
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

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

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE EMBRIONES CLONES DE
Ovis canadensis mexicana”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

P R E S E N T A

BIÓL. SARAHÍ HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTORES

DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO
DR. JOSÉ ERNESTO HERNÁNDEZ PICHARDO

ASESOR INTERNO

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA

CIUDAD DE MÉXICO a 06 de noviembre del 2017

COMITÉ DE TUTORES

Co-directores

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

carmennavarro2006@yahoo.com.mx

Dr. José Ernesto Hernández Pichardo

Departamento de Producción Agrícola y Animal

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

mvzjehp@yahoo.com.mx

Asesor interno

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

deme@xanum.uam.mx

JURADO DE EXAMEN

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
bet@xanum.uam.mx

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
deme@xanum.uam.mx

Dra. Irma Jiménez Morales

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
jimi@xanum.uam.mx

Dr. Alfredo Trejo Córdova

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
atrejo109@hotmail.com

“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 institución, que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACyT con número de registro 003797”

Número de CVU 717616 y becario otorgado por CONACyT: 592794.

Los miembros del Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada:

"Evaluación de la calidad de embriones clones de *Ovis canadensis mexicana*"
que presentó:

Biól. Sarahí Hernández Martínez

El día lunes 06 de noviembre del 2017.

Sinodales:

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
PRESIDENTE



DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA
SECRETARIO



DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES
VOCAL



DR. ALFREDO TREJO CÓRDOVA
VOCAL



AGRADECIMIENTOS

- A Dios:** Por la vida, fortaleza, salud e inteligencia. Gracias por permitirme llegar hasta aquí y contemplar tus maravillas a través de la ciencia.
- A mis padres Cristina y Nazario,** por su amor, paciencia, desvelos, consejos y apoyo durante toda mi vida. Los amo y admiro, nunca terminaré de agradecerles.
- A mis hermanos Hugo Alan y Dulce María,** por motivarme a ser un ejemplo para ustedes, son mis mejores cómplices, los amo.
- A mis familiares,** por las enseñanzas, risas y apoyo en cada paso de mi vida.
- A mis amigas Maritza y Sandra,** quienes han colorearon mis días grises con su apoyo incondicional. Gracias por llevarme de la mano y enseñarme lo que es la amistad, las amo.
- A mis compañeros y amigos de laboratorio Roberto, Adriana, Enrique, Salvador, Gabriela y Samara,** por los gratos momentos, las risas y el apoyo que nos hemos dedicado para enfrentar los desafíos de los experimentos científicos, así como aquellos que nos han permitido construir esta sólida amistad. Esto es para ti querido amigo.
- A mis compañeros y amigos de la Maestría Tania, Pablo, Jaqueline, Sergio y Arturo,** quienes mediante su inteligencia y personalidad me mostraron el éxito que tienen las personas cuando trabajan en equipo dentro y fuera del aula de clases. Los quiero y admiro amigos.
- A la Dra. María del Carmen Navarro Maldonado,** por su amistad y por permitir adueñarme un poco de su sueño de investigación. Ha sido mi más grande ejemplo a seguir en la preservación de la fauna silvestre mexicana.
- Al Dr. José Ernesto Hernández Pichardo,** por su amistad, disciplina, guía y enseñanzas en la realización de esta investigación. Así también extendo el agradecimiento a su esposa **Lupita** quien mediante sus palabras evitó que me rindiera ante los obstáculos que se presentaron día con día.
- Al Dr. Demetrio Alonso Ambríz García,** por su apoyo incondicional y guía. Un claro ejemplo de que la disciplina no esta peleada con la diversión y la amistad.
- Al Dr. Miguel Ángel Armella y la Dra. Lulú Yañez,** por ser como unos padres académicos para mi, por aconsejarme y guiarme en cada momento de mi vida, desde que Dios cruzó nuestros caminos. Gracias los quiero.

A mi jurado el Dr. José Miguel Betancourt R., la Dra. Irma Jiménez M., el Dr. Alfredo Trejo C. Por las observaciones y críticas realizadas en favor del mejoramiento de mi trabajo.

Al M. en B. E. José Luis Rodríguez Suástegui, por su amistad, consejos y guía para el desarrollo metodológico de esta tesis.

Al Dr. Raymundo Rangel Santos, por haberme proporcionado el Manual de la Sociedad de Transferencia de Embriones (IETS), cuya utilidad fue invaluable para el desarrollo de esta tesis.

Al PhD. Reuben J. Mapletoft, por proporcionarme el material bibliográfico necesario para implementar los criterios la evaluación de embriones de la IETS en el laboratorio.

A la Dra. Alejandra Serrato, por las facilidades proporcionadas en el almacenamiento de material biológico en el Laboratorio de Biología Molecular.

Al Dr. Arturo Salame Méndez, por todas las aportaciones, sugerencias y enseñanzas en la temática de esta tesis.

Al Sr. Luis Alberto Guarneros, por facilitar el material biológico para la realización del presente trabajo.

Al Laboratorio de Reproducción Animal Asistida (S-234) de UAM-I, el cual, mediante su infraestructura y grupo de investigación, forjó mis primeros pasos como investigadora.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por mantener siempre en el tiempo sus puertas abiertas hacia mi.

FINALMENTE AGRADEZCO

A los ejemplares utilizados en esta investigación, las borregas domésticas y el borrego cimarrón, el cual mediante esta técnica persistirá en tiempo y espacio en el planeta.

Son ustedes y los animales de bioterio, los más extraordinarios seres creados por Dios, tienen mi mayor respeto y amor, gracias por existir.

DEDICATORIA

A mi amada familia

Abuelos[†], padres, tios, primos y sobrinos, quienes por causas ajenas no tuvieron la posibilidad de estudiar. No obstante, conservaron el entusiasmo de seguir aprendiendo, de generar conocimiento y mostrarme lo que es un verdadero científico de la vida. Deseo que este trabajo, que hoy les dedico con mucho cariño, sea considerado como un fruto de ustedes y para ustedes.

Gracias por heredarme la semilla de su sabiduría.

*“Va a haber un momento,
en el que al ovocito le quitaremos
el núcleo y le pondremos otro
para generar un organismo”*
Hans Spemann, 1936

RESUMEN.

Las biotecnologías reproductivas han generado avances en la producción de embriones *in vitro*, sin embargo, aún no se han logrado las eficiencias observadas en el proceso *in vivo*; para su éxito, la evaluación y selección de los embriones han sido consideradas. Éstas consisten en identificar los embriones de mejor calidad con altas probabilidades de iniciar una gestación y una cría nacida viva. En este estudio se evaluaron los embriones clones de un borrego cimarrón macho adulto (*Ovis canadensis mexicana*), implementando los criterios internacionales de evaluación morfológica embrionaria. Los criterios evaluados fueron: tasa de segmentación, donde el grupo experimental (embriones clones de *O. c. mexicana*) no difirió del grupo control (embriones partenogenéticos de *Ovis aries*) ($P>0.05$) y los datos fueron similares a los reportados en la literatura. La tasa de formación de blastocistos fue de 14.2% para embriones clones y 19.6% para embriones partenogenéticos ($P>0.05$). La fragmentación embrionaria tipo IV, fue superior y significativa en el grupo experimental ($P<0.05$). Mediante la evaluación del estadio embrionario se demostró que, a las 24 horas de cultivo, se pueden identificar aquellos embriones que realizaron al menos una división celular y fue posible determinar los embriones fragmentados. A las 96 horas se detectó la mayor proporción de mórulas (clones 33% y partenogenéticos 35%). A las 192 horas se observaron los estadios finales del desarrollo embrionario: no segmentados, fragmentados, blastocistos y la tasa de bloqueo del desarrollo. Otro criterio evaluado fue la morfología, la cual tiene relación inversa con el tiempo de cultivo *in vitro*, ya que la calidad morfológica embrionaria disminuye a través de este. Por lo que se determinó que las 96 horas de cultivo, es el mejor tiempo para predecir la calidad final de un embrión. La tinción de mórulas indicó que la «calidad 1» («Excelente») posee el porcentaje más elevado de blastómeros normales en ambos grupos (clones 79.7% y partenogenéticos 82.1%). La fragmentación en mórulas mostró 3.3% en clones clasificados como «calidad 1» y 14.4% en embriones partenogenéticos «calidad 2» («Buena») (esto es el porcentaje tolerable de fragmentación en un embrión). La viabilidad embrionaria evaluada en mórulas y blastocistos mostró que, a mejor calidad morfológica aumenta la proporción de blastómeros viables, siendo los embriones de calidad 1 y 2 de cada grupo, candidatos a transferencia. La viabilidad del cohorte de embriones clones fue

de 53.8% para mórulas y 83.3% para blastocistos (tomando en cuenta $\geq 75\%$ de blastómeros viables), con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (mórulas 80%, blastocistos 84.6%) ($P < 0.05$). Según esta investigación, los criterios internacionales de evaluación morfológica embrionaria de la IETS permitieron describir la dinámica, estadio y calidad de los embriones clones de *Ovis canadensis mexicana* con alto grado de confiabilidad. Además, se identificó las tasas de anomalías del desarrollo embrionario en los sistemas de cultivo *in vitro*. Finalmente, se determinó que las mórulas y blastocistos clones de *Ovis canadensis mexicana* calidad 1 («Excelente») y 2 («Buena»), son candidatos de transferencia embrionaria.

ABSTRACT.

Reproductive biotechnologies allow significant advances in embryo *in vitro* production, however, efficiencies still have not been observed on *in vivo* processes. For its success, evaluation and selection of embryos is considered. This consists in identify the best quality embryos that have high odds of generating a pregnancy and a newborn alive. This study was conducted to evaluate bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) cloned embryos from an adult male, by the implementation of the international embryo morphological evaluation criteria. The criteria assessed were: rate of segmentation, where experimental group (*O. c. mexicana* cloned embryos) results did not differ from those of the control group (*Ovis aries* parthenogenetic embryos) ($P>0.05$) and data were similar to that reported in literature. Blastocyst rate was 14.2% for cloned embryos and 19.6% for parthenogenetic embryos ($P>0.05$). Embryo fragmentation type IV, was higher and significant in the experimental group ($P<0.05$). The evaluation of embryo development stages proved that embryos that conducted at least one cell division can be identified at 24 hours of culture, making possible to determine the fragmented embryos. At 96 hours culture the highest proportion of morula was detected (clones 33% vs. parthenogenetic 35%). At 192 hours the final embryo development stages observed were: non-segmented, fragmented, blastocysts and blocking development rate. Other evaluated criterion was the embryo morphology which had an inverse relationship with the *in vitro* culture period, since morphological embryo quality decreased through time. So, it was determined that 96 hours of culture is the best time to predict the final quality of an embryo. Staining in morula showed that quality 1 embryos have the highest percentage of normal blastomeres in both groups (clones 79.7% vs. parthenogenetic 82.1%). Morula fragmentation showed 3.3% clones classified as quality 1 («Excellent») and 14.4% parthenogenetic embryos classified as quality 2 («Good») (this is a tolerable percentage of fragmentation in an embryo). Embryo viability in morula and blastocysts showed that the better morphological quality, the proportion of viable blastomers increases, being quality 1 and 2 embryos candidates for transfer. Viability of the cohort of cloned embryos was 53.8% morula and 83.3% blastocysts (taking into account $\geq 75\%$ of viable blastomers), with statistically significant differences from the control group (morula 80%, blastocysts 84.6%) ($P<0.05$).

According to this study, the international embryo morphological evaluation criteria of IETS allowed to evaluate dynamics, stage and quality of *Ovis canadensis mexicana* cloned embryos with a high degree of reliability. They allow identifying rates of abnormal embryo development on *in vitro* culture systems. Finally, morula and blastocyst cloned embryos from *Ovis canadensis mexicana* quality 1 («Excellent») and 2 («Good»), are candidates for embryo transfer.

ÍNDICE

RESUMEN.	x
ABSTRACT.	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.	xvi
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. MARCO TEÓRICO.	2
1. Biotecnologías reproductivas.	2
2. Transferencia nuclear de células somáticas.	2
3. Clonación manual como una biotecnología de vanguardia.	3
4. Aplicación de la clonación manual en especies domésticas.	4
5. Aplicación de la clonación manual en especies silvestres.	5
6. Aplicación de biotecnologías reproductivas en la especie en riesgo <i>Ovis canadensis mexicana</i>	5
7. Alcances y limitaciones de la clonación manual.	8
8. Desarrollo embrionario temprano.	8
III. ANTECEDENTES.	10
1. Evaluación de la calidad de embriones producidos <i>in vitro</i>	10
2. Evaluación de la calidad en embriones clones.	10
3. Alteraciones embrionarias tempranas <i>in vitro</i>	11
4. Fragmentación embrionaria.	11
5. Multinucleación blastomérica.	12
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	14
V. JUSTIFICACIÓN.	15
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	16
II. HIPÓTESIS.	17
VIII. OBJETIVOS.	18
1. Objetivo General.	18
2. Objetivos Particulares.	18
IX. DISEÑO EXPERIMENTAL.	19
X. MATERIALES Y MÉTODOS.	20
1. Bioética animal.	20
2. Colecta de tejido de piel de oreja de <i>O. c. mexicana</i>	20
3. Deriva de fibroblastos de piel de <i>O. c. mexicana</i> en cultivo primario.	21

4. Pasaje celular de fibroblastos de piel de <i>O. c. mexicana</i>	22
5. Criopreservación y descongelación de fibroblastos de <i>O. c. mexicana</i>	22
6. Obtención y maduración <i>in vitro</i> de ovocitos de <i>O. aries</i>	23
6.1. Obtención y selección de Complejos Ovocito Cúmulo.....	23
6.2. Denudación de los Complejos Ovocito Cúmulo	24
7. Clonación manual interespecífica	24
7.1. Preparación de citoplastos de <i>O. aries</i>	24
7.2. Formación y fusión del triplete cario-citoplastos.....	25
8. Preparación del grupo control: ovocitos partenogenéticos	27
9. Activación de tripletes reconstruidos y ovocitos partenogenéticos.....	27
10. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones en sistema WOW	27
11. Determinación de la Calidad Embrionaria	28
11.1. Evaluación de la tasa de segmentación y del estadio de desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	28
11.2. Evaluación de la morfología embrionaria	28
11.3. Evaluación de la fragmentación embrionaria	30
11.4. Evaluación de la viabilidad embrionaria y conteo nuclear.....	30
XI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
XII. RESULTADOS	34
1. Deriva de fibroblastos de <i>O. c. mexicana post mortem</i>	34
2. Obtención y maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	35
3. Producción y evaluación de embriones	36
3.1. Obtención de citoplastos de <i>O. aries</i> para clonación manual.....	36
3.2. Producción de embriones, segmentación y fragmentación	37
3.3. Estadio embrionario.....	38
3.4. Morfología embrionaria	39
3.5. Viabilidad y conteo nuclear	42
XIII. DISCUSIÓN.....	50
XIV. CONCLUSIONES.....	70
XV. PERSPECTIVAS	71
XVI. BIBLIOGRAFÍA.....	72
XVII. ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICOS.....	88
XVIII. ANEXOS	89

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

CITES.	Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres.
CDMX.	Ciudad de México.
COC.	Complejo Cúmulo Ovocito.
CONABIO.	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
CONANP.	Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.
CP.	Cuerpo Polar.
DEIV.	Desarrollo Embrionario <i>in vitro</i> .
DGZVS.	Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre, de la SEDEMA en la CDMX.
DMEM.	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco.
DMSO.	Dimetil Sulfoxido.
DPBS.	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos de Dulbecco.
EGF.	Factor de Crecimiento Epidermal.
ERO.	Especies Reactivas de Oxígeno.
GC.	Grupo Control.
GE.	Grupo Experimental.
FIV.	Fertilización <i>in vitro</i> .
GnRH.	Hormona Liberadora de Gonadotropinas.
FSH.	Hormona Folículo Estimulante.
hCG.	Hormona Coriónica Humana.
IA.	Inseminación Artificial.
ICSI.	Inyección Intracitoplasmática del Espermatozoide.
IETS.	Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

IUCN.	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.
MCI.	Masa Celular Interna.
MIV.	Maduración <i>in vitro</i> .
NOM-059.	Norma Oficial Mexicana-059.
PEIV.	Producción de Embriones <i>in vitro</i> .
PHA.	Fitohemaglutinina.
PVA.	Alcohol Polivinílico.
SEDEMA.	Secretaría de Medio Ambiente.
SEMARNAT.	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
SFB.	Suero Fetal Bovino.
SOF.	Fluido Oviductal Sintético.
TCM-199.	Medio de Cultivo de Tejidos 199.
TNCE.	Transferencia Nuclear de Células Embrionarias.
TNCS.	Transferencia Nuclear de Células Somáticas.
T2.	Medio de Cultivo de Tejidos 199 con 2% de Suero Fetal Bovino.
T10.	Medio de Cultivo de Tejidos 199 con 10% de Suero Fetal Bovino.
T20.	Medio de Cultivo de Tejidos 199 con 20% de Suero Fetal Bovino.
UMA.	Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre.
WOW.	Pozo sobre pozo.
ZP.	Zona Pelúcida.
6-DMAP.	6-Dimetilaminopurina.

I. INTRODUCCIÓN.

En las últimas décadas se han logrado avances significativos en el desarrollo de técnicas de reproducción asistida para generar embriones *in vitro*, por lo que a partir de procedimientos básicos como la maduración ovocitaria, la capacitación espermática, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano, se ha contribuido al progreso de biotecnologías más especializadas como la clonación y la transgénesis animal (Ferré y Cattaneo, 2013).

La clonación o Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS) es una biotecnología en la que se produce un individuo fenotípicamente idéntico a un progenitor. Desde el nacimiento de la oveja Dolly, en 1997, se han publicado una serie de estudios sobre mamíferos clonados, sin embargo, a pesar de considerarse una biotecnología en potencia, aún no se valora de exitosa aplicación. En vista de ello, los investigadores han buscado mejorarla, aplicando procedimientos que optimicen sus etapas, centrándose, principalmente, en el desarrollo embrionario *in vitro* (DEIV), el cual es un proceso de estudio clave en diferentes técnicas de reproducción asistida (Ao *et al.*, 2016).

El DEIV es un proceso artificial que recrea lo que ocurre en la naturaleza, por lo que la calidad y viabilidad de estos embriones es, inclusive, más baja que los producidos *in vivo*. En consecuencia, la evaluación embrionaria es de gran importancia para el éxito de las técnicas de laboratorio. Algunos de los métodos para llevarla a cabo son la clasificación morfológica, seguimiento de la dinámica del desarrollo, simetría de escisión, diagnóstico genético preimplantacional, medición de la tasa metabólica, birrefringencia de la zona pelúcida (ZP), etc. Las cuales plantean alternativas para aumentar la eficiencia del DEIV en técnicas de reproducción asistida como la TNCS (Rocha *et al.*, 2016).

II. MARCO TEÓRICO.

1. Biotecnologías reproductivas.

Son un conjunto de técnicas encaminadas a aumentar la eficiencia reproductiva en humanos y animales. En otras palabras, son herramientas útiles que permiten aplicar otras técnicas más modernas, como la transgénesis (Ugalde, 2014).

Según Thibier (1990), hasta hoy se contemplan cinco generaciones de biotecnologías: 1) inseminación artificial; 2) control hormonal, transferencia y congelación de embriones; 3) sexado de espermatozoides y embriones y Fertilización *in vitro* (FIV); 4) TNCS e Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI); 5) transgénesis. De tal manera que, mediante el conocimiento de los modelos naturales, se han logrado desarrollar técnicas a lo largo del tiempo que garantizan el manejo de células, gametos o genes a favor de la reproducción de los animales.

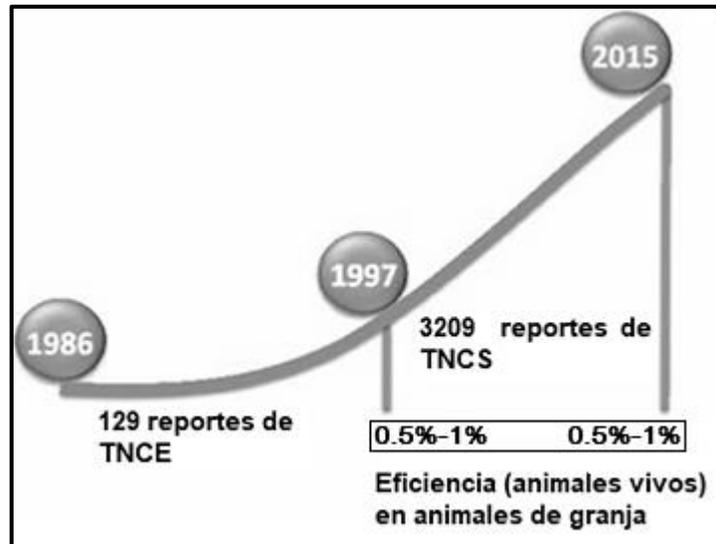
2. Transferencia nuclear de células somáticas.

La clonación por TNCS desarrollada en la cuarta generación, permite obtener embriones-clones (individuos genéticamente similares a otros organismos) a partir de células somáticas de animales domésticos y/o silvestres, con fines de conservación (Navarro *et al.*, 2003, 2004). El primer reporte del nacimiento de una cría viva de un mamífero obtenida por TNCS, utilizando una célula somática adulta, fue la oveja Dolly (en 1997), con la que se logró consolidar la técnica de clonación. Sin embargo, a partir de la publicación de 3209 reportes desde ese año hasta el 2015, aún no se ha mejorado su eficiencia en animales domésticos (Figura 1), por esta razón, se ha apostado por implementar diferentes técnicas para resolver algunos de los problemas en la producción de embriones de esta biotecnología (Loi *et al.*, 2016).

Para lograr clonar un individuo por TNCS es necesario obtener células donadoras de la información genética. Los fibroblastos son los comúnmente utilizados, debido a que son fácilmente obtenidos y proliferan en cultivo. Estas células son introducidas en un ovocito que ha sido previamente enucleado física o químicamente. El complejo celular formado, es fusionado mediante corriente eléctrica y luego sometido a un estímulo físico-químico para iniciar el desarrollo embrionario. Los factores presentes

en el ovocito son los encargados de inducir una serie de cambios en la regulación de la expresión de genes, los cuales inciden en la morfología y funcionalidad del fibroblasto, tales modificaciones son conocidas como reprogramación nuclear, que es la responsable de darle nueva información a la célula, desarrollando su capacidad para iniciar la segmentación y generar un organismo completo (Bosch, 2005).

Figura 1. Eficiencia de la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS).



Fuente: Loi *et al.* (2016)

TNCE¹: Transferencia Nuclear de Células Embrionarias.
TNCS: Transferencia Nuclear de Células Somáticas.

3. Clonación manual como una biotecnología de vanguardia.

En la actualidad, han sido descritos dos métodos para realizar la transferencia nuclear: el método convencional y la clonación manual (*handmade cloning*). La clonación convencional consiste en teñir e identificar la placa metafásica de un ovocito mediante luz ultravioleta, para retirarla posteriormente con pipetas de micromanipulación, sin eliminar la ZP. En el ovocito enucleado, ya sea en su citoplasma o en el espacio perivitelino, es inyectada la célula somática. Este complejo es fusionado y activado químicamente, para que, durante el tiempo de

¹ Primer método de clonación utilizando células embrionarias como donadoras de información genética. Willadsen, en 1986, reportó el nacimiento de un cordero vivo, fusionando un ovocito en metafase II enucleado con un blastómero de un embrión de oveja en estadio de 8 a 16 células.

cultivo, se lleve a cabo el desarrollo embrionario del clon (Meissner y Jaenisch, 2006).

En tanto, la clonación manual es una técnica que prescinde tanto del uso de micromanipuladores como de equipo de alto costo, en contraste con la clonación convencional (Vajta *et al.*, 2001).

Para producir un embrión por clonación manual, los ovocitos son desprovistos de la zona pelúcida y enucleados utilizando una micronavaja. Durante este procedimiento, dos ovocitos enucleados (citoplastos) son unidos a una célula somática (carioplasto), formando así el complejo cario-citoplastos (tripleto). Éste tripleto es fusionado por medio de corriente eléctrica para ser activado químicamente y dar inicio al desarrollo embrionario (Costa-Borges *et al.*, 2006). Con el propósito de mantener la integridad blastomérica de los embriones (libres de zona pelúcida), durante el tiempo de cultivo *in vitro*, se requiere el apoyo del sistema WOW (*Well On the Well*) o «pozo sobre pozo», que consiste en elaborar microceldas al interior de una caja de cultivo, produciendo un espacio individual para cada embrión (Vajta *et al.*, 2001). Los embriones generados por esta técnica pueden ser criopreservados en un banco de germoplasma o transferidos a una hembra receptora para la obtención de crías.

