicos, entre los cuales se encuentra utilizar ovocitos sin zona pelúcida para la formación de citoplastos. Esto se consigue exponiendo a los ovocitos a un tratamiento con pronasa, enzima que degrada las glicoproteínas que conforman a la zona pelúcida. Los ovocitos sin zona pelúcida son tratados con demecolcina para exteriorizar a los cromosomas de la placa metafásica en una protuberancia a nivel de membrana plasmática, esta porción de citoplasma se corta utilizando una micro navaja. Por este método de enucleación se retira alrededor del 30% de citoplasma, así que para compensar la pérdida de citoplasma se utilizan dos citoplastos por cada embrión que se desarrolle por clonación (Vajta *et al.*, 2006; Vajta, 2007).

Debido a que en la “clonación manual” se generan embriones sin zona pelúcida se requiere de un sistema de cultivo especial para evitar que se adhieran entre si los embriones en desarrollo, por esta razón se implementó el sistema WOW

(well of the well) o de micropozos, el cual consiste en hacer pequeños pozos dentro de una celda de una caja de cuatro pozos, el diámetro de estos debe de ser poco mayor al tamaño de los embriones. Este sistema aparte de evitar la adherencia embrionaria, también pretende recrear las condiciones del microambiente que existe dentro de la zona pelúcida para el adecuado desarrollo embrionario (Vajta *et al.*, 2000).

A partir de este método se han clonado cinco especies de mamíferos domésticos, bovinos (*Bos taurus*; Vajta *et al.*, 2001), porcinos (*Sus scrofa*; Du *et al.*, 2007), caprinos (*Capra hircus*; Akshey *et al.*, 2011), equinos (*Equus caballus*; Lagutina *et al.*, 2005) y ovinos transgénicos (*Ovis aries*; Zhang *et al.*, 2013). En cuanto a las especies silvestres se ha clonado el antílope tibetano (*Pantholops hodgsonii*; Yu *et al.*, 2011) y una especie de búfalo asiático (*Bubalus bubalis*; Madheshiya *et al.*, 2015), para lo cual se utilizaron citoplastos de especies domésticas cercanas (transferencia nuclear de células somáticas interespecífica). Se han obtenido crías vivas de todas estas especies, a excepción de los caprinos y del antílope tibetano de los cuales solo se ha logrado generar embriones en etapas tempranas de desarrollo.

4. Alcances y limitaciones de la SCNT

La SCNT es la única técnica con el potencial de generar individuos a partir de embriones derivados de la unión del núcleo de una célula somática diferenciada con un ovocito enucleado, cuya aplicación se extiende a diferentes niveles, tomando particular importancia en la reproducción de animales domésticos con elevado valor genético y especies silvestres amenazadas, incluso extintas (Folch *et al.*, 2009), siempre y cuando se tenga la disponibilidad de tejidos y células bajo un adecuado resguardo. Sin embargo, la SCNT es una técnica que no sigue los procesos reproductivos naturales y los mecanismos involucrados en esta no son completamente entendidos, por lo cual es poco eficiente en la obtención de animales

recién nacidos (Wolf *et al.*, 2001). Aunado al hecho de que algunos de ellos presentan ciertas anomalías en su desarrollo, tales como el síndrome de nacimientos de crías grandes (Long Offspring Syndrome, LOS por sus siglas en inglés) observado en vacas, ovejas y ratones (Young *et al.*, 1998).

También se ha documentado la presencia de hipoxia, hipotermia, hipoglucemia, acidosis metabólica, disfunción placentaria, defectos neonatales en el tracto urogenital, sistema respiratorio y vascular, entre otros (Kühholzer y Prather, 2000; Edwards *et al.*, 2003), cuya posible causa ha sido relacionada al fallo en la reprogramación epigenética del genoma del carioplasto y por consecuencia a una expresión espacio temporal anormal del genoma (Golbabapour *et al.*, 2011; Ogura *et al.*, 2012; Rodríguez-Osorio *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2014).

5. La transferencia nuclear en la reproducción y conservación de mamíferos

A partir de la SCNT se han clonado alrededor de 20 especies de mamíferos tanto domésticos como silvestres (Meissner *et al.*, 2006; Rodríguez-Osorio *et al.*, 2012) algunos de los cuales están en peligro de extinción; por lo que la SCNT puede ser otra alternativa para su conservación. Como ejemplo se puede mencionar la obtención de clones de gaur (*Bos gaurus*; Lanza *et al.*, 2000), muflón (*Ovis orientalis musimon*; Loi *et al.*, 2001), argali (*Ovis ammon*; Pan *et al.*, 2014), y el lobo gris (*Canis lupus*; Kim *et al.*, 2007), entre otras especies.

México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en diversidad de mamíferos con 523 especies según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN por sus siglas en inglés, 2008), de las cuales, 291 se encuentran en alguna de las cuatro categorías de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 como especies en riesgo. Entre éstas se incluyen el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*), el bisonte (*Bos bison bison*), el berrendo (*Antilocapra americana*) y el venado bura (*Odocoileus hemionus*), entre otras (Norma Oficial Mexicana, 2010).

La situación actual de estas especies se debe principalmente a la cacería ilegal, la pérdida del hábitat por actividades agropecuarias e introducción de ganado doméstico. Dada esta problemática, se han diseñado planes estratégicos para la conservación y recuperación de especies, al igual que para la protección de su hábitat (Gómez-Nísino, 2006a; Gómez-Nísino, 2006b; Zarza-Villanueva, 2006).

A pesar de las legislaciones establecidas y las acciones realizadas, la situación de algunas especies sigue siendo crítica, por lo cual se deben utilizar métodos alternos como la SCNT que ofrece la posibilidad de recuperar individuos y a futuro reintroducirlos al ecosistema siempre y cuando se realicen estudios multidisciplinarios para optimizar su desarrollo y conformar poblaciones estables. Sin embargo, al tratarse de especies protegidas y de invaluable valor ecológico, es necesario utilizar modelos animales para la estandarización de las técnicas que permitan posteriormente extrapolarlas a las especies silvestres. El borrego cimarrón, el berrendo, el bisonte y el venado bura, pertenecen al orden *Artiodactyla* al igual que el borrego doméstico (*Ovis aries*). Este último es una especie domesticada, de fácil manejo y que se encuentra distribuida a lo largo del territorio Nacional por su importancia económica y su adaptabilidad a los diferentes climas del país, convirtiéndola en un modelo animal experimental adecuado para la transferencia de núcleos (Álvarez-Romero y Medellín, 2005).

6. Desarrollo Embrionario Temprano

Una vez que el ovocito es fecundado por el espermatozoide, comienza el desarrollo embrionario con la formación del cigoto de una célula, cuya primera división mitótica tiene lugar entre las 22 y 36 horas en condiciones *in vitro* para los ovinos, dando lugar al embrión de dos células (denominadas blastómeros). Durante el proceso de segmentación, el plano de la primera división en el cigoto es meridional mientras que en la segunda división, uno de los blastómeros se divide meridionalmente y el otro ecuatorialmente (Gilbert, 2010). Las divisiones de los

embriones de mamíferos son asincrónicas, es decir, no todos los blastómeros se dividen al mismo tiempo, por lo cual se pueden encontrar embriones con número de blastómeros impar (Gilbert, 2010; Abecia y Forcada, 2010). En cada ciclo de división los blastómeros resultantes son la mitad del tamaño de los blastómeros iniciales, de tal forma que el volumen del embrión se mantiene mientras que el número celular se incrementa (Gilbert, 2010; Hyttel *et al.*, 2010).

Eventualmente los blastómeros forman una esfera de células similar a una mora, por lo cual el embrión se llama mórula. Posteriormente, en mamíferos, los blastómeros externos comienzan a compactarse más que los centrales, dividiéndose en blastómeros externos e internos. La compactación de los blastómeros externos es estabilizada por uniones estrechas que se forman a partir de moléculas de adhesión celular como la E-cadherina y complejos de proteínas tales como claudinas y ocludinas; estas uniones sellan el interior del embrión dejando confinados a los blastómeros internos, los cuales establecen comunicación entre ellos por medio de uniones gap que permiten el flujo de pequeñas moléculas e iones (Gilbert, 2010; Senger, 2005).

En el interior de la mórula compacta se forma una cavidad llena de líquido llamada blastocele, momento en el cual el embrión se denomina blastocisto temprano, el cual está conformado por dos tipos celulares, las células que forman el trofoblasto que se encuentra en el exterior y las células de la masa celular interna que se forma en un polo dentro del embrión (Hyttel *et al.*, 2010).

Las células del blastocisto continúan dividiéndose y el blastocele aumenta de tamaño conforme se llena de líquido. Por otra parte, las células del trofoblasto secretan enzimas proteolíticas que debilitan y adelgazan la zona pelúcida, en este momento el embrión se denomina blastocisto expandido, etapa que se alcanza a los 6 ó 7 días después de la ovulación en ovinos. Las células del blastocisto comienzan a expandirse y contraerse para generar presión sobre la zona pelúcida, y finalmente

generar una fisura en esta, a través de la cual escapa el embrión, ahora nombrado “blastocisto eclosionado” (Abecia y Forcada, 2010; Hyttel *et al.*, 2010).

Las primeras divisiones de segmentación del embrión están controladas por los transcritos del genoma materno localizados en el citoplasma, posteriormente se requiere de la activación del genoma embrionario que toma el control del desarrollo, esta transición entre el genoma materno y embrionario es específica de la especie, para el caso de los ovinos esta tiene lugar en el estadio embrionario de 8 a 16 células, que corresponden al cuarto y quinto ciclo de división (Abecia y Forcada, 2010; Hyttel *et al.*, 2010).

7. Evaluación de la condición del estado de desarrollo embrionario

Los embriones generados *in vitro* suelen evaluarse por observación directa de sus características morfológicas, tales como el tamaño similar entre los blastómeros, así como el color y la textura, la homogeneidad del citoplasma sin granulación ni formación de vacuolas, al igual que la concordancia entre la etapa de desarrollo y el tiempo de cultivo (Bó y Mapletoft, 2013).

La evaluación morfológica es un parámetro de calidad que puede ser subjetivo y no predecir con certeza el potencial de desarrollo embrionario, por lo cual es necesario evaluar otros parámetros que permitan la discriminación de los embriones viables de aquellos que no lo son, entre estos parámetros se encuentra la evaluación del número de núcleos presentes en los embriones y su correlación con el número de blastómeros de acuerdo al estado de desarrollo (Critser *et al.*, 1986; Sawicki *et al.*, 1990). Para dicha evaluación se emplea la tinción de Hoechst o bisbenzimidá, el cual es un fluorocromo permeable a la membrana plasmática que se une a secuencias específicas de adenina y timina de la cadena de ADN, cuya onda de longitud de excitación es ~353 nm y de emisión es ~483 nm (Chazotte, 2011).

III. Antecedentes

Los ovocitos en MII tienen la capacidad inherente de reprogramar el núcleo del espermatozoide para obtener un embrión y finalmente un individuo completamente desarrollado. Sin embargo, el ovocito también tiene la capacidad de reprogramar el núcleo de una célula somática diferenciada y obtener el mismo resultado, como se ha demostrado en los experimentos de SCNT (Gurdon y Colman, 1999). Se sabe que sólo el ovocito tiene esta capacidad de reprogramación a un estado totipotencial, ya que posee diversos factores citoplasmáticos involucrados en este proceso (Bai *et al.*, 2015; Gonzalez–Muñoz *et al.*, 2014; Shinagawa *et al.*, 2014)

En el ovocito se han identificado dos factores, la chaperona de histonas 3/4 ASF1A (Anti-Silencing Function 1A Histone Chaperone) y el factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF9: Growth Differentiation Factor 9), que junto con la sobreexpresión de Oct4 tienen la capacidad de reprogramar fibroblastos humanos. ASF1A se encarga de la acetilación de la lisina 56 de la histona 3 (H3K56), favorece el estado pluripotente y quizás intervenga también en su adquisición. GDF9 es un factor paracrino secretado por el propio ovocito (Gonzalez–Muñoz *et al.*, 2014).

La unidad fundamental de la cromatina, el nucleosoma está conformado por las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Sin embargo, existen variantes a estas cuatro histonas básicas, para las dos primeras histonas están las variantes TH2A y TH2B, estas son expresadas abundantemente por los ovocitos y se han encontrado en menor cantidad en etapas tempranas del desarrollo embrionario. El papel de estas dos variantes de histonas es el establecimiento de una configuración laxa de la cromatina, lo cual favorece la reprogramación celular como se ha mostrado en la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC: induced Pluripotent Stem Cell) (Shinagawa *et al.*, 2014).

La metiltransferasa SMYD3 (SET and MYND domain containing protein 3) actúa específicamente sobre la lisina 4 de la histona 3 (H3K4), favoreciendo la transcripción. Se ha identificado su presencia en ovocitos de mamíferos como los

bovinos, en los cuales se han caracterizado cuatro variantes de SMYD3-1, -2, -3 y -4. La expresión de SMYD3 a nivel de RNAm es constante durante la maduración del ovocito y del desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, durante la maduración del ovocito SMYD3 se localiza alrededor de los cromosomas y en el cigoto está presente en el núcleo y citoplasma. Se ha mostrado que SMYD3 favorece la expresión de *Nanog* e interviene en la formación del blastocisto, lo cual indica su importante participación durante el desarrollo embrionario temprano (Bai *et al.*, 2015).

Considerando el potencial de reprogramación celular del ovocito, a partir de este se pueden elaborar extractos u homogenizados que consisten en la suspensión de los componentes celulares al someter a los ovocitos a procesos de disgregación. Estos extractos se emplean para la reprogramación de células somáticas previo a su utilización en la generación de embriones por SCNT (Rathbone *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2013). Por ejemplo, se mejora la calidad de los embriones en términos epigenéticos como son los patrones de metilación del ADN, acetilación y metilación de histonas, así como la adecuada expresión de genes en tiempo y espacio (Bui *et al.*, 2012).

La reprogramación de células somáticas con extractos de ovocitos de la misma especie se le denomina homóloga (Tang *et al.*, 2009) y heteróloga cuando se utilizan extractos de especies distintas (Xiong *et al.*, 2013).

En el primer caso, Bui *et al.* (2008) incubaron células del cúmulo con extractos de ovocitos en estadio de vesícula germinal (VG) obtenidos de ratón, posteriormente las células tratadas fueron utilizadas para la generación de embriones clonados, y de los blastocistos obtenidos evaluaron el nivel de metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9), así como la expresión de los genes *Oct4* y *Cdx2*. Los resultados mostraron que los parámetros evaluados eran similares a los blastocistos obtenidos a partir de ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection), por lo tanto concluyeron que la reprogramación de células del cúmulo con extractos de ovocitos en VG mejora la

calidad de los blastocistos clonados con base al número de células totales y la relación de la expresión de las proteínas Oct4 y Cdx2 por las células de la masa celular interna y las células del trofoblasto, respectivamente.

El mismo equipo de investigación utilizando al cerdo como modelo, expusieron fibroblastos de piel con extractos de ovocitos en VG y a partir de estas células generaron embriones por SCNT, que se evaluaron observando la expresión de los genes *Oct4* y *Nanog*, así como patrones de metilación y acetilación de la H3K9, similares a los de embriones obtenidos por fertilización *in vitro* (Bui *et al.*, 2012).

Tang *et al.* (2009) en bovinos, incubaron fibroblastos fetales con extractos preparados a partir de ovocitos inmaduros, maduros y partenogénéticos. De cada tratamiento generaron embriones por SCNT y evaluaron el desarrollo embrionario en etapa de dos células, mórula y blastocisto, así como el número de células de la masa celular interna, el trofoblasto y la proporción de células entre la masa celular interna y el trofoblasto. A partir de los carioplastos tratados con extractos de ovocitos maduros, obtuvieron el mayor porcentaje de embriones en etapa de blastocisto con mejor calidad en términos del número de células totales y de la masa celular interna.