4. Aplicación de la clonación manual en especies domésticas.

La TNCS por clonación manual ha permitido producir embriones y crías de diferentes especies. Entre los mamíferos domésticos clonados por esta técnica encontramos: embriones en etapa de blastocisto (Vajta *et al.*, 2001; Malenko *et al.*, 2006; Chacón *et al.*, 2009; Selokar *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2017) y crías vivas (Vajta *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2009; Selokar *et al.*, 2014) de bovino, blastocisto (Fan *et al.*, 2013) y crías vivas (Du *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016) de porcino, blastocistos de caprino (Akshey *et al.*, 2011; Jena *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014; Mukherjee *et al.*, 2014), mórula (Navarro *et al.*, 2016; Vazquez, 2016) y blastocistos (Hosseini *et al.*, 2013b; Zhang *et al.*, 2013) de ovino, e incluso la producción de blastocistos interespecie, como los generados por Khan *et al.* (2014) a partir de cabra y borrego, y los blastocistos producidos por Selokar *et al.* (2011), en los que fusionaron fibroblastos de cuatro especies (búfalo, vaca, ratón y cabra) con un respectivo ovocito de búfalo.

5. Aplicación de la clonación manual en especies silvestres.

Actualmente existen estudios de producción de embriones y nacimientos de crías vivas por clonación manual aplicada en fauna silvestre en riesgo como: embriones en etapa de mórula de antílope tibetano (*Pantholops hodgsonii*) (Yu *et al.*, 2011), blastocistos del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) (Selokar *et al.*, 2012a; 2012b; Kaith *et al.*, 2015; Jyotsana *et al.*, 2015; Mohapatra *et al.*, 2015; Jyotsana *et al.*, 2016; Sandhu *et al.*, 2016) y el nacimiento de una cría de esta especie (Madheshiya *et al.*, 2015), mórula (Vazquez *et al.*, 2016) y blastocistos (Vazquez *et al.*, 2017) de borrego cimarrón hembra (*O. c. mexicana*).

6. Aplicación de biotecnologías reproductivas en la especie en riesgo *Ovis canadensis mexicana*.

México es un país megadiverso, a pesar de contar únicamente con 1.3% de la superficie total del planeta, representa del 10 al 12% de la biodiversidad mundial al albergar 108,519 especies descritas, colocándolo en primer lugar en reptiles, segundo en mamíferos, cuarto en anfibios y quinto en plantas vasculares (CONABIO-CONANP, 2010). En cuanto a la biodiversidad faunística, México posee 535 especies distintas de mamíferos (lo cual representa el 12.21% a nivel mundial), siendo esta clase taxonómica una de las más amenazadas en el país. De acuerdo a la CONABIO (2010), 295 especies de mamíferos están registradas bajo alguna categoría de riesgo en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010). De éstas, siete están extintas, 43 están en peligro de extinción, 124 en amenaza y 121 sujetas a protección especial. Estos datos indican que más de la mitad de las especies de mamíferos mexicanos ostenta algún tipo de amenaza, lo que resulta sumamente grave ya que, de no darse un cambio en las estrategias de conservación, toda esta riqueza podría perderse a corto plazo (Armella *et al.*, 2011).

Entre las especies vulnerables está el borrego cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*), una especie nativa de México y Norteamérica, la cual está enlistada en las normas de protección². La NOM-059-SEMARNAT-2010 y la Convención sobre Comercio

² Estas normas tienen por objeto identificar las especies o poblaciones de flora y fauna silvestres en riesgo en la República Mexicana, mediante la formación de listas, donde se establecen criterios de inclusión, exclusión o cambio de categoría de riesgo para las especies o poblaciones, de acuerdo a su riesgo de extinción (NOM-059-SEMARNAT-2010).

Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) en su apéndice II, lo catalogan como una especie sujeta a protección especial y la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2011) como de preocupación menor, esto por la reducción de sus poblaciones.

El género *Ovis* apareció en el periodo plio-pleistoceno³. Aunque, en el presente, hay ovinos en casi todos los continentes, el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) es la única especie de *Ovis* silvestre que se distribuye en México. La especie *Ovis canadensis* está organizada en siete subespecies: *O. c. canadensis*, *O. c. californiana*, *O. c. nelsoni*, *O. c. mexicana*, *O. c. auduboni*, *O. c. cremnobates* y *O. c. weemsi*, de las cuales una está extinta (*Ovis canadensis auduboni*) y tres están en nuestro país: *O. c. mexicana*, *O. c. cremnobates* y *O. c. weemsi* (Shackleton, 1985). Estas tres subespecies están bajo la categoría de riesgo dentro de las normas oficiales, debido en gran parte a las actividades antropogénicas, como el desarrollo urbano, caza furtiva, cambios en las condiciones del hábitat y cambios abióticos como el calentamiento global y el cambio climático. Por lo cual su distribución actual corresponde sólo al 30% de la históricamente reconocida (Navarro y Ambríz, 2008). Todas estas causas multifactoriales han comprometido a la especie, volviéndola blanco de estudio y aplicación de estrategias de conservación emergentes para su rescate.

De acuerdo a la IUCN, la diversidad biológica debe conservarse como una cuestión de principio, ya que todas las especies merecen protección, independientemente de si son de importancia ecológica o económica para la humanidad. En reconocimiento a ello, esfuerzos regionales, nacionales e internacionales se están haciendo para desarrollar estrategias, programas y proyectos para la preservación de los recursos zoogenéticos (Segura-Correa y Montes-Pérez, 2001).

En el caso de la fauna silvestre, se han determinado tres métodos de conservación que permiten su resguardo,

- Estrategia *in situ*: cuando la especie es protegida en el área natural donde se distribuye, crece y reproduce;

³ Hace 1.8-2.4 millones de años.

-
-
- El método *ex situ in vivo*: en el que se mantienen individuos vivos, pero en condiciones fuera de su distribución natural, por ejemplo, en zoológicos, en Sistemas Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), en ranchos cinegéticos, etc.; y
 - La conservación *ex situ in vitro*, en la cual se conserva al animal en un entorno artificial de condiciones criogénicas. Estos sistemas albergan germoplasma de ovocitos, espermatozoides, embriones, células somáticas o tejidos que poseen el potencial de reconstituir a un individuo completo, incluso después de que ocurra la muerte del animal (FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2007). Dentro de este método, se ha sugerido que las biotecnologías reproductivas podrían ser una estrategia alternativa para el resguardo de material genético de estas especies.

A pesar de que México posee un gran número de especies en riesgo, poco se ha efectuado sobre la aplicación de biotecnologías de vanguardia como estrategias de conservación *ex situ*. El borrego cimarrón es una especie emblemática y vulnerable de nuestro país, sin embargo, su investigación científica actual radica en estudios anatómicos y monitoreos poblacionales (Besser *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014). Con relación a los estudios reproductivos, los datos reportados hasta el momento son de detección de gestación por métodos no invasivos (Borjesson *et al.*, 1996), de determinación de hormonas esteroideas en heces y estudios de conducta sexual en cautiverio (Soto, 2006). A diferencia de Italia y Estados Unidos donde, por la técnica de transferencia nuclear convencional, se lograron clonar otras especies de borregos silvestres, obteniendo una cría de *O. orientalis musimon* (Loi *et al.*, 2001) y gestaciones de *O. ammon* (White *et al.*, 1999).

Recientemente, en México, se consiguió obtener células de piel de ovinos machos y hembras cimarrones (*O. c. mexicana*) en cautiverio (Navarro *et al.*, 2015), así también la producción de embriones de hembra en etapa de mórula (Vazquez *et al.*, 2016) y de blastocisto (Vazquez *et al.*, 2017), ofreciendo, de esta manera, una importante alternativa de conservación de germoplasma de esta especie silvestre en riesgo, mediante la producción de embriones clonados.

7. Alcances y limitaciones de la clonación manual.

El hecho de aplicar biotecnologías reproductivas en una especie silvestre, implica conocer los alcances y límites de la técnica. La clonación manual, al igual que otros métodos de TNCS, posee múltiples factores que influyen en su éxito, algunos de ellos son, el manejo y la eficiencia de cada una de las etapas que la componen, y el control que se ejerce sobre la selección de las células utilizadas. La selección celular es un tema estudiado ampliamente, principalmente con el objetivo de evaluar el potencial del ovocito para reprogramar al carioplasto y dirigir las primeras segmentaciones, así también, para analizar la capacidad que tiene la célula somática de ser reprogramada dependiendo de su tipo, ciclo celular, edad, morfología y pasaje (Akagi *et al.*, 2014).

Otras limitantes de la producción de embriones clones son, la activación del genoma, el bloqueo del desarrollo en la etapa de mórula y, por ende, el desarrollo en la etapa de blastocisto, la implantación, gestación y nacimiento de crías vivas. No obstante, se sabe que el éxito final de la técnica dependerá, en gran parte, de la selección y manipulación de las células y de los patrones normales y anómalos que se muestren en el desarrollo embrionario temprano (Tian *et al.*, 2003).

8. Desarrollo embrionario temprano.

Un nuevo ciclo de vida inicia con la fecundación y fusión del material genético de dos gametos (espermatozoide y óvulo). Esta fusión es conocida como singamia y estimula a la nueva célula formada (cigoto) a iniciar el desarrollo. Las etapas (fases o estadios) de desarrollo entre la fecundación y el nacimiento reciben el nombre de embriogénesis, la cual está dividida en dos principales etapas: el desarrollo embrionario temprano (pre implantacional) y el desarrollo embrionario tardío (post implantacional) (Gilbert, 2005).

El desarrollo embrionario temprano inicia tras la primera segmentación del cigoto; está caracterizado por una serie de divisiones mitóticas extremadamente rápidas y de ciclos celulares cortos, en los que la mitosis y citocinesis se suceden repetidamente, sin periodos intermedios. Durante esta etapa la masa celular no aumenta, al contrario, es dividida en células más pequeñas llamadas blastómeros (Wolpert *et al.*, 2009).

Posteriormente éstas se organizarán en células de mayor tamaño (macrómeras) y unas de menor tamaño (micrómeras) para formar una esfera sólida conocida como mórula que, al aumentar su área de superficie celular en contacto, se comprime, generando el estadio de mórula compacta. Al finalizar, este grupo celular formará una nueva estructura conocida como blastocisto que está caracterizado por la presencia de una vesícula líquida interna conocida como blastocele, el cual se rodea por dos tipos celulares: las células del trofoectodermo y las células de la masa celular interna (MCI). En cambio, el desarrollo embrionario tardío involucra los procesos post implantacionales, que van desde la gastrulación y organogénesis hasta el nacimiento de la cría (Wolpert *et al.*, 2009).

III. ANTECEDENTES.

1. Evaluación de la calidad de embriones producidos *in vitro*.

Aunque se han generado diversos estudios acerca de la Producción de Embriones *in vitro* (PEIV) como, por ejemplo, las condiciones de cultivo, la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos, el bloqueo del desarrollo embrionario, entre otros factores que repercuten en la competencia del embrión; aún falta prestarle mayor atención a uno de los pasos decisivos del éxito de estas técnicas: la evaluación y selección de embriones. Esta selección consiste en identificar los embriones de mejor calidad (que sean competitivos al poseer características transferibles) dentro de una cohorte, en función de una serie de parámetros morfológicos externos e internos, ritmos de división y viabilidad (Jiménez *et al.*, 2005).

La literatura concerniente a la evaluación de la calidad de embriones, con base en diferentes parámetros, métodos de obtención y producción por diferentes técnicas como la FIV, ICSI, e incluso, post-congelación, cada vez es más abundante (Baez *et al.*, 2010; Fabozzi *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2016). A pesar de ello, su descripción en la clonación manual es inexistente, por este motivo, el implementarlo podría generar datos sobre la dinámica y calidad de los embriones clones producidos.

2. Evaluación de la calidad en embriones clones.

Es bien conocido que, la selección temprana de embriones producidos *in vitro*, permite elevar la tasa de transferencias, implantaciones y nacimientos de crías vivas en técnicas de reproducción asistida (Fabozzi *et al.*, 2016). No obstante, en clonación manual no se han documentado evaluaciones morfológicas de la calidad embrionaria, debido a que el éxito de la técnica y del desarrollo embrionario está determinado por el nacimiento de una cría viva (Du *et al.*, 2008).

Los pocos análisis de calidad embrionaria publicados, hasta ahora, en TNCS están realizados en embriones obtenidos por clonación convencional y van desde el análisis de anomalías cromosómicas en bovinos (Slimane-Bureau y King, 2004) hasta el reporte más reciente de perfil morfológico (número y proporción de células, perímetro y distribución mitocondrial) y perfil genético de embriones en bovino (Bang

et al., 2015). Esto podría explicar la baja tasa de crías vivas obtenidas a partir de embriones producidos por TNCS (0.5-1%) (Loi *et al.*, 2016).

En contraste a estos datos, en FIV, la literatura concierne trata sobre la caracterización de un embrión de calidad en humanos (Van Royen *et al.*, 1999); el efecto de la MIV de los ovocitos sobre la viabilidad de embriones preimplantatorios basada en tiempo y número de segmentaciones⁴ en embriones humanos (Shoukir *et al.*, 1997; Lundin *et al.*, 2001); anomalías cromosómicas en bovinos (Slimane *et al.*, 2000); criterios morfológicos y cromosómicos en bovinos (Dieleman *et al.*, 2002); la relación de la expresión de proteínas reguladoras de apoptosis con la calidad de los embriones bovinos (Yang y Rajamahendran, 2002), la estabilidad cromosómica en ratón (Balbach *et al.*, 2007), entre otros.

3. Alteraciones embrionarias tempranas *in vitro*.

La producción de embriones *in vitro* mediante biotecnologías reproductivas, ha significado un enorme reto para la ciencia, dado que los embriones, hasta ahora generados, presentan un desarrollo y calidad más bajos que los obtenidos *in vivo*.

Debido a que, el embrión es un sistema dinámico, es necesario utilizar métodos de valoración que puedan determinar la fisiología normal y anormal dentro del DEIV, por lo que la implementación de metodologías morfométricas permite detectar alteraciones embrionarias tempranas tales como la asimetría de blastómeros, la apariencia degenerada del citoplasma, la fragmentación embrionaria, la multinucleación de blastómeros, entre otros; considerando la influencia que tienen estas sobre la viabilidad embrionaria (Gardner y Balaban, 2016).

4. Fragmentación embrionaria.

Entre las múltiples alteraciones identificadas en los embriones producidos *in vitro*, la fragmentación ha tomado gran relevancia por su alta frecuencia dentro del desarrollo. Este fenómeno es definido como la generación de células enucleadas durante el desarrollo embrionario temprano, asociado con anomalías cromosómicas,

⁴ Según Gilbert (2005), la segmentación en embriología es la serie de divisiones celulares ocurridas en el cigoto que originan células más pequeñas conocidas como blastómeros.

la multinucleación blastomérica⁵ y el mosaicismo⁶ en humanos (Fujimoto *et al.*, 2011). Ocurre generalmente, durante la primera división celular (en un 40% de los embriones generados *in vitro*), y el grado de fragmentación puede variar de cero a más del 50% del volumen citoplasmático (Halvaei *et al.*, 2016).

Es difícil determinar si la división anómala o deficiente del citoplasma es consecuencia de un factor particular, en virtud de esto se ha propuesto como el resultado de múltiples factores moleculares, celulares, genéticos e intrínsecos del ovocito o del embrión (Fujimoto *et al.*, 2011), los cuales provocan el fracaso de la dinámica normal entre microtúbulos y microfilamentos, durante la fase división (específicamente citocinesis) dentro del ciclo celular (Alikani *et al.*, 2005). Aunque los factores intrínsecos ya han sido descritos, se sabe además que, la manipulación celular pueden incidir a favor de este fenómeno, un claro ejemplo de esto, es lo provocado por el pulso eléctrico utilizado durante la fusión, en embriones clones, el cual desestabiliza los microfilamentos de actina, evitando así, la sincronía entre la citocinesis y la cariocinesis promoviendo la formación de residuos citoplasmáticos (Kawahara *et al.*, 2002).

La fragmentación ha sido relacionada con la reducción del potencial de desarrollo del embrión, debido a que los fragmentos privan de volumen al embrión y le confieren una viabilidad menor en comparación con aquellos que no los presentan. Es conocido también que, la fragmentación, está ligada a la apoptosis y que ésta puede inducirse, independientemente de la calidad de los ovocitos y la etapa de división embrionaria, en FIV (Bakri *et al.*, 2016). Actualmente se ha buscado considerar a la apoptosis como un criterio de calidad, ya que impacta y determina los resultados de una gestación (Ebner *et al.*, 2001).

5. Multinucleación blastomérica.

Es definida como una alteración en la que un blastómero presenta más de un núcleo en interfase. Ésta es considerada una característica morfológica importante

⁵ Mayor cantidad de núcleos que de blastómeros, cuando la relación debe ser 1:1.

⁶ Según Kovaleva y Cotter (2017) el mosaicismo cromosómico es una alteración genética del individuo, donde coexiste la presencia de dos o más líneas celulares con diferente constitución cromosómica, pero originadas del mismo cigoto. Este fenómeno es más común en los seres humanos que en otras especies animales.

de un embrión en división, que tiene un efecto perjudicial sobre la viabilidad y el potencial de implantación, en consecuencia, es una alteración que debe ser incorporada a los esquemas de clasificación (Gardner y Balaban, 2016).

Para que un embrión lleve a cabo una división celular (mitosis) es necesario que duplique sus cromosomas, si este proceso se lleva a cabo normalmente, cada blastómero generado deberá contener un núcleo, sin embargo, si la citocinesis sufre un fallo y se produce un arresto del estado de división del citoplasma, el blastómero contendrá más de un núcleo. Esta alteración puede producirse en cualquier momento del desarrollo embrionario, aunque, a menudo, se origina desde la primera segmentación (Van Royen *et al.*, 2003).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La clonación manual es catalogada como una biotecnología de vanguardia, implementada en diversas especies domésticas productivas y, recientemente, en especies silvestres para el resguardo de germoplasma y producción de individuos. Si bien su aplicación, para la repoblación de vida silvestre en riesgo, ha sido poco estudiada, el recambio temporal de un individuo es, por el momento, lo más viable.

Hasta hoy, en la técnica de clonación manual no se ha establecido una caracterización del desarrollo embrionario *in vitro*, lo cual sugiere la falta de un marco de referencia sobre la calidad embrionaria de los clones. Por lo tanto, es necesario evaluar parámetros como, tasa de segmentación, estadio del desarrollo embrionario, tasa de fragmentación, morfología, número de núcleos y viabilidad embrionaria, con la finalidad de caracterizar el desarrollo embrionario *in vitro* y, lograr predicciones de calidad en estadios tempranos que mejoren las tasas de desarrollo de blastocistos.

V. JUSTIFICACIÓN.

El empleo de criterios internacionales de evaluación morfológica embrionaria, en embriones clones de *O. c. mexicana*, permitiría establecer un marco de referencia sobre su desarrollo ontogenético *in vitro*. De la misma manera, contribuirá a identificar las posibles alteraciones a las que está sujeto el embrión, posibilitando, de esta manera, seleccionar los embriones con el potencial de alcanzar la etapa de blastocisto desde etapas tempranas del desarrollo.

VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Qué calidad tendrán los embriones de *Ovis canadensis mexicana* producidos por clonación manual utilizando los criterios internacionales de evaluación morfológica embrionaria?

II. HIPÓTESIS.

La aplicación de criterios internacionales de evaluación morfológica en embriones de *Ovis canadensis mexicana* producidos por clonación manual, permitirá determinar su estadio de desarrollo, así como su calidad y posible viabilidad.

VIII. OBJETIVOS.

1. Objetivo General.

Evaluar la calidad de los embriones de *Ovis canadensis mexicana* producidos por clonación manual.

2. Objetivos Particulares.

Evaluar la calidad embrionaria mediante la determinación de:

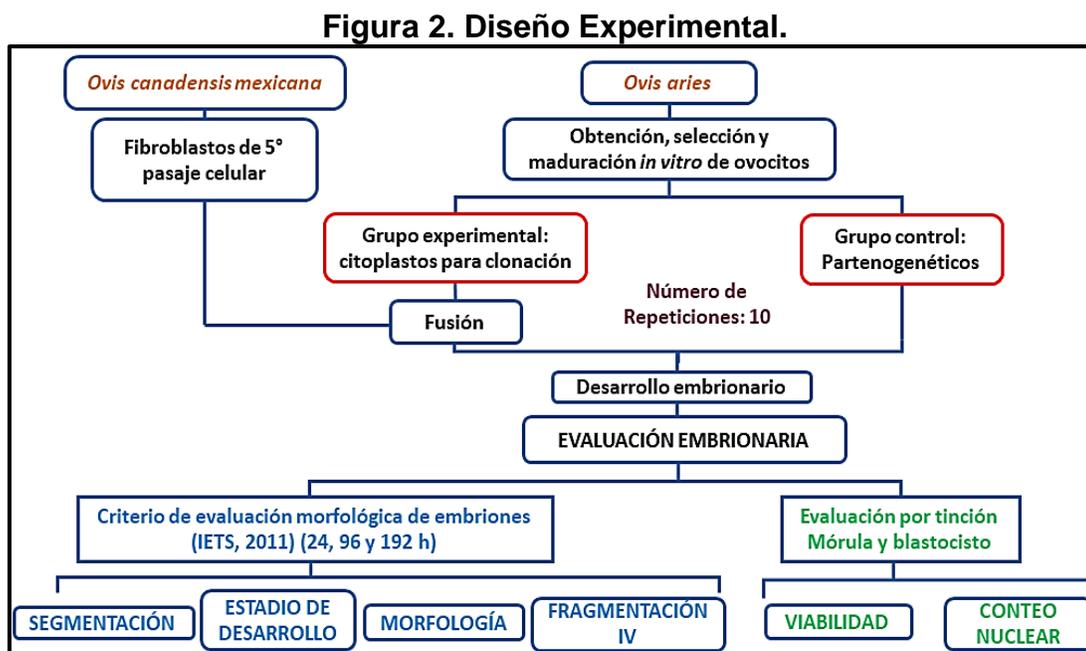
- Tasa de segmentación y estadio del desarrollo embrionario.
- Morfología embrionaria.
- Tasa de fragmentación embrionaria.
- Tasa de viabilidad embrionaria de mórulas y blastocistos.
- Número de núcleos presentes en mórulas y blastocistos.

IX. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para llevar a cabo esta investigación se realizaron diez repeticiones de experimentos. Ovocitos de *O. aries* obtenidos mediante punción folicular fueron seleccionados y madurados *in vitro*; posteriormente se dividieron en dos grupos:

- Grupo experimental: Ovocitos de *O. aries* destinados a formar citoplastos para generar embriones de *O. c. mexicana* mediante clonación manual.
- Grupo control: Ovocitos de *O. aries* destinados a generar embriones activados partenogénicamente.

Una vez activados químicamente, los embriones clones de *O. c. mexicana* (originados por la fusión de ovocitos enucleados de *O. aries* con fibroblastos de piel de oreja de *O. c. mexicana* provenientes del 5° pasaje) y los embriones partenogénicos de *O. aries*, se cultivaron en el sistema WOW para su desarrollo. Los embriones de ambos grupos fueron evaluados bajo seis criterios de calidad: segmentación, estadio de desarrollo, morfología, fragmentación, viabilidad y conteo nuclear (Figura 2).



Fuente: Elaboración propia

X. MATERIALES Y MÉTODOS.

Todos los reactivos utilizados son de la marca Sigma (*Sigma-Aldrich Chemical Company*, ST. Louis, Estados Unidos), a menos que se indique lo contrario. De igual manera, las condiciones de cultivo fueron realizadas en una incubadora a 38 °C, con inyección de CO₂ al 5% en aire y humedad a saturación.

1. Bioética animal.

Los ejemplares de la especie *Ovis aries* fueron hembras sacrificadas en un rastro del Estado de México, por tal motivo, no se infringieron los Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación, la Docencia y la Difusión de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (2010), ni los Códigos de Bioética y Bienestar Animal (Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2016).

En el caso particular del borrego cimarrón (*O. c. mexicana*), el muestreo de macho adulto *post mortem* se efectuó con el permiso de colecta científica: SGPA/DGVS/07250/15 expedido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Por su parte, la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre (DGZVS) de la Secretaría de Medio Ambiente (SEDEMA) en la Ciudad de México (CDMX), autorizó la colecta, y su personal especializado llevo a cabo la toma de muestra de piel de oreja. Dado que el animal muestreado murió por causas naturales no se infringieron los protocolos de manejo bioético de la DGZVS.

2. Colecta de tejido de piel de oreja de *O. c. mexicana*.

Se obtuvo una muestra de 1 cm² de piel de oreja de un ejemplar de *O. c. mexicana* proveniente del Zoológico de Chapultepec de la DGZVS de la SEDEMA en la CDMX. El tejido fue colectado y desinfectado con cloro al 1% durante 10 minutos para después lavarlo y transportarlo en 5 mL de medio a base de solución salina amortiguada por fosfatos de Dulbecco (DPBS), sin calcio ni magnesio (*In Vitro*, S. A.), suplementado con 2% de antibiótico y antimicótico 100X (10,000 UI/mL de Penicilina G Sódica, 10,000 µg/mL de Sulfato de Estreptomicina y 25 µg/mL de Anfotericina B solubilizada, *In vitro* S. A.). A continuación, se trasladó en frío al

Laboratorio de Reproducción Animal Asistida S-234, del Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

La muestra de piel se colocó en una caja de Petri de 100x15 mm que contenía DPBS suplementado, bajo un microscopio estereoscópico. Se eliminó la mayor cantidad de pelo utilizando una navaja de afeitar, bisturí y tijeras. En seguida, se desinfectó durante 5 minutos en cloro al 1%, se sumergió en alcohol al 70% y se lavó tres veces con DPBS suplementado (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

3. Deriva de fibroblastos de piel de *O. c. mexicana* en cultivo primario.

La deriva de fibroblastos de piel de oreja de *O. c. mexicana*, se realizó mediante la técnica mecánico-enzimática. El tejido de piel se disgregó utilizando instrumental de disección, posteriormente los segmentos se colocaron en un tubo de vidrio que contenía una solución enzimática a base de Colagenasa tipo I y II (0.2%/0.2%, *Gibco*; en DPBS sin calcio ni magnesio). El tubo se mantuvo en oscilación constante dentro de una estufa a 37 °C, durante 3 horas.