Por otra parte, se han utilizado extractos de ovocitos bovinos en MII para reprogramar fibroblastos de Yak (*Bos grunniens*) una especie de bovino silvestre; posteriormente estas células se utilizaron para la obtención de embriones por SCNT. En los fibroblastos tratados se evaluaron las fases del ciclo celular, la acetilación de la H3K9 y la desmetilación de los promotores de los genes Oct-4 y Nanog. Los resultados mostraron que el número de células en etapa de G0/G1 fue mayor en el grupo tratado al igual que la acetilación de H3K9 con respecto al control, así como constatar la desmetilación de los promotores de genes pluripotenciales. En cuanto al desarrollo embrionario, observaron una mayor tasa de formación de blastocistos a partir de embriones de 8 células con los fibroblastos expuestos a extractos de ovocitos (Xiong *et al.*, 2013).

En el caso de la reprogramación heteróloga, se han expuesto fibroblastos fetales de bovino a extractos preparados a partir de ovocitos y huevos de rana (*Xenopus laevis*), los resultados mostraron la remodelación de la lámina nuclear en las células tratadas, indicando que los factores encargados de la reprogramación celular son conservados entre los ovocitos de los vertebrados (Alberio *et al.*, 2005).

Rathbone *et al.* (2010), utilizaron extractos de huevos de *Xenopus laevis* en VG para reprogramar fibroblastos fetales de ovino, los cuales fueron utilizados para obtener embriones por SCNT. En las células tratadas se evaluó la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (TriH3K9Me) y el estado de metilación del ADN. Se observó una disminución del nivel de metilación del ADN, así como en la intensidad del marcaje para TriH3k9Me, lo cual indica la reprogramación nuclear de los fibroblastos. En cuanto a los embriones clonados se evaluó el desarrollo embrionario en etapa de 2-células y blastocisto, así como el porcentaje de embriones transferidos, hembras gestantes, nacimientos, corderos recién nacidos y sobrevivientes. Además de que constataron diferencia significativa entre el tratamiento y el control con respecto al número de nacimientos (8 vs 2) y el porcentaje de corderos recién nacidos (14.7 vs 3.1). Del grupo control se obtuvieron dos corderos mientras que del tratamiento diez, sin embargo, de estos diez solo sobrevivieron cuatro; la autopsia reveló anomalías del corazón y riñón en la mayoría de los corderos recién nacidos.

IV. Justificación

La transferencia nuclear de células somáticas ha permitido clonar poco más de 20 especies de mamíferos domésticos y silvestres, estos últimos en estatus de amenazadas o en peligro de extinción, siendo por lo tanto una alternativa de conservación. Sin embargo, la obtención de mamíferos por clonación es poco exitosa desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. Entre las diversas razones es que aún se conoce poco, por ejemplo, sobre los procesos bioquímicos y genómicos involucrados en el desarrollo de los embriones clonados. Estudios que en conjunto permitirían ir conociendo más sobre las razones de la incompleta reprogramación del núcleo donados (carioplastos) de una célula funcional de un individuo adulto con el citoplasma aceptor (citoplasto) y por tanto conocer más sobre la relación citoplasma-núcleo. Lo que daría pauta a mejorar algunos los métodos de clonación y así lograr, al menos, que la reprogramación del carioplasto sea pluripotencial.

Por lo antes mencionado, es relevante lograr la reprogramación de las células somáticas de individuos adultos utilizadas como carioplastos previo a la clonación, y así mejorar las tasas de desarrollo de los embriones clonados hasta estadios más avanzados que de blástulas tempranas.

V. Hipótesis

El citoplasma de ovocitos en metafase II de borregas adultas al poseer factores que regulan el programa de expresión de genes, en células somáticas diferenciadas reprogramarán su núcleo a un estado totipotencial. Por lo tanto, la transferencia de carioplastos obtenidos a partir de fibroblastos de feto previamente expuestos a extractos de ovocitos en MII, optimizará el desarrollo de embriones clonados de *Ovis aries*.

VI. Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto de la exposición de fibroblastos de feto de *Ovis aries* utilizados como carioplastos para la obtención de embriones por clonación manual, a extractos de ovocitos en etapa de metafase II.

Objetivos particulares

- Evaluar el desarrollo de embriones obtenidos a partir de fibroblastos de feto expuestos a extractos de ovocitos en MII.
- Determinar la condición del estado de desarrollo de los embriones en base al número de núcleos presentes de acuerdo a la etapa de desarrollo.

VII. Materiales y Métodos

1. Colecta de tejido de piel de *Ovis aries*

La muestra de piel de ovino doméstico (*Ovis aries*) se obtuvo de un rastro local. Se realizó un corte de 1 cm² del borde inferior de la oreja de un feto de hembra, cuya edad fue de 5 meses de gestación. La muestra de tejido se colocó dentro de un tubo falcón de 15 mL con solución de transporte (DPBS sin Ca⁺² ni Mg⁺², por sus siglas en inglés Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, In vitro; 2% de Antibiótico-antimicótico: Penicilina G sódica 10.000 UI/mL, Sulfato de estreptomicina 10.000 µg/mL, Anfotericina B solubilizada 25 µg/mL, In vitro) para su traslado con geles refrigerantes al laboratorio y su posterior procesamiento (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

2. Aislamiento de fibroblastos de oreja de feto de *Ovis aries* para cultivos primarios

Una vez en el laboratorio, utilizando microscopio estereoscópico (Olympus, SZ61; 2X) se eliminó la mayor cantidad de pelo de la muestra de piel de la oreja y se sumergió en cloro al 1% por 3 minutos, en alcohol al 70% por 3 segundos y se lavó cuatro veces en solución de transporte.

Sobre una caja de Petri el tejido se fragmentó utilizando un bisturí (No. 22); los fragmentos de piel se colocaron en un tubo de ensaye que contenía colagenasa tipo I (17100-017, Gibco) y II (17101-015, Gibco) al 0.02%. El tubo se cerró herméticamente y se dejó incubando a 37°C durante 2 horas en oscilación (López *et al.*, 2007; Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción enzimática, agregando 4 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, por sus siglas en inglés, In vitro) (Anexo) suplementado (Antibiótico-antimicótico y 10% de Suero Fetal Bovino, SFB, Microlab). Los remanentes de piel que no se disgregaron totalmente se cultivaron como explantes en caja de Petri de 35 mm con 3 mL de DMEM-S. La

solución obtenida de la disgregación se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante, se adicionaron 4 mL de DMEM-S para lavar y se volvió a centrifugar. El sobrenadante se descartó y el botón celular conteniendo los fibroblastos se resuspendió en 1 mL de DMEM-S para sembrarlo en caja de Petri de 35 mm. Se agregaron 2 mL más de medio para tener un volumen final de 3 mL. Las cajas de cultivo se incubaron a 38°C, 5% de CO₂ en aire y 60% de humedad a saturación (Incubadora de CO₂, Binder serie CB-150) y a las 24 horas se evaluó la deriva celular (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

3. Pasaje celular

Los fibroblastos cultivados en cajas de Petri de 35 mm de diámetro suelen alcanzar el 90 o 100% de confluencia cada siete días (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015; Phelan K. y May K. 2016), tiempo que se consideró para despegar los fibroblastos de la caja de cultivo. Para lo cual se retiró el medio de cultivo realizando dos lavados con DPBS. Se agregaron 700 µL de tripsina-verseno (0.05%, In vitro, en solución salina de fosfatos sin Ca⁺⁺ y sin Mg⁺⁺) y se incubó bajo las condiciones antes mencionadas por 5 minutos.

Una vez que la mayoría de las células se desprendieron por este método de tripsinización se detuvo la reacción enzimática con la adición de 1 mL de DMEM-S.

Se recuperó la solución que contenía los fibroblastos en suspensión, y se vertió por partes iguales en dos tubos cónicos para microcentrífuga y se centrifugaron a 150x g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y las células de uno de los tubos se resembraron mientras que el otro se criopreservó a -80°C. Para el primer caso, el botón celular obtenido se resuspendió en 2 mL de DMEM-S y se dividió en dos cajas de cultivo, se completó con DMEM-S para obtener un volumen final de 3 mL en cada caja. Éstas se incubaron bajo las condiciones antes descritas, por siete días (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

4. Criopreservación y descongelación de fibroblastos

El tubo de microcentrifuga conteniendo el botón celular (fibroblastos) para criopreservación se resuspendió en 1 mL de medio para congelación de células (In vitro, Anexo); esta solución se colocó en un criotubo de 1.5 mL y se almacenó en congelación a -80°C , hasta el momento de su utilización (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015; Phelan K. y May K. 2016).

Para la descongelación de los fibroblastos se dejó incubar el criotubo a 37°C por alrededor de 5 minutos; posteriormente se adicionó 1 mL de DMEN-S y se centrifugó a $150 \times g$, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resembró en una caja de Petri con 3 mL de medio DMEM-S y se incubó bajo las condiciones antes mencionadas (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015). En cada experimento de clonación, se descongelaron y cultivaron fibroblastos que fueron utilizados como carioplastos en la clonación manual.

5. Permeabilización de fibroblastos

La membrana plasmática de los fibroblastos se permeabilizó con Estreptolisina O (SLO, Sigma-Aldrich). La preparación de esta consistió en disolverla en PBS (suplementado con 0.01% de BSA y 5 mM de DTT) a una concentración de 20,000 UI/mL, se incubó a 37°C por 60 minutos y posteriormente se prepararon alícuotas de 20 μL las cuales se almacenaron a -80°C (Halley-Stott *et al.*, 2010).

Previo a la permeabilización, los fibroblastos en cultivo se tripzinaron como se describió en pasaje celular. Para eliminar posibles residuos de proteínas de las células desprendidas se realizaron dos lavados con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Los fibroblastos se resuspendieron en 250 μL de PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} con SLO a una concentración de 10 UI/mL y se dejaron incubar por 30 minutos a 38°C con agitación ocasional de las células. Al finalizar el tiempo, los fibroblastos permeabilizados se incubaron con los extractos de ovocitos. Posteriormente los fibroblastos se cultivaron por 2 horas en DMEM suplementado con 2 mM de CaCl_2 y 20% de SFB para resellar la membrana plasmática y después se cultivaron en

DMEM-S por 15 días. Estas células se utilizaron como carioplastos para la transferencia nuclear por clonación manual (Miyamoto *et al.*, 2009).

6. Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos

Se obtuvieron ovocitos a partir de ovarios de ovejas domésticas adultas (*Ovis aries*) tipo criollo, colectados de un rastro del Edo. de México. Los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina al 0.9% a una temperatura de 25-30°C en un lapso no mayor a una hora.

6.1. Obtención de complejos ovocito cúmulo

Con base al método descrito por Robledo-Verduzco *et al.* (2009) y Soberano-Martínez *et al.* (2011), los complejos ovocito-cúmulo (COC) se obtuvieron por aspiración de folículos de entre 2 a 8 mm de diámetro con una aguja hipodérmica calibre 18; el medio de aspiración empleado fue TCM-199 (Tissue Culture Medium, por sus siglas en inglés, *In vitro*) con HEPES, suplementado con 100 UI/mL de heparina (Anexo). El líquido folicular recuperado se colocó en una caja de Petri de 55 mm, de donde se seleccionaron aquellos COC de mejor condición fenotípica en base a la morfología citoplasmática y número de capas de células de la granulosa (Grado 1: ovocitos con múltiples capas de células cúmulos compactas; Grado 2: ovocitos parcialmente desnudos; Grado 3: ovocitos con células cúmulos expandidas, y Grado 4: ovocitos desnudos) (Ward *et al.*, 2000).

Los COC grado 1 y 2 colectados se lavaron dos veces en medio de maduración *in vitro*, MIV (8.3 mL de TCM-199, 10% de SFB, 5 UI/mL de hCG, 5 µg/mL de FSH, 100 µL de EGF y 65 µL de antibac-antifun). En una caja de cuatro pozos (Nunc) previamente equilibrada con 500 µL de medio MIV y cubiertos bajo aceite mineral, se colaron 50 COC en cada pozo y se dejaron incubar de 20 a 24 horas a 38°C con 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación.

6.2. Denudación de los complejos ovocito cúmulus

Una vez completado el tiempo de maduración *in vitro* de los COC fueron denudados es decir, se les eliminaron las células foliculares que conformaban el cúmulo granular expandido. Para lo cual los COC se colocaron en un tubo cónico con 500 μ L de hialuronidasa (Sigma-Aldrich) en solución (0.5 mg/mL en TCM-199) y se resuspendieron varias veces con una micropipeta automática, después se agitaron en vórtex por 3 minutos para eliminar la mayor cantidad de células del cúmulo.

Los ovocitos se colectaron en una caja de Petri e 35 mm y se les realizó dos lavados con medio T2 (TCM-199 suplementado con SFB al 2%) para inactivar la acción enzimática y retirar las células de la granulosa. Se seleccionaron los ovocitos que presentaron extrusión del primer cuerpo polar, los cuales están en la fase meiótica MII.

7. Preparación de extractos de ovocitos

Los ovocitos con extrusión del primer cuerpo polar (MII) se seleccionaron y se les disgregó la zona pelúcida con pronasa (2 mg/mL, en TCM-199 con 10% de SFB).

Los ovocitos libres de zona pelúcida se equilibraron en un Sistema Regenerativo de Energía (SER: 1 mM ATP, 10 mM fosfocreatina y 25 μ g de creatina cinasa, Sigma-Aldrich) (Xiong *et al.*, 2013) y posteriormente se resuspendieron (80 ovocitos en promedio) en 5 μ L del SER en un tubo cónico de microcentrífuga (0.2 mL) y se centrifugó a 21,000x g por 20 minutos a 4°C (Micromax RF, Thermo Electron Corporation). El sobrenadante resultante se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización (Tang *et al.*, 2009). El procedimiento se repitió para obtener diferentes lotes de extractos.

8. Clonación manual o Handmade cloning

Para la técnica de clonación de embriones se siguió el método descrito por Vajta *et al.* (2001, 2006), Peura y Vajta (2003).

Una vez completado el tiempo de maduración *in vitro*, los ovocitos con células del cúmulo expandidas se desnudaron de éstas para lo cual se colocaron en un tubo cónico con 500 μL de hialuronidasa en solución (0.5 mg/mL en TCM-199) y se resuspendieron varias veces con la micropipeta, después se agitaron en vórtex por 3 minutos para eliminar la mayor cantidad de células del cúmulo.

Los ovocitos se colectaron en una caja Petri de 35 mm y se les realizaron dos lavados con medio T2 (TCM-199 suplementado con SFB al 2%) para inactivar la acción enzimática y retirar las células de la granulosa.

De los ovocitos desnudados se seleccionaron aquellos que presentaron extrusión del primer cuerpo polar, los cuales se encontraban en MII. Estos se colocaron en medio MIV con demecolcina a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 38 °C, 5% de CO_2 en aire y humedad a saturación por alrededor de 1 hora.

8.1. Preparación de los citoplastos

Sobre una caja Petri de 55 mm se colocaron microgotas de 30 μL de T2, T20, T10 (TCM-199 suplementado con 10% de SFB), T20 (TCM-199 suplementado con 20% SFB), Pronasa (2 mg/mL en medio T10). Las microgotas se cubrieron con aceite mineral y en esta caja se prepararon los citoplastos (Figura 1).

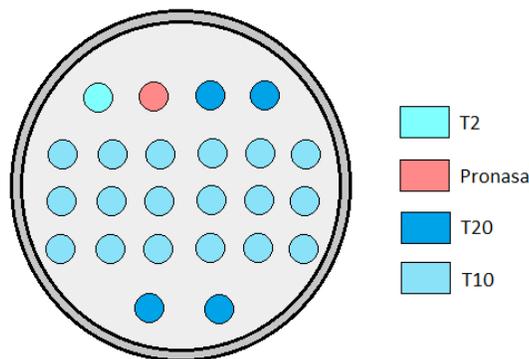


Figura 1. Caja de preparación de citoplastos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación en demecolcina, los ovocitos se transfirieron a la microgota de medio T2 de la caja de preparación de citoplastos. A continuación se pasaron grupos de entre 20 a 30 ovocitos a la gota de pronasa por 3 minutos o hasta que la zona pelúcida se disgregó por completo, inmediatamente después, los ovocitos libres de zona pelúcida se colocaron en la gota de medio T20 para inactivar la acción de la pronasa. Este procedimiento se repitió con todos los ovocitos disponibles.