Una vez transcurrido el tiempo, la acción enzimática se detuvo adicionando 4 mL de medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, *In vitro* S. A.) suplementado (Suero Fetal Bovino [SFB], *Microlab*; Antibiótico-antimicótico 100X) ajustado a un pH de 7.4. Los remanentes de piel no disgregados se sembraron en una caja Petri de 35x15 mm como explantes (disgregación mecánica) con 3 mL de DMEM suplementado.

La solución disgregada se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos descartando el sobrenadante. El paquete celular obtenido se resuspendió en 4 mL de DMEM suplementado y centrifugado bajo las mismas condiciones. El nuevo paquete celular fue sembrado en una caja Petri de 35x15 mm y cultivado en condiciones de incubación. La caja se mantuvo en cultivo durante siete días, supervisándola a las 24, 72 y 178 horas con el propósito de identificar la deriva de las primeras células (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

4. Pasaje celular de fibroblastos de piel de *O. c. mexicana*.

Para realizar un pasaje celular, el cultivo debe alcanzar, entre el 80 y 100% de confluencia⁷, en un lapso de siete días (Phelan y May, 2016). Una vez comprobada esta condición, la caja de cultivo fue lavada con 1 mL de DPBS suplementado, aplicando movimientos en cruz. Una vez retirado este medio; con el fin de desprender las células adheridas, se agregaron 700 µL de tripsina (tripsina-verseno 0.05% / 0.05%; en DPBS durante 5 a 10 minutos, en condiciones de incubación y revisiones constantes. Una vez desprendidas las células, al acción enzimática se detuvo con 2 mL de DMEM suplementado, en este momento se tomaron 10 µL de esta suspensión para realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer⁸ y determinar así la cantidad de células cultivadas por caja.

La suspensión restante se recuperó en dos viales estériles, los cuales fueron centrifugados a 150 x g durante 6 minutos, descartando el sobrenadante. El paquete celular se homogenizó en 0.5 mL de DMEM-suplementado y se sembró en dos cajas de Petri de 35x15 mm con 3 mL de DMEM suplementado. Este procedimiento se realizó cada siete días, hasta completar cuatro pasajes (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

5. Criopreservación y descongelación de fibroblastos de *O. c. mexicana*.

Según Navarro-Maldonado *et al.* (2015), una vez completados los cuatro pasajes, las células de cada caja fueron tripsinizadas y centrifugadas. Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 0.5 mL de medio de congelación a base de Dimetil sulfóxido (DMSO, *In Vitro S. A.*) y, finalmente, se almacenaron en 1 mL a -80 °C en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Las células en 4° pasaje se mantuvieron almacenadas hasta ocho días antes de cada experimento de clonación. El proceso de descongelación consistió en incubar un criotubo durante 5 minutos a 38 °C, después su contenido se colocó en un vial

⁷ La confluencia en cultivo se tomó en cuenta conforme a la inhibición de la proliferación celular por contacto (Akshey *et al.*, 2011).

⁸ El conteo celular en la cámara de Neubauer se realizó de acuerdo a Bastidas (2013), mediante la siguiente fórmula : $concentración\ celular = \frac{número\ de\ células\ contabilizadas\ x\ 10,000}{número\ de\ cuadros\ contabilizados} / 1\ mL$

que contenía 1 mL DMEM suplementado y se centrifugó a 150 x g por 4 minutos. El paquete celular se cultivó en una caja Petri de 35x15 mm en condiciones de incubación, para continuar hacia el 5° pasaje.

El día de la clonación, los fibroblastos, con una confluencia >80%, fueron tripsinizados para desprenderlos de la base de la caja y se mantuvieron en un vial con 0.3 mL de medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199, *In Vitro S. A.*) con Hepes, suplementado con 20% de SFB (T20) (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015; Vajta, 2003). Para que estas células fueran seleccionadas como carioplastos debían tener las siguientes condiciones: morfología normal, tamaño simétrico y no presentar cuerpos picnóticos o vacuolas.

6. Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos de *O. aries*.

Se colectaron ovarios de ovejas adultas (*Ovis aries*) tipo criolla, recién sacrificadas en un rastro del Estado de México. Estos ovarios fueron transportados al laboratorio en un máximo de una hora a una temperatura de 30-35 °C en solución salina fisiológica (NaCl 0.9% y 1% de antibiótico y antimicótico) (Palma, 2001).

6.1. Obtención y selección de Complejos Ovocito Cúmulo.

Los ovarios se lavaron tres veces consecutivas en solución salina fisiológica isotérmica. Los Complejos Ovocito Cúmulo (COC) se obtuvieron mediante punción-aspiración de los folículos ováricos (2-5 mm), utilizando una aguja hipodérmica de calibre 20G x 32 mm y una jeringa de 10 mL, para ello se empleó como soporte TCM-199 con Hepes suplementado con 100 UI/mL de Sal de Sodio de Heparina (Robledo-Verduzco *et al.*, 2009).

Los COC recuperados se colocaron en dos cajas Petri de 55x142 mm, en donde se clasificaron y seleccionaron los COC que presentaban morfología normal, de acuerdo a los parámetros morfológicos establecidos por la ASEBIR (2015).

La clasificación por número de capas de las células de la granulosa se realizó con base en los criterios de Kakkassery *et al.* (2010):

- Clase A: Caracterizados por tener más de cinco capas de células del cúmulo.

-
-
- Clase B: Ovocitos con 3 a 5 capas completas de células del cúmulo.
 - Clase C: Ovocitos con 1 a 2 capas completas de células del cúmulo.
 - Clase D: Ovocitos desnudos.

Una vez seleccionados los COC de morfología normal y clase A-B, se colocaron en grupos de 50 COC en una microplaca de cuatro celdas (*Thermo-Scientific Nunc*, Rochester NY), cada una de las celdas contenía 500 μ L de medio de MIV a base de TCM-199 suplementado con Cisteína (0.57 mM), D- glucosa (3.05 mM), alcohol polivinílico (PVA) (0.1%), Piruvato de sodio (0.91 mM), 10% de SFB, Hormona Coriónica Humana (hCG, 5 UI/mL, *Ferring pharmaceuticals*), Hormona Folículo Estimulante (FSH, 0.1 UI/mL, Merck Serono), EGF (10 ng/mL) y Antibiótico-antimicótico (2%); las celdas fueron cubiertas con aceite mineral. Los COC se incubaron durante 21 horas bajo las condiciones ya descritas (Rodríguez-Suástegui, 2012).

6.2. Denudación de los Complejos Ovocito Cúmulo.

Transcurrido el tiempo, y de acuerdo con la metodología propuesta por Kragh *et al.* (2004), se determinó el porcentaje de expansión de las células del cúmulo, como primer criterio de MIV, después se disgregaron estas células utilizando hialuronidasa (0.5 mg/mL). Una vez denudados los ovocitos, se procedió a identificar la presencia del primer cuerpo polar (CP), como parámetro definitivo de la MIV.

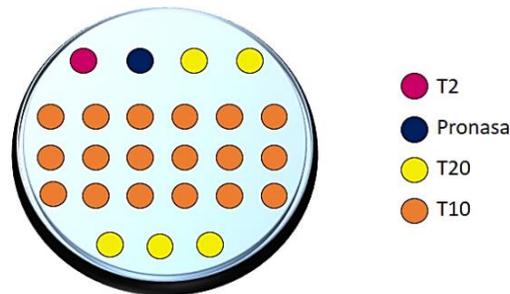
Los ovocitos que presentaron el primer CP, se dividieron en dos grupos: grupo experimental (utilizados para formar embriones clones de *O. c. mexicana*) y grupo control (utilizados para formar embriones partenogénéticos de *O. aries*).

7. Clonación manual interespecífica.

7.1. Preparación de citoplastos de *O. aries*.

Los ovocitos de *O. aries* correspondientes al grupo experimental se incubaron durante una hora en demecolcina (10 μ g/mL) para la formación del cono o extrucción de la placa metafásica, mientras tanto, se preparó una caja de Petri, de 55x142 mm con microgotas de 20 μ L de medios, y se cubrió con aceite mineral, como puede observarse en la siguiente figura:

Figura 3. Arreglo de la caja de preparación de citoplastos.



Fuente: Elaboración propia

Pasado el tiempo de incubación en demecolcina, los ovocitos, con presencia de CP y cono, se colocaron para un lavado en la microgota de T2 (TCM-199 con Hepes y 2% de SFB).

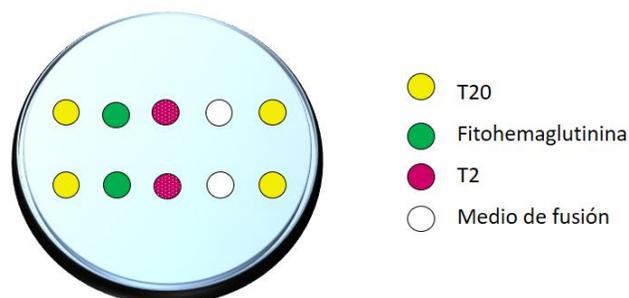
Para digerir la ZP, grupos de 30 ovocitos fueron expuestos a microgotas de pronasa (2 mg/mL) de 5 a 7 minutos sobre platina térmica. La reacción de la pronasa se detuvo mediante dos lavados en microgotas de T20.

Cuando los ovocitos fueron desnudados, se alinearon (como máximo 5) en microgotas de T10 (TCM-199 con Hepes y 10% de SFB) para proceder a la enucleación. Ésta se realizó mediante una bisección utilizando una micronavaja (*Ultra Sharp Splitting Blade-Bioniche*). Los ovocitos se orientaron con el primer CP hacia el norte, de tal manera que, utilizando la micronavaja, se pudieran eliminar el CP y el cono. Los ovocitos enucleados (citoplastos) fueron recuperados en las microgotas de T20 para reconstituir a su forma esférica, de acuerdo a Vajta *et al.* (2003).

7.2. Formación y fusión del triplete cario-citoplastos.

Para llevar a cabo este proceso, además del electrofusionador (*Cell Fusioner Instrument BLS*), se preparó la cámara (BTX *microslide*, 0.5 mm de apertura, modelo 450) y la caja de cultivo para fusión. En la caja se colocaron microgotas de 15 μ L de medios cubriéndolos con aceite mineral, como se aprecia en la siguiente figura:

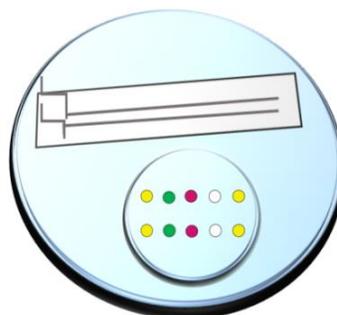
Figura 4. Arreglo de la caja de fusión.



Fuente: Elaboración propia

La caja y cámara de fusión se montaron sobre la tapa de una caja Petri de 100x15 mm (Figura 5). A la cámara de fusión se le adicionaron 300 μ L de medio de fusión a base de 5.46 g de D-Manitol y 0.1 g de PVA, disueltos en un volumen de 98 mL de agua Mili Q.

Figura 5. Montaje de la caja y cámara de fusión.



Fuente: Elaboración propia

Alrededor de 40 carioplastos (fibroblastos de *O. c. mexicana* en suspensión) se colocaron en la microgota de T2 y los citoplastos (ovocitos de *O. aries* enucleados) se colocaron en la primer microgota de T20. Posteriormente se tomaron dos citoplastos para ser sumergidos momentáneamente en la microgota de Fitohemaglutinina (PHA, 5 mg/mL), en la gota de T2 se unió un carioplasto con dos citoplastos colocando al primero en medio (triplete), finalmente se alinearon en los electrodos de la cámara sobre una gota de medio de fusión. Para la atracción de los tripletes al electrodo, se liberó una corriente alterna (AC) constante de 4-6 V, posteriormente para llevar a cabo la fusión se aumentó la AC a 9 V para aplicar un

solo pulso a 100 V/mm de corriente directa (DC) por 9 μ seg, inmediatamente la AC se disminuyó gradualmente hasta 0 V y se esperó unos segundos a que los tripletes se apartaran del electrodo (Vajta *et al.*, 2003).

Los tripletes fusionados se colocaron en la última gota de T20 para que empezaran a reconstruirse en una sola célula, mientras tanto, se volvió a repetir el proceso de fusión con los citoplastos restantes. Una vez reconstruidos los tripletes se incubaron durante 3 horas para efectuar la reprogramación del carioplasto en medio de cultivo de desarrollo embrionario *in vitro*.

8. Preparación del grupo control: ovocitos partenogénéticos.

Los ovocitos de *O. aries* designados para el grupo control (embriones partenogénéticos) fueron desnudados de la ZP con pronasa y se mantuvieron en SOF con 5% de SFB en condiciones de incubación, hasta el proceso de activación (Jena *et al.*, 2012). Se consideró que, los ovocitos partenogénéticos, fueran libres de ZP para que los embriones producidos fueran un mejor control *versus* los embriones clones.

9. Activación de tripletes reconstruidos y ovocitos partenogénéticos.

Los tripletes reconstruidos (*O. c. mexicana*-*O. aries*) y los ovocitos de *O. aries* partenogénéticos, se activaron químicamente en medio T2 con ionóforo de calcio A23187 (1 mg/mL) durante 5 minutos bajo condiciones de incubación. Después se lavaron tres veces en 1 mL de T20 por 5 minutos. Finalmente, se incubaron individualmente (con tal de evitar su aglutinación) en microgotas de 2 μ L de medio de cultivo suplementado con 2 mM de 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP), durante 5 horas. En seguida, las células se retiraron de la gota de 6-DMAP y se lavaron tres veces en 1 mL de T20 por 5 minutos (Vajta *et al.*, 2003).

10. Cultivo *in vitro* de embriones en sistema WOW.

Según Vajta *et al.* (2008), los tripletes que se reconstruyeron en una sola célula (en lo sucesivo embriones clones) y los ovocitos partenogénéticos de *O. aries*, se cultivaron en sistema WOW, que consiste en hacer un micropozo dentro de una celda de una microplaca, para proteger al futuro embrión carente de ZP. Cada uno de estos micropozos contuvo un embrión de cada grupo. Con base en lo descrito por

Hafez y Hafez (2000), para el tiempo de desarrollo embrionario en ovinos, los embriones de ambos grupos se incubaron por ocho días (192 horas) en medio secuencial. Las primeras 96 horas se incubaron en medio *Cleavage (Cook Medical)* y las 96 horas restantes en medio *Blastocyst (Cook Medical)* (Morton *et al.*, 2006).

11. Determinación de la Calidad Embrionaria.

Para determinar la calidad de los embriones clones y partenogenéticos, se evaluaron los siguientes aspectos: segmentación, estadio de desarrollo embrionario *in vitro*, morfología, fragmentación, viabilidad y conteo nuclear.

11.1. Evaluación de la tasa de segmentación y del estadio de desarrollo embrionario *in vitro*.

La tasa de segmentación fue determinada mediante el conteo de los embriones que llevaron a cabo al menos, una división celular durante el tiempo de cultivo.

El desarrollo embrionario fue evaluado a las 24, 96 y 192 horas de cultivo. En cada uno de los periodos, se contabilizó el número de embriones por estadio. Las categorías se establecieron de acuerdo a los códigos de estadios numéricos sugeridos por el capítulo 9 del Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés) 4ª edición (2011) con sus respectivas modificaciones basadas en la cronología descrita para el DEIV de ovinos por Winterberger-Torres y Sevellec (1987) (Cuadro 1).

11.2. Evaluación de la morfología embrionaria.

Los embriones clones de *O. c. mexicana* y partenogenéticos de *O. aries* fueron evaluados y catalogados con base en los parámetros de calidad morfológica propuestos por Bó y Mapletoft (2013) para embriones producidos *in vitro* y tomados del manual de IETS (2011) (Cuadro 2).

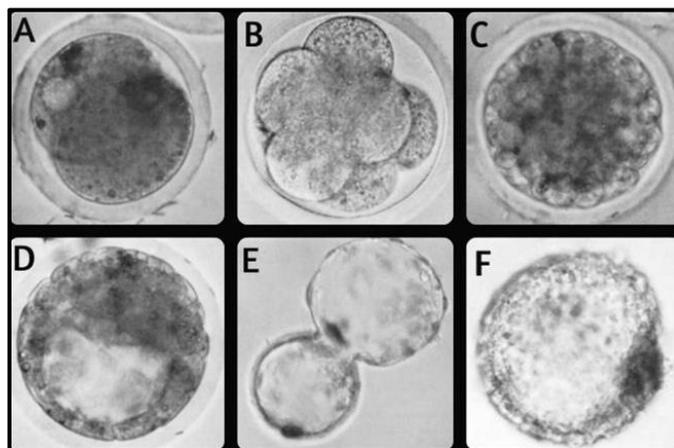
Cuadro 1. Código de estadio numérico de acuerdo a la IETS.

Código de estadio de desarrollo	Estadio	Día	Hora
1	Embrión de 1 célula, no activado	1	12
2	Embrión de 2-8 células	2-3	24-72
3	Embrión en mórula temprana	4	96
4	Embrión en mórula compacta	4-5	96-120
5	Blastocisto temprano	6	144
6	Blastocisto tardío	6-7	144-168
7	Blastocisto expandido	7	168
8	Blastocisto eclosionado*	8	192
9	Blastocisto eclosionado-expandido*	10	216
10	Fragmentado	1-10	24-192

Fuente: Códigos de estadios de desarrollo numéricos de acuerdo al Manual de IETS (Stringfellow y Givens, 2011) con modificaciones para la cronología del desarrollo embrionario de ovinos descrito por Winterberger-Torres y Sevellec (1987) (ver Figura 6).

* Este estadio no puede ser evaluado en este proyecto, debido a que los embriones carecen de ZP. Aún no se han descrito parámetros de evaluación para este tipo de embriones.

Figura 6. Desarrollo embrionario *in vitro* en ovino.



Fuente: Baril *et al.* (1995).

(A) Estadio diploide, primera segmentación. **(B)** Estadio de 8 células. **(C)** Estadio de mórula. **(D)** Blastocisto temprano con blastocele visible. **(E)** Blastocisto expandido eclosionando. **(F)** Blastocisto eclosionado sin ZP.

Cuadro 2. Código numérico de calidad morfológica de acuerdo a la IETS.

Código morfológico	Calidad	Descripción
1	Excelente	Masa embrionaria simétrica y esférica, con blastómeros individuales, uniformes en tamaño, color y densidad. Este embrión coincide con la etapa de desarrollo esperado. Las irregularidades deben ser relativamente menores y el 85% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable. Este criterio debe basarse en el porcentaje de fragmentos liberados.
2	Buena	Irregularidades moderadas en la forma total de la masa embrionaria y/o en el tamaño, color y densidad de los blastómeros. Por lo menos, el 50% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable.
3	Mala	Irregularidades importantes en la forma total de la masa embrionaria y/o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Al menos, el 25% del material celular debe ser una masa embrionaria intacta y viable.
4	Degenerado	Embriones de una sola célula, ovocitos o embriones deteriorados o no viables.

Fuente: Códigos de calidad morfológica numérica de acuerdo al Manual de IETS (Stringfellow y Givens, 2011)

11.3. Evaluación de la fragmentación embrionaria.

De acuerdo a la clasificación de embriones por tipo de fragmentación propuesta por Stone *et al.* (2005), a las 192 horas se identificaron morfológicamente aquellos con fragmentación tipo IV que presentaron fragmentos grandes, y los cuales abarcaron más del 50% del volumen embrionario; o aquellos que, a las 24 horas, presentaron más de ocho segmentaciones. Todos estos fueron considerados como morfológicamente no viables.

11.4. Evaluación de la viabilidad embrionaria y conteo nuclear.

Mediante una doble tinción, se pudieron evaluar dos criterios importantes de un embrión en estadio de mórula y blastocisto (estadios transferibles):

- Tasa de viabilidad embrionaria.
 - Blastómeros viables por mórula y blastocisto.

-
-
- Embriones viables: $\geq 75\%$ de blastómeros vivos.
 - Relación entre el número de blastómeros y el número de núcleos.
 - Relación 1:1 entre núcleo y blastómero.
 - Tasa de fragmentación individual⁹
 - Tasa de multinucleación.
 - Tasa de blastómeros normales.

Para llevar a cabo esta evaluación, se preparó una doble tinción, utilizando una solución de Hoechst 33342: 5 $\mu\text{g/mL}$, disuelta en 1 mL de DPBS con 1 g/L de PVA. Se tomó 1 μL de esta solución para añadirla a un stock madre de 300 $\mu\text{g/mL}$ de yoduro de propidio, disuelto en 1 mL de DPBS (Rodríguez-Suástegui, 2012; Moreira *et al.*, 2001).

Una vez realizadas las evaluaciones morfológicas previas, a las 192 horas de cultivo *in vitro*, los embriones se retiraron de la incubadora y se lavaron tres veces en DPBS, posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 4% por 20 minutos. Transcurrido este tiempo, los embriones se volvieron a lavar en DPBS, para después colocarlos en una microgota de 20 μL de doble tinción en total oscuridad. La caja se incubó durante 10 minutos. Los embriones teñidos se lavaron tres veces en 700 μL de medio DPBS. Para el montaje de los embriones, éstos se colocaron sobre un portaobjetos, donde se les retiró la mayor cantidad de medio. Se agregó 1 μL de medio de montaje (1:1 v/v, glicerol/DPBS) y se protegieron con un cubreobjetos, finalmente sus orillas fueron selladas con esmalte cosmético (Rodríguez-Suástegui, 2012).

Los embriones fueron evaluados bajo un microscopio de epifluorescencia, para ello, la contabilización de núcleos se realizó cuando estos emitieron una coloración azul, por efecto, del Hoechst al ser observados con un filtro UV-2A (longitud de onda: 330-380 nm). Las células dañadas o muertas se identificaron cuando éstas presentaron una coloración roja por la exposición del yoduro de propidio en un filtro G-2A (longitud de onda: 510-560 nm) (Ptak *et al.*, 2006). Los aspectos evaluados con sus respectivos parámetros se describen en el siguiente cuadro:

⁹ Fragmentación no identificada visualmente, sino que es observa a partir de tinciones en embriones individuales.

Cuadro 3. Evaluación de la viabilidad embrionaria y conteo nuclear.

Aspecto de viabilidad evaluado	Colorante fluorescente indicador	Parámetro
Relación núcleo / blastómero	Hoechst	- Conteo de núcleos por embrión - Blastómeros multinucleados, fragmentados y normales (correlación 1:1)*
Viabilidad: Blastomérica y embrionaria	Yoduro de propidio	- Conteo de blastómeros viables por embrión: mórulas y blastocistos - Conteo total de embriones viables

Fuente: Elaboración propia

*Estas características fueron determinadas a partir de la relación núcleo-blastómero.

XI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Siguiendo el estudio de Rodríguez-Suástegui (2012), la comparación entre ambos grupos (control y experimental) se realizó bajo la prueba de chi-cuadrada (χ^2), con un nivel de confianza de 0.05. Además, los resultados se expresaron con media y desviación estándar, para tal fin se consideraron los siguientes parámetros:

- Segmentación: Porcentaje de embriones divididos por grupo.
- Estadio de desarrollo embrionario: Porcentaje de estadios identificados por horas.
- Morfología embrionaria: Porcentaje de embriones clasificados en código 1, 2, 3 o 4 por horas.
- Fragmentación embrionaria tipo IV: Porcentaje de embriones fragmentados a las 192 horas.
- Viabilidad embrionaria: Porcentaje de blastómeros y embriones vivos

Para correlacionar el criterio de calidad morfológica con la viabilidad y blastómeros normales en mórulas y blastocistos, se aplicó una prueba de Pearson con un nivel de confianza de 0.05.

Ambas pruebas se realizaron con el paquete estadístico NCSS versión 2007.

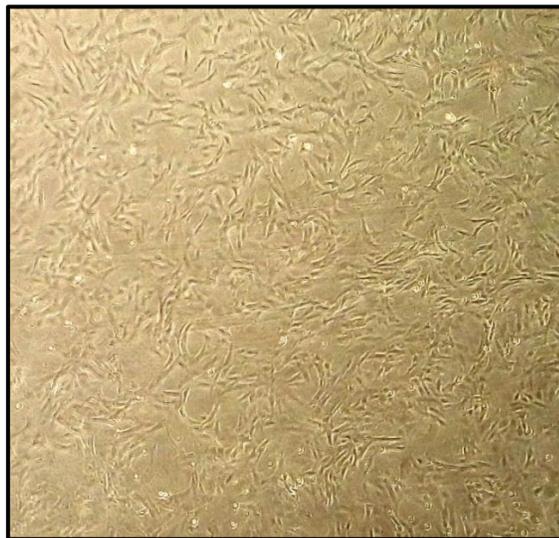
XII. RESULTADOS.

1. Deriva de fibroblastos de *O. c. mexicana post mortem*.

A partir de un 1 cm² de tejido de piel de la zona basal posterior de la oreja de un borrego cimarrón macho adulto (*O. c. mexicana*) colectado a las cuatro horas *post mortem*, se derivaron fibroblastos en cultivo primario, que se llevaron a 5° pasaje celular con una confluencia mayor a 80% de la superficie de la caja de cultivo (Figura 7).

Cada caja de cultivo confluyente mantuvo una concentración celular promedio de 991,000 fibroblastos en 3 mL de medio. Durante cada experimento de clonación se utilizó una alícuota de 50 µL de células en suspensión (aproximadamente 16,500 fibroblastos). Finalmente, para la formación de tripletes se utilizaron 0.5 µL de esta nueva suspensión (40 fibroblastos). Alrededor del 90% de los fibroblastos presentaron morfología normal, tamaño simétrico, sin presencia de cuerpos picnóticos o vacuolas, considerándolos candidatos para ser los carioplastos en cada clonación.

Figura 7. Fibroblastos de *Ovis canadensis mexicana post-mortem* macho adulto.

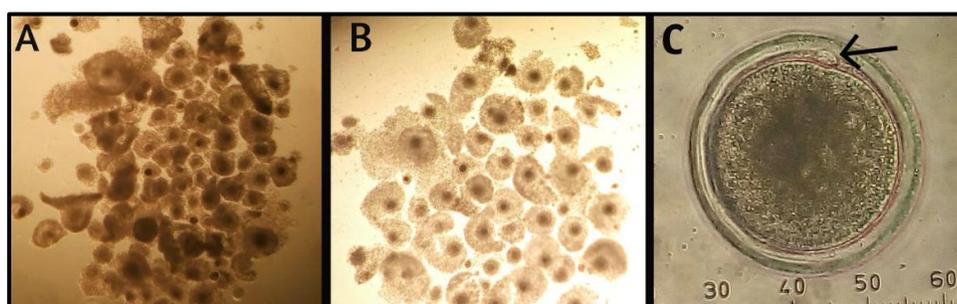


Fibroblastos del 5° pasaje que presentan 100% de confluencia. Microscopio invertido, aumento 20X.

2. Obtención y maduración *in vitro* de ovocitos.

De 567 ovarios de *O. aries* colectados de rastro, se obtuvo por aspiración-punción folicular un total de 2,374 ovocitos, recuperándose en promedio 4.2 ovocitos por ovario. De acuerdo a los parámetros de clasificación de morfología ovocitaria del ASEBIR (2015), 798 ovocitos (33.6%) fueron considerados con morfología normal, por lo que únicamente en ellos se evaluó la tasa de MIV basada en dos criterios: la expansión de las células de cúmulo (90.9%), y la presencia del primer CP (87.3%) (Figura 8), sin haber diferencias estadísticamente significativas entre ambos criterios de maduración ($P > 0.05$) (Cuadro 4).

Figura 8. Maduración *in vitro* de ovocitos *O. aries*



(A) Complejos Ovocito Cúmulo (COC) obtenidos de *O. aries* observados en campo claro. (B) COC posterior a 21 horas de MIV con expansión de las células del cúmulo, microscopio estereoscópico aumento a 2X. (C) MIV por presencia del primer cuerpo polar (→), microscopio invertido, aumento a 40X.

Cuadro 4. Obtención y MIV de ovocitos de *Ovis aries*.

Ovarios		Ovocitos			MIV	
		Tasa de obtención	Obtenidos	Morfología Normal (%)	Expansión cúmulo (%) [*]	Con CP (%) [*]
Total	567	-	2374	798 (33.6)	725 (90.9) ^a	697 (87.3) ^a
$\bar{x} \pm DE$	56.7 \pm 20.4	4.2 \pm 0.9	237.4 \pm 86.9	79.8 \pm 21.2	72.5 \pm 20.6	69.7 \pm 22.4

Fuente: Elaboración propia

$\bar{x} \pm DE$: Media \pm Desviación estándar, MIV: Maduración *in vitro*, CP: Cuerpo polar.

* Los porcentajes fueron obtenidos a partir de los ovocitos clasificados con morfología normal.

^{a,b} Literales similares en la fila no indican diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

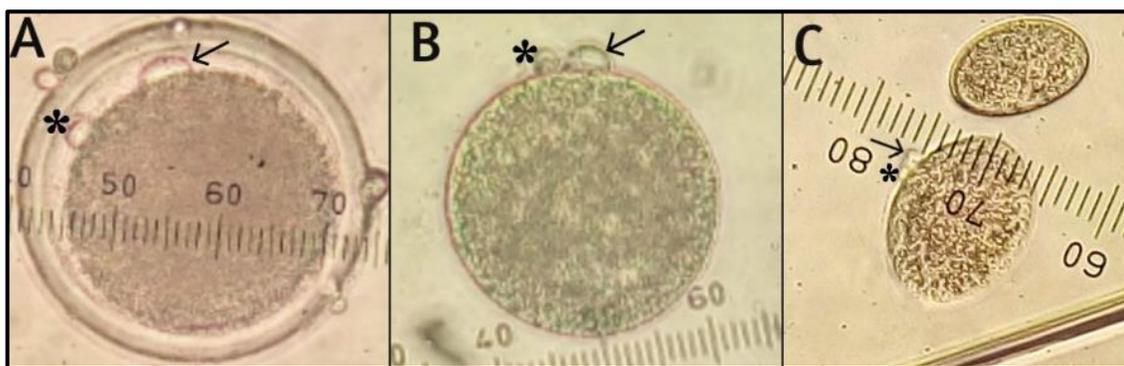
Los datos desglosados por experimento están en el Anexo 1 y 2.

3. Producción y evaluación de embriones.

3.1. Obtención de citoplastos de *O. aries* para clonación manual.

Dentro de los primeros pasos de la clonación manual es indispensable la formación de citoplastos que serán los receptores de la célula somática. Éstos fueron obtenidos a partir de ovocitos que presentaron el primer CP y como posterior a la incubación en demecolcina (Figura 9) El total de ovocitos utilizados para la formación de citoplastos fue de 492, de los cuales 456 (92.6%) fueron enucleados utilizando micronejadora y 392 (79.6%) se reconstituyeron a su forma esférica. Entre estos dos procesos existieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Cuadro 5).

Figura 9. Obtención de citoplastos de *O. aries*.



(A) Primer Cuerpo Polar (*) y cono (→) en ovocito con ZP. (B) Primer CP y cono de ovocito denudado. (C) Corte y obtención de citoplasto. Microscopio invertido, aumento a 40X y 20X.

Cuadro 5. Eficiencia de la obtención de citoplastos de *O. aries* para clonación manual.

	Ovocitos		Citoplastos
	MIV (CP)	Enucleados (%)	Reconstituidos (%)
Total	492	456 (92.6) ^a	392 (79.6) ^b
$\bar{x} \pm DE$	49.2 \pm 16.2	45.6 \pm 16.2	39.2 \pm 10.5

Fuente: Elaboración propia

MIV: Maduración *in vitro*, CP: Cuerpo polar, $\bar{x} \pm DE$: Media \pm Desviación estándar.

^{a,b} Literales diferentes en la fila indican diferencias estadísticamente significativas entre los procesos ($P < 0.05$).

Estos datos desglosados están por experimento en el Anexo 3.

3.2. Producción de embriones, segmentación y fragmentación.

Para simplificar términos, el grupo experimental de embriones clones de *O. c. mexicana* se representará con la abreviatura **GE** y el grupo control de embriones partenogenéticos de *Ovis aries* como **GC**:

GE: Grupo experimental.

GC: Grupo control.

La producción de embriones se inició con un total de 175 tripletes reconstruidos para GE y 122 ovocitos para GC. Conforme a la segmentación, que corresponde al primer parámetro de calidad embrionaria a evaluar, 160 tripletes de GE (91.4%) reconstruidos presentaron, por lo menos, una división embrionaria, mientras que para GC fueron 102 (83.6%), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P > 0.05$) (Figura 10). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo de blastocistos entre GE ($n=25$, 14.2%) y GC ($n=24$, 19.6%) ($P > 0.05$).

Finalmente, la fragmentación embrionaria tipo IV se detectó en 52 embriones (29.7%) para GE y 22 (18.0%) para GC, con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P < 0.05$) (Cuadro 6).

Figura 10. Primera segmentación embrionaria.



Embrión partenogenético de *O. aries* llevando a cabo su primera segmentación a las 24 horas de cultivo. Microscopio invertido, aumento a 40X.

Cuadro 6. Producción de embriones, segmentación y fragmentación.

Grupo	Total	Embriones n (%)		
		Segmentados	Blastocistos	Fragmentados (Tipo IV)
Experimental: Clones <i>O. c. mexicana</i>	175**	160 (91.4) ^a	25 (14.2) ^a	52 (29.7) ^a
$\bar{x}\pm DE$	(17.5 \pm 4.8)	(16.0 \pm 4.4)	(2.5 \pm 1.3)	(5.2 \pm 2.3)
Control: Partenogénéticos <i>O. aries</i>	122***	102 (83.6) ^a	24 (19.6) ^a	22 (18.0) ^b
$\bar{x}\pm DE$	(12.2 \pm 6.2)	(10.2 \pm 6.3)	(2.4 \pm 1.4)	(2.2 \pm 2.3)

Fuente: Elaboración propia

$\bar{x}\pm DE$: Media \pm Desviación estándar.

** Total de reconstruidos.

*** Total de cultivados.

^{a,b} Literales diferentes en la columna indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (P<0.05).

Los datos están desglosados por experimento en el Anexo 4 y 5.

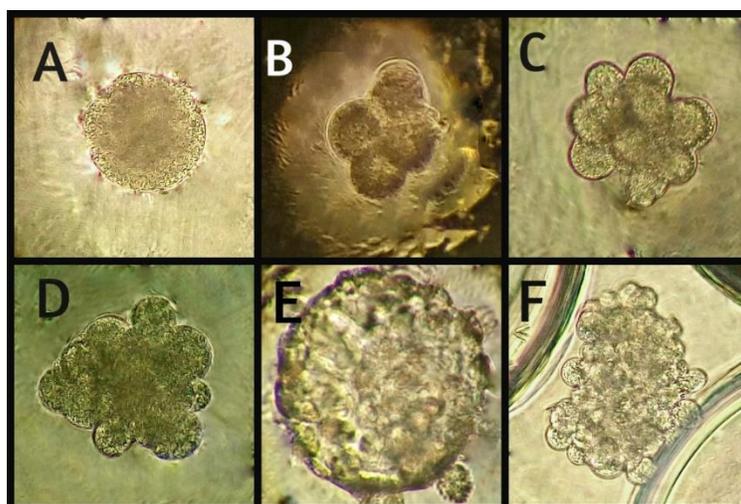
3.3. Estadio embrionario.

Según el código numérico de estadios embrionarios propuestos por la IETS (2011), se evaluó el desarrollo a las 24, 96 y 192 horas de cultivo (Figura 11). De acuerdo a esto, se observó lo siguiente: en ambos grupos, la mayoría de los embriones realizaban, al menos, una división celular, dentro de las primeras 24 horas, que los colocaban en los estadios de 2 a 8 células (GE 61% vs. GC 70%), la mayor proporción de mórulas se obtuvo a las 96 horas en ambos grupos (GE 33% vs. GC 35%) y, finalmente, el estadio de blastocisto se observó hasta las 192 horas. (GE: 14% vs. GC: 20%). Todo esto sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre grupos (P>0.05).

Los datos indican, además, que hay un bloqueo del desarrollo embrionario en ambos grupos durante el estadio de 2 a 8 células (GE 22% vs. GC 22%) y el estadio de mórula (GC 25% vs. GC 24%) evaluado a las 192 horas, lo cual no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (P>0.05).

La fragmentación embrionaria tipo IV se detectó desde las primeras 24 horas, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los tres tiempos evaluados en ambos grupos: GE y GC (24 horas: 7% vs. 1%; 96 horas: 29% vs. 15%; 192 horas: 30% vs. 18%, respectivamente) (Gráfico 1).

Figura 11. Estadios del desarrollo de embriones clones de *O. c. mexicana*.



(A) Triplete no segmentado (96 horas de cultivo). (B) Estadio de 2-8 células (24 horas). (C) Mórula temprana (96 horas). (D) Mórula compacta (96 horas). (E) Blastocisto temprano (192 horas). (F) Embrión fragmentado (24 horas). Microscopio invertido, aumento a 40X.

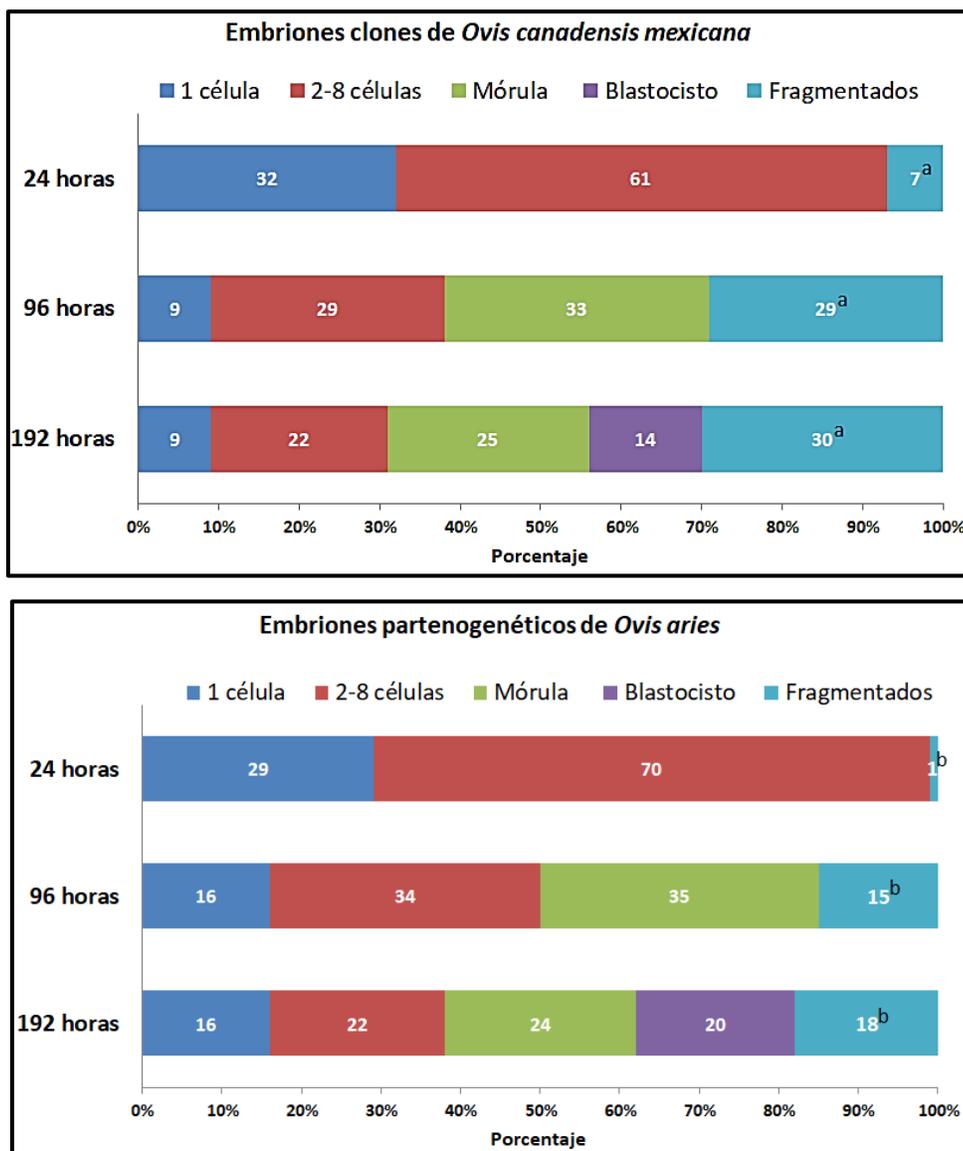
3.4. Morfología embrionaria.

De las cuatro categorías evaluadas a las 24, 96 y 192 horas de cultivo, se determinó que la calidad morfológica se correlaciona negativamente con el tiempo de cultivo de DEIV, ya que, mientras éste avanza, la calidad de los embriones va disminuyendo progresivamente.

Por lo cual a pesar de observar a las 24 horas un alto porcentaje de embriones calidad 1: «Excelente» (GE 69% vs. GC 58%) y 2: «Buena» (GE 30% vs. GC: 34%), esta hora no es la más adecuada para realizar una valoración y predicción morfológica adecuada, debido a que, a partir de las 96 horas, la calidad 1 disminuye considerablemente (GE 2% vs. GC 9%) mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P < 0.05$) mientras que la calidad 2 se mantiene estable (GE 30% vs. GC 34%). Al mismo tiempo, la calidad 3: «Malo» (GE 49% vs.

GC 35%) y 4: «Degenerado» (GE 19% vs. GC 22%) aumentan, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Gráfico 1. Determinación del estadio de desarrollo embrionario a las 24, 96 y 192 horas de cultivo.



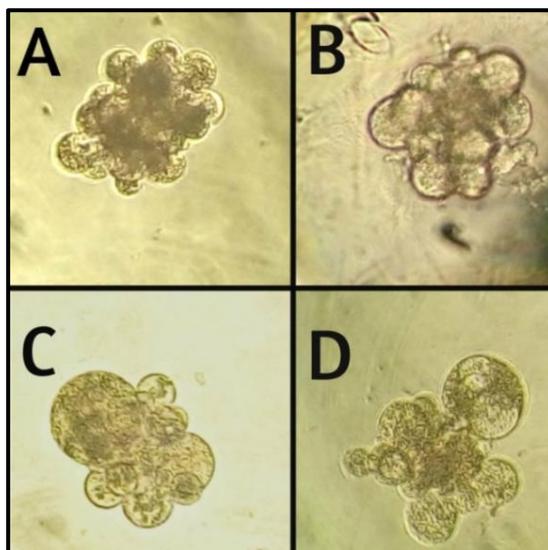
Fuente: Elaboración propia

* Los códigos fueron agrupados para unificar valores, de manera que el estadio de mórula comprende a los códigos de mórula temprana (3) y compacta (4). Mientras que el estadio de blastocisto comprende a los códigos de blastocisto temprano (5), tardío (6) y expandido (7), de acuerdo al Manual de IETS. ^{a,b} Literales diferentes en estadio indican diferencias estadísticamente significativas entre las mismas horas de ambos grupos ($P < 0.05$). Los datos están desglosados en formato de cuadro en el Anexo 6.

A las 192 horas se observan las calidades definitivas de los embriones con una proporción equitativa entre todas las categorías, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P>0.05$).

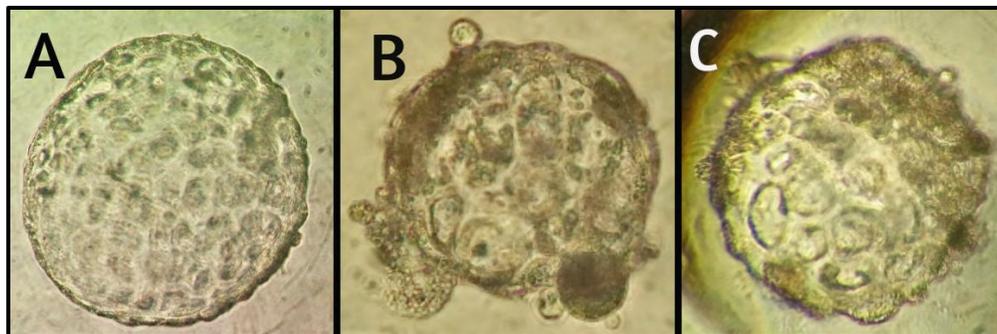
Finalmente, en el estadio de mórula, a las 96 horas se determinaron las 4 categorías de calidad morfológica («Excelente», «Buena», «Mala» y «Degenerado») (Figura 12). En tanto, para los blastocistos se identificaron únicamente las 3 primeras categorías a las 192 horas (Figura 13).

Figura 12. Calidad morfológica de mórulas clones *O. c. mexicana*.



(A) Mórulas clasificadas a las 96 horas de cultivo como Calidad 1: «Excelente». (B) Calidad 2: «Buena». (C) Calidad 3: «Mala». (D) Calidad 4: «Degenerado». Microscopio invertido, aumento 40X.

Figura 13. Calidad morfológica de blastocistos clones *O. c. mexicana*.



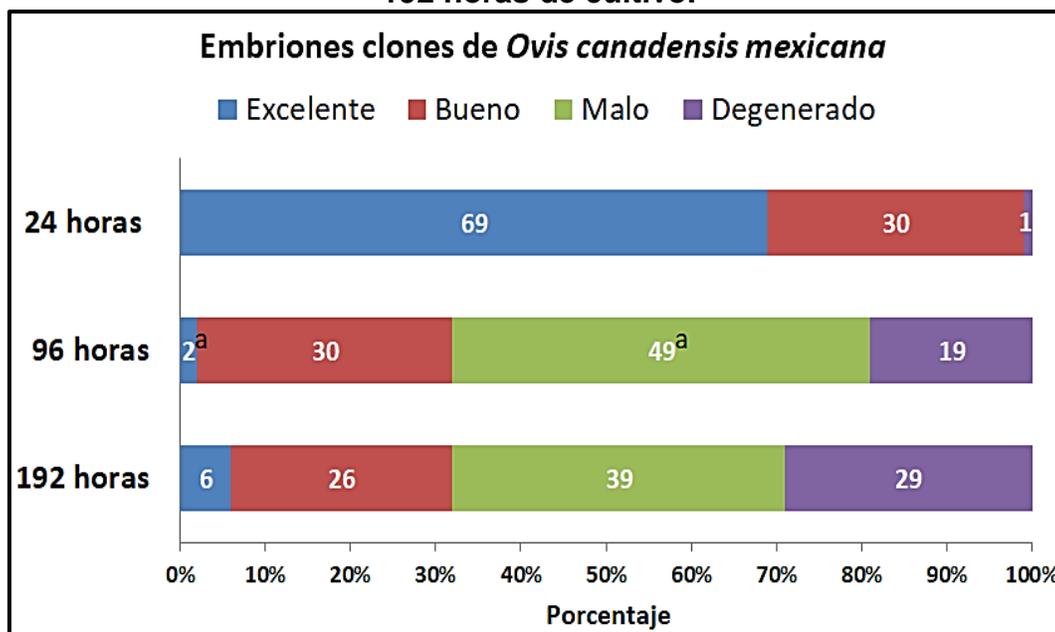
Blastocistos a las 192 horas de cultivo. (A) Calidad 1: «Excelente». (B) Calidad 2: «Buena». (C) Calidad 3: «Mala». Microscopio invertido, aumento 40X.

Tomando en cuenta que, de las 96 a las 192 horas, la calidad de los embriones se mantienen constantes y que, en este tiempo, se desarrolla el estadio de mórula (estadio de transferencia embrionaria), se puede considerar a este lapso y estadio como adecuados para predecir la calidad morfológica de los embriones clones, con un alto grado de confiabilidad, esto es, con potencial de formar blastocistos de buena calidad (Gráfico 2).

3.5. Viabilidad y conteo nuclear.

Los estadios de mórula (96 horas de cultivo) y blastocisto (192 horas de cultivo), los cuales ya se consideran transferibles, fueron evaluados para determinar su viabilidad y para el conteo de núcleos.

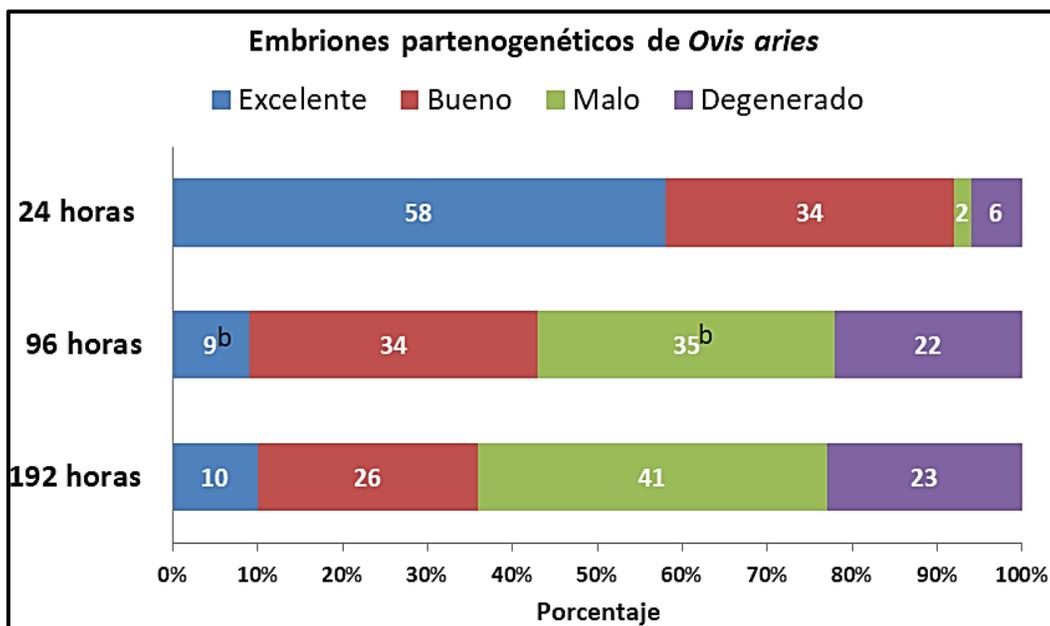
Gráfico 2. Determinación de la calidad morfológica embrionaria a las 24, 96 y 192 horas de cultivo.