Los ovocitos libres de zona pelúcida se distribuyeron en grupos de seis en cada una de las microgotas de medio T10 y se prosiguió con su enucleación con ayuda de una micronavaja (Bioniche) y bajo un microscopio estereoscópico (Olympus, SZ61), se cortó la protuberancia del citoplasma que se encontraba a nivel de membrana, la cual contenía el material genético del ovocito. Haciendo notar que los citoplastos recuperan su forma esférica casi instantáneamente. Los ovocitos enucleados (citoplastos) se colectaron en las gotas de medio T20.

8.2 Formación de triplete y fusión de los cario-citoplastos

Sobre una tapa de caja Petri de 35 mm se colocaron gotas de 15 μ L en dos líneas horizontales de medio T20, fitohemaglutinina (5 mg/mL en TCM-199 con Hepes, Sigma-Aldrich), T2 y medio de fusión (0.3 M de D-Manitol y 1 mg/ mL de Polivinil alcohol, Sigma-Aldrich) (Figura 2).

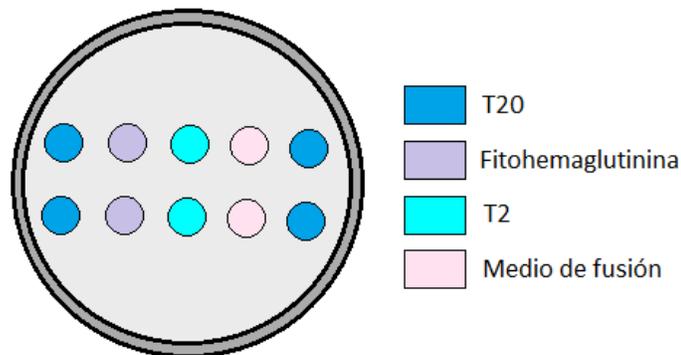


Figura 2. Caja de fusión

Los citoplastos se colocaron en las dos primeras gotas de medio T20, posteriormente se tomaron los citoplastos y uno por uno se fueron sumergiendo en la gota de fitohemaglutinina por 3 a 4 segundos, después se transfirieron a la gota de medio T2 que contenía una baja densidad de carioplastos (fibroblastos de *Ovis aries*) y a continuación se formaron los tripletes. Para ello, se unió un carioplasto con dos citoplastos colocando al primero entre los dos últimos.

Los tripletes formados se equilibraron en la gota de medio de fusión y se transfirieron a la cámara de fusión (BTX microslide, 0.5 mm de apertura, modelo 450) (Figura 3). Se dejó pasar una corriente de 4 V de corriente alterna (AC) para alinear los tripletes al electrodo positivo, después se incrementó la AC a 9 V y se aplicó un soló pulso de 100 V/mm de corriente directa (DC) por 9 μ seg. Los tripletes se colocaron en las últimas gotas de medio T20 y el procedimiento se repitió con los demás tripletes. Una vez que los tripletes formaron una sola célula, se incubaron 3 horas para la reprogramación nuclear en medio SOF-1 (Synthetic Oviductal Fluid, por sus siglas en inglés. In Vitro SA de SV) con 5% de SFB a 38°C y 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación.



Figura 3. Cámara de fusión

8.3 Activación

A las células obtenidas por electrofusión se les indujo la activación por métodos químicos; para lo cual se incubaron en medio T2 que contenía 8 μM de ionóforo de Ca^{2+} A23187 (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos a 30°C, 5% de CO_2 en aire y humedad a saturación. Posteriormente los tripletes reconstruidos se lavaron tres veces en medio T20 y se colocaron de manera individual en gotas de 2 μL de medio SOF-1 con 5% de SFB que contenía 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP, Sigma-Aldrich). Las gotas se cubrieron con aceite mineral y se dejaron incubar por espacio de 4 horas a 30°C, 5% de CO_2 en aire y humedad a saturación. Al finalizar el tiempo de incubación en 6-DMAP, los embriones reconstruidos se lavaron tres veces en medio SOF-1 con 5% de SFB por espacio de 3 minutos en cada lavado.

8.4 Cultivo *in vitro* de embriones en el sistema WOW

El sistema WOW o de micropozos, consistió en hacer estos en cada celda de una caja de cuatro pozos de acuerdo al número de células formadas por electrofusión (Vajta *et al.*, 2000). A cada celda se le agregaron 100 μL de medio SOF-1 con 15% de SFB y se cubrieron con aceite mineral; se dejó equilibrar el medio por 4 horas y después se transfirieron cuidadosamente las células obtenidas por electrofusión a cada uno de los micropozos, se dejaron en incubación a 38°C y 5% de CO_2 en aire y humedad a saturación por 7 días.

9. Evaluación del desarrollo embrionario

A los 7 días de cultivo se evaluó el desarrollo embrionario, para lo cual se consideró la etapa de segmentación en que se encontraban los embriones a partir del número de blastómeros observados bajo el microscopio estereoscópico a aumento de 20X.

Para determinar el desarrollo embrionario, se desarrollaron al mismo tiempo que los embriones clonados, ovocitos partenogénicos, de acuerdo con la metodología descrita por Jena *et al.* (2012). Ésta consistió en la activación de ovocitos en MII con 8 μ M de Ionóforo de Ca^{+2} A23187 por 5 minutos y la incubación con 2 mM de 6-DMAP por 4 horas. Los cigotos partenogénicos se cultivaron en las mismas condiciones descritas para las células clonadas obtenidas por electrofusión.

10. Evaluación de la condición del desarrollo embrionario

La condición del desarrollo embrionario se determinó con base en la etapa de segmentación esperada a las 48 y 96 horas de cultivo (embriones de 8-células, mórulas compactas ó blastocistos, respectivamente) (Mara *et al.*, 2013). Posteriormente, los embriones se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 hora, se lavaron en 1 mL de PBS y se incubaron con Hoechst (5 mg/mL de Hoechst, SIGMA B-2883, disuelto en PBS con 1g/L de polivinil alcohol) durante 5 minutos. Finalizado el tiempo de incubación se realizó un lavado en PBS y posteriormente se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje (1:1 v/v, glicerol-PBS) y se cubrieron con un cubreobjetos cuyas orillas se sellaron con barniz de uñas (Rodríguez-Suástegui, 2012).

En base al conteo de núcleos de los embriones teñidos con Hoechst se clasificó la condición de los embriones en:

No fragmentados, aquellos embriones donde el número de núcleos correspondía con el número de blastómeros y cada uno de ellos poseía solo un núcleo.

Fragmentados, embriones donde el número de blastómeros era mayor al número de núcleos.

Polinucleares, cuando los embriones presentaban más de un núcleo en el mismo blastómero.

11. Análisis estadístico

La comparación entre los diferentes grupos de embriones tratados en relación a la etapa de desarrollo embrionario, así como el número de embriones polinucleares, fragmentados y grado de fragmentación, se realizó aplicando un análisis de chi-cuadrada utilizando el paquete estadístico NCSS versión 07.1.21. Las diferencias fueron consideradas significativas a una $P < 0.05$.

VIII. Resultados

1. Estandarización de la clonación manual

1.1. Deriva de fibroblastos de *Ovis aries*

A partir de una biopsia de piel, obtenida de la oreja de un feto, de una oveja hembra de 5 meses de gestación, se derivaron fibroblastos, los cuales se cultivaron hasta alcanzar el 5^{to} pasaje celular. En cada uno de los pasajes se obtuvo una confluencia en promedio del 90% y el tiempo entre cada pasaje fue de 7 días (Figura 4).

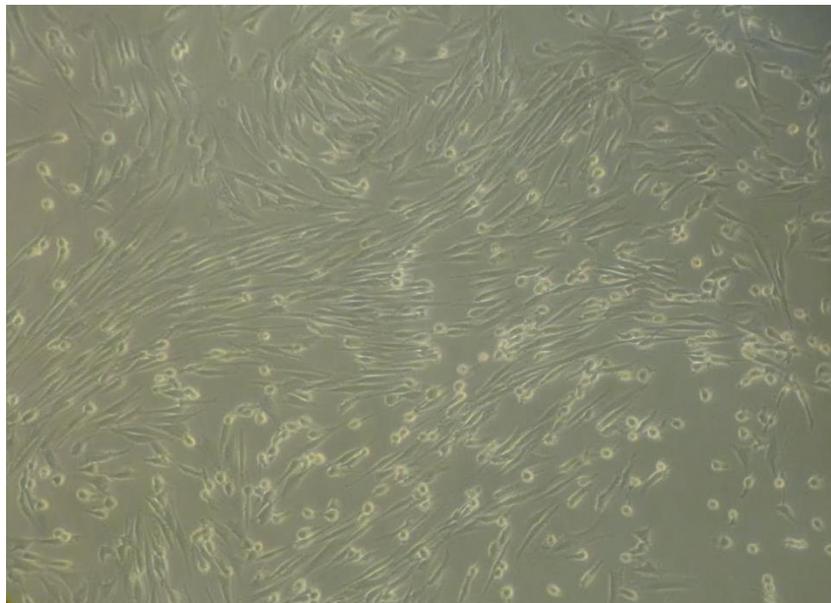


Figura 4. Fibroblastos de *O. aries* correspondientes al 5^{to} pasaje celular que presentan 90% de confluencia (Microscopio invertido, aumento 40X).

1.2. Obtención de citoplastos

Para estandarizar la técnica de clonación manual en *Ovis aries*, se realizaron 8 experimentos. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la eficiencia en la obtención de citoplastos a partir de ovocitos madurados *in vitro* (MII determinada por la presencia del 1^{er} cuerpo polar), de ovocitos con extrusión de la placa metafásica y la formación de citoplastos después de la enucleación (Figura 5 y 6).

Tabla 1. Eficiencia en la obtención de citoplastos a partir de la maduración *in vitro* y extrusión de la placa metafásica en ovocitos de *Ovis aries*.

Recuperados	Ovocitos		Citoplastos n (%)
	MIV (1 ^{er} CP) n (%)	EPM n (%)	
108	78 (72)	68 (87)	52 (76)
112	88 (79)	83 (94)	68 (82)
138	116 (84)	75 (65)	61 (81)
80	64 (80)	56 (88)	42 (75)
155	117 (75)	88 (75)	66 (75)
173	110 (64)	92 (84)	76 (83)
162	110 (68)	98 (89)	78 (80)
81	52 (64)	48 (92)	42 (88)
1009	735 (73)	608 (60)	458 (48)

Maduración *in vitro* (MIV), Primer Cuerpo Polar (1^{er} CP), Extrusión de la Placa Metafásica (EPM), Total (% en relación a la columna anterior).

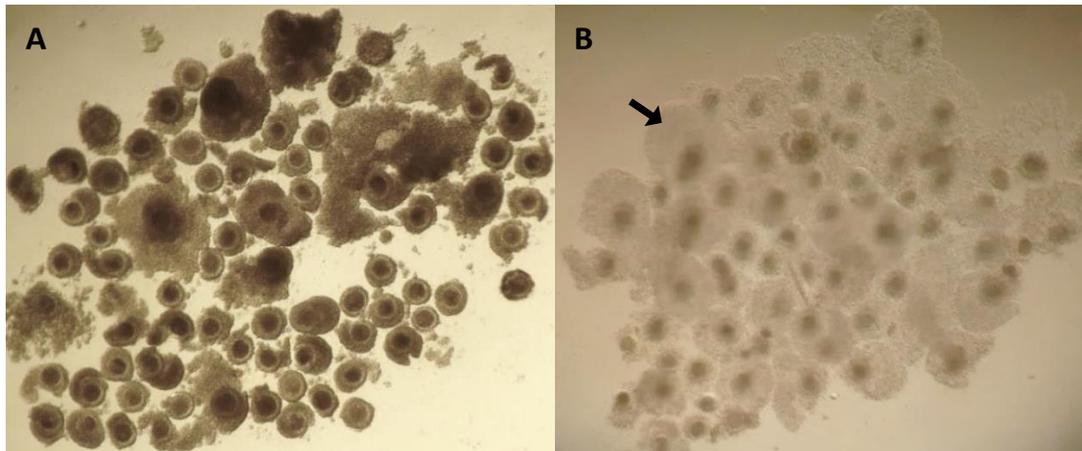


Figura 5. Maduración *in vitro* de ovocitos de *Ovis aries*, A) antes y B) después de la maduración, la flecha señala la expansión de las células del cumulus.

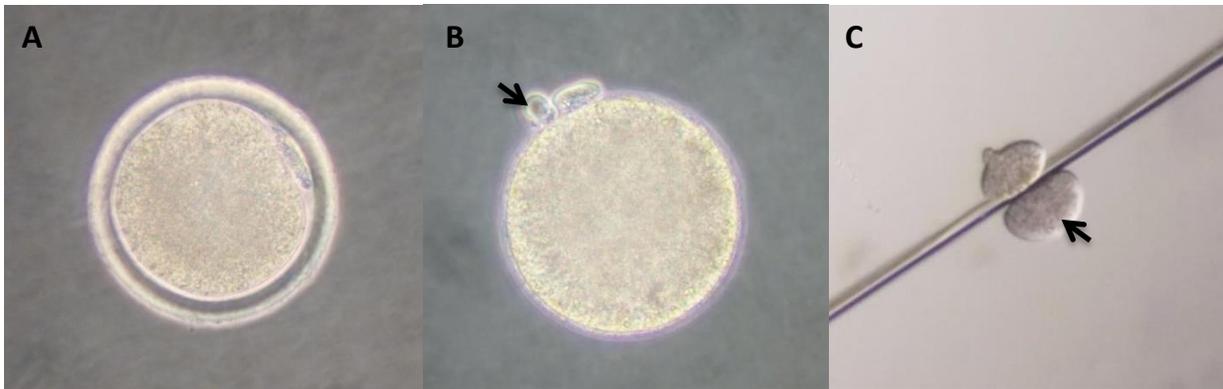


Figura 6. Formación de citoplastos, A) Ovocito en MII donde se aprecia el primer cuerpo, B) Ovocito sin zona pelúcida, la flecha señala el primer cuerpo polar al lado de la extrusión citoplasmática de la placa metafásica por efecto de la demecolcina, C) Enucleación de ovocito por corte transversal de la extrusión citoplasmática, la flecha indica el citoplasto formado.

El número total de ovocitos a madurar fue de 1009 (100%), de los cuales 735 (73%) maduraron *in vitro*, de estos 608 (60%) presentaron extrusión de la placa metafásica y a partir de su enucleación se obtuvieron finalmente 458 (48%) citoplastos (Tabla 1 y Figura 7).

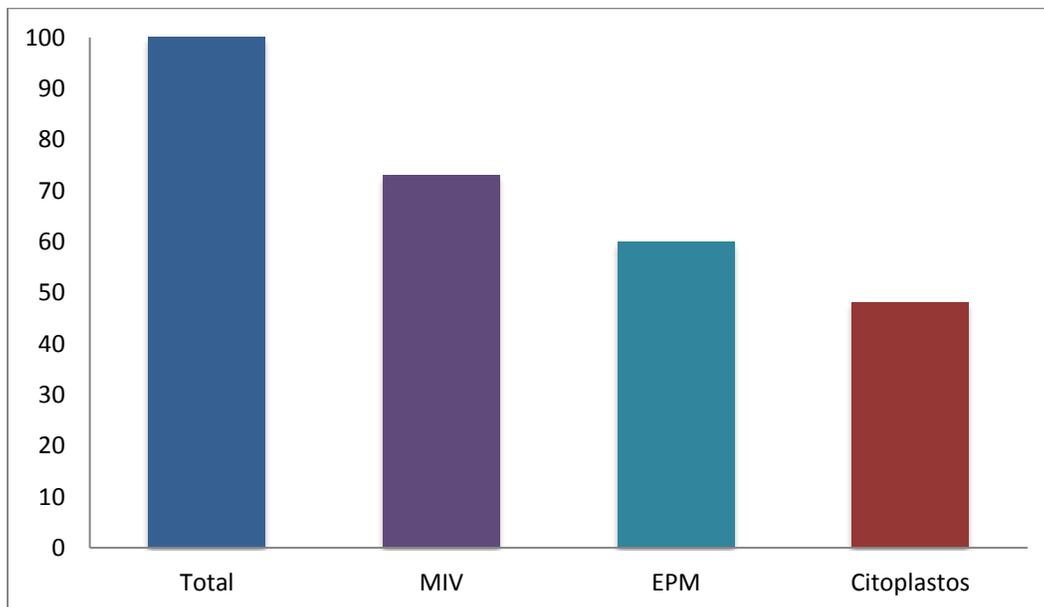


Figura 7. Eficiencia de obtención de citoplastos a partir del total de ovocitos madurados *in vitro* y con extrusión de la placa metafásica en *Ovis aries*. Maduración *in vitro* (MIV), Extrusión de la Placa Metafásica (EPM).