Fuente: Elaboración propia

^{a,b} Literales diferentes en estadio indican diferencias estadísticamente significativas entre las mismas horas de ambos grupos ($P < 0.05$).

Los datos desglosados en formato de cuadro están en el Anexo 7.



Fuente: Elaboración propia

^{a,b} Literales diferentes en estadio indican diferencias estadísticamente significativas entre las mismas horas de ambos grupos ($P < 0.05$).

Los datos desglosados en formato de cuadro están en el Anexo 7.

3.5.1. Viabilidad de los blastómeros en mórulas.

Para determinar la viabilidad de los blastómeros, se evaluaron 13 mórulas clones de *O. c. mexicana* y 15 mórulas partenogenéticas de *O. aries*.

El promedio de blastómeros viables por embrión fue de 95.4% en mórulas de GE calidad 1, en comparación, con las calidades 2, 3 y 4 (76.9, 59.3 y 15%, respectivamente), donde fueron menores. Esta misma tendencia se observó en las mórulas de GC (96.5, 82.5, 33.3 y 0% para la calidad 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) para las calidades 3 y 4.

Posteriormente, se realizó una prueba de Pearson para correlacionar la proporción de blastómeros viables con la calidad morfológica, dando como resultado para GE una $r = 0.937$, la cual indica que la correlación es positiva entre las variables, así a mejor calidad morfológica, la proporción de blastómeros viables aumenta. Lo mismo sucedió para GC con una $r = 0.869$ (Cuadro 8).

Cuadro 7. Evaluación de viabilidad, conteo nuclear y blastómeros normales en estadio de mórula (96 horas).

Grupo	Calidad IETS	Blastómeros					
		Totales	Viables n (%)	Núcleos presentes	Multinucleados	Fragmentados	Normales n (%)
Grupo experimental: clones de <i>O. c. mexicana</i> (n=13)	1	11.8±2.7	11.2±2.4 (95.4)	18.4±8.2	1.8±1.9	0.4±0.9	9.6±3.7 (79.7)
	2	20±2	15.3±1.5 (76.9)	12.0±4.0	0.7±0.6	8.3±5.7	11.0±4.6 (55.9)
	3	10±1.7	6.0±1.7 (59.3) ^a	3.3±1.2	0±0	6.7±1.5	3.3±1.2 (33.3) ^a
	4	13±4.2	1.5±2.1 (15.0) ^a	3.0±1.4	0.5±0.7	10.5±4.9	2.0±0.0 (16.3) ^a
			\bar{x} : 13.7		\bar{x} :0.92 ^a (6.7%)	\bar{x} :5.2 ^a (37.9%)	
Grupo control: partenogénéticos <i>O. aries</i> (n=15)	1	14.5±8.8	14.2±9.1 (96.5)	10.8±2.4	0.5±0.8	4.2±2.2	9.8±1.8 (82.1)
	2	13.8±5.7	11.5±4.9 (82.5)	14.7±5.8	2.2±2.2	2.0±2.8	9.7±5.1 (68.9)
	3	13.5±6.4	6.0±8.5 (33.3) ^b	9±0	1.0±1.4	5.5±7.8	2.5±3.5 (19.6) ^b
	4	14±0	0±0 ^b	3±0	0±0	11±0	0±0 ^b
			\bar{x} : 13.9		\bar{x} :1.2 ^a (8.6%)	\bar{x} :3.9 ^a (28%)	

Fuente: Elaboración propia

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (2011).

\bar{x} ±DE: Media ±Desviación estándar.

^{a,b} Literales diferentes en la fila indican diferencias estadísticamente significativas entre los códigos de calidad morfológica entre los grupos (P<0.05).

Datos desglosados por mórula en el Anexo 8.

0

3.5.2. Conteo de núcleos en el estadio de mórula (96 horas).

Se realizó el conteo de núcleos para determinar la tasa de blastómeros multinucleados, fragmentados y normales (relación núcleo: blastómero/1:1). En cuanto al proceso de multinucleación (Figura 14), se determinó que, a excepción de la calidad 3 en mórulas clones y 4 en mórulas partenogenéticas, todas las demás calidades presentaron blastómeros multinucleados. El promedio fue mayor para la calidad 1 en los clones (1.8 blastómeros multinucleados) y para la calidad 2 en partenogenéticos (2.2 blastómeros multinucleados). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre los grupos (Cuadro 7).

Con relación a la fragmentación embrionaria (Figura 15), ésta se presentó en todas las calidades, con un promedio de 0.4 a 10.5 fragmentos por embrión, en GE y 2.0-11.0 en GC. Sin diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre los grupos.

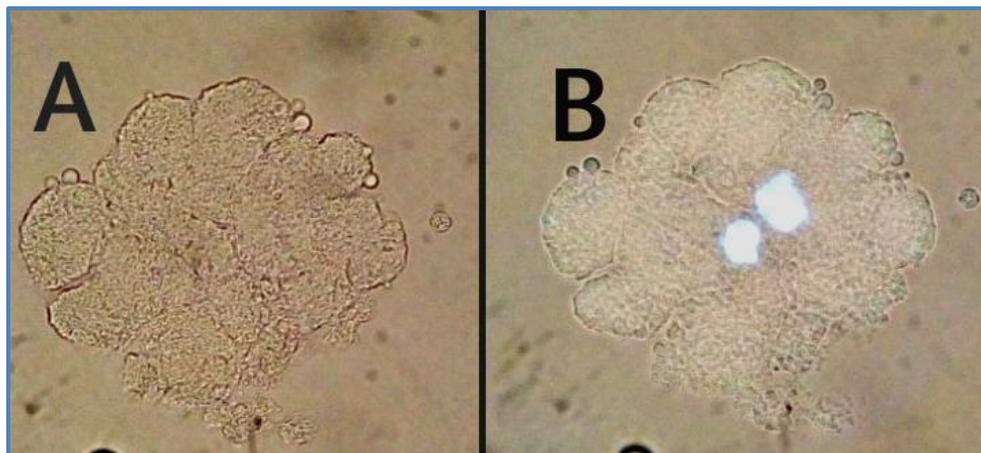
El porcentaje de blastómeros normales (caracterizados por la relación núcleo: blastómero/1:1), no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P > 0.05$) para la calidad 1 (GE 79.7% vs. GC 82.1%) y calidad 2 (GE 55.9% vs. GC 68.9%). Caso contrario a la calidad 3 (GE 33.3% vs. GC 19.6%) y calidad 4 (GE 16.3% vs. GC 0%) donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Cuadro 7).

Figura 14. Multinucleación en mórula clon de *O. c. mexicana* a las 96 horas.



(A) Mórula observada en campo claro con 18 blastómeros asimétricos. **(B)** 7 núcleos teñidos con Hoechst y un blastómero multinucleado (3 núcleos) (*), fragmentos citoplasmáticos (x) y un blastómero no viable teñido con Yoduro de Propidio (→). Microscopio de epifluorescencia, aumento 40X.

Figura 15. Fragmentación en embrión clon de *O. c. mexicana* a las 96 horas.



(A) Embrión con 21 “blastómeros” observados en campo claro. **(B)** Se observan, además, dos núcleos teñidos con Hoechst. Microscopio de epifluorescencia, aumento 40X.

La correlación de Pearson establecida para la proporción de blastómeros normales *versus* la calidad morfológica mostró una correlación positiva, al obtener una $r = 0.845$ para GE y $r = 0.778$ para GC. Lo cual indica que a mejor calidad morfológica mayor proporción de blastómeros normales (Cuadro 8).

Cuadro 8. Correlación de la viabilidad y blastómeros normales con la calidad de la IETS en estadio de mórula (96 horas).

Grupo	Proporción de blastómeros viables $r =$	Proporción de blastómeros normales $r =$	Correlación de Pearson
Grupo experimental: clones de <i>O. c. mexicana</i> n=13	0.937	0.845	Calidad Morfológica
Grupo control: partenogénéticos de <i>O. aries</i> n=15	0.869	0.778	

Fuente: Elaboración propia

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (2011).

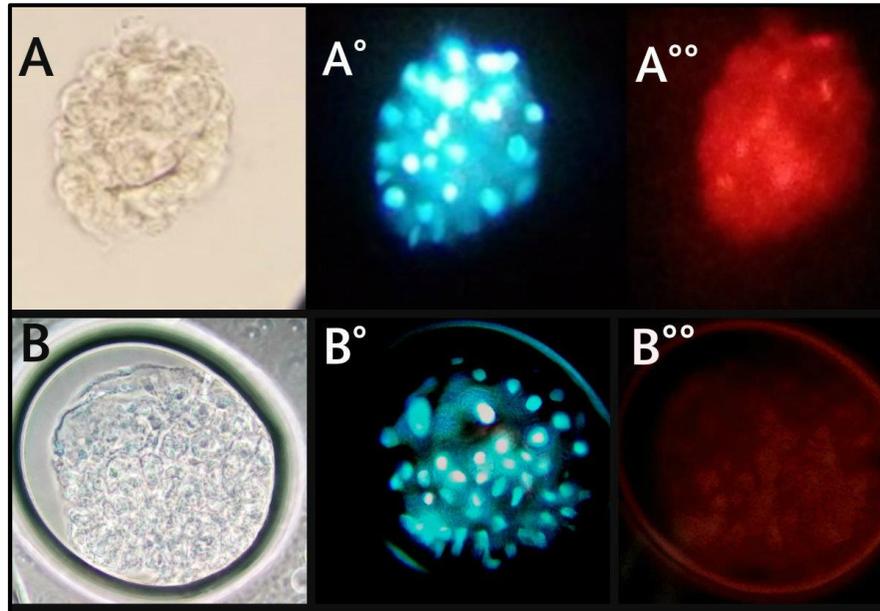
$r =$ Correlación de Pearson con un nivel de confianza de 0.05.

Datos desglosados por mórula en el Anexo 9.

3.5.3. Viabilidad del estadio de blastocisto (192 horas).

Se evaluó la viabilidad de 12 blastocistos clones de *O. c. mexicana* (Figura 16) y 14 blastocistos partenogénéticos de *O. aries* (Figura 17) (Cuadro 9).

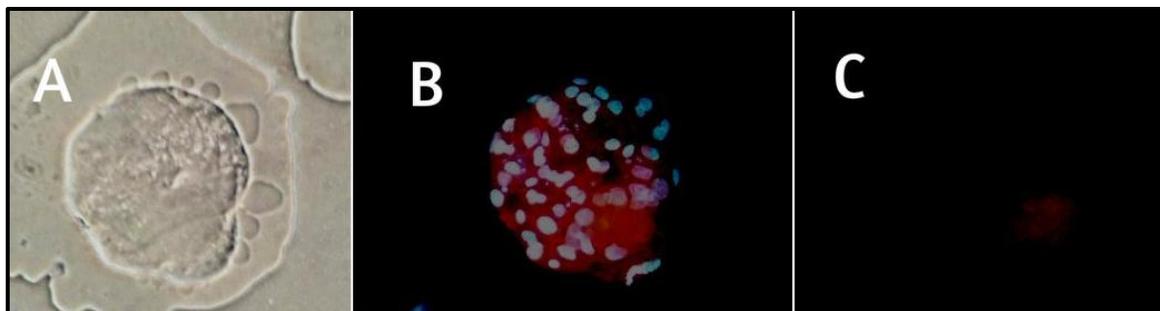
Figura 16. Viabilidad y conteo nuclear de blastocistos clones de *O. c. mexicana*.



A. Blastocisto temprano observado en campo claro (192 horas), (**A°**) mostrando 49 núcleos teñidos con Hoechst y (**A°°**) 11 núcleos no viables identificados con la tinción de Yoduro de Propidio. Microscopio de epifluorescencia, aumento a 20X.

B. Blastocisto temprano observado en campo claro (216 horas), (**B°**) mostrando 64 núcleos teñidos con Hoechst. (**B°°**) La tinción de Yoduro de Propidio no muestra blastómeros no viables. Microscopio de epifluorescencia, aumento a 40X.

Figura 17. Viabilidad y conteo nuclear de blastocisto partenogénético de *O. aries*.



(A) Blastocisto temprano observado en campo claro (192 horas), **(B)** con 67 núcleos teñidos con Hoechst. **(C)** La tinción de Yoduro de Propidio no muestra blastómeros no viables. Microscopio de epifluorescencia a 20X.

Cuadro 9. Viabilidad en estadio de blastocisto (192 horas).

Grupo	Blastocistos evaluados	Calidad morfológica IETS	Proporción de viabilidad celular	r =
Grupo Experimental:	5	1	0.95	0.913
Clones <i>O. c. mexicana</i>	5	2	0.85	
	2	3	0.71	
Grupo Control:	6	1	0.95	0.945
Partenogénéticos	6	2	0.85	
<i>O. aries</i>	2	3	0.74	

Fuente: Elaboración propia

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
r = Correlación de Pearson con un nivel de confianza de 0.05.
Datos desglosados por blastocisto en el Anexo 10.

De acuerdo a la correlación de Pearson, GE tuvo una $r = 0.913$, mientras que GC tuvo una $r = 0.945$, lo cual indica que ambos grupos tuvieron una correlación positiva, es decir, a mejor calidad morfológica, la proporción de blastómeros viables aumenta (Cuadro 9).

La media de núcleos presentes en los blastocistos de GE fue de 46.7 ± 8.1 , mientras que para GC fue de 44.2 ± 9.9 , sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P > 0.05$).

3.5.4. Viabilidad embrionaria.

Fue determinada a partir del número de embriones que poseían $\geq 75\%$ de blastómeros vivos.

El porcentaje de embriones viables en estadio de mórula mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), con un 53.8% para GE y 80% para GC (Cuadro 12). En el estadio de blastocisto no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P > 0.05$), con un 83.3% de viabilidad para GE y 84.6% para GC, como puede apreciarse en el siguiente cuadro:

Cuadro 10. Viabilidad embrionaria

Grupo	Estadio embrionario	Embriones: Viables / totales (%)
Experimental: clones	Mórula	7/13(53.8) ^a
<i>O. c. mexicana</i>	Blastocisto	10/12(83.3) ^a
Control: partenogénéticos	Mórula	12/15(80) ^b
<i>O. aries</i>	Blastocisto	11/13(84.6) ^a

Fuente: Elaboración propia

^{a,b} Literales diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (P<0.05).

XIII. DISCUSIÓN.

Los avances en las investigaciones básicas han permitido desarrollar una serie de biotecnologías reproductivas para aumentar el número de descendientes en animales domésticos y silvestres genéticamente selectos, así como de aquellos individuos infértiles o en situación vulnerable (Bertolini y Bertolini, 2009). A pesar de ello, la producción de embriones *in vitro* por FIV, ICSI y TNCS aún no ha alcanzado las eficiencias deseadas, obteniendo en la mayoría de los casos, resultados modestos (Loi *et al.*, 2016). Entre los factores limitantes que se pueden mencionar para las diferentes técnicas están, la calidad ovocitaria, la tasa de MIV, el seguimiento de la dinámica del DEIV, el bloqueo del desarrollo embrionario, etc. Siendo el ovocito el encargado de determinar la mayoría de estos procesos.

Morfología ovocitaria

El ovocito es considerado la célula gestora pilar del desarrollo embrionario preimplantacional, por lo que es materia de intensa investigación, al considerarse que el éxito clínico de las técnicas de reproducción asistida se sustenta prioritariamente en la calidad ovocitaria (Piña-Aguilar, 2012). En la actualidad, no hay reportes detallados acerca de las alteraciones morfológicas ovocitarias y su relación con la producción embrionaria en especies animales, en contraste con la especie humana, donde estas han sido reportadas por el avance de las técnicas de FIV e ICSI en las clínicas de fertilidad (Ingilizova *et al.*, 2014). Concluyendo que, el utilizar ovocitos que presenten alguna alteración morfológica, comprometen el desarrollo y calidad del embrión (Dal canto *et al.*, 2017).

En el presente estudio se obtuvieron 2374 ovocitos (4.2 ovocitos/ovario), de los cuales el 33.6% mostró morfología normal. Faramarzi *et al.* (2017) reportaron 22.8% de ovocitos normales obtenidos de mujeres superovuladas, dato inferior a lo encontrado en esta investigación. Si bien las borregas utilizadas en el presente estudio no fueron superovuladas, diversos factores particulares pudieron haber influido en los resultados obtenidos, entre ellos la alimentación, edad y estado reproductivo de las hembras (Meldrum *et al.*, 2016) o factores externos como la

manipulación y condiciones de transporte de los ovarios hacia el laboratorio (tiempo y temperatura) (Huanca *et al.*, 2007).

La TNCS recomienda la utilización del mayor número de ovocitos disponibles para aumentar el número de obtención de citoplastos y cubrir, así, las pérdidas de ovocitos que ocurren en cada uno de los pasos de la clonación manual. Sin embargo, en la especie ovina hay que considerar que, durante el periodo de ovulación, existe, casi siempre, un solo folículo dominante (ocasionalmente dos o tres), el cual contiene el ovocito adecuado para ovular. Una vez realizado este proceso, los folículos restantes comienzan el proceso de atresia, lo que impacta en la calidad de los ovocitos de estos folículos (Uribe *et al.*, 2009). Si bien la técnica requiere de una gran cantidad de ovocitos, es necesario no tomar en cuenta aquellos que presenten alguna alteración, ya que pueden disminuir la eficiencia de la clonación.

Maduración in vitro de ovocitos

En la mayoría de las hembras de los mamíferos, los ovocitos entran en las primeras etapas de la meiosis durante la vida fetal y se detienen en la etapa de diploteno de la profase I (denominada etapa de vesícula germinal) hasta que se comprometen con la ovulación o la atresia. Con el apoyo de medios artificiales, en la MIV, se estimula la reanudación de la meiosis del ovocito y su progreso a través de ésta, resulta en la detención en la metafase II, con la extrusión del primer cuerpo polar. Dentro de los múltiples criterios para determinar la MIV de un ovocito se encuentran, la expansión de las células del cúmulo, la maduración citoplasmática y la maduración nuclear, siendo la presencia del primer CP una característica de ésta última (Lonergan y Fair, 2016).

La MIV de ovocitos de *O. aries*, en esta tesis, fue evaluada por la expansión de las células del cúmulo (90.9%) y presencia del primer CP (87.3%). En contraste, en ovocitos de ovino obtenidos de ovarios colectados de rastro, Byri *et al.* (2017) reportaron 95% de MIV, bajo el criterio de expansión de las células del cúmulo, utilizando suplementos de medios de cultivo similares al presente estudio,

agregando, además, estradiol¹⁰. Asimismo, lograron aumentar su MIV a 98% suplementando con kisspeptina¹¹. Si bien, el resultado de estos autores es ligeramente superior a lo encontrado en este trabajo, no precisan el número de ovocitos obtenidos por ovario ni sus características. También reportaron un 80% de MIV utilizando como criterio la presencia del primer CP, lo que es ligeramente inferior a lo aquí encontrado. Estos autores demostraron que hay diferencias estadísticamente significativas entre sus dos criterios de MIV, en contraposición de lo obtenido en esta tesis. Ellos argumentan que la causa de sus resultados son los suplementos del medio de MIV, pues, mientras el suero fetal bovino contiene los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para una buena expansión de células del cúmulo, el estradiol genera un efecto negativo sobre la maduración nuclear y, por lo tanto, en la extrucción del primer CP. Por su parte, Hajarian *et al.* (2017) obtuvieron 82.1% de MIV (criterio de expansión) en ovejas Sanjabi durante la época reproductiva, suplementando su medio con 10% de suero fetal ovino, valor inferior a lo aquí reportado. Lo cual puede ser atribuible a la raza ovina de la cual procedieron los ovocitos, así como el tipo de suero utilizado, que difieren a lo implementado en esta tesis. En términos generales, se acepta como adecuada la tasa MIV de ovocitos obtenida en esta tesis.

Deriva de fibroblastos

Para llevar a cabo la clonación manual se necesitan dos células: una que donará la información genética (carioplasto) y otra que la recibirá (citoplasto). Se ha descrito que la calidad del carioplasto está determinada por la viabilidad, tasa de proliferación, longevidad y morfología normal, lo que asegura la integridad genómica del futuro embrión (Singh *et al.*, 2011).

Las células somáticas, comúnmente, utilizadas en clonación como carioplastos son los fibroblastos, por lo que en el presente trabajo se derivaron y cultivaron estas células a partir de una biopsia de piel de oreja de un ejemplar macho de *O. c.*

¹⁰ Es un tipo de hormona estrogénica que influye en los caracteres sexuales secundarios, inducción del celo y aumento de la libido en las hembras (Holy, 1991).

¹¹ La kisspeptina es un péptido de 145 aminoácidos que participa en la regulación de la secreción de la Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Su administración incide en el hipotálamo estimulando la madurez sexual y la ovulación en hembras (Byri *et al.*, 2017).

mexicana, a 4 horas *post mortem*. Singh *et al.* (2011) reportaron que el derivar fibroblastos de piel de oreja de ovino a diferentes intervalos de tiempo *post mortem* puede afectar la proliferación inicial de estas células en cultivo primario. Sin embargo, entre las células obtenidas en fresco y las obtenidas a 56 horas almacenadas a 4 °C, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al crecimiento de la población, los tiempos de duplicación y la morfología celular durante los pasajes posteriores. Esto sugiere que las células con la información genética de un animal *post mortem*, pueden ser rescatadas durante un período de tiempo relativamente largo, para ser cultivadas *in vitro* y que, de esta manera, sean donadoras de núcleos exitosos en clonación. En cuanto a este trabajo la biopsia fue trabajada 4 horas *post mortem*, sin generar dificultades para la deriva celular y su cultivo *in vitro* a este tiempo.

Obtención de citoplastos

La TNCS implica la sustitución del material genético del ovocito por el núcleo de una célula somática, de modo que, el ovocito debe ser enucleado. En el citoplasma de este gameto se almacenan moléculas conocidas y desconocidas que le confieren la capacidad única para reprogramar el núcleo de una célula somática y guiar el desarrollo embrionario temprano hasta la activación del genoma. En este aspecto, el volumen de los citoplastos representa la cantidad de estos materiales disponibles para la reprogramación, los cuales deben conservarse tanto como sea posible durante el proceso de enucleación (Hosseini *et al.*, 2013a).

En la clonación manual la enucleación es realizada mediante un corte con micronavaja; es importante señalar que, durante este proceso, el ovocito recibe un impacto sobre la membrana y el citoesqueleto, haciendo probable que algunos no logren restablecer su forma esférica (Hosseini *et al.*, 2013b). En cuanto a las variables a evaluar en este proceso están, el porcentaje de enucleación (que indica el control y precisión de la técnica por parte del ejecutante) y el porcentaje de citoplastos reconstituidos (que indica el número de ovocitos que tienen la capacidad de restaurar su membrana citoplasmática posterior al corte).

En esta investigación, a partir de 492 ovocitos de *O. aries*, con presencia de cuerpo polar y formación de cono posterior a la incubación en demecolcina, se enuclearon 92.6% de ovocitos, reconstituyéndose el 79.6% de los mismos ($P < 0.05$). En la misma especie, Hosseini *et al.* (2013b), obtuvieron 91.5% de reconstitución, utilizando un método de enucleación ovocitaria que contempla el uso de demecolcina y la aspiración del cono mediante una pipeta. En tanto que Vazquez (2016) reportó el 80% de reconstitución ovocitaria bajo las mismas condiciones que las reportadas en esta tesis. En porcinos, Li *et al.* (2006) reportaron 90% de reconstitución. En bovinos, Rodríguez-Álvarez (2009) reportó 64.4% de ovocitos enucleados y 47.8% de formación de citoplastos. Los valores aquí obtenidos son inferiores a los reportados para la especie ovina y porcina, pero superiores a lo observado en bovinos, por este motivo puede haber diferencias en la reconstitución de ovocitos enucleados atribuibles a la especie y a la variabilidad en la manipulación.

Producción de embriones in vitro

Segmentación

Conforme a la producción de embriones, el primer parámetro a evaluar fue el porcentaje de segmentación¹². Para GE se obtuvo 91.4%, mientras para GC fue de 83.6% ($P > 0.05$).

En ambos grupos se utilizó una estimulación partenogenética mediante la cual se activó un núcleo diploide (2n). La tasa de activación y segmentación dependen de varios factores como, la especie animal de la cual se obtienen los ovocitos, la calidad ovocitaria, el método de activación o el medio de cultivo embrionario utilizado, etc. El envejecimiento del ovocito, es considerado el factor más influyente en la activación-segmentación, debido a que, los ovocitos inmaduros son más difíciles de activar y tienden a la formación de embriones fragmentados, disminuyendo, así, el potencial del ovocito (Vallejo *et al.*, 2003). En cuanto a embriones clones, los factores asociados a una activación partenogenética eficiente son, los tratamientos utilizados para llevar a cabo esta estimulación, el voltaje del pulso eléctrico para la fusión

¹² Aquellos embriones que presentaron al menos un proceso de división durante el tiempo de cultivo embrionario *in vitro*.

celular, el tipo y concentración de agentes químicos encargados de elevar los niveles intracelulares de calcio durante la activación (ionomicina o ionóforo de calcio) o agentes post-tratamiento (citocalasina B o D, ciclohexamida o 6- Dimetilamino purina [6-DMAP]) (Kharche y Birade, 2013).

Al comparar los datos de la segmentación obtenidos en embriones clones de *O. c. mexicana* (GE 91.4%) con los reportados en una especie emparentada (*O. aries*) y, utilizando los mismos agentes activadores (ionóforo de calcio y 6-DMAP), se encontró que, Navarro *et al.* (2016) obtuvieron 68.5% de segmentación, mientras que Vazquez (2016) obtuvo un 89%. Los valores de los autores son inferiores a los obtenidos en esta tesis, pero hay que considerar que, en estos trabajos, se utilizaron medios de cultivo embrionario *in vitro* permanentes (SOF). En un estudio posterior, Vazquez *et al.* (2017), obtuvieron una tasa de segmentación embrionaria en *O. c. mexicana* hembra de 93.3%, utilizando medio secuencial (*Cleavage & Blastocyst*), dato similar al obtenido aquí. Lo cual corrobora la influencia del medio de cultivo en la tasa segmentación embrionaria.

En cuanto a los datos de segmentación embrionaria obtenidos en partenogénéticos de *O. aries* (GC 83.6%) son superiores a lo descrito por Jena *et al.*, (2012) quienes, en embriones partenogénéticos de *Capra hircus*, obtuvieron una tasa de segmentación de 48.2% en el medio permanente mSOF¹³. Los autores, además, evaluaron la importancia de la presencia de la ZP en los embriones partenogénéticos, observando un aumento en la tasa de segmentación (72%) en presencia de la ZP. No obstante, dichos valores siguen siendo inferiores a los aquí obtenidos.

Producción de blastocistos

La producción de blastocistos se evaluó bajo el total de embriones reconstruidos para clones y el total de cultivados para partenogénéticos. Para GE se obtuvieron 14.2% blastocistos de *O. c. mexicana*, similar a lo reportado por Vazquez *et al.* (2017) con un 15% de blastocistos en la misma especie, utilizando fibroblastos de hembra joven. En contraposición, Hosseini *et al.* (2013b) generaron 13.2% de

¹³ modified Synthetic Oviductal Fluid.

blastocistos a partir de fibroblastos de ovino doméstico macho, conservando durante la enucleación, el 95% del volumen citoplasmático del ovocito.

El sexo del donador de la célula somática, su edad y el número del pasaje celular, son variables que pueden determinar la capacidad del fibroblasto para reprogramarse y, de esta forma, mejorar la producción de blastocistos clones. La reprogramación celular consiste en revertir el proceso de diferenciación mediante un cambio inducido en la expresión génica (transcripción), más no en el contenido de sus genes (secuencia de nucleótidos). Esto se logra debido a que, la célula somática aún conserva la información genética necesaria para volverse una célula madre pluripotente. Los factores encontrados en el citoplasma del ovocito son elementos que permiten reactivar estos genes, al regular su actividad transcripcional. Algunos de estos factores son: Oct3/4, Sox2, Nanog, STAT3, β -catenina, c-Myc, Klf4, entre otros, que al dirigir la expresión génica, inducen el estado pluripotente (Yamanaka, 2008).

El sexo como variable de éxito en el desarrollo de blastocistos no ha sido estudiado a fondo, y los resultados aún son contrapuestos. Sandhu *et al.* (2016), en blastocistos de búfalo determinaron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre la competencia de desarrollo y formación de blastocistos de embriones hembras con machos; no obstante, en las hembras el índice apoptótico es superior que en los embriones machos (mayor cantidad de ARNm [Ácido ribonucleico mensajero] del gen pro-apoptótico CASPASA 3), lo que puede relacionarse con las bajas tasas de implantación. Además, determinaron que, en los embriones machos, hay mayor proceso de metilación y acetilación de histonas, lo que resulta importante para la remodelación de la cromatina y, por tanto, para la reprogramación de la célula somática. Según estos autores, en las hembras tales procesos se llevan a cabo en menor proporción, lo que genera aberraciones en las modificaciones epigenéticas en el embrión, y tienen como segundo origen la presencia del transcrito específico del X inactivo (XIST).

En cuanto a la edad del individuo se ha concluido que, las células somáticas fetales y juveniles, tienen tasas superiores de formación de blastocistos, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, sí mejoran la tasa de

nacimiento de crías sanas. La posible explicación de esto es que, en las células adultas, pudieran haberse acumulado mutaciones con el transcurso del tiempo, además de que están más diferenciadas, lo que deriva en la baja capacidad de responder a la reprogramación y en altas probabilidades de fracaso en el desarrollo a largo plazo (Tian *et al.*, 2003).

En cuanto al pasaje celular, Zhang *et al.* (2009), comparando diferentes números de pasajes (P 1-10) de células epiteliales de porcino, demostraron que los pasajes de 3 a 6 generan una mayor tasa de blastocistos clones con un mayor número de células por embrión, el argumento de sus resultados es que, las células de pasajes superiores (P 7-10), experimentan senescencia celular, mutaciones y pérdidas alélicas de genes, por lo que la exposición de la célula a un mayor número de ciclos de división se relaciona con una inapropiada reprogramación y un desarrollo posterior anormal de los embriones clones. Posteriormente, Zhang *et al.* (2013) confirmaron estos datos en la especie ovina, produciendo blastocistos clones a partir de pasajes celulares del 8 al 12 e identificando que, a menor número de pasaje, se produjo una mayor tasa de blastocistos (P 8: 13.8%, P 9: 6.7%, P 10: 6.6%, P 11: 8.6% y P 12: 8.9%). En esta tesis se utilizaron fibroblastos del 5° pasaje, logrando un mayor porcentaje en la formación de blastocistos (14.2%), en contraste a los autores citados.

Un factor adicional que se describió anteriormente, es el tipo de medio de cultivo utilizado en el desarrollo embrionario *in vitro*. La finalidad de estos medios artificiales son la de satisfacer las demandas metabólicas de los embriones simulando los nutrientes proporcionados por los oviductos y el útero. Para ello se han diseñado dos tipos de medio de cultivo: el secuencial y el permanente. El primero se maneja bajo el principio de que el embrión tiene cambios morfológicos y metabólicos antes y después de la compactación, por lo que los componentes del medio deben cambiarse en momentos específicos. En tanto, el medio permanente se emplea bajo la suposición de que el embrión tomará de todos los componentes de la mezcla, aquellos elementos necesarios para continuar su desarrollo. Cabe mencionar que, a pesar de que, el medio secuencial, es considerado más exitoso que el permanente, continúan los estudios comparativos (Haydar *et al.*, 2012).

En esta tesis se produjeron blastocistos clones cultivados en un medio secuencial para embriones humanos, a partir de fibroblastos de 5° pasaje celular, de un ovino macho silvestre. La tasa de obtención fue considerada como adecuada al compararla con los reportes descritos previamente.

Respecto a los embriones partenogénéticos de *O. aries*, se obtuvo 19.6% de blastocistos. Shirazi *et al.* (2009), a partir de ovocitos de la misma especie obtenidos de folículos de 2-6 mm y utilizando ionomicina como activador, lograron una tasa de blastocistos superior a la encontrada en este trabajo (26%). En cabras, Jena *et al.* (2012) documentaron 5.6% de blastocistos partenogénéticos en medios mSOF, y una producción mayor cuando los embriones conservaron la ZP (11.9%). Cabe mencionar que estos autores destacan la importancia que tiene la ZP en el desarrollo embrionario temprano, ya que al conservarla se puede duplicar el número de blastocistos obtenidos.

La ZP es una matriz extracelular compuesta por glicoproteínas, que recubre al ovocito y es sintetizada por las células foliculares. Entre las funciones que desempeña durante el desarrollo embrionario temprano *in vivo* se pueden enunciar: evitar la implantación prematura del embrión, protegerlo contra daños físicos, regular la comunicación embrionaria-materna, asegurar y aumentar la proximidad entre blastómeros durante las divisiones tempranas y por ende la compactación del embrión, impidiendo que éstos se dispersen y disminuya el número celular del futuro blastocisto, impactando en la calidad. Igualmente, se considera que aquellos embriones que logren eclosionar de la ZP son de buena calidad. A pesar de que algunas de estas funciones se mantienen en el DEIV, hay estudios que sugieren que la ZP estructuralmente no siempre es requerida en el proceso *in vitro*, al compensar su ausencia con sistemas como WOW. Sin embargo, molecularmente parece ser necesaria, pues su ausencia se relaciona con un aumento de factores de transcripción de apoptosis en los blastómeros extruidos (Velásquez *et al.*, 2013).

Aunque diversos estudios se siguen realizando, se sugiere la prevalencia de la ZP en los embriones producidos *in vitro*. Por lo que es necesario proponer un método para incorporarla en embriones clones libres de ZP para mejorar la calidad embrionaria.

Evaluación de la calidad embrionaria

Fragmentación tipo IV

Una de las anomalías presentes en los embriones producidos *in vitro* es la fragmentación citoplasmática, considerada como limitante del desarrollo embrionario. En el presente trabajo a partir del número de embriones segmentados se determinó un 29.7% de fragmentación tipo IV en GE y 18.0% en GC ($P < 0.05$).

La tasa de fragmentación en clonación manual no ha sido descrita; no obstante, en la TNCS convencional hay dos estudios acerca de este fenómeno. Uno de ellos se llevó a cabo en ovino doméstico (Xue *et al.*, 2011), donde, bajo condiciones similares a las de este estudio, pero utilizando medios permanentes, obtuvieron una tasa de fragmentación del 17.7% en medio permanente SOFaa¹⁴. Los autores mencionan que la fragmentación es un proceso multifactorial ligado a causas intrínsecas del embrión como la inestabilidad de los microfilamentos de actina, anomalías cromosómicas y defectos del genotipo parental, aunque también hay causas extrínsecas generadas por la manipulación del embrión producido *in vitro*. Así, ellos concluyen que el medio de cultivo de DEIV utilizado, es uno de los factores que determina la tasa de fragmentación, pues al emplear medios condicionados con aminoácidos, iones de calcio y de magnesio (SOFaa: 21.3%) disminuyen esta alteración, en comparación de los medios que carecen de estos suplementos (CR1¹⁵aa: 52.4%).

Sin embargo, hay otros factores que pueden elevar la tasa de fragmentación, como el aumento del pulso eléctrico de fusión, por ejemplo, utilizando un voltaje de 1.4 kv/mm, ocurre 17.7% de fragmentación y al elevar el voltaje a 1.8 kv/mm, la fragmentación es de 21.2%. Por lo demás, al aumentar la concentración del activador ionomicina de 2.5 a 5.0 μM se genera de 36.4 a 75.0% de fragmentación (Xue *et al.*, 2011). El interés por reducir la fragmentación embrionaria, radica en que ésta disminuye la actividad citoplasmática del embrión, reduciendo a la par, el volumen y

¹⁴ Synthetic Oviductal Fluid with amino acids.

¹⁵ Medio Charles Rosenkrans 1.

número de organelos esenciales para la compactación, cavitación y formación de blastocistos (Stigliani *et al.*, 2013).

Por su parte, Im *et al.* (2005), obtuvieron en clones de porcino una tasa de fragmentación de 26.1% y en partenogénéticos de 35.3%. Ellos argumentan que tal fragmentación de embriones clones está determinada por el proceso de electrofusión, donde el pulso eléctrico desestabiliza la bicapa lipídica de la membrana, lo que afecta físicamente la organización de los microfilamentos de actina, por lo que sugieren que este proceso podría minimizarse al aumentar la osmolaridad del medio de DEIV durante las primeras 48 horas (320-360 mOsm). Además, al evaluar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) presentes, en el grupo de clones y partenogénéticos, los autores identificaron que los embriones fragmentados poseen niveles de ERO más elevados que los normales, lo que posiblemente, pueda estar impactando en la permeabilidad de la membrana, en el retraso o inhibición de la polimerización y despolimerización de los microfilamentos de actina, induciendo, de este modo, la división asincrónica del citoplasma y el núcleo, derivando en la multinucleación de los blastómeros.

Sin embargo, aunque la fragmentación embrionaria puede ser atribuible a la manipulación durante la clonación, su presencia también es observada en embriones partenogénéticos, lo cual reafirma su origen diverso.

Determinación del estadio de desarrollo embrionario a las 24, 96 y 192 horas.

La dinámica o cinética del desarrollo embrionario *in vitro* ha sido poco estudiada en la clonación de embriones, aunque se debe destacar la importancia que tiene el investigar este proceso, ya que, a diferencia de los embriones producidos por otras técnicas *in vitro*, los embriones clones siguen una dinámica particular de división en el tiempo de cultivo. Para ello, en este trabajo, se evaluó la dinámica del desarrollo embrionario determinando los estadios a las 24, 96 y 192 horas de cultivo.

Para ambos grupos se determinó que, dentro de las 24 horas de cultivo, hay mayor proporción de embriones segmentados (estadio 2 a 8 células) (GE 61%; GC 70%), lo que es superior a lo obtenido por Kaith *et al.* (2015) en clonación manual de búfalo (54% a las 24 horas), donde concluyen que los embriones que tienen una división

temprana poseen mayor potencial de formar blastocistos de mejor calidad y presenten un menor índice apoptótico.

En TNCS convencional de porcino, Jeon *et al.* (2011) obtuvieron 86.6% de segmentación temprana (24 horas), más la presencia de 13.9% de fragmentación embrionaria. Cabe resaltar que, esta tasa de fragmentación, es superior a los datos encontrados en esta tesis (GE 7%; GC 1%), lo cual puede ser atribuible a la calidad ovocitaria de la especie, la técnica de clonación, el agente activador, el método de fusión y el medio de DEIV utilizados. En la misma especie, Isom *et al.* (2012), compararon la segmentación temprana en embriones clonados por TNCS convencional (43.7%), FIV (31.9%) y embriones partenogénéticos (31.9%), sin hallar diferencias estadísticamente significativas.

Estos datos indican que las diferencias entre la segmentación temprana (24 horas) de los embriones, dependen de las características particulares de cada especie, la manipulación de las células, la técnica de reproducción asistida o el tipo de TNCS aplicada.

A las 96 horas de cultivo, se identificó el estadio de mórula (temprana y compacta) en ambos grupos, lo que coincide parcialmente con lo reportado por Winterberger-Torres y Sevellec (1987) en ovino doméstico, ya que ellos describieron que en el día 4 (96 horas), los embriones *in vivo* pasan del oviducto a útero, encontrándose en el estadio de mórula temprana. En esta tesis, la diferencia entre estadios de mórula (temprana y compacta) puede ser atribuible a la técnica de producción *in vitro*, pues los embriones clones y partenogénéticos se encuentran un estadio avanzado conforme al tiempo. El estadio de blastocisto (temprano, tardío y expandido) se identificó a las 192 horas de cultivo en ambos grupos, lo que es parcialmente similar a lo descrito *in vivo* por Winterberger-Torres y Sevellec (1987). En esta tesis, algunos de los embriones clones producidos se atrasaron hasta por 48 horas, puesto que a las 192 horas, aún había blastocistos tempranos, los cuales, según los autores mencionados, debían presentarse a las 144 horas.

Si bien, se sabe que el avance o detención del DEIV de un embrión clon está determinado por la capacidad de reprogramación que tiene el carioplasto ante el

citoplasto (Jeon *et al.*, 2011), muy probablemente la velocidad del desarrollo observada en estos embriones, puede estar determinada también por este potencial, el cual es definido por las características particulares de cada carioplasto.

Mientras tanto, a las 192 horas se determinaron los estadios embrionarios finales en ambos grupos, por lo que en este tiempo, se obtuvo la tasa final de embriones no segmentados, en etapa de blastocisto, fragmentados y aquellos que sufrieron de bloqueo del desarrollo (los cuales pueden ser identificados desde las 96 horas). El porcentaje de embriones con bloqueo del desarrollo a las 192 horas fue de 22% en estadio de 2 a 8 células y 25% de mórulas para GE, mientras que, para GC fue de 22% y 24%, respectivamente.

Durante el periodo preimplantacional, el embrión debe someterse a múltiples procesos como la división celular, reprogramación epigenética, activación del genoma, compactación, diferenciación celular y desarrollo a blastocisto, aunque, la activación del genoma es considerado uno de los pasos más cruciales. Ésta es llevada a cabo durante la fase de 8 a 16 células, donde se elimina el ARNm materno y el embrión se vuelve dependiente de las nuevas transcripciones producidas por el núcleo. Si el embrión no responde exitosamente a los nuevos transcritos, es incapaz de activar genes importantes, como los reguladores del ciclo celular, la integridad genómica y la muerte celular (p53, p21, BAX, Bcl-2), o es sometido a estrés producido por el ambiente¹⁶, entonces entrará a un bloqueo del desarrollo embrionario seguido de una elevada actividad apoptótica (Greenwood y Gautier, 2005; Tarazona *et al.*, 2010; García *et al.*, 2015).

Aunque el bloqueo del desarrollo embrionario es un fenómeno que ocurre por diversas causas, que están dictadas por la competencia particular de cada embrión, una de las más aceptadas es la relacionada con el estrés oxidativo y los altos niveles de producción de ERO derivados del proceso de activación (Rausell y Tarín, 2005).

Determinación de la calidad morfológica embrionaria a las 24, 96 y 192 horas.

¹⁶ Condiciones *in vitro* que alteran la distribución y función mitocondrial necesaria para la generación de ATP para el arreglo del citoesqueleto, la acumulación de ARNm y la eliminación de ERO.

La evaluación morfológica busca caracterizar el desarrollo embrionario y seleccionar a los mejores embriones para su transferencia, tomando en cuenta ciertas características definidas en intervalos de tiempo; dentro de las cuales están, el número, la forma y la simetría de los blastómeros, así como la fragmentación embrionaria. A pesar de que se han diseñado sistemas de evaluación más sofisticados, éstos no han logrado sustituir totalmente la evaluación morfológica de embriones, que sigue siendo la técnica más fácil y no requiere de equipo adicional (Machtinger y Racowsky, 2013).

En el presente estudio se determinó la calidad morfológica embrionaria de acuerdo al manual de la IETS a las 24, 96 y 192 horas de cultivo. En ambos grupos se observó que la calidad disminuye conforme pasa el tiempo de cultivo de DEIV, debido a que los embriones van perdiendo su potencial de desarrollo, es decir, no activan, fragmentan o bloquean su desarrollo. Finalmente, a las 192 horas se valoró la calidad «Excelente» y «Buena» con un porcentaje de 32% para GE y 36% para GC. El porcentaje restante (que involucra la calidad «Mala» o «Degenerada») fue de 68% para GE y de 64% para GC, que corresponde con los estadios embrionarios: no activados, bloqueo del desarrollo y fragmentados. A las 96 horas de cultivo fue posible predecir la calidad embrionaria, debido a que las características morfológicas no se modifican significativamente hacia las 192 horas.

Mediante el sistema de valoración morfológica, diseñado por los Científicos ALFA en Medicina Reproductiva y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (2011), Halim *et al.* (2017) evaluaron embriones humanos producidos por ICSI a las 72 horas de cultivo, y de acuerdo a sus criterios morfológicos reportaron un 36.7% para la calidad transferible (Grado 1: «Bueno» y 2: «Justo») y 63.3% para la calidad no transferible (Grado: 3 «Pobre»). Concluyendo que, en esta etapa, los embriones humanos pueden ser evaluados correctamente con criterios morfológicos. Realizando una analogía entre los datos citados en humanos con los obtenidos en ovino en esta tesis, el tiempo idóneo de evaluación sería a las 96 horas donde las calidades transferibles (Código 1: «Excelente» y 2: «Bueno») fue de 32% para GE y 43% en GC. Mientras tanto, para las calidades no transferibles (Código 3: «Malo» y 4: «Degenerado») se obtuvo un 68% en GE y 57% en GC. Como se pudo

observar, los datos reportados aquí son similares a los reportados por Halim *et al.*, (2017), con excepción del grupo control partenogenético que muestra mayor porcentaje de embriones de calidad transferible, en comparación con ICSI y clonación manual. Es necesario señalar que, el método utilizado por los autores, abarca todas las características de valoración en un embrión, permitiendo generar una clasificación de calidad más precisa, además, incorpora tinciones para corroborar sus datos en toda la cohorte de embriones.

Pahuara y Naveros (2014) produjeron embriones bovinos mediante FIV y los evaluaron utilizando el Manual de IETS. A las 168 horas, obtuvieron 3.03% de calidad «Excelente», 8.69% de calidad «Buena», 6.62% calidad «Mala» y 81.66% calidad «Degenerada», en medio SOFaa. Estos datos son inferiores a los reportados en esta tesis (calidad «Excelente»: 6% y 10%, calidad «Buena»: 26% y 26%, calidad «Mala», 39% y 41%, calidad «Degenerada»: 29% y 23%, para GE y GC, respectivamente), probablemente porque utilizaron FIV para producir los embriones en un medio de cultivo embrionario permanente y en una especie diferente, por lo que ellos concluyen que sus datos son el resultado de la competencia de los embriones y las condiciones subóptimas de cultivo, las cuales al combinarse producen un retraso en el desarrollo, anormalidades y una reducción de la viabilidad.

Todos estos datos nos confirman que el mejor intervalo de tiempo para predecir la calidad embrionaria es a las 96 horas en embriones clones y partenogenéticos, donde la calidad morfológica está relacionada estrechamente con la tasa de formación de blastocistos.

Por su parte, Majumdar *et al.* (2017) describieron que las categorías morfológicas determinadas para embriones humanos producidos por FIV permitían predecir la tasa de euploidia e implantación. Así, determinaron que, a los 3 (estadio de mórula) y 5 días (estadio de blastocisto), la categoría «Buena» presenta mejor euploidia (3d: 40.6% y 5d: 73.2%) y mejor tasa de implantación (3d: 43.8% y 5d: 51.7%), en comparación a las categorías: «Promedio» y «Pobre» que mostraron menor euploidia (3d: 29.3% y 5d: 50%; 3d: 25.8% y 5d: 40.5%) y baja tasa de implantación (3d: 37.5% y 5d: 71.4%; 3d: 0% y 5d: 66.7%). La aplicación de análisis de genotipo en embriones clones, podría permitir corroborar los datos aquí obtenidos de calidad

morfológica, detectar anomalías genéticas y determinar las tasas de implantación de futuras transferencias embrionarias.

Evaluación de la viabilidad, conteo nuclear y blastómeros normales en estadio de mórula (96 horas)

La viabilidad de un embrión está determinada por una serie de factores, los cuales pueden ser identificados mediante técnicas moleculares. Cuando un blastómero es considerado como no viable, su condición es el resultado de la convergencia de fenómenos como la fragmentación celular o la apoptosis, que finalmente son los encargados de disminuir la competencia de un embrión (Palma, 2001).

En la presente tesis, en el estadio de mórula (96 horas), se obtuvo que a mejor calidad morfológica, mayor número de blastómeros viables y menor tasa de multinucleación. Rodríguez-Suásteguí (2012) observó este mismo patrón utilizando el Manual de IETS (2ª edición) para evaluar embriones ovinos producidos por FIV en medio secuencial y medio permanente (correlación entre morfología y viabilidad con una $r = 0.7408$). Ushijima *et al.* (2004) en porcino y con la técnica de Inseminación Artificial (IA) obtuvieron una tasa de viabilidad del 87% en embriones de calidad transferible (no se especifican las categorías), dato similar a lo encontrado aquí para la calidad «Buena» de ambos grupos.

En contraste, Fernández *et al.* (2013) obtuvieron una tasa del 100% de viabilidad en mórulas de ovino y porcino producidas por FIV. Para ello, las mórulas evaluadas fueron aquellas de categoría «Excelente» y «Buena», de acuerdo al manual de la IETS. Esto es similar a la categoría «Excelente» (GE 95.4% y GC 96.5%), reportada en esta investigación para ambos grupos. Los datos indican que las categorías morfológicas están relacionadas estrechamente con la viabilidad del embrión.

Respecto a la relación núcleo-blastómero (1:1), en este estudio se demostró que la tasa de blastómeros normales (1:1) en los embriones, se relaciona con la calidad morfológica. Para GE se obtuvo 79.7, 55.9, 33.3, y 16.3% de blastómeros normales para las calidades 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Mientras que, para GC se obtuvo 82.1, 68.9, 19.6 y 0%, respectivamente. En contraste, Xue *et al.* (2011) en mórulas de ovino producidas por TNCS convencional, obtuvieron un porcentaje de 61% de

blastómeros normales (1:1) en medio SOFaa, tales valores son similares al obtenido en la calidad 2 de esta tesis.