1.3. Formación y desarrollo de embriones clonados

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la eficiencia de la fusión de dos citoplastos con el carioplasto (Figura 8) para la formación de una célula de la cual se desarrollará un embrión clonado, su activación y posterior desarrollo embrionario de 8 a 16 células y mórula, etapas que fueron evaluadas a las 96 horas de cultivo *in vitro*.

Tabla 2. Desarrollo de embriones de *Ovis aries* por clonación manual a partir de embriones reconstruidos y activados.

Células formadas por electrofusión n(%)	Embriones n (%)		
	Activados	8-16 células	Mórulas
26 (50)	26 (100)	8 (31)	18 (69)
22 (32)	14 (64)	7 (50)	7 (50)
27 (44)	27 (100)	2 (7)	25 (93)
20 (48)	19 (95)	9 (47)	10 (53)
33 (50)	27 (82)	1 (4)	26 (96)
31 (41)	28 (90)	20 (71)	8 (29)
35 (45)	30 (86)	12 (40)	18 (60)
21 (50)	20 (95)	11 (55)	9 (45)
215	191 (89)	70 (33)	121 (63)

El porcentaje de células formadas por electrofusión se obtuvo a partir del número de citoplastos, tomando en cuenta que por cada célula formada se utilizaron dos citoplastos. **Total (% en relación a los activados).**

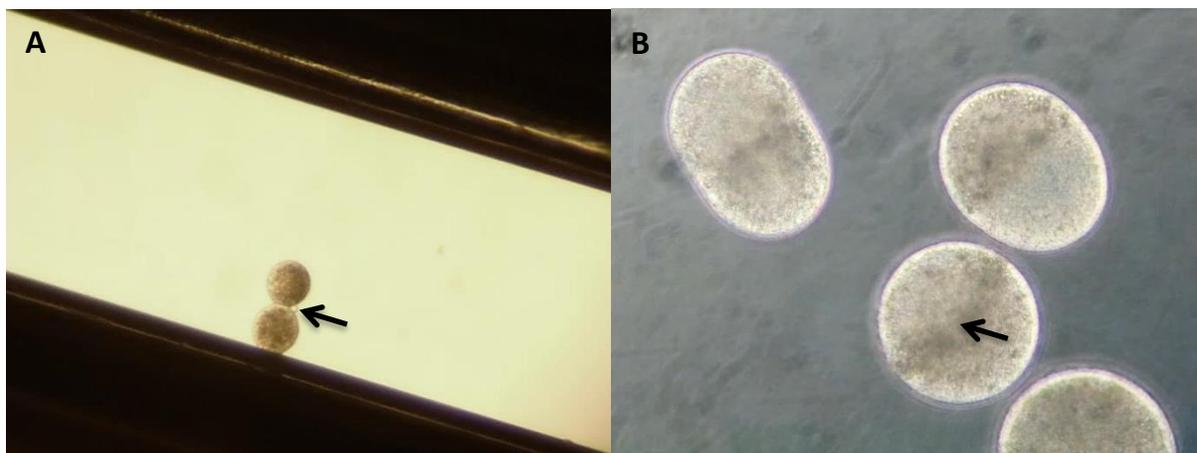


Figura 8. Formación de embriones clonados de *Ovis aries*, A) Fusión de tripletes, la flecha indica el carioplasto entre los dos citoplastos; B) Reconstrucción de complejos cario-citoplastos, la flecha señala la unión entre los dos citoplastos.

El número total de células formadas por fusión fue de 215 (100%), de los cuales 191 (89%) activaron. A las 96 horas de cultivo *in vitro* se evaluó el desarrollo de los embriones clonados, 70 (33%) alcanzaron la etapa de 8 a 16 células y 121 (56%) alcanzaron la etapa de mórula (Figura 9).

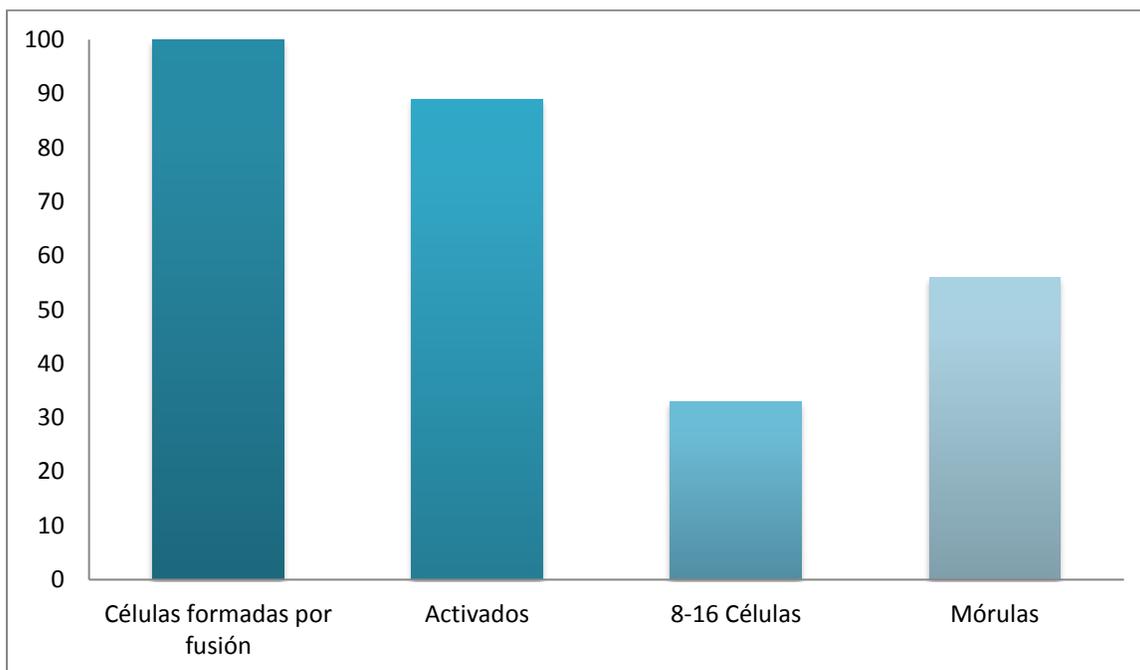


Figura 9. Porcentaje de desarrollo de embriones de *Ovis aries* por clonación manual a partir del número total de células formadas por fusión y activadas.

Cabe señalar que, a pesar de haber obtenido un porcentaje alto de embriones en etapa de 8 a 16 células (33%) y mórulas (56%) en relación a las células formadas por fusión, no ocurrió la compactación ni cavitación de las mórulas y por consecuencia no fue posible lograr el desarrollo de blastocistos.

2. Determinación de la concentración idónea de Estreptolisina-O para la permeabilización de fibroblastos

Antes de exponer los fibroblastos de piel de *Ovis aries* del 5° pasaje celular, a los extractos de ovocitos homólogos en metafase II, primero se permeabilizaron con estreptolisina-O (SLO) a concentraciones y tiempos variados. En la Tabla 3 se muestran los porcentajes de fibroblastos permeabilizados utilizando diferentes concentraciones de células, de SLO y volumen de dilución (PBS) a distintos tiempos de

incubación, a 38°C. Para evaluar la permeabilización de los fibroblastos, se tiñeron con yoduro de propidio, el cual solo pasa al interior de la célula si la membrana ha sido permeabilizada y presenta gran afinidad por los ácidos nucleicos. Las células permeabilizadas emitieron fluorescencia de color rojo al ser excitadas por luz ultravioleta de 536 nm de longitud de onda (Figura 10).

Tabla 3. Porcentaje de fibroblastos permeabilizados con Estreptolisina-O (SLO)

Concentración Celular/mL	Concentración de SLO (Volumen)	% de Células Permeabilizadas				
		0 min	10 min	15 min	30 min	120 min
288,000	10 UI (50 µL)	15	90	-	-	-
288,000	10 UI (500 µL)	5	5	10	-	20
140,000	20 UI (500 µL)	8	50	90	-	-
140,000	10 UI (250 µL)	8	10	15	70	-

SLO (Estreptolisina-O), Unidades Internacionales (UI).

La permeabilización de 288,000 células con 10 UI de SLO en un volumen de 50 µL de PBS resultó ser el más efectiva, lográndose permeabilizar el 90% de células en 10 minutos. Sin embargo, no fusionaron con los citoplastos debido a que sus membranas no lograron resellar, ya que permitían la entrada del colorante azul de tripano. Por esta razón, se decidió aumentar el volumen 10 veces más (500 µL) manteniendo la concentración celular y de SLO, no obstante, al cabo de 120 minutos sólo se había permeabilizado el 20% de las células. Por lo tanto, se planteó reducir la concentración de células a la mitad (140,000) y utilizar dos concentraciones de SLO (10 y 20 UI) en dos volúmenes diferentes (250 y 500 µL). De estos dos ensayos, el más adecuado que permitió resellar las membranas plasmáticas y la fusión celular, fue la concentración de 10 UI de SLO en 250 µL de PBS durante 30 minutos de incubación a 38 °C, en la cual se obtuvo el 70% de fibroblastos permeabilizados (98,000 células) (Tabla 3).

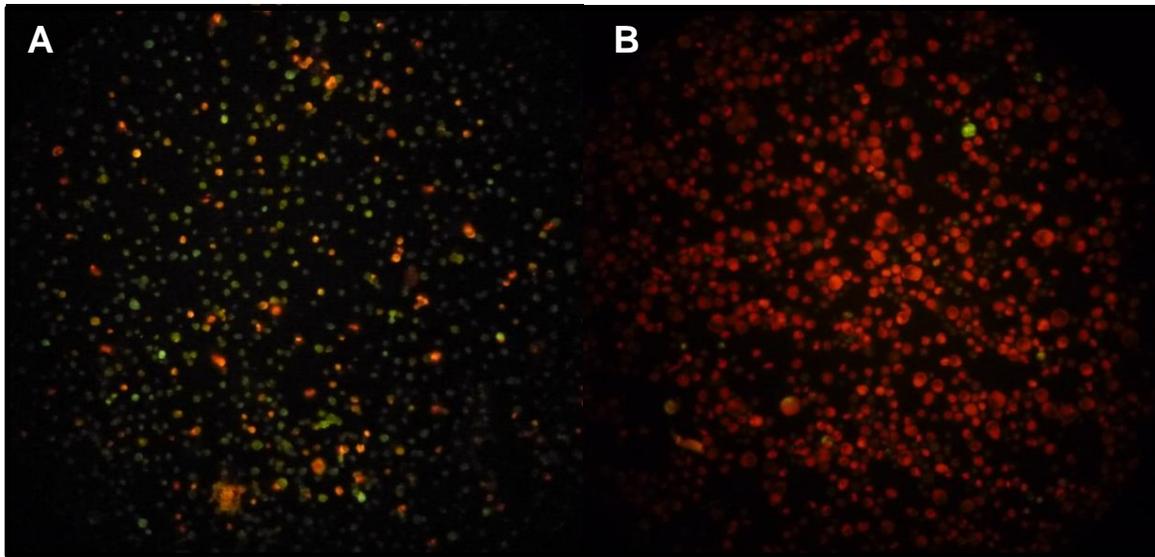


Figura 10. Fibroblastos teñidos con ioduro de propidium y observados bajo microscopía de epifluorescencia (20X), (A) no permeabilizados y (B) permeabilizados.

3. Obtención de embriones clonados a partir de fibroblastos expuestos a extractos de ovocitos homólogos en MII

El desarrollo de los embriones clonados y partenogénicos se evaluó a las 96 horas de cultivo *in vitro*. Los embriones se clasificaron en grupos de 3 a 8 células, 10 a 12 células y estadio de mórula, como se muestra en la Tabla 4 y Figura 11.

Tabla 4. Desarrollo de embriones clonados de *Ovis aries* a partir de fibroblastos tratados con extractos de ovocitos homólogos

	Experimento	Embriones n	Desarrollo embrionario n (%)		
			3-8 células	10-12 células	Mórulas
Sin Extractos	1	5	-	1 (20)	4 (80)
	2	5	1 (20)	-	4 (80)
	Totales	10	1 (10) ^a	1 (10) ^a	8 (80) ^a
Con Extractos	1	5	1 (20)	1 (20)	3 (60)
	2	6	1 (16.5)	1 (16.5)	4 (67)
	Totales	11	2 (18) ^a	2 (18) ^a	7 (64) ^a
Partenogénicosl		12	4 (33) ^a	2 (17) ^a	6 (50) ^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos (*Chi-cuadrada*, $P < 0.05$).

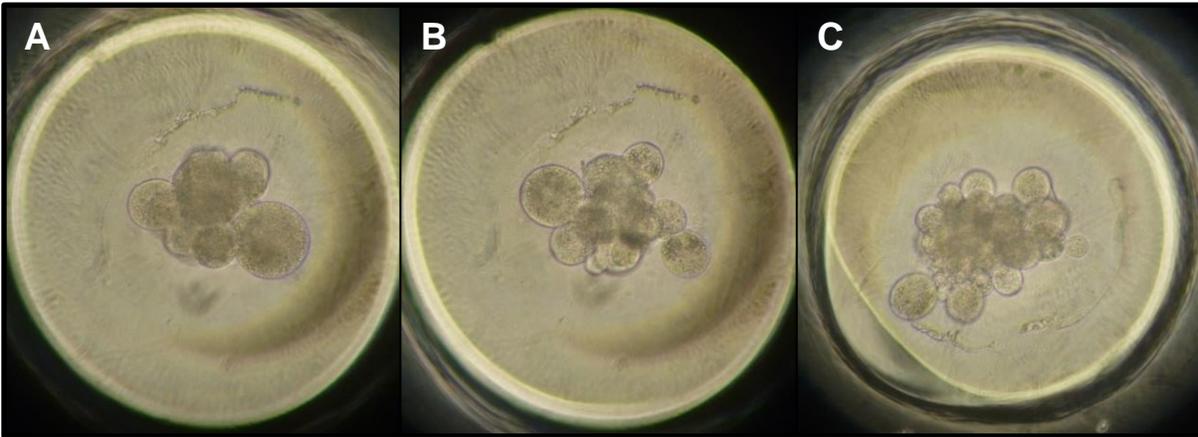


Figura 11. Diferentes etapas del desarrollo de embriones clonados de *Ovis aries* a partir de fibroblastos de feto tratados con extractos de ovocitos en MII. A) Embrión de 6-blastómeros, B) Embrión de 12-blastómeros, C) Embrión en estadio de mórula. (Aumento 20X).

Con respecto a la etapa de desarrollo embrionario, no se observó diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre los diferentes grupos (Tabla 4). Sin embargo, el grupo de embriones partenogénicos presentó un mayor porcentaje de desarrollo embrionario a la etapa de 3 a 8 células (33%) con respecto al grupo tratado con extractos de ovocitos (18%) y al grupo control (10%). Por otra parte, el grupo de embriones clonados a partir de fibroblastos tratados con extractos de ovocitos y el grupo de embriones partenogénicos, presentaron una mejor tasa de desarrollo alcanzando la etapa de 10 a 12 células en comparación con el grupo control (18%, 17% vs 10%). Sin embargo, el grupo control (embriones partenogénicos) presentó un mayor porcentaje de embriones en etapa de mórula (80%) en comparación con el grupo de embriones clonados a partir de fibroblastos tratados con extractos de ovocitos (64%) y el grupo de embriones partenogénicos (50%) (Tabla 4).

4. Evaluación de la condición del desarrollo de embriones clonados de *Ovis aries* mediante tinción de Hoechst

Los embriones clonados y partenogénicos fueron fijados y teñidos con Hoechst para contrastar, bajo el microscopio de epifluorescencia (Nikon, eclipse E600), el número de blastómeros y núcleos presentes. Se encontró que los embriones clonados con o sin exposición de fibroblastos a extractos de ovocitos presentaron fragmentación

del citoplasma y 40% de cada uno de estos grupos mostraron blastómeros polinucleares. Solo en el grupo de embriones partenogénicos, se obtuvo un embrión (12.5%) cuyo número de núcleos correspondía con el número de blastómeros, de los demás embriones el 63% exhibieron fragmentación, en tanto que el 25% presentó blastómeros polinucleares (Tabla 5) (Figura 12).

Tabla 5. Determinación del número de núcleos con relación al número de blastómeros en embriones clonados y partenogénicos de *O. aries*

	Embrión	Número de Blastómeros	Número de Núcleos	Fragmentados		
				No	Si	Pol
Control	1	8	1		X	
	2	16	18 [∅]		X	X
	3	16	4 ^{&}		X	X
	4	17	12		X	
	5	16	1		X	
Extractos	1	16	10*		X	X
	2	17	12		X	
	3	16	7		X	
	4	16	12 [§]		X	X
	5	17	10		X	
Partenogénicos	1	16	7		X	
	2	10	6		X	
	3	3	+30	X		X
	4	16	1		X	
	5	3	+10	X		X
	6	12	12	X		
	7	16	2		X	
	8	16	7		X	

Polinucleares (Pol), ∅ en 5 blastómeros, & en 1 blastómero, *

Los embriones clonados con blastómeros polinucleares (más de un núcleo en mismo blastómero) también mostraron fragmentación citoplasmática, mientras que los embriones partenogénicos fragmentados no exhibieron blastómeros polinucleares. Además, en el grupo de embriones partenogénicos, los embriones polinucleares se caracterizaron por poseer pocos blastómeros (3) (Figura 12).

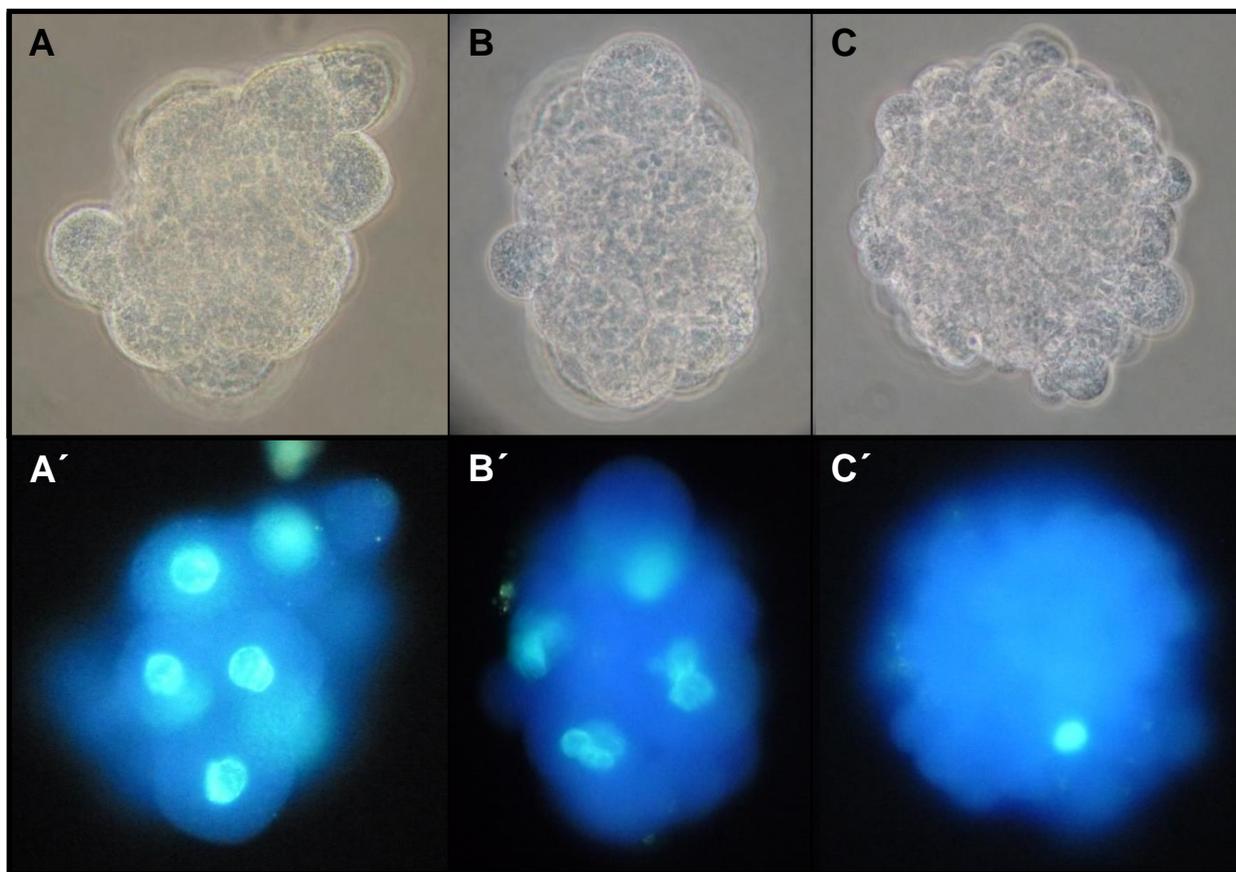


Figura 12. Embriones clonados de *Ovis aries* teñidos con Hoechst. (A-C) Campo claro. (A'-C') microscopía de fluorescencia, filtro de excitación de UV 350 nm; Aumento a 40X. (A, A') Embrión de 17B/12N. (B, B') Embrión de 12B/18N en 5 blastómeros. (C, C') Embrión fragmentado.

No se observó diferencia ($P > 0.05$) entre los diferentes grupos con respecto al número de embriones que presentaron o no fragmentación citoplasmática y blastómeros polinucleares (Tabla 6 y Figura 12).

Tabla 6. Fragmentación citoplasmática de embriones clonados a partir de fibroblastos tratadas con extractos homólogos en *Ovis aries*

Tratamiento	Embriones	Sin fragmentación n (%)	Con fragmentación n (%)	Polinucleares n (%)
Control	5	0	5 (100) ^a	2 (40) ^a
Extractos	5	0	5 (100) ^a	2 (40) ^a
Partenogénicos	8	1 (12.5)	7 (87.5) ^a	2 (25) ^a

Literales diferentes en la misma columna son estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Al analizar la relación del número de núcleos por blastómeros presentes en los embriones de cada grupo, incluyendo la totalidad de embriones, se encontró una mejor relación para los partenogénicos (0.8, tomando en consideración que el valor 1 representa la relación ideal, cada blastómero con un núcleo) que para los clonados con o sin exposición de fibroblastos a extractos de ovocitos (0.6 y 0.5, respectivamente) (Figura 13). Al eliminar los datos de embriones polinucleares (Figura 14), se observó una relación favorable para los embriones cuyos fibroblastos fueron tratados con extractos de ovocitos en comparación con aquellos no tratados (0.58 vs 0.45), y ambos fueron mejores que para los partenogénicos (0.38) (Figura 14). Lo que podría indicar alguna bondad de la utilización de los extractos de ovocitos homólogos a pesar de lo reducido de la muestra disponible en el presente trabajo de tesis.

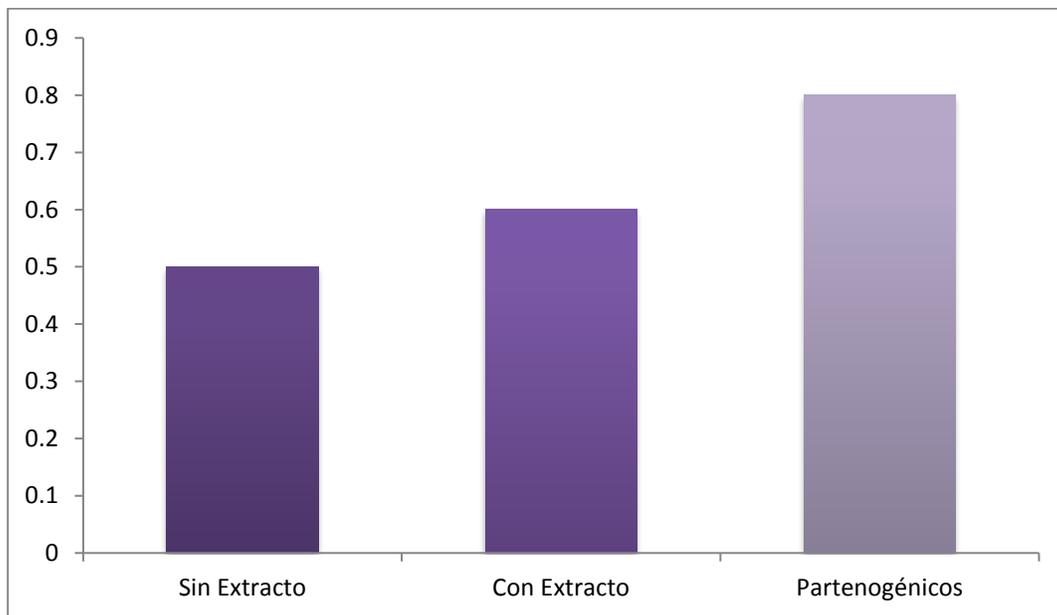


Figura 13. Relación entre el número de núcleos por blastómeros presentes en los embriones clonados con y sin extractos de ovocitos, y partenogénicos.

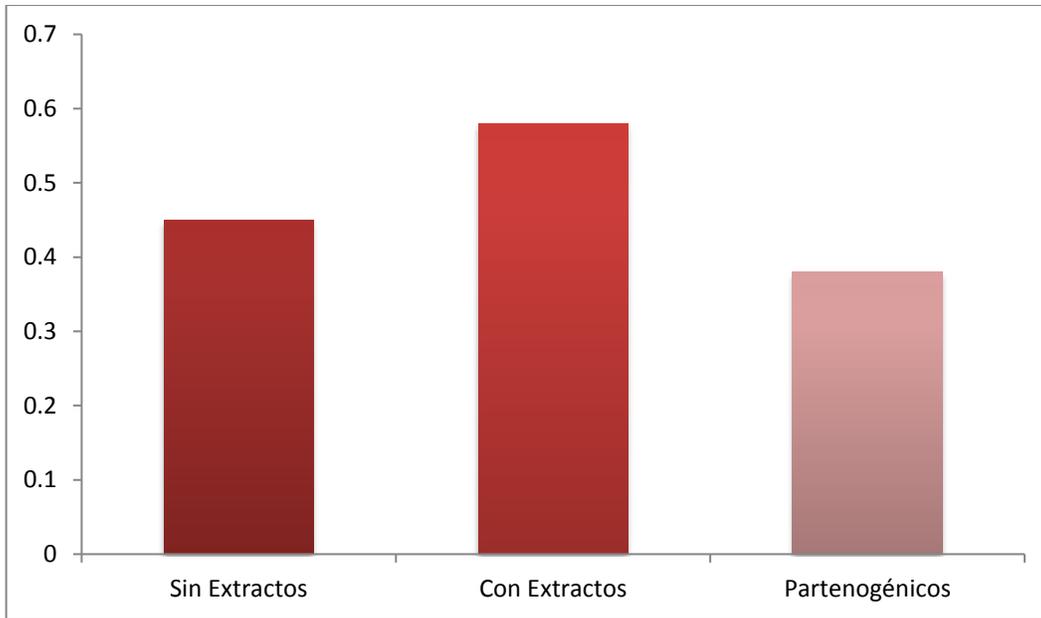


Figura 14. Relación entre el número de núcleos por blastómeros presentes en los embriones clonados con y sin extractos de ovocitos, y partenogénicos.

Por otro lado, si consideramos los embriones clonados sin exposición de los fibroblastos a extractos de ovocitos homólogos (exceptuando los polinucleares), en dos de los tres embriones restantes (66%) no hubo división nuclear. En los partenogénicos esta condición se presentó en dos de los seis embriones divididos (33%). En tanto que en los clonados a partir de fibroblastos sometidos a extractos de ovocitos homólogos no existió esta condición.

IX. Discusión

Entre las biotecnologías aplicadas a la reproducción asistida en animales y humanos, se encuentran la FIV y la ICSI, donde los embriones así desarrollados son transferidos a las hembras receptoras. La biotecnología de transferencia nuclear de células somáticas, permite generar embriones clonados a partir de la unión de un ovocito desprovisto de su núcleo con una célula somática lo que permite tener un individuo con características genéticas y fenotípicas correspondientes al donante de la célula somática y por lo tanto ser un clon (Solter, 2000; Ogura *et al.*, 2012).

La SCNT tiene un potencial único entre las biotecnologías reproductivas, dado que es un tipo de reproducción asexual que lleva implícito conservar las características del donante de la célula somática. Por medio de la SCNT se han clonado diversas especies de mamíferos domésticos, particularmente animales de granja con características genéticas sobresalientes para la ganadería (Rodríguez-Osorio *et al.*, 2012). También, se han clonado algunos mamíferos silvestres amenazados con fines de conservación, sin embargo, debido a los aún limitados nacimientos y viabilidad de individuos obtenidos, la introducción de especies silvestres clonadas al ecosistema, sigue siendo un tema de estudio y debate.

Es importante reconocer que el porcentaje de eficiencia en la clonación de mamíferos por SCNT es bajo (<6%), además de que algunos de éstos individuos pueden llegar a presentar anomalías en su desarrollo (Young *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2003). Anomalías atribuidas, por ejemplo, al método de clonación y la especie; el tipo de célula somática utilizada; los protocolos de activación embrionaria; la fragmentación del citoplasma, así como el sistema y medios de cultivo utilizados para el desarrollo embrionario *in vitro* (Akagi *et al.*, 2014; Kawahara *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2003).

Entre las dificultades inherentes a la técnica de SCNT, está el hecho de que el ovocito está fisiológicamente constituido para recibir el núcleo haploide del espermatozoide a través de la fertilización y no un núcleo diploide de una célula somática a través de una fusión o microinyección. Sin embargo, está comprobado que

el ovocito enucleado es capaz de reprogramar el núcleo de una célula diferenciada (especializada) es decir, cambia la identidad de la célula somática (programa de expresión de genes) por otra y así lograr ser una célula totipotente para originar un individuo (Eilertsen *et al.*, 2007; Halley-Stott, 2014; Teperek y Miyamoto, 2013).

En gran medida la baja eficiencia de la SCNT ha sido atribuida a la falta o inapropiada reprogramación espacio temporal del núcleo somático (Golbabapour *et al.*, 2011). Por lo tanto, se han desarrollado diversos métodos de reprogramación celular, por ejemplo, utilizar extractos de células (Collas y Taranger, 2006). Dichos extractos se han preparado a partir de células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, e incluso a partir de ovocitos de rana (*Xenopus laevis*) (Alberio *et al.*, 2005), así como de diferentes mamíferos, tales como cerdos (Bui *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha documentado la utilización de extractos de ovocitos de oveja para reprogramar células somáticas de la misma especie. Por esta razón, en el presente trabajo se analizó el efecto de la exposición de los fibroblastos permeabilizados a extractos de ovocitos homólogos en MII, sobre el desarrollo de embriones clonados de ovino doméstico (*Ovis aries*).

Por otro lado, la técnica de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos es un paso común a los procedimientos para la producción de embriones por FIV, ICSI y SCNT. Pero a diferencia de las dos primeras, en la SCNT, se requiere retirar el material genético de los ovocitos madurados para la generación de citoplastos o recipiente citoplasmático receptor del núcleo somático.

En la presente tesis se obtuvieron porcentajes de MIV de ovocitos de *Ovis aries* de 73%, mientras que en otros trabajos en la misma especie, se reportan valores que van de 48.4% (Ni *et al.*, 2015), 57% (Valiollahpoor *et al.*, 2015), 77.8% (Wang *et al.*, 2012), 83% (Rose *et al.*, 2013) y 94.2% (Gharibi *et al.*, 2013). La variación del porcentaje de MIV entre los diferentes estudios puede deberse a diversos factores como la raza, edad y estado reproductivo de las hembras de donde proceden los ovocitos, así como a la composición de los medios de maduración *in vitro* y las condiciones particulares de cada laboratorio (Paramio e Izquierdo, 2014). Por su parte, Dadashpour *et al.* (2014) no encontraron diferencias significativas en la MIV de ovocitos

de ovino recuperados dentro o fuera de la época reproductiva. Se debe tomar en consideración que los ovarios a puncionar para obtener los ovocitos, poseen folículos en diferentes etapas de desarrollo por lo cual se obtienen ovocitos con un potencial variable para alcanzar la metafase II (MII) (de Souza-Fabjan *et al.*, 2014). Por lo tanto, el porcentaje de MIV obtenido en esta tesis (73%), se encuentra dentro del rango obtenido por otros grupos de investigación, por lo cual se puede considerar que fue adecuado.