En cuanto a la multinucleación, las mórulas de GE obtenidas mostraron una tasa de 6.7% de blastómeros multinucleados, mientras que las de GC mostraron 8.6%. Estos valores son inferiores a los reportados por Vazquez (2016) en embriones de 8 a 16 células obtenidos por clonación manual (40% de blastómeros multinucleados) y embriones partenogénéticos (25%) de ovino doméstico, donde se pueden identificar variables como: la especie, el medio de DEIV permanente utilizado y el porcentaje de SFB.

Según Desai *et al.* (2014), en embriones humanos producidos por ICSI, la multinucleación se relaciona con la calidad morfológica embrionaria: en la calidad «Excelente» se presenta a una tasa de 5 a 7%; mientras que, en embriones de «Mala» calidad, alcanza un 25%. Además, observaron que en los embriones multinucleados evaluados, la binucleación fue más frecuente (16%), en comparación a los blastómeros que presentaban ≥ 3 núcleos (9%). Los autores concluyen que la binucleación es menos perjudicial que aquellos blastómeros que contienen ≥ 3 núcleos, ya que los embriones con blastómeros binucleados pueden mantener una euploidia similar a los embriones con blastómeros mononucleados. Probablemente porque éstos son teñidos posterior al proceso de la cariocinesis pero antes de la citocinesis.

La tasa de multinucleación obtenida en mórulas en esta tesis (GE 6.7% y GC 8.6%), es similar a la calidad «Excelente» presentada por los autores citados. Sin embargo, se sugiere la implementación de sistemas de evaluación nuclear más objetivos, ya que Desai *et al.* (2014), detectaron hasta un 20% de error en las tasas de multinucleación utilizando el sistema convencional de tinción *versus* el sistema de imágenes por tiempo en embriones humanos (*Time-Lapse Embryo Imaging*).

Conforme al porcentaje de fragmentación por mórula, en este estudio se observó que la tasa de fragmentación embrionaria aumenta conforme disminuye la calidad morfológica. Ragione *et al.* (2007), pudieron predecir el éxito en la implantación de los futuros blastocistos, determinando la tasa de fragmentación embrionaria en

mórulas humanas producidas por FIV. Así también, determinaron que, embriones con >10-50% de fragmentación, aunque pueden alcanzar la etapa de blastocisto avanzado, su tasa de implantación es significativamente inferior en comparación con los embriones con ≤10%. Cabe señalar que los embriones altamente fragmentados (20-40%) presentan anomalías cromosómicas relacionadas con la distorsión de los planos de división, lo que ocasiona una anormal compactación, cavitación y formación de blastocisto. Considerando los rangos óptimos de fragmentación proporcionados por los autores citados, las calidades transferibles de mórulas producidas en la presente tesis serían: la calidad 1 del grupo experimental de clones *O. c. mexicana* (3.3%) y 2 del grupo control de partenogénéticos *O. aries* (14.4%).

El destino de los fragmentos citoplasmáticos embrionarios aún es controvertido; se ha descrito que pueden ser reabsorbidos por los blastómeros vecinos; sin embargo, hay investigaciones que rechazan esta idea debido a la incapacidad fagocitaria que tienen los blastómeros, haciendo que la apoptosis sea el proceso final más aceptado. Los fragmentos citoplasmáticos reducen el volumen del embrión y, consecuentemente, disminuyen la disponibilidad de organelos esenciales, como las mitocondrias, de este modo, los restos finales de los fragmentos liberan al medio el ADNm, el cual es necesario para que el embrión prosiga con su desarrollo. Por lo que, una elevada liberación de ADNm se relaciona con embriones de mala calidad que pueden presentar también aneuploidías y mosaicismo cromosómico (Stigliani *et al.*, 2013).

Stigliani *et al.* (2013) demostraron que, embriones humanos producidos por FIV con fragmentación moderada y severa (>5%) tienen mayor liberación de ADNm hacia el medio de cultivo (440 pg de ADNm/ ADN genómico), comparándolos con los que presentan fragmentación leve (<5%) (350 pg de ADNm/ADN genómico). Haciendo posible que en ausencia de ADNm, los embriones con alta tasa de fragmentación terminen con un bloqueo de desarrollo, siendo blastocistos de mala calidad o de bajo potencial de implantación.

De acuerdo a la literatura citada y el manual de la IETS, las mórulas clones *O. c. mexicana* y partenogénéticas *O. aries* calidad 1 y 2 producidas en este trabajo, son consideradas como candidatas a transferencia embrionaria.

Evaluación de la viabilidad en estadio de blastocisto (192 horas)

En el estadio de blastocisto se observó que, a mejor calidad morfológica mayor proporción de blastómeros viables, para ambos grupos. Para GE se obtuvo 95.9, 85.6 y 70.6% de viabilidad para las calidades 1, 2 y 3, respectivamente; mientras que, para GC fue de 95.4, 85.8, 73.9. Por su parte, Grygoruk *et al.* (2011), consiguieron 87.2% de células embrionarias que no mostraron apoptosis a diferencia de las células restantes (12.8%) en blastocistos de ratón evaluados mediante la prueba TUNEL. La viabilidad respecto al índice apoptótico reportada por los autores, es inferior a la obtenida en esta tesis (donde se utilizó un método morfológico), para los embriones de calidad 1, pero similar para los embriones de calidad 2 y superior para los embriones de calidad 3 y 4.

Respecto a la media de núcleos contabilizados en los embriones, GE presentó 46.7 ± 8.1 , mientras que GC fue de 44.2 ± 9.9 ($P < 0.05$). Gómez *et al.* (2017) reportaron en blastocistos de bovino una media de 77.5 ± 8.2 núcleos para clones (clonación manual) y 78.1 ± 7.6 para partenogénéticos, datos superiores a los reportados aquí. Caso contrario a Cao *et al.* (2011), cuyos datos fueron inferiores a los de esta investigación, al reportar 39 ± 3 núcleos para clones (clonación convencional) y 39 ± 17 para partenogénéticos de porcino. La variabilidad en el número de blastómeros y núcleos en un blastocisto es atribuible a diferentes factores como, la especie, el tipo de técnica implementada, la manipulación (en clonación, por ejemplo, por la degradación de proteínas, la enucleación, la exposición a los diferentes químicos y el pulso eléctrico), la disponibilidad de nutrientes en el medio, el tiempo de cultivo, etc. Lo que influye directamente sobre la tasa de división celular (Gómez *et al.*, 2017).

De acuerdo al manual de la IETS y a los datos obtenidos sobre viabilidad, en este estudio, los blastocistos de calidad 1 y 2, en ambos grupos, son considerados como candidatos a transferencia embrionaria.

Evaluación de la viabilidad embrionaria de estadios transferibles (mórula y blastocistos)

En el presente trabajo se tomó en cuenta que un embrión viable es aquel que presenta $\geq 75\%$ de blastómeros vivos, por lo que, el porcentaje de viabilidad total en

el cohorte de mórulas fue de 53.8% para GE y 80% para GC. En el estadio de blastocisto fue de 83.3% para GE y 84.6% para GC.

Rodríguez-Suástegui (2012) reportó una viabilidad del 83% en la cohorte de mórulas (16 cél.) de ovino producidas por FIV, siendo superior a la viabilidad obtenida en embriones clones de *O. c. mexicana*, en tanto que, los embriones partenogenéticos de esta tesis, muestran una tasa similar. Esto puede ser atribuible al número celular y tiempo de cultivo embrionario definido por el autor. Morató *et al.* (2010) obtuvieron una tasa de viabilidad del 61% en una cohorte de blastocistos de bovino post-vitrificación, dato inferior a lo reportado aquí; no obstante, hay que considerar el daño provocado por el proceso de vitrificación y descongelamiento.

En general, las tasas de viabilidad embrionaria para mórulas y blastocistos, reportadas en esta tesis, son consideradas adecuadas.

XIV. CONCLUSIONES.

- Se logró producir embriones clones en estadio de mórula y blastocisto por clonación manual de un individuo macho *post mortem* de la especie *Ovis canadensis mexicana*; lo que propone a la clonación manual como una estrategia de conservación *ex situ in vitro* de especies silvestres en riesgo.
- Mediante el Manual de IETS, se lograron identificar los estadios del desarrollo en embriones clones y partenogénéticos, así como los procesos anómalos: bloqueo del desarrollo, fragmentación y multinucleación.
- En el estadio de mórula (96 horas) se pueden determinar los embriones potenciales a desarrollar blastocitos de mejor calidad.
- De acuerdo a las tasas óptimas de fragmentación, multinucleación, blastómeros normales y viables, las mórulas clones de las calidades 1 («Excelente») y 2 («Buena») se consideran como candidatas de transferencia embrionaria.
- Se produjeron 14.2% de blastocistos clones de *Ovis canadensis mexicana* macho *post mortem*, de los cuales el 80% pertenecen a la calidad 1 y 2, que en concordancia con su categoría morfológica y viabilidad son calificados como transferibles.

Los criterios de evaluación morfológica embrionaria propuestos por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) permitieron evaluar la dinámica, el estadio y la calidad de embriones clones de *Ovis canadensis mexicana* con alto grado de confiabilidad.

XV. PERSPECTIVAS.

Aún son desconocidas las diversas causas de los procesos que delimitan el éxito de la clonación manual, por lo que se sugiere una previa selección folicular y ovocitaria. Si bien la técnica requiere de una gran cantidad de ovocitos, es necesario no tomar en cuenta aquellos de mala calidad, ya que disminuyen la eficiencia de la técnica y el potencial para formar mórulas y blastocistos.

Es necesario implementar un método de enucleación del ovocito que le permita conservar un mayor volumen citoplasmático, dejando a disposición del embrión organelos necesarios para su desarrollo.

Se propone implementar un método para mantener o incorporar la ZP a los embriones clones, con la finalidad de mejorar su calidad y la tasa de formación de blastocistos.

También, se propone utilizar un método más objetivo y sofisticado para evaluar la multinucleación y fragmentación embrionaria, con el fin de corroborar las tasas proporcionadas por el método de tinción convencional.

De igual manera, se sugiere determinar el número de núcleos presentes por cada blastómero multinucleado, para que, mediante este criterio, se implemente una nueva clasificación de calidad embrionaria.

Es necesario incorporar, además, un método de evaluación de genotipo en embriones clones.

Finalmente, es recomendable determinar el porcentaje de éxito de las diferentes calidades aquí obtenidas mediante la transferencia de los embriones clones, determinando así por categoría, la tasa de implantación, gestación y crías vivas nacidas.

XVI. BIBLIOGRAFÍA.

- Akagi S., Matsukawa K., Takahashi S. (2014). Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *The Journal of Reproduction and Development*. 60: 329-335.
- Akshey Y. S., Malakar D., De A. K. (2011). Production of handmade cloned goat blastocysts using fetal fibroblast cells. *Reproduction Fertility and Development*. 20: 91-92.
- 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: 335-344.
- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*. 26: 1270-1283.
- Ao Z., Liu D., Cai G., Wu Z., Li Z. (2016). Placental developmental defects in cloned mammalian animals. *Hereditas*. 38: 402-410.
- Armella V. M. A., Roberto E., Yáñez L. M. L. (2011). Mamíferos mexicanos en peligro de extinción. *Revista Digital Universitaria*. 12: 1-10.
- Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. (2015). Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de embriología clínica. 3ª edición. España. Pp. 94.
- Báez C. F. J., Landinez A. J. A., Hernández F. H. J., Villamediana M. P. C. (2010). Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos madurados y fecundados *in vitro* obtenidos a partir de hembras mestizas. *Revista de la Facultad de Agronomía*. Universidad Nacional de La Plata. LUZ. 27: 460-478.
- Bakri N. M., Ibrahim S. F., Osman N. A., Hasan N., Jaffar F. H., Rahman Z. A. y Osman K. 2016. Embryo apoptosis identification: ¿Oocyte grade or cleavage stage? *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23: S50-5.
- Balbach S. T., Jauch A., Böhm-Steuer B., Cavaleri F. M., Han Y. M., Boiani M. (2007). Chromosome stability differs in cloned mouse embryos and derivative ES cells. *Developmental Biology*. 308: 309-321.

-
-
- Bang J. L., Jin J. I., Ghanem N., Choi B. H., Fakruzzaman M., Ha A. N., Lee K. L., Uhm S. J., Ko D. H., Koo B. C., Lee J. G., Kong I. K. (2015). Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. *Theriogenology*. 84: 509-23.
 - Baril G., Brebion P., Chesné P. (1995). Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras. Food and Agriculture Organizations Editorial. Roma. Pp. 175.
 - Bastida O. (2013). Conteo células con hematocitómetro. Celeromics. Technical Note- Neubauer chamber cell counting. Pp.1-6.
 - Bertolini M., Bertolini L. R. (2009). Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 56: 184-194.
 - Besser T. E., Frances-Cassirer E., Highland M. A., Wolff P., Justice-Allen A., Mansfield K., Davis M. A., Foreyt W. (2013). Bighorn sheep pneumonia: sorting out the cause of a polymicrobial disease. *Preventive Veterinary Medicine*. 108: 85-93.
 - Bó G. A., Mapletoft R. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*. 10: 344-348.
 - Borjesson D. L., Boyce W. M., Gardner I. A., DeForge J., Lasley B. (1996). Pregnancy detection in bighorn sheep (*Ovis canadensis*) using a fecal-based enzyme immunoassay. *Journal of Wildlife Diseases*. 32: 67-74.
 - Bosch P. (2005). Clonado de animales mediante transferencia nuclear: aplicaciones en ganadería y biomedicina en Manual de Ganadería Doble Propósito. González-Stagnaro C. y Soto-Belloso E. (eds.). Ediciones Astro Data. Maracaibo-Venezuela. 3: 283-290.
 - Byri P., Gangineni A., Reddy K. R., Raghavender K. B. P. (2017). Effect of kisspeptin on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Veterinary World*. 10: 276-280.
 - Cao Z., Sui L., Li Y., Ji S., Zhang X., Zhang Y. (2011). Effects of chemically defined medium on early development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and cloning. *Zigote*. 20: 229-236.

-
-
- Chacón L., Gómez M., Jenkins J. A., Leibo P. S., Wirtu G., Dresser B., Pope E. 2009. Production of bovine cloned embryos with donor cells frozen at a slow cooling rate in a conventional freezer (-20°C). *Zigote*. 17: 341-351.
 - Código Sanitario para los Animales Terrestres. (2016). Volumen I. Título 7: Bienestar animal. Capítulo 7.8: Utilización de animales en la investigación y educación. OIE (Organización mundial de Sanidad Animal).
 - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) a través de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010.
 - Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). Apéndices I, II y III. En vigor a partir del 5 de febrero de 2015.
 - Costa-Borges N., Santaló J., Ibáñez E. (2006). Preparación de citoplastos receptores para transferencia nuclear mediante enucleación química de ovocitos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 23: 163-172.
 - Dal Canto M., Guglielmo M. M., Mignini R. M., Fadini R., Moutier C., Merola M., De Ponri E., Coticchio G. (2017). Dymorphic patterns are associated with cytoskeletal alterations in human oocytes. *Human Reproduction*. 32: 750-75.
 - Desai N., Ploskonka S., Goodman L. R., Austin C., Goldberg J., Falcone T. (2014). Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12: 54.
 - Dieleman S. J., Hendriksen P. J. M., Viuff D., Thomsen P. D., Hyttel P., Knijn H. M., Wrenzycki C., Kruip T. A. M., Niemann H., Gadella B. M., Bevers M. M., Vos P. L. A. M. (2002). Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*. 57: 5-20.
 - Du Y., Kragh P. M., Zhang Y., Li J., Schmidt M., Bogh I. B., Zhang X., Purup S., Jorgensen 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: 1104–1110.

-
-
- Du Y., Lin L., Schmidt M., Bøgh I. B., Kragh P. M., Sørensen C. B., Li J., Purup S., Pribenszky C., Molnár M., Kuwayama M., Zhang X., Yang H., Bolund L., Vajta G. (2008). High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning and Stem Cells*. 10: 325-330.
 - Ebner T., Yaman C., Moser M., Sommergruber M., Polz W., Gernot T. (2001). Embryo fragmentation *in vitro* and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*. 76: 281-285.
 - Fabozzi G., Alteri A., Rega E., Starita M. F., Piscitelli C., Giannini P., Colicchia A. (2016). Morphological assessment on day 4 and its prognostic power in selecting viable embryos for transfer. *Zygote*. 24: 477-484.
 - Fan N., Chen J., Shang Z., Dou H., Ji G., Zou Q., Wu L., He L., Wang F., Liu K., Liu N., Han J., Zhou Q., Pan D., Yang D., Zhao B., Ouyang Z., Liu Z., Zhao Y., Lin L., Zhong C., Wang Q., Wang S., Xu Y., Luan J., Liang Y., Yang Z., Li J., Lu C., Vajta G., Li Z., Ouyang H., Wang H., Wang Y., Yang Y., Liu Z., Wei H., Luan Z., Esteban M. A., Deng H., Yang H., Pei D., Li N., Pei G., Liu L., Du Y., Xiao L., Lai L. (2013). Piglets cloned from induced pluripotent stem cells. *Cell Research*. 23: 162-166.
 - Faramarzi A., Mohammad A. K., Ashourzadeh S. (2017). Oocyte morphology and embryo morphokinetics in an intra-cytoplasmic sperm injection programme. Is there a relationship? *Zygote*. 7: 1-7.
 - Fernández R. F., Hernández P. J. E., Romero R. J. G., Rodríguez S. J. L. (2013). Viabilidad después de la vitrificación de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro*. *Revista de Salud Animal*. 35: 52-58.
 - Ferré L., Cattaneo L. (2013). Biotecnologías reproductivas: producción *in vitro* de embriones y semen sexado. (¿La pareja perfecta?). *Revista de Medicina Veterinaria*. 94: 28-36.
 - 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: 1197-1204.
 - García S. M., Marinho L. S., Lunardelli P. A., Seneda M. M., Meirelles F. V. (2015). Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos: effects

-
-
- of protein supplementation source and developmental kinetics. *PLoS One*. 10: e0119463.
- Gardner D. K., Balaban B. (2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Molecular Human Reproduction*. 22: 704-718.
 - Gilbert Scott F. (2005). *Biología del Desarrollo*. Editorial Médica Panamericana. 7ª edición. Buenos Aires. Pp. 902.
 - Gómez N. A., Ramírez M. M., Ruíz T. (2017). Handmade cloned bovine embryos, parthenogenesis and *in vitro* fertilization: a comparison. *Revista de Investigación en Ciencia y Biotecnología Animal*. 1: 9-18.
 - Greenwood J., Gautier J. (2005). From oogenesis through gastrulation: developmental regulation of apoptosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 16: 215-224.
 - Grygoruk C., Sieczynski P., Modlinski J. A., Gajda B., Greda P., Grad I., Pietrewicz P., Mrugacz G. (2011). Influence of embryo transfer on blastocyst viability. *Fertility and Sterility*. 95: 1458-1461.
 - Hafez E. S., Hafez B. (2000). *Reproducción e inseminación artificial*. Mc Graw Hill. 7ª edición. México. Pp. 509.
 - Hajarian H., Aghaz F., Karami S. H. (2017). Replacement of serum with sericin in *in vitro* maturation and culture media: Effects on embryonic developmental competence of Sanjabi sheep embryo during breeding season. *Theriogenology*. 92: 144-148.
 - Halim B., Lubis H. P., Novia D., Thaharuddin M. (2017). Does oval oocyte have an impact on embryo development in *in vitro* fertilization? *JBRA Assisted Reproduction*. 21: 15-18.
 - Halvaei L., Khalili M. A., Esfandiari N., Safari S., Talebi A. R., Miglietta S., Nottola S. A. (2016). Ultrastructure of cytoplasmic fragments in human cleavage stage embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 33: 1677-1684.
 - Haydar N. C., Turan A., Cihan G., Bilgen O., Mustafa B. (2012). Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media a sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 29: 891-900.

-
-
- Holy L. (1991). Bases biológicas de la reproducción bovina. Editorial Diana. 4ª reimpresión. México. Pp. 464.
 - Hosseini S. M., Moulavi F., Asgari V., Shirazi A., Abazari-Kia A. H., Ghanaei H. R., Nasr-Esfahani M. H. (2013a). Simple, fast, and efficient method of manual oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 49: 569-575.
 - Hosseini S. M., Hajian M., Moulavi F., Asgari V., Forouzanfar M., Nasr-Esfahani M. H. (2013b). Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled Pasteur pipette. *Cellular Reprogramming*. 15: 15-23.
 - Huanca W., Palomino J. M., Cervantes M., Cordero A., Huanca T. (2007). Efecto de temperaturas de transporte (35 °C, 4 °C) sobre la calidad morfológica de ovocitos colectados desde ovarios de alpacas. En: Res. XX Reunión ALPA. Cusco, Perú.
 - Im G. S., Yang B. S., Lai L., Liu Z., 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: 159-165.
 - Ingilizova G., Ivanov D., Kovachev E., Evrev M., Kostov I., Necheva. (2014). Oocyte quality as a predictive marker for assessment of IVF/ICSI procedure outcome. *Akusherstvo I Ginekologija*. 53: 41-46.
 - International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of Threatened Species 2011.2.
 - Isom S. C., Li R. F., Whitworth K. M., Prather R. S. (2012). Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the *in vitro* developmental potential of porcine embryos derived from *in vitro* fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 79: 197-207.
 - 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: 255-262.

-
-
- Jeon Y., Jeong S. H., Biswas D., Jung E. B., Lee E. S., Hyun S. H. (2011). Cleavage pattern and survivin expression in porcine embryos by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*. 76: 1187-1196.
 - Jiménez V., Buelta L., Hervas J. L., Valdor C., Carrera T., Illarregui A. (2005). Clasificación de embriones a las 25-27 h post-fecundación en su elección para transferencia. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 22: 172-180.
 - Jyotsana B., Sahare A. A., Raja A. K., Singh K. P., Singla S. K., Chauhan M. S., Manik R. S., Palta P. (2015). Handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced from somatic cells isolated from milk and ear skin differ in their developmental competence, epigenetic status, and gene expression. *Cell Reprogramming*. 17: 393-403.
 - Jyotsana B., Sahare A. A., Raja A. K., Singh K. P., Nala N., Singla S. K., Chauhan M. S., Manik R. S., Palta P. (2016). Use of peripheral blood for production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos by handmade cloning. *Theriogenology*. 86: 1318-1324.
 - Kaith S., Saini M., Raja A. K., Sahare A. A., Jyotsana B., Madheshiya P., Palta P., Chauhan M. S., Manik R. S., Singla S. K. (2015). Early cleavage of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos is an indicator of their developmental competence and quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 50: 214-220.
 - Kakkassery M. P., Vijayakumaran V., Sreekumaran T. (2010). Effect of cumulus oocyte complex morphology on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 41: 12-17.
 - Kawahara M., Mori T., Tanaka H., Shimizu H. (2002). The suppression of fragmentation by stabilization of actin filament in porcine enucleated oocytes. *Theriogenology*. 58: 1081-1095.
 - Khan F.A., Bhat M. H., Yaqoob S. H., Waheed S. M., Naykoo N. A., Athar H., Khan H. M., Fazili M. R., Ganai N. A., Singla S. K., Shah R. A. (2014). *In vitro* development of goat-sheep and goat-goat zona-free cloned embryos in different culture media. *Theriogenology*. 81: 419-423.
 - Kharche D. S., Birade S. H. (2013). Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production: A review. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 4: 170-182.

-
-
- Kovaleva N. V., Cotter P. D. (2017). Mosaicism for structural non-centromeric autosomal rearrangements in disease-defined carriers: sex differences in the rearrangements profile and maternal age distributions. *Molecular Cytogenetics*. 19:10-18.
 - Kragh P. M., Vajta G., Corydon T. J., Purup S., Bolund L., Callesen H. (2004). Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reproduction and Fertility Development*. 16: 315-318.
 - 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 and Stem Cells*. 8: 241-250.
 - Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación, la Docencia y la Difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (2010). Aprobada en la sesión 8.10 ante el Consejo Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud. Producción Editorial UAMI. México. Pp. 21.
 - Liu H., Li Y., Wei Q., Liu C., Bolund L., Vajta G., Dou H., Yang W., Xu Y., Luan J., Wang J., Yang H., Staunstrup N. H., Du Y. (2013). Development of transgenic minipigs with expression of antimorphic human cryptochrome 1. *PLoS One*. 8: e76098.
 - Loi P., Ptak G., Barboni B., Fulka J., Cappai P., M. Clinton. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using *post-mortem* somatic cells. *Nature Biotechnology*. 10: 962-964.
 - Loi P., Toschi P., Zacchini F., Ptak G., Scapolo P. A., Capra E., Stella A., Marsan P. A., Williams J. L. (2016). Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. *Genetic, Selection, Evolution*. 58: 53.
 - Lonergan P., Fair T. (2016). Maturation of oocytes *in vitro*. *Annual Review of Animal Biosciences*. 4: 255-268.
 - Lundin K., Bergh C., Hardarson T. (2001). Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Human Reproduction*. 16: 2652-2657.
 - Machtinger R., Racowsky C. (2013). Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reproductive Biomedicine on line*. 26: 210-221.