La obtención de embriones por clonación manual, consiste en una serie de pasos orientados a obtener carioplastos (células somáticas donadoras de núcleo) y citoplastos (recipientes citoplasmáticos receptores de núcleos). En esta tesis se logró por electrofusión de dos citoplastos con un carioplasto la activación de estos complejos cario-citoplastos que *in vitro* se desarrollaron hasta una etapa de mórula.

Se generaron citoplastos a partir de ovocitos libres de zona pelúcida tratados con demecolcina, para inducir la protrusión citoplasmática de la placa metafásica y de esta manera, facilitar la enucleación. El 83% de los ovocitos tratados con demecolcina presentaron una protuberancia citoplasmática visible, lo cual es ligeramente inferior al compararlo con el 87.2% reportado en ovino (Hosseini *et al.*, 2013), y bastante menor al compararlo con el 95.9% obtenido en ciervo Sika (Yin *et al.*, 2014), el 96% en porcino (Li *et al.*, 2006) y el 100% en hámster sirio dorado (Wang *et al.*, 2009). La expulsión de la placa metafásica con demecolcina se logra en mayor o menor medida dependiendo de las concentraciones utilizadas, tiempo de exposición y especie con la que se trabaje. Esto es importante de considerar ya que los ovocitos de distintas especies de mamíferos presentan diferente respuesta a una misma concentración y tiempo de exposición a la demecolcina como se reporta por diferentes autores (Hosseini *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2006).

Al enuclear el ovocito, la porción del citoplasma sin núcleo recuperará su forma esférica casi instantáneamente para dar lugar al citoplasto. En este trabajo de tesis se obtuvo de ovocitos de oveja, 80% de citoplastos formados, es decir, que recuperaron su forma esférica después de ser enucleados; valor moderadamente inferior al 89% y 94%, obtenidos por Vajta *et al.* (2001) y Li *et al.* (2006) en ovocitos de bovino. Durante

el proceso de enucleación, algunos ovocitos tienden a lisarse y no restituyen su forma esférica, lo cual se puede deber a procesos tales como a una alterada capacidad de reconstitución de la membrana plasmática, así como también al impacto físico de esta maniobra en la membrana y en el citoesqueleto del ovocito (Hosseini *et al.*, 2013).

El promedio de tripletes fusionados (dos citoplastos y un carioplasto) en esta tesis fue de 87%, mientras que otros autores han obtenido valores de 78.5% en cabra (Akshey *et al.*, 2011) y 98.3% en buffalo (Selokar *et al.*, 2012). La estimulación eléctrica de la membrana celular induce la formación de pequeños poros, bajo este estado las membranas celulares tienden a fusionarse entre sí para formar una sola célula (Abidor y Sowers, 1992; Ramos y Teissié, 2000). La inducción de este proceso va a depender de la intensidad y duración del pulso eléctrico, así como del número de repeticiones de éste. En este trabajo se aplicó un pulso de 80 V/mm durante 9 μ s a diferencia del utilizado por Akshey *et al.* (2011), quienes emplearon un pulso de 336 V/mm durante 4 μ s (fibroblastos). Además, es importante considerar la integridad de la membrana plasmática para que ocurra la fusión, ya que células con daños en esta no serán capaces de completar la fusión.

Para que inicie la segmentación de los complejos cario-citoplastos, se induce la activación por tratamientos químicos, físicos o ambos. En esta tesis, se logró un 86% de embriones segmentados a partir de activación química, similar a los valores alcanzados por Akshey *et al.* (2011) de 84.5% en cabras, y Liu *et al.* (2011) que obtuvieron 89% en porcinos. Otros estudios, por activación química han obtenido tasas de segmentación embrionaria inferiores: 61.3% en antílope tibetano, (Shah *et al.*, 2008), 70.14% (Yu *et al.*, 2011) y 78% (Selokar *et al.*, 2012), en búfalo para ambos casos.

A partir de los embriones segmentados, se obtuvo 63% de embriones en estadio de mórula, valor por debajo de lo reportado por Yu *et al.* (2011), quienes lograron un desarrollo del 100% de mórulas en antílope tibetano, sin embargo, al igual que lo ocurrido en el presente estudio, tampoco obtuvieron blastocistos.

Con respecto al tratamiento de los carioplastos con extractos de ovocitos homólogos para reprogramar sus núcleos, en la presente tesis se obtuvieron 70% de fibroblastos de ovino nonato permeabilizados con tan solo 10 UI/mL de SLO durante 35 min a 37°C. Otros estudios han logrado la permeabilización de diferentes tipos celulares como fibroblastos y células del cúmulo, derivadas de fetos y animales adultos de diferentes especies como: porcinos (Bui *et al.*, 2012; Miyamoto *et al.*, 2007), bovinos (Xiong *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2009) y ratones (Bui *et al.*, 2008); empleando concentraciones elevadas de SLO (100 a 500 ng/mL), así como diferentes condiciones y tiempos de incubación. Las condiciones empleadas entre los diferentes trabajos para la permeabilización de células, van en función del tipo celular, la edad del ejemplar y la especie con la que se trabaja. Independientemente de todas estas variables, los protocolos de permeabilización deben considerar una concentración ideal de SLO con la cual se obtenga del 60 al 80% de células permeabilizadas entre los 10 y 15 minutos de incubación (Walev *et al.*, 2001). Es importante considerar que, la permeabilización de los fibroblastos debe ser reversible ya que de lo contrario, no se podrá realizar la electrofusión con los citoplastos para la formación de ‘tripletes’. La concentración mayor de SLO (20 UI) aquí utilizada, si bien, permitió obtener un mejor porcentaje de permeabilización, dificultó el resello y la fusión, así como la concentración de 10 UI a volumen reducido (50 μ L). Esta diferencia con respecto a la literatura puede ser debido a las condiciones específicas de cultivo, al tipo celular y a la especie involucrada.

Con respecto a los embriones obtenidos a las 96 horas de cultivo, se encontró que los procedentes de fibroblastos no expuestos a extractos de ovocitos, tendieron a favorecer el desarrollo embrionario (80% de mórulas), en comparación con los sometidos a extractos (64%) y estos dos fueron mayores a los partenogénicos (50%). Dada la reducida cantidad de embriones, la prueba estadística no logró mostrar diferencias significativas ($p > 0.05$). Pareciera ser entonces que, en este trabajo, la utilización de extractos de ovocitos homólogos para reprogramar los fibroblastos, no tuviera utilidad, sin embargo, al analizar la condición del desarrollo de los embriones se constata una tendencia de mejorarla. Por su parte, Xiong *et al.* en 2013 utilizaron fibroblastos (carioplastos) obtenidos de yak expuestos a extractos de ovocitos heterólogos fusionados con ovocitos de vaca (citoplastos), reportaron un aumento del

doble en la formación de blastocistos (28.6%) frente a los no expuestos a extractos (13.6%). Además de constatar que cuando colocaron 10 o 50 μ L del extracto, no hubo diferencias en el porcentaje de desarrollo embrionario. Rathbone *et al.* (2010), trabajando la reprogramación de fibroblastos ovinos con extractos de ovocitos heterólogos (*Xenopus laevis*), no reportaron diferencias entre el grupo de fibroblastos control y el expuesto a los extractos de ovocitos sobre el desarrollo embrionario de 2 células y blastocistos (84.4 vs 83.9% y 18.6 vs 21.3%, respectivamente). Sin embargo, reportaron diferencia significativa en etapas avanzadas del desarrollo embrionario, de manera que los carioplastos (fibroblastos) expuestos a extractos tuvieron cuatro veces más blastocistos, que llegaron a crías nacidas comparados con los carioplastos no expuestos (14.7% vs 3.1%).

Cabe resaltar que la diferente capacidad de reprogramación nuclear que poseen los extractos de ovocitos está relacionada con el grado de madurez alcanzado por esta célula germinal durante sus procesos de ovogénesis (vesícula germinal vs metafase II; Rathbone *et al.*, 2010). Por lo tanto, es evidente que la utilización de extractos de ovocitos ha resultado benéfica para la técnica de clonación de embriones de mamífero, sin embargo, es importante identificar en estos extractos de ovocitos en MII que moléculas serían las que participarían en la reprogramación nuclear de la célula somática (carioplasto).

Como anteriormente se hizo mención, poco se conoce sobre los mecanismos de acción que tiene las moléculas de los extractos de ovocitos sobre la regulación de la expresión nuclear de la célula somática expuesta. En este sentido se ha tratado de explicar con un enfoque epigenético es decir, su relación, por ejemplo, con los mecanismos de metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas, relacionados con los genes que interviene durante el desarrollo embrionario temprano (Eilertsen *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2010). Al respecto Rathbone *et al.* (2010) reportaron una disminución en la metilación de las citosinas del ADN (5MeC), así como en la tri-metilación de lisina 9 en la histona 3 (TriH3K9Me) de fibroblastos de ovino sometidos a extractos de ovocitos de *Xenopus laevis* y medido por medio de anticuerpos específicos fluorescentes. En el caso de 5MeC, la reducción fue de casi

13% en tanto que para la TriH3K9Me fue de 25% en comparación con los fibroblastos no expuestos.

Por su parte, Xiong *et al.* (2013) reportaron el efecto de la exposición de fibroblastos de yak a dos cantidades de extractos de ovocitos de vaca (10 y 50 μL) sobre la acetilación de la lisina en la histona tres, encontrando que a baja cantidad de extractos, la acetilación se duplicó, en tanto que a cantidades altas se triplicó; por lo tanto hay un efecto dependiente de la cantidad de extractos y dependiente de la concentración de moléculas que intervienen en la reprogramación nuclear. También reportaron resultados de la metilación del ADN de promotores de genes pluripotentes (*Oct4* y *Nanog*) por medio de la secuencia de bisulfito en los promotores de los genes. Observaron una menor metilación en el promotor de *Oct4* y *Nanog* en aquellas células expuestas a 10 y 50 μL de extracto (76.4, 72.2 y 35.6, 27.9%, respectivamente) en comparación con las células sin exposición a extractos (92.1 y 47.8%, respectivamente). Concluyendo que una mayor cantidad de extractos tiene un mejor efecto sobre la reprogramación nuclear. Otra aportación reportada en el mismo trabajo fue que al analizar los transcritos (por RT PCR) de otros genes relacionados con el desarrollo embrionario (HDAC-1, HDAC-2, Dnmt-1 y Dnmt-3a) su regulación fue a la baja.

Por otro lado, se ha señalado como una limitante en el desarrollo de los embriones *in vivo* e *in vitro* utilizando las metodologías de FIV, ICSI y SCNT, la fragmentación citoplasmática, la cual se ha descrito como la presencia de porciones citoplasmática rodeadas de membrana que carecen de núcleos y se presentan durante el desarrollo embrionario (Fujimoto *et al.*, 2011; Kawahara *et al.*, 2002). En el presente trabajo de tesis, los embriones clonados presentaron fragmentación citoplasmática, así como algunos blastómeros polinucleares, en tanto que, de los embriones partenogénicos solo uno (12.5%) no mostró estas condiciones. El proceso por el cual se presenta la fragmentación citoplasmática no se ha comprendido del todo, sin embargo, se ha observado que acontece una vez que el ovocito se activa para iniciar la segmentación y ocurre específicamente durante la fase de citocinesis del ciclo celular

en los blastómeros en división, en respuesta a una inadecuada sincronización entre los microtúbulos del huso y los microfilamentos corticales (Alikani *et al.*, 2005).

Al relacionar el número de núcleos con el número de blastómeros de cada embrión, descartando a los polinucleares, y se comparó entre los tres grupos (con extractos, sin extractos y partenogénicos) se encontrándose que esta relación fue favorable para los embriones clonados obtenidos con fibroblastos expuestos a extractos de ovocitos homólogos (0.58), en tanto que los no expuestos (0.45) y los partenogénicos (0.35) fueron menores. Esto indica que casi la mitad de los blastómeros presentes en un embrión clonado o partenogénico no son fragmentados. En el caso de los embriones clonados, es probable que lo anterior se deba a un inadecuado acoplamiento del citoesqueleto entre los dos citoplastos con el carioplasto después de la fusión celular, de tal manera que el carioplasto se sincroniza con solo uno de los citoplastos para generar blastómeros nucleados mientras que el otro citoplasto se fragmenta. Sin embargo, este fenómeno de fragmentación también se presenta en los embriones partenogénicos lo cual sugiere más de un origen para la fragmentación.

También se ha correlacionado la fragmentación con la pobre competencia citoplasmática y nuclear del ovocito (Fujimoto *et al.*, 2011). Sin embargo, en los embriones clonados la presencia de fragmentación se ha relacionado a los pulsos eléctricos durante la fusión celular y activación de la SCNT, los cuales desestabilizan los microfilamentos de actina promoviendo la fragmentación citoplasmática (Kawahara *et al.*, 2002; IM *et al.*, 2005). Para disminuir el daño ocasionado al citoesqueleto se emplean diferentes químicos en la técnica de clonación, tales como la citocalasina B y la demecolcina, que evitan la polimerización de los microfilamentos corticales y los microtúbulos del huso, respectivamente (Alikani *et al.*, 2005).

La presencia de blastómeros polinucleares (varios núcleos en un mismo blastómero) en los embriones fragmentados obtenidos por clonación con o sin exposición a extractos y en los embriones partenogénicos, puede indicar una mitosis anormal durante la segmentación, en la cual los cromosomas no se alinearon adecuadamente durante la metafase, quedando repartidos en múltiples núcleos (Shawn *et al.*, 2012).

Del presente trabajo de tesis, destaca que, la exposición de los fibroblastos a extractos de ovocitos homólogos, permitió mejorar la calidad del desarrollo de los embrionario clonados de *Ovis aries*, posiblemente debido a la reprogramación del fibroblasto mejoró su comunicación con el citoplasto y coordinarse durante la segmentación. Cabe señalar que dependiendo de la magnitud de la fragmentación citoplasmática, puede o no compromete la viabilidad del embrión en formación.

La clonación de embriones de mamíferos, si bien resulta relevante, al momento presenta limitaciones por resolver, que sin lugar a duda, permitirán aumentar las eficiencias relativas, que actualmente son bajas. Con todo, la clonación ha abierto un campo de conocimiento amplio en lo relativo a la reprogramación nuclear, sustancial hoy día, en las terapias celulares, en beneficio de la salud humana. Desde el nacimiento de la oveja Dolly, el conocimiento en la metodología y regulación de la clonación de embriones ha avanzado sustancialmente en los procesos de la reprogramación de células adultas hacia la totipotencialidad, pero aún falta mucho por hacer en este campo, dado los grandes beneficios que la clonación de embriones ofrece, al ser aplicada en reproducción y conservación de especies animales domésticas y silvestres.

X. Conclusiones

- Se consiguió preparar extractos de ovocitos en MII de *Ovis aries*.
- Se encontró la concentración idónea (10 UI en 250 μ L de PBS, durante 30 minutos) de estreptolisina-O para permeabilizar y posteriormente lograran resellar las membranas plasmáticas de los fibroblastos fetales de oveja.
- Se logró obtener embriones clonados de *Ovis aries* por clonación manual, los cuales alcanzaron etapas de 8 células y de mórula.
- La exposición de extractos de ovocitos en MII a fibroblastos de feto, previo a su utilización en la clonación manual, no favoreció el desarrollo de embriones clonados de *Ovis aries*; Sin embargo, si mejoró la relación entre el número de núcleos y el número de blastómeros presentes en los embriones clonados. Por lo tanto, los embriones presentaron menor grado de fragmentación citoplasmática, teniendo la posibilidad de alcanzar etapas posteriores del desarrollo embrionario.

XI. Aportaciones

En la mayoría de los estudios de embriones clonados revisados en la literatura, no se realizan tinciones de núcleos para cuantificarlos y establecer la relación entre éstos y la cantidad de blastómeros presentes en el embrión, sin embargo, se sugiere que es indispensable, dado que se requiere conocer con precisión este parámetro de calidad.

La permeabilización reversible de fibroblastos fetales de oveja (carioplastos) con estreptolisina-o debe considerar la concentración de esta, el tiempo de incubación, la cantidad de fibroblastos y el volumen en el cual estén resuspendidos. Este aspecto es importante porque es necesario que las membranas plasmáticas del carioplasto y el citoplasto estén integras para que se lleve a cabo el proceso de fusión.

XII. Perspectivas

Se desconocen aspectos importantes del desarrollo de los embriones clonados, por ejemplo, el tiempo que transcurre antes de la primera división mitótica. No se sabe si este lapso de tiempo es similar o diferente al de los embriones generados por FIV o al de embriones partenogénicos.

Los embriones clonados a partir de fibroblastos fetales de *Ovis aries* expuestos a extractos de ovocitos no mostraron una mejoría en etapas tempranas del desarrollo embrionario (8 células y mórula), sin embargo, se podría observar un efecto benéfico en etapas posteriores del desarrollo, por ejemplo, de blastocisto. Para lograr el desarrollo de embriones clonados a esta etapa, es necesario utilizar medios adecuados para el cultivo de embriones.

XIII. Bibliografía

- Abecia A., Forcada F. (2010) Manejo Reproductivo en Ganado Ovino. Editorial Servet, Zaragoza, pág. 195.
- Abidor I. G., Sowers A. E. (1992) Kinetics and mechanism of cell membrane electrofusion, *Biophysical Journal*, 61(6): 1557-1569.
- Akagi S., Matsukawa K., Takahashi S. (2014) Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle, *Journal of Reproduction and Development*, 60(5): 329-335.
- Akshey Y. S., Malakar D., De A. K., Jena M. K., Pawar S. K., Dutta R., Sahu S. (2011) Effect of roscovitine treated donor cells and different activation methods on development of handmade cloned goat (*Capra hircus*) embryos, *Theriogenology*, 75(8):1516-1524.
- Alberio R., Zakhartchenko V., Motlik J., Wolf E. (2001) Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer, *The International Journal of Developmental Biology*, 45(7): 797-809.
- Alberio R., Johnson A., Stick R., Campbell K. (2005) Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm, *Experimental Cell Research*, 307(1): 131-141.
- Alikani M. Schimmel T., Willadsen S. M. (2005) Cytoplasmic fragmentation in activated eggs occurs in the cytokinetic phase of the cell cycle, in lieu of normal cytokinesis, and in response to cytoskeletal disorder, *Molecular Human Reproduction*, 11(5): 335-344.
- Álvarez-Romero J., Medellín R. (2005). *Ovis aries* (doméstica). Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. México D. F.
- Bai H., Li Y., Gao H., Dong Y., Han P., Yu H. (2015) Histone methyltransferase SMYD3 regulates the expression of transcriptional factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development, *Cytotechnology*, DOI: 10.1007/s10616-014-9838-5

- Bó G. A., Mapletoft R. J. (2013) Evaluation and classification of bovine embryos, *Animal Reproduction*, 10(3): 344-348.
- Bui H. Wakayama S. Kishigami S. Kim J. Van Thuan N. Wakayama T. (2008) The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming, *Development*, 135(23): 3935-3945.
- Bui H., Kwon D., Kang M., Oh M., Park M., Park W., Paik S., Van Thuan N., Kim J. (2012) Epigenetic reprogramming in somatic cells induced by extracts from germinal vesicles stage pig oocytes, *Development and Stem Cells*, 139(23): 4330-4340.
- Chavez S. L., Loewke K. E., Han J., Moussavi F., Colls P., Munne S., Behr B., Reijo R. A. (2012) Dynamic blastomere behavior reflects human embryo ploidy the four-cell stage, *Nature Communications*, 3(1251): doi: 10.1038/ncomms2249
- Cockburn K. and Rossant J. (2010) Making the blastocyst: lessons from the mouse, *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4): 995-1003.
- Collas P., Taranger K. C. (2006) Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts, *Stem Cells Reviews*, 2(4): 309-317.
- Critser E. S., First N. L. (1986) Use of fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos, *Stain Technology*, 61(1): 1-5.
- Dadashpour D. N., Zare S. A., Kohram H., Zhandi M., Dashti S., Shamsi H., Moghadam R. (2014) *In vitro* ovine embryo production: the study of seasonal and oocyte recovery method effects, *Iran Red Crescent Medical Journal*, 16(9): e20749.
- Du Y., Kragh P.M., Zhang Y., Li J., Schmidt M., BØgh I. B., Zhang X., Purup S., JØrgensen A. L., Pedersen A. M., Villemoes K., Yang H., Bolund L., Vajta G. (2007) Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation, *Theriogenology*, 68(8): 1104-1110.
- Edwards J., Schrick F., McCracken M., Amstel V., Hopkins F., Welborn M., Davies C. (2003). Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer, *American Journal of Reproductive Immunology*, 50(2): 113-123.

- Eilertsen K. J., Power R. A., Harkins L. L., Misica P. (2007) Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer, *Animal Reproduction Science*, 98(1-2): 129-146.
- Ferrari J. K., Pasini D. (2013) Regulation and function of DNA and histone methylations, *Current Pharmaceutical Design*, 19(4): 719-733.
- Folch J., Cocero M.J., Chesné P., Alabart J. L., Domínguez V., Cognié Y., Roche a., Fernández-Árias a., Martí J. I., Sánchez P., Echeгойen E., Beckers J. F., Sánchez A., Vignon X. (2009) First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica*) by cloning, *Theriogenology*, 71(6): 1026-1034.
- Fujimoto V. Y., Browne R. W., Bloom M. S., Sakkas D., Alikani M. (2011) Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation, *Fertility and Sterility*, 95(4): 1197-1204.
- Gao Y., Ren J., Zhang L., Zhang Y., Wu X., Jiang H., Xu F., Yuan B., Yu X., Zhang J. (2014) The effects of demecolcine, alone or in combination with sucrose on bovine oocyte protrusion rate, MAPK1 protein level and C-Mos gene expression level, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(6): 1974-1982.
- Ganier O., Bocquet S., Peiffer I., Brochard V., Arnaud P., Puy A., Jouneau A., Feli R., Renard J. P., Méchali M. (2011) Synergic reprogramming of mammalian cells by combined exposure to mitotic *Xenopus* egg extracts and transcription factors, *Cell Biology*, 108(42): 17331-17336.
- German D. S., Campbell S. H., Thornton E., McLachlan G., Sweetman D., Alberio R. (2015) Ovine induced pluripotent stem cells are resistant to reprogramming after nuclear transfer, *Cellular Reprogramming*, 17(1): 1-9.
- Gharibi Sh., Hajian M., Ostadhosseini S., Hosseini S. M., Forouzanfar M., Nasr-Esfahani M. H. (2013) Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on nuclear maturation and *in vitro* development of ovine oocytes, *Theriogenology*, 80(4): 302-312.
- Gilbert S. F. (2010) *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 300-301.

- Golbabapour S. Abdulla M. Hajrezaei M. (2011) A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms, *International Journal of Molecular Mechanisms*, 12(12): 8661-8694.
- Gómez-Nísino A. (2006) a. Ficha técnica de *Odocoileus hemionus cerrosensis*. En: Medellín R. Los mamíferos mexicanos en riesgo de extinción según el PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. México D. F.
- Gómez-Nísino A. (2006) b. Ficha técnica de *Antilocapra americana*. En: Medellín R. Los mamíferos mexicanos en riesgo de extinción según el PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. México D. F.
- Gonzalez-Muñoz E., Arboleda-Estudillo Y., Otu H. H., Cibelli J. B. (2014) Histone chaperone ASF1A is required for maintenance of pluripotency and cellular reprogramming, *Cell Reprogramming*, 345(6198): 822-825.
- Gurdon J. B., Colman A. (1999) The future of cloning, *Nature*, 402(6763): 743-746.
- Halley-Stott R. P., Pasque V., Astrand C., Miyamoto K., Simeoni I., Jullien J., Gurdon J. B. (2010) Mammalian nuclear transplantation to germinal vesicle stage *Xenopus* oocyte- A method for quantitative transcriptional reprogramming, *Methods*, 51(1): 56-65.
- Halley-Stott R. P., Gurdon J. B. (2013) Epigenetic memory in the context of nuclear reprogramming and cancer, *Briefings in Functional Genomics*, 12(3): 163-173.
- Halley-Stott R. (2015) Nuclear reprogramming and mitosis-how does mitosis enhance changes in gene expression? *Transcription*, 6(1): 17-20.
- Hosseini S.M., Hajian M., Moulavi F., Asgari V., Forouzanfar M., Nasr-Esfahani M. H. (2013) Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled Pasteur pipette, *Cellular Reprogramming*, 15(1): 15-23.
- Hyttel P., Sinowatz F., Vejlsted M. (2010) Essentials of Domestic Animal Embryology, Saunders Elsevier, China, pp. 13-24.

- IM G.S., Yang B. S., Lai L., Hao Y., Prather R. S. (2005) Fragmentation and development of preimplantation porcine embryos derived by parthenogenetic activation and nuclear transfer, *Molecular Reproduction and Development*, 71(2): 159-165.
- Iuso D., Czernik M., Zacchini F., Ptak G., Loi P. (2013) A simple approach for oocyte enucleation in mammalian cloning, *Cellular Reprogramming*, 15(6): 490-494.
- Jena M. K., Malakar D., De A. K., Garg S., Akshey Y. S., Dutta R., Sahu S., Mohanty A.K., Kaushik J. K. (2012) Handmade cloned and parthenogenetic goat embryos – A comparison of different culture media and donor cells, *Small Ruminant Research*, 105(2012): 255-262.
- Jullien J., Pasque V., Halley-Stott R. P., Miyamoto K., Gurdon B. (2011) Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process?, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 12(7): 453-459.
- Kang H., Park J. L., Roh S. (2016) Murine somatic cell nuclear transfer using reprogramming donor cells expressing male germ cell-specific genes, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(1): 149-152.
- Kawahara M., Mori T., Tanaka H., Shimizu H. (2002) The suppression of fragmentation by stabilization of actin filament in porcine enucleated oocytes, *Theriogenology*, 58(6):1081-1095.
- Kharche D. S., Birade S. H. (2013) Parthenogenesis and activation of mammalian oocyte for *in vitro* embryo production: a review, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(2): 170-182.
- Kim M., Jang g., Oh H., Yuda F., Kim H., Hwang W., Hossein M., Kim J., Shin N., Kang s., Lee B. (2007) Endangered wolves cloned from adult somatic cells, *Cloning Stem Cells*, 9(1): 130-137.
- Kühholzer B., Prather R. (2000). Advances in livestock nuclear transfer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 224(4): 240-245.
- Lagutina I., Lazzari G., Duchi r., Colleoni S., Ponderato N., Turini P., Crotti G., Galli C. (2005) Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte

morphology, embryo reconstruction method and donor cell type, *Reproduction*, 130(4): 559-567.

- Lanza P. Cibelli J. Diaz F. Moraes C. Farin P. Farin C. Hammer C. West M. Damiani P. (2000) Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer, *Cloning*, 2(2): 79-90.
- Li J., Du Y., Zhang Y. H., Kragh P. M., Purup S., Bolund L., Yang H., Xue Q. Z., Vajta G. (2006) Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes, *Cloning Stem Cells*, 8(4): 241-250.
- Liu Y., Østrup O., Li J., Vajta G., Kragh M. P., Purup S., Callesen H. (2011) Cell colony formation induced by *Xenopus* egg extract as a marker for improvement of cloned blastocyst formation in the pig, *Cellular Reprogramming*, 13(6): 521-526.
- Loi P., Ptak G., Barboni B., Fulka J., Cappai P., Clinton M. (2001) Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells, *Nature Biotechnology*, 19(10): 962-964.
- Lopéz B. J., Quijano P. G., Suárez L. L., Roa M. N. (2007) Comparación de técnicas de disgregación mecánica, enzimática y mecano-enzimática en la extracción de poblaciones linfocitarias y macrófagos en tejidos con periodontitis crónica avanzada, *Red de Revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 26(58): 26-33.
- Long C., Westhusin M., Golding M. (2014) Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer, *Molecular Reproduction and Development* 81(2): 183-193.
- Madheshiya P. K., Sahare A. A., Jyotsana B., Singh K. P., Saini M., Raja a. K., Kaith S., Singla S. K., Chauhan M. S., Manik R. S., Palta P. (2015) Production of a cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) calf from somatic cells isolated from urine, *Cellular Reprogramming*, 17(3): 160-169.
- Meissner A., Jaenisch R. (2006) Mammalian nuclear transfer, *Developmental Dynamics*, 235(9): 2460-2469.
- Miyamoto K., Furusawa T., Ohnuki M., Goel S., Tokunaga T., Minami N., Yamada M., Ohsumi K., Imai H. (2007) Reprogramming events of mammalian

somatic cells induced by *Xenopus laevis* egg extracts, *Molecular Reproduction and Development*, 74(10): 1268-1277.

- Miyamoto K., Tsukiyama T., Yang Y., Li N., Minami N., Yamada M., Imai H. (2009) Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells, *Biology of Reproduction*, 80(5): 935-943.
- Navarro M. C., Rosado G. A., Fernando S. H. (2003-4), Técnicas de clonación de embriones, *Ciencia Veterinaria*, 9: 35-74.
- Navarro-Maldonado M.C., Hernández-Martínez S., Vázquez-Avendaño J.R., Martínez-Ibarra J.L., Zavala-Vega N. L., Vargas-Miranda B., Rivera-Rebolledo A., Ambríz-García D. A. (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*, 31(2): 275-282.
- Ni H., Sheng X., Cui X., Gu M., Liu Y., Qi X., Xing S., Guo Y. (2015) Epidermal growth factor-mediated mitogen-activated protein kinase 3/1 pathway is conducive to *in vitro* maturation of sheep oocytes, *PLoS One*, 10(3): e0120418.
- Niwa H. (2014). The pluripotency transcription factor network at work in reprogramming, *Current Opinion in Genetics & Development*, 28: 25-31.
- Ogura A., Inoue K., Wakayama T. (2012) Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer, *Philosophical Transactions of The Royal Society of London, series B, Biological Sciences*, 368(1609): 1-12.
- Pan X., Zhang Y., Guo Z., Wang F. (2014) Development of interspecies nuclear transfer embryos reconstructed with argali (*Ovis ammon*) somatic cells and sheep ooplasm, *Cell Biology International*, 38(2): 211-218.
- Paramino M-T., Izquierdo D. (2014) Current status of *in vitro* embryo production in sheep and goats, *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4): 37-48.
- Pasque V., Miyamoto k., Gurdon J. B. (2010) Efficiencies and mechanisms of nuclear reprogramming, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2010(75):189-200.
- Peserico A., Simone C. (2011) Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(2011): 1-10.

- Peters A., Schubeler D. (2005) Methylation of histones: playing memory with DNA, *Current Opinion in Cell Biology*, 17(2):230-238.
- Peura T., Vajta G. (2003) A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer, *Cloning and Stem Cells*, 5(4): 257-277.
- Phelan K., May K. M. (2016) Mammalian cell tissue culture techniques, *Current Protocols in Pharmacology*. 73: 12.1.1-12.1.23. doi: 10.1002/cpph.1.
- Ramos C., Teissié J. (2000) Electrofusion: a biophysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis, *Biochimie*, 82(5): 511-518.
- Rathbone A.J., Fisher P. A., Lee J. H., Craigon J., Campbell K. (2010) Reprogramming of ovine somatic cells with *xenopus laevis* oocyte extract prior to SCNT improves live birth rate, *Cellular Reprogramming*, 12(5):609-616.
- Robledo-Verduzco J. M., Herrera-Camacho J., Cajero-Juárez M., Navarro-Maldonado M. C., García-Valladares A. (2009) Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(2009): 95-99.
- Rodríguez-Osorio N., Urrego R., Cibelli J. B., Eilertsen K., Memili E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells, *Theriogenology*, 78(9): 1869-1886.
- Rodríguez-Pardo V. (2005) Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación, *Universitas Scientiarum*, 10(1): 5-14.
- Rodríguez-Suástegui J. L. (2012) Evaluación de desarrollo embrionario *in vitro* en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Tesis de Maestría en Biología Experimental.
- Rose D. R., Gilchrist B. R., Kelly M. J., Thompson G. J., Sutton-McDowall L. M. (2013) Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators, *Theriogenology*, 79(1): 142-148.
- Sánchez F. Smitz J. (2012) Molecular control of oogenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(12): 1896-1912.
- Sawicki W., Mystkowska E. T. (1990) *In vivo* staining of mouse preimplantation embryos with Hoechst 33342, *The Anatomical Record*, 227: 359-362.

- Selokar N. L., Shah R. A., Saha A. P., Muzaffar M., Saini M., Chauhan M. S., Manik R. S., Palta P., Singla S. K. (2012) Effect of post-fusion holding time, orientation and position of somatic cell-cytoplasts during electrofusion on the development of handmade cloned embryos in buffalo (*Bubalus bubalis*), *Theriogenology*, 78(4): 930-936.
- Senger P. L. (2005) Pathways to Pregnancy and Parturition, Current Conceptions, Washington, pp. 284-289.
- Shah A. R., George A., Singh K. M., Kumar D., Chauhan M. S., Manik R., Palta P., Singla K. S. (2008) Hand-made cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: comparison of different media and culture systems, *Cloning and Stem Cells*, 10(4): 435-442.
- Shinagawa T., Takagi T., Tsukamoto D., Tomaru C., Huynh M. L., Sivaraman P., Kumarevel T., Inoue K., Nakato R., Katou Y., Sado T., Takahashi S., Ogura A., Shirahige K., Ishii S. (2014) Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 14(2): 217-227.
- Soberano-Martínez A., Bravo-Patiño A., Olivio-Zepeda I., Toscano-Torres I., Cajero-Júarez M., Herrera-Camacho J., Navarro-Maldonado M. C., Segura-Correa J. C. (2011) Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14(2011): 301-307.
- Solter D. (2000) Mammalian cloning: advances and limitations, *Nature Reviews Genetics*, 1(3): 199-207.
- de Souza-Fabjan J. M., Panneau B., Duffard N., Locateli Y., de Figueiredo J. R., Freitas V. J., Mermillod P. (2014) *In vitro* production of small ruminant embryos: late improvements and further research, *Theriogenology*, 81(9): 1149-1162.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, 131(5): 861-872.
- Tang S., Wang Y., Zhang D., Gao Y., Ma Y., Yin B., Sun J., Liu J., Zhang Y. (2009) Reprogramming donor cells with oocyte extracts improves in vitro development of nuclear transfer embryos, *Animal Reproduction Science*, 115(1-4): 1-9.

- Teperek M., Miyamoto K. (2013) Nuclear reprogramming of sperm and somatic nuclei in eggs and oocytes, *Reproductive Medicine and Biology*, 2013(12): 133-149.
- Tian C. X., Kubota C., Enright B., Yang X. (2003) Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(98): 1-7.
- Turek-Plewa J., Jagodzinski P. P. (2005) The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression, *Cellular & molecular biology letters*, 10(4): 631-647.
- Vajta G., Peura T. T., Holm P., Páldi A., Greve T., Trounson A. O., Callesen H. (2000) New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The well of the well (WOW) system, *Molecular Reproduction and Development*, 55(3): 256-264.
- Vajta G., Lewis I., Hyttel P., Thouas G., Trounson A. (2001) Somatic cell cloning without micromanipulators, *Cloning*, 3(2): 89-95.
- Vajta G., Lewis I. M., Tercirlioglu R. T. (2006) Handmade somatic cell cloning in cattle, *Methods in Molecular Biology*, 348: 187-195.
- Vajta G. (2007) Handmade cloning: the future way of nuclear transfer?, *Trends in Biotechnology*, 25(6): 250-253.
- Valiollahpoor A. M., Deldar A., Ansari P. Z. (2015) Impact of supplementary royal jelly on *in vitro* maturation of sheep oocytes: genes involved in apoptosis and embryonic development, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62(1): 31-38.
- Van Oevelen C., Kallin E. M., Graf T. (2013). Transcription factor-induced enhancer modulations during cell fate conversions, *Current Opinion in Genetics & Development*, 23: 562-567.
- Verma G., Arora J. S., Sethi R. S., Mukhopadhyay C. S., Verma R. (2105) Handmade cloning: recent advances, potential and pitfalls, *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6:43, doi: 10.1186/s40104-015-0043-y.
- Walev I., Bhakdi S. C., Hofmann F., Djonder N., Valeva A., Aktories K., Bhakdi S. (2001) Delivery of proteins into living cells by reversible membrane

permeabilization with streptolysin-O, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6): 3185-3190.

- Wang L., Lin J., Huang J., Wang J., Zhao Y., Chen T. (2012) Selection of ovine oocytes by brilliant cresyl blue staining, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(2012): 161372.
- Wang L., Jiang H., Su L., Tang B., Li D., Li Z. (2009) Effects of colchicine or demecolcine on cytoplasmic protrusions and assisted enucleation of golden hamster oocyte, *Cell Biology International*, 33(12): 1274-1279.
- Ward F. A., Lonergan P., Enright B. P., Boland M. P. (2000) Factor affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology, *Theriogenology*, 54(3): 433-446.
- Wen-Ting G., Xi-Wen W., Yangming W. (2014) Micro-management of pluripotent stem cells, *Protein Cell*, 5(1): 36-47.
- Westhusin M. E., Levanducki M. J., Scarborough R., Looney C R., Bondioli K. R. (1992) Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows, *Journal of Reproduction & Fertility*, 95: 475-480.
- Willadsen S. M. (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos, *Nature*, 320(6057): 63-65.
- Williams J. C. (2002) Signaling mechanism of mammalian oocyte activation, *Human Reproduction Update*, 8(4): 313-321.
- Wolf P. D., Mitalipov S., Norgren B. R. (2001) Nuclear transfer technology in mammalian cloning, *Archives of Medical Research*, 32(6): 609-613.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, Conservación Internacional, Universidad del Estado de Arizona, Universidad A&M Texas, Universidad de Roma, Universidad de Virginia, Sociedad Zoológica de Londres. (2008). An analysis of mammals on the 2008 IUCN Red list <www.iucnredlist.org/mammals> Visitado el 22 de enero de 2013.
- Xiong X.R., Lan D. L., Li J., Zi X. D., Ma L., Wang Y. (2014) Cellular reprogramming facilitates nuclear reprogramming by altering DNA methylation and pluripotency gene expression, *Cellular Reprogramming*, 16(3): 215-222.

- Xie B., Wang J., Liu S., Wang J., Xue B., Li J., Wei R., Zhao Y., Liu Z. (2014) Positive correlation between the efficiency of induced pluripotent stem cells and the development rate on nuclear transfer embryos when the same porcine embryonic fibroblast lines are used as donor cells, *Cellular Reprogramming*, 16(3):206-214.
- Xiong X.R., Li J., Fu M., Gao C., Wang Y., Zhong J. C. (2013) Oocyte extract improves epigenetic reprogramming of yak fibroblast cells cloned embryo development, *Theriogenology*, 79(3): 462-469.
- Yin J. X., Tani T., Yonemura I., Kawakami M., Miyamoto K., Hasegawa R., Kato Y., Tsunoda Y. (2002) Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes, *Biology of Reproduction*, 67(2): 442-446.
- Yin Y., Mei M., Zhang D., Fan A., Zhou H., Li Z. (2014) The construction of cloned sika deer embryos (*Cervus Nippon hortulorum*) by demecolcine auxiliary enucleation, *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1): 164-169.
- Young L., Sinclair K., Wilmut I. (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep, *Reviews of Reproduction*, 3(3):155-163.
- Yu H. H., Guo Z. L., Guo S. C., Qi D. L., Yang X. L., Yue P. P., Cao H., Xie L., Zhao X. Q. (2011) Interspecies embryo reconstruction in Tibetan antelope *Pantholops hodgsonii* by handmade cloning, *African Journal of Biotechnology*, 10(12): 2360-2365.
- Zarza-Villanueva, H. (2006) Ficha técnica de *Ovis canadensis*. En: Medellín, R. Los mamíferos mexicanos en riesgo de extinción según el PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. México D. F.
- Zhang P., Liu P., Dou H., Chen L., Chen L., Lin I., Tan P., Vajta G., Gao J., Du Y., Ma R. Z. (2013) Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids, *Public Library of Science*, 8(2): e55941.
- Zhao J. Whyte J., Prather S. R. (2010) Effect of epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer, *Cell and Tissue Research*, 341(1): 13-21.

- Zhao Q., Zheng G., Piao S., Wang C., An T. (2015) Discovery of porcine maternal factors related nuclear reprogramming and early embryo development by proteomic analysis, *Proteome Science*, 13:18, doi: 10.1186/s12953-015-0074-5.

XIV. Anexos

Medio TCM-199 para MIV

<i>Componente</i>	<i>Concentración g/L</i>
Sales inorgánicas	
NaCl	6.80
KCL	0.4
NaH ₂ PO ₄	0.122
CaCl ₂ .H ₂ O	0.265
MgSO ₄ (anhidro)	0.09770
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.00072
NaHCO ₃	2.2
Aminoácidos	
L-Arginina.HCl	0.07
DL-Alanina	0.05
DL-Ácido Aspártico	0.06
L-Cisteina.HCl.H ₂ O	0.0001
L-Cistina.2HCl	0.02608
DL-Ácido Glutámico	1.034
L-Glutamina	0.10
Glicina	0.05
L-Histidina.HCl.H ₂ O	0.02188
OH-L-Prolina	0.01
DL-Isoleucina	0.04
DL-Leucina	0.12
L-Lisina.HCl	0.07
DL-Metionina	0.03
DL-Fenilalanina	0.05
L-Prolina	0.04
DL-Serina	0.05
DL-Treonina	0.06
DL-Triptofano	0.02
L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	0.05766
DL-Valina	0.05

Componentes del medio TCM-199 proporcionado por in vitro S.A. de S.V.

<i>Componente</i>	<i>Concentración g/L</i>
Vitaminas	
Ácido p-aminobenzoico	0.00005
Ácido Ascórbico	0.00005
Biotina	0.00001
Pantotenato de Calcio	0.00001
Ácido fólico	0.00001
Myo-inositol	0.00005
Niacinamida	0.000026
Ácido Nicotínico	0.000026
Piridoxal.HCl	0.000026
Piridoxina.HCl	0.000026
Riboflavina	0.00001
Tiamina.HCl	0.00001
α-Tocoferol	0.00001
Calciferol	0.0001
Menadiona	0.000016
Cloruro de colina	0.0005
Vitamina-A	0.00014
Otros	
Sulfato de adenina	0.01
ATP.2Na	0.001
AMP	0.0002
Colesterol	0.0002
Guanina.HCl	0.0003
2-Desoxirribosa	0.0005
Glutación reducido	0.00005
Hipoxantina	0.0003
D-Ribosa	0.0005
Timina	0.0003
Uracilo	0.0003
Xantina	0.0003
Acetato de sodio	0.05
Tween 80	0.02
Glucosa	1.0
Rojo de fenol.Na	0.0213

Componentes del medio TCM-199 proporcionado por in vitro S.A. de S.V.

Medio TCM-199 con HEPES para punción folicular

<i>Componente</i>	<i>Concentración g/L</i>
Sales inorgánicas	
NaCl	6.80
KCL	0.4
NaH ₂ PO ₄	0.122
CaCl ₂ .H ₂ O	0.265
MgSO ₄ (anhidro)	0.09770
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.00072
NaHCO ₃	2.2
HEPES	5.9575
Aminoácidos	
L-Arginina.HCl	0.07
DL-Alanina	0.05
DL-Ácido Aspártico	0.06
L-Cisteina.HCl.H ₂ O	0.0001
L-Cistina.2HCl	0.02608
DL-Ácido Glutámico	1.034
L-Glutamina	0.10
Glicina	0.05
L-Histidina.HCl.H ₂ O	0.02188
OH-L-Prolina	0.01
DL-Isoleucina	0.04
DL-Leucina	0.12
L-Lisina.HCl	0.07
DL-Metionina	0.03
DL-Fenilalanina	0.05
L-Prolina	0.04
DL-Serina	0.05
DL-Treonina	0.06
DL-Triptofano	0.02
L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	0.05766
DL-Valina	0.05

Componentes del medio TCM-199 proporcionado por in vitro S.A. de S.V.

<i>Componente</i>	<i>Concentración g/L</i>
Vitaminas	
Ácido p-aminobenzoico	0.00005
Ácido Ascórbico	0.00005
Biotina	0.00001
Pantotenato de Calcio	0.00001
Ácido fólico	0.00001
Myo-inositol	0.00005
Niacinamida	0.000026
Ácido Nicotínico	0.000026
Piridoxal.HCl	0.000026
Piridoxina.HCl	0.000026
Riboflavina	0.00001
Tiamina.HCl	0.00001
α-Tocoferol	0.00001
Calciferol	0.0001
Menadiona	0.000016
Cloruro de colina	0.0005
Vitamina-A	0.00014
Otros	
Sulfato de adenina	0.01
ATP.2Na	0.001
AMP	0.0002
Colesterol	0.0002
Guanina.HCl	0.0003
2-Desoxirribosa	0.0005
Glutación reducido	0.00005
Hipoxantina	0.0003
D-Ribosa	0.0005
Timina	0.0003
Uracilo	0.0003
Xantina	0.0003
Acetato de sodio	0.05
Tween 80	0.02
Glucosa	1.0
Rojo de fenol.Na	0.0213

Componentes del medio TCM-199 proporcionado por in vitro S.A. de S.V.

Medio Eagle Modificado por Dulbecco

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Sales inorgánicas	
NaCl	4.4
KCL	0.4
MgSO ₄ (anhidro)	0.0977
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.265
Na ₂ HPO ₄	0.1084
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.0001
Glucosa	1.0
Aminoácidos	
L-Arginina.HCl	0.084
L-Cistina.2HCl	0.0626
Glicina	0.03
L-Glutamina	0.584
L-Histidina.HCl.H ₂ O	0.042
L-Isoleucina	0.105
L-Leucina	0.105
L-Lisina.HCl	0.146
L-Metionina	0.03
L-Fenilalanina	0.066
L-Serina	0.042
L-Treonina	0.095
L-Triptofano	0.016
L-Tirosina.2Na.H ₂ O	0.1038
L-Valina	0.094
Vitaminas	
Pantotenato de calcio	0.004
Ácido fólico	0.004
Myo-inositol	0.0072
Nicotinamida	0.004
Piridoxina.HCl	0.004
Riboflavina	0.004
Tiamina.HCl	0.004
Cloruro de colina	0.004

<i>Componente</i>	<i>g/L</i>
Otros	
Piruvato de sodio	0.11
Rojo de fenol	0.0159

Componentes del medio TCM-199 proporcionado por in vitro S.A. de S.V.

Medio Synthetic Oviductal Fluid 1

<i>Componente</i>	<i>Cantidad g/100 mL</i>
NaCl	0.5826
KCl	0.0534
KH ₂ PO ₄	0.0162
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.01
DL-Lactato Na	0.037
NaHCO ₃	0.21
Piruvato de Sodio	0.0036
L-Glutamina	0.0146
Glucosa	0.0270
CaCl ₂	0.025
Albumina Bovina	0.8
EDTA.2Na	0.0186
Taurina	0.0012
Solución de Aminoácidos no esenciales (100X) para MEM	3 mL
Solución de Aminoácidos esenciales (50X) para BME	6 mL

Componentes del medio SOF-1 proporcionado por in vitro S.A. de S.V.

Medio para congelación de células con DMSO

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
Medio mínimo esencial (1X)	75 mL
Bicarbonato de sodio 4.4% gasificado	2.5 mL
Suero fetal bovino	15 mL
Dimetil sulfoxido	7 mL
Gentamicina 10 µg/ml	0.5mL

Componentes del medio para congelación de células con DMSO para 100 mL de medio, proporcionado por in vitro S.A. de S.V.