-
-
- 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: 160-169.
 - Majumdar G., Majumdar A., Verma I., Upadhyaya K. (2017). Relationship between morphology, euploidy and implantation potential of cleavage and blastocyst stage embryos. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 10: 49-57.
 - Malenko G. P., Prokof M. I., Pinyugina M V., Antipova T. A., Mezina M. N., Bukreev M Y. 2006. Production of cloned bovine embryos by somatic cell transfer into enucleated zona-free oocytes. *Cell Biology*. 33: 224-230.
 - Meissner A., Jaenisch R. (2006). Mammalian nuclear transfer. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Associations of Anatomists*. 235: 2460-2469.
 - Meldrum D. R., Casper R. F., Diez J. A., Simon C., Domar A. D., Frydman R. (2016) Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? *Fertility and Sterility*. 105:548-559.
 - Mohapatra S. K., Sandhu A., Singh K. P., Singla S. K., Chauhan M. S., Manik R., Palta P. (2015). Establishment of trophectoderm cell lines from buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos of different sources and examination of *in vitro* developmental competence, quality, epigenetic status and gene expression in cloned embryos derived from them. *PloS One*. 10: e0129235.
 - Morató R., Izquierdo D., Paramio M. T. Mogas T. (2010). Vitrificación de blastocistos bovinos producidos *in vitro* en diferentes estadios de desarrollo. *Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción, ASEBIR*. 15: 27-33.
 - Moreira F., Paula-López F., Hernández-Cerón J., Moore K., Hansen J. (2001). Protocol to count number preimplantation embryos using nuclear staining Hoescht 33342 or Dapi. University of Florida. *Animal Science*. 1: 1-2.
 - Morton K., Rowe A., Maxwell C., Evans G. (2006). *In vitro* and *in vivo* survival of bisected sheep embryos derived from frozed-thawed unsorted, and frozed-thawed sex-sorted and refrozed-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 65: 1333-1345.

-
-
- Mukherjee A., Malik H., Saha A. P., Dubey A., Singhal D. K., Boateng S., Saugandhika S., Kumar S., De S., Guha S. K., Malakar D. (2014). Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 31: 229-239.
 - Navarro M. M. C., Rosado G. A., Serrano H. F. (2003, 2004). Técnicas de clonación de embriones. *Ciencia Veterinaria*. 9: 35-66.
 - Navarro M. M. C., Ambríz G. D. (2008). El borrego cimarrón: Una especie amenazada por la ignorancia del hombre. *Contactos*. 69: 16-22.
 - Navarro-Maldonado M. C., Hernández-Martínez S., Vázquez-Avendaño J. R., Martínez-Ibarra J. L., Zavala-Vega N. L., Vargas-Miranda B., Rivera-Rebolledo J. A., Ambríz-García D. A. (2015). Epitelial cells derived from *Ovis canadensis mexicana* thawed skin tissue for a germplasm bank. *Acta Zoológica Mexicana*. 31: 275-282.
 - Navarro M. M. C., Hernández M. S., Ibarra M. J. L., Vazquez A. J. R., Ambriz G. D. A., Rangel S. R., Vajta G. (2016). Clonación de embriones de *Ovis aries* utilizando fibroblastos criopreservados durante 14 meses. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 3: 45-53.
 - Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. (2010). Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. 30 de diciembre de 2010. México D.F.
 - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2007). Métodos de conservación, en: La situación de los recursos zoogénético mundiales para la alimentación y la agricultura. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Roma. Pp. 485-520.
 - Pahuara L. E., Naveros M. (2014). Producción *in vitro* de embriones bovinos (*Bos taurus*) en dos medios de cultivo. *Spermova*. 4: 54-57.
 - Palma G. (2001). Biotecnología de la Reproducción. Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 1ª edición. Argentina. Pp. 693.

-
-
- Phelan K., May K. M. (2016). Mammalian cell tissue culture techniques. *Current Protocols in Pharmacology*. 73: 12.1.1-12.1.23.
 - Piña-Aguilar R. E. (2012). El regreso del ovocito: de la olvidada transferencia citoplasmática a la actual transferencia del huso meiótico. *Revista Mexicana de Reproducción*. 4: 132-138.
 - Ptak G., Lopes F., Matsukawa K., Tischner M. y Loi P. (2006). Leukaemia inhibitory factor enhances sheep fertilization *in vitro* via an influence on the oocyte. *Theriogenology*. 65: 1891-1899.
 - Ragione T., Verheyen G., Papanikolaou E. G., Van Landuyt L., Devroey P., Van Steirteghem A. (2007). Developmental stage on day-5 and fragmentation rate on day-3 can influence the implantation potential of top-quality blastocysts in IVF cycles with single embryo transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 5: 2.
 - Rausell F., Tarín J. J. (2005). Función del glutatión reducido durante la maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo pre-implantatorio de embriones *in vitro* en mamíferos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 22: 415-429.
 - Ribeiro E. S., Gerger R. P., Ohlweiler L. U., Ortigari I. Jr., Mezzalira J. C., Forell F., Bertolini L. R., Rodrigues J. L., Ambrósio C. E., Miglino M. A., Mezzalira A., Bertolini M. (2009). Developmental potential of bovine hand-made cloned embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem Cells*. 11: 377-386.
 - 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: 95-99.
 - Rocha J. C., Passalia F., Matos F., Maserati M. P., Alves M. F., Almeida T. G., Cardoso B. L., Basso A. C., Nogueira M. F. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assisted Reproduction*. 20: 150-158.
 - Rodríguez-Álvarez L. (2009). Generación de embriones bovinos por transferencia nuclear somática: Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vivo* e *in vitro* y de la expresión génica en las etapas pre y peri-implantatorias. Universidad de Concepción. Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Chile.

-
-
- 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. México.
 - Sandhu A. Mohapatra S. K., Agrawal H., Singh M. K., Palta P., Singla S. K., Chauhan M. S., Manik R. S. (2016). Effect of sex of embryo on developmental competence, epigenetic status, and gene expression in buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced by hand-made cloning. *Cellular Reprogramming*. 18: 356-365.
 - Segura-Correa J., Montes-Pérez R. (2001). Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Revista Biomédica*. 12: 196-206.
 - Selokar N. L., George A., Saha A. P., Sharma R., Muzaffer M., Shah R. A., Palta P., Chauhan M. S., Manik R. S., Singla S. K. (2011). Production of interspecies handmade cloned embryos by nuclear transfer of cattle, goat and rat fibroblasts to buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Animal Reproduction Science*. 123: 279–282.
 - Selokar N. L., Saini M., Muzaffer M., Krishnakanth G., Saha A. P., Chauhan M. S., Manik R., Palta P., Madan P., Singla S. K. (2012a). Roscovitine treatment improves synchronization of donor cell cycle in G0/G1 stage and *in vitro* development of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Cellular Reprogramming*. 14: 146-154.
 - Selokar N. L., Shah R. A., Saha A. P., Muzaffar M., Saini M., Chauhan M. S., Manik R. S., Palta P., Singla S. K. (2012b). 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: 930-936.
 - Selokar N. L., St J. L., Revay T., King W. A., Singla S. K., Madan P. (2013). Effect of histone deacetylase inhibitor valproic acid treatment on donor cell growth characteristics, cell cycle arrest, apoptosis, and handmade cloned bovine embryo production efficiency. *Cellular Reprogramming*. 15: 531-542.
 - Selokar N. L., Saini M., Palta P., Chauhan M. S., Manik R., Singla S. K. (2014). Hope for restoration of dead valuable bulls through cloning using donor somatic cells isolated from cryopreserved semen. *PLoS One*. 9: e90755.
 - Shackleton M. D. (1985). *Ovis canadensis*. *Mammalian species*. 230: 1-9.

-
-
- Shirazi A., Bahiraei A., Ahmadi E., Nazari H., Heidari B., Borjian S. (2009). The effect of the duration of *in vitro maturation* (IVM) on parthenogenetic development of ovine oocytes. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 1: 181-191.
 - Shoukir Y., Campana A., Farley T., Sakkas D. (1997). Early cleavage of *in-vitro* fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Human Reproduction*. 12: 1531-1536.
 - Singh M., Ma X., Amoah E. (2011). *In vitro* culture of fibroblast-like cells from *postmortem* skin of Katahdin sheep stored at 4 °C for different time intervals. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. 47: 290-293.
 - Slimane W., Heyman Y., Lavergne Y., Humblot P., Renard J. P. (2000). Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine *in vitro*-fertilized embryos by using fluorescent *in situ* hybridization with three different cloned probes. *Biology of Reproduction*. 62: 628-35.
 - Slimane-Bureau., King W. A. (2004). Chromosomal abnormalities: A potential quality issue for cloned cattle embryos. *Cloning and Stem Cells*. 4(4): 319-329.
 - Smith J. B., Jenks J. A., Grovenburg T. W., Klaver R. W. (2014). Disease and predation: sorting out causes of a bighorn sheep (*Ovis canadensis*) decline. *PLoS One*. 14: e88271.
 - Soto M. S. (2006). Monitoreo no invasivo de las etapas reproductivas en borregos cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) en cautiverio mediante la observación conductual reproductiva y la cuantificación de esteroides fecales. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. Pp. 64.
 - Stigliani S., Anserini P., Venturini P. L., Scaruffi P. (2013). Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction*. 28: 2652-2660.
 - Stone B. A., Greene J., Vargyas J. M., Ringler G. E., Marrs R. P. (2005). Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development *in vitro* and pregnancy outcomes following embryo transfer. *American Journal Obstetrics and Gynecology*. 192: 2014-2019.
 - Stringfellow D. A., Givens M. D. (2011). Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4ª edición. Champaign, Illinois. USA. Pp. 165.

-
-
- Tarazona A. M., Olvera-Angel M., Lenis Y. Y. (2010). Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42: 125-133.
 - Thibier M. (1990). New technologies in cattle reproduction. Procedimiento del 7° congreso de FAVA. Pattaya Tailandia. Pág. 512-524.
 - Tian X. C., Kubota C., Enright B., Xiangzhong Y. (2003). Cloning animals by somatic cell nuclear transfer–biological factors. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 98.
 - Ugalde R. J. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 48: 33-34.
 - Uribe V. L. F., Correa O. A., Henry O. J., (2009). Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud*. 8: 117-131.
 - Ushijima H., Yoshioka H., Esaki R., Takahashi K., Kuwayama M., Nakane T., Nagashima H. (2004). Improved survival of vitrified *in vivo*-derived porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 50: 481-486.
 - Vajta G., Lewis I. M., Hyttel P., Thouas G. A., Trounson A. O. (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 3: 89–95.
 - Vajta G., Lewis I. M., Trounson A. O., Purup S., Maddox-Hyttel P., Schmidt M., Pedersen H. G., Greve T., Callesen H. (2003). Handmade somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 68: 571-578.
 - Vajta G., Bartels P., Joubert J., De la Rey M., Treadwell R., Callesen H. (2004). Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the handmade cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS). *Theriogenology*. 62: 1465-1472.
 - Vajta G., Korösi T., Du Y., Nakata K., Ieda S., Kuwayama M., Nagy Z. P. (2008). The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reproductive Biomedicine Online*. 17: 73-81.
 - Vallejo J., Gómez P. V., Tarín J. J. (2003). Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 20: 177-187.

-
-
- Van Royen E., Mangelschots K., De Neubourg D., Valkenburg M., Van de Meerssche M., Ryckaert G., Eestermans W., Gerris J. (1999). Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Human Reproduction*. 4: 2345-9.
 - Van Royen E., Mangelschots K., Vercruyssen M., De Neubourg D. Valkenburg M., Ryckaert G., Gerrys J. (2003). Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human Reproduction*. 18: 1062-1069.
 - Vazquez A. J. R., Hernández M. S., Hernández P. J. E., Ambríz G. D. A., Rivera R. J. A., Vajta G., Navarro M. M. C. (2016). Obtención de embriones de *Ovis canadensis* hembra por clonación manual interespecífica a partir de ovocitos de *Ovis aries*. Compendio de Investigaciones Científicas en México. Editores Solano S. C., Sánchez M. E., Vázquez G. V., Martínez G. A., Esquiváis J. M. Editorial Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. México. ISBN 978-607-95228-7-2: 237-242.
 - Vazquez A. J. R. (2016). Reprogramación de carioplastos con extractos de ovocitos como estrategia de producción de embriones por handmade cloning en *Ovis aries*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Tesis de Maestría en Biología de la Reproducción Animal. México.
 - Vazquez A. J. R., Hernández M. S., Hernández P. J. E., Rivera R. J. A., Ambríz G. D. A., Navarro M. M. C. (2017). Producción de blastocistos de hembra *Ovis canadensis mexicana* por clonación manual interespecífica: Efecto del uso de medio secuencial humano. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*. 33: 328-338.
 - Velásquez A. E., Manríquez J. R., Castro F. O., Rodríguez A. L. (2013). Effect of zona pellucida removal on early development of *in vitro* produced bovine embryos. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 45: 7-15.
 - White K. L., Bunch T. D., Mitalipov S., Reed W. A. (1999). Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning*. 1: 47-54.
 - Willadsen S. M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*. 320: 63-65.

-
-
- Winterberger-Torres S., Sellevec C. (1987). Atlas du développement embryonnaire précoce chez les ovins. *I.N.R.A Publications. Versailles*. Pp. 51.
 - Wolpert L., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E., Robertson E., Smith J. (2009). Principios del desarrollo. Editorial Médica Panamericana. 3ª edición. España. Pp. 552.
 - Xue L., Cheng L., Su G., Kang F., Wu X., Bai C., Zhang L., Li G. P. (2011). Nuclear transfer procedures in the ovine can induce early embryo fragmentation and compromise cloned embryo development. *Animal Reproduction Science*. 126: 179-186.
 - Yamanaka S. (2008). Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 363: 2079-2087.
 - Yang M. Y., Rajamahendran R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Animal Reproduction*. 70: 159-69.
 - Yang Z., Vajta G., Xu Y., Luan J., Lin M., Liu C., Tian J., Dou H., Li Y., Zhang Y., Li L., Yang W., Bolund L., Yang H., Du Y. (2016). Production of pigs by hand-made cloning using mesenchymal stem cells and fibroblasts. *Cellular Reprogramming*. 18: 256-263.
 - Yu H. H., Guo Z. L., 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 Online*. 10: 2360-2365.
 - Zhang Y. H., Song S., Kim E. S., Cong P. Q., Lee S. H., Lee J. W., Yi Y. J., Park C. S. (2009). Effects of donor cell passage, size and type on development of porcine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 22: 194-200.
 - Zhang P., Liu P., Dou H., Chen L., Chen L., Lin L., Tan P., Vajta G., Gao J., Du Y., Ma R. Z. (2013). Handmade cloned transgenic sheep rich in Omega-3 fatty acids. *Plos One*. 8: 1-9.

XVII. ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICOS

Número de cuadro	Página
Cuadro 1. Código de estadio numérico de acuerdo a la IETS.....	29
Cuadro 2. Código numérico de calidad morfológica de acuerdo a la IETS.	30
Cuadro 3. Evaluación de la viabilidad embrionaria y conteo nuclear.	32
Cuadro 4. Obtención y MIV de ovocitos de <i>Ovis aries</i>	35
Cuadro 5. Eficiencia de la obtención de citoplastos de <i>O. aries</i> para clonación manual.	36
Cuadro 6. Producción de embriones, segmentación y fragmentación.	38
Cuadro 7. Evaluación de viabilidad, conteo nuclear y blastómeros normales en estadio de mórula (96 horas).	44
Cuadro 8. Correlación de la viabilidad y blastómeros normales con la calidad de la IETS en estadio de mórula (96 horas).....	46
Cuadro 9. Viabilidad en estadio de blastocisto (192 horas).	48
Cuadro 10. Viabilidad embrionaria	49

Número de figura	Página
Figura 1. Eficiencia de la Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS).	3
Figura 2. Diseño Experimental.	19
Figura 3. Arreglo de la caja de preparación de citoplastos.....	25
Figura 4. Arreglo de la caja de fusión.	26
Figura 5. Montaje de la caja y cámara de fusión.....	26
Figura 6. Desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en ovino.	29
Figura 7. Fibroblastos de <i>Ovis canadensis mexicana post-mortem</i> macho adulto.	34
Figura 8. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos <i>O. aries</i>	35
Figura 9. Obtención de citoplastos de <i>O. aries</i>	36
Figura 10. Primera segmentación embrionaria.	37
Figura 11. Estadios del desarrollo de embriones clones de <i>O. c. mexicana</i>	39
Figura 12. Calidad morfológica de mórulas clones <i>O. c. mexicana</i>	41
Figura 13. Calidad morfológica de blastocistos clones <i>O. c. mexicana</i>	41
Figura 14. Multinucleación en mórula clon de <i>O. c. mexicana</i> a las 96 horas.	45
Figura 15. Fragmentación en embrión clon de <i>O. c. mexicana</i> a las 96 horas.	46
Figura 16. Viabilidad y conteo nuclear de blastocistos clones de <i>O. c. mexicana</i>	47
Figura 17. Viabilidad y conteo nuclear de blastocisto partenogenético de <i>O. aries</i>	47

Número de Gráfico	Página
Gráfico 1. Determinación del estadio de desarrollo embrionario a las 24, 96 y 192 horas de cultivo.	40
Gráfico 2. Determinación de la calidad morfológica embrionaria a las 24, 96 y 192 horas de cultivo.	42

XVIII. ANEXOS.

Anexo 1. Clasificación de ovocitos obtenidos por punción- aspiración de ovarios de *O. aries*.

Experimento	Ovarios Colectados	Ovocitos			
		Tasa de obtención	Obtenidos	Viables *	Dañados*
1	52	4	196	107	89
2	16	4	61	48	13
3	68	3	176	76	100
4	87	4	351	90	261
5	38	6	220	62	158
6	64	4	235	63	172
7	75	4	301	99	202
8	43	5	206	57	149
9	66	5	341	94	247
10	58	5	287	102	185
Total:	567		2374	798	1576
$\bar{x}\pm DE:$	56.7±20.4	4.2±0.9	237.4±86.9	79.8±21.2	157.6±71.1
Porcentaje:			100	33.6 ^a	66.4 ^b

Fuente: Elaboración propia

$\bar{x}\pm DE$: Media \pm Desviación estándar.

* Clasificados de acuerdo a los parámetros de evaluación de ovocitos del ASEBIR, 2015.

^{a,b} Literales diferentes en los valores indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Anexo 2. Maduración *in vitro* de ovocitos de *Ovis aries*.

Experimento	Ovarios	Ovocitos obtenidos	MIV	
			Expansión cúmulo	Con CP
1	52	107	106	94
2	16	48	43	33
3	68	76	68	54
4	87	90	90	80
5	38	62	56	55
6	64	63	57	56
7	75	99	89	93
8	43	57	52	51
9	66	94	90	85
10	58	102	74	96
Total:	567	798	725	697
$\bar{x} \pm DE$:	56.7±20.4	79.8±21.2	72.5±20.6	69.7±22.4
Porcentaje:		100	90.9 ^a	87.3 ^a

Fuente: Elaboración propia

$\bar{x} \pm DE$: Media \pm Desviación estándar, MIV: Maduración *in vitro*, CP: Cuerpo polar.

* Los porcentajes fueron obtenidos a partir de los ovocitos clasificados con morfología normal.

^{a,b} Literales similares en fila no indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Anexo 3. Obtención de citoplastos de *O. aries* para clonación manual.

Experimento	Ovocitos		Citoplastos
	MIV (CP)	Enucleados n(%)	Reconstituidos n (%)
1	63	54(86)	49(78)
2	25	22(88)	22(88)
3	41	33(80)	36(88)
4	40	33(83)	30(75)
5	42	42(100)	39(93)
6	40	40(100)	36(90)
7	73	73 (100)	53(73)
8	36	36(100)	29(81)
9	67	58(87)	48(72)
10	65	65(100)	50(77)
Total:	492	456(92.6) ^a	392(79.6) ^b
$\bar{x}\pm DE$:	49.2 \pm 16.2	45.6 \pm 16.2	39.2 \pm 10.5

Fuente: Elaboración propia

$\bar{x}\pm DE$: Media \pm Desviación estándar, CP: Cuerpo polar.

* Clasificados de acuerdo a los parámetros de evaluación de ovocitos del ASEBIR, 2015.

^{a,b} Literales diferentes en los valores indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Anexo 4. Segmentación, producción de blastocistos y embriones clones fragmentados de *O. canadensis mexicana*.

Experimento	Tripletes		Embriones clones	
	Reconstruidos	Segmentados n (%)	Blastocistos n (%)	Fragmentados n(%)*
1	22	21(95)	5(23)	7(33)
2	11	11(100)	1(9)	4(36)
3	18	17(94)	3(17)	5(29)
4	15	13(87)	3(20)	2(15)
5	19	18(95)	1(5)	2(11)
6	18	15(83)	1(6)	7(47)
7	26	24(92)	3(12)	8(33)
8	14	13(93)	3(21)	6(46)
9	21	18(86)	3(14)	8(44)
10	11	10(91)	2(18)	3(30)
Total:	175	160(91.4)	25(14.2)	52(32.5)
$\bar{x}\pm DE$:	17.5 \pm 4.8	16.0 \pm 4.4	2.5 \pm 1.3	5.2 \pm 2.3

Fuente: Elaboración propia. $\bar{x}\pm DE$: Media \pm Desviación estándar.

* Valor obtenido a partir del número de embriones activados.

Anexo 5. Segmentación, producción de blastocistos y embriones fragmentados partenogénéticos de *O. aries*

Experimento	Cultivados	Activados n(%)	Blastocistos n(%)	Fragmentados n(%)*
1	28	25(89)	5(18)	7(28)
2	7	7(100)	1(14)	1(14)
3	11	10 (91)	3(27)	4(40)
4	6	6(100)	2(33)	0
5	10	6(60)	1(10)	0
6	10	4(40)	1(10)	1(25)
7	10	6(60)	1(10)	1(17)
8	12	12(100)	3(25)	5(42)
9	12	10(83)	3(25)	2(20)
10	16	16(100)	4(25)	1(6)
Total:	122	102(83.6)	24(19.6)	22(21.5)
$\bar{x}\pm DE$:	12.2 \pm 6.2	10.2 \pm 6.3	2.4 \pm 1.4	2.2 \pm 2.3

$\bar{x}\pm DE$: Media \pm Desviación estándar. * Obtenido a partir del número de embriones activados.

Anexo 6. Evaluación del estadio del desarrollo embrionario de acuerdo a IETS.

Estadio de desarrollo	Código de estadio IETS*	Grupo experimental: Clones <i>O. c. canadensis</i> (%) (horas)			Grupo control: Partenogenéticos <i>O. aries</i> (%) (horas)		
		24	96	192	24	96	192
1 célula	1	55(32)	15(9)	15(9)	35(29)	20(16)	20(16)
2-8 células	2	107(61)	51(29)	39(22)	86(70)	42(34)	27(22)
Mórula	3,4	0	58(33)	44(25)	0	42(35)	29(24)
Blastocisto	5,6,7	0	0	25(14)	0	0	24(20)
Fragmentado	10	13(7) ^a	51(29) ^a	52(30) ^a	1(1) ^b	18(15) ^b	22(18) ^b

Fuente: Elaboración propia

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (2011).

* Los códigos fueron agrupados para unificar valores, por lo que el estadio de mórula comprende a los códigos de mórula temprana (3) y compacta (4), mientras que el estadio de blastocisto comprende a los códigos de blastocisto temprano (5), tardío (6) y expandido (7).

^{a,b} Literales diferentes en fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las mismas horas de ambos grupos (P<0.05).

Anexo 7. Calidad morfológica embrionaria de acuerdo a IETS.

Calidad morfológica IETS	Grupo Experimental: Clones (%) (horas)			Grupo control: Partenogenéticos (%) (horas)		
	24	96	192	24	96	192
1. Excelente o bien	122(69)	3(2) ^a	11(6)	72(58)	11(9) ^b	12(10)
2. Buena	52(30)	54(30)	45(26)	41(34)	41(34)	32(26)
3. Mala	0	85(49) ^a	68(39)	2(2)	43(35) ^b	50(41)
4. Degenerado	1(1)	33(19)	51(29)	7(6)	27(22)	28(23)

Fuente: Elaboración propia

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.

^{a,b} Literales diferentes en fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las mismas horas de ambos grupos (P<0.05).

Anexo 8. Evaluación de la viabilidad y conteo nuclear de mórulas (96 horas).

Grupo	Número	Calidad IETS	Blastómeros					
			Totales	Viabiles n (%)	Núcleos presentes	Multinucleados	Fragmentados	Normales n (%)
Grupo experimental: Clones de <i>Ovis canadensis mexicana</i>	1	1	16	15(93.8)	18	1	0	15(93.7)
	2		10	9(90.0)	13	1	0	9(90.0)
	3		13	12(92.3)	11	0	2	11(84.6)
	4		10	10(100)	18	2	0	8(80.0)
	5		10	10(100)	32	5	0	5(50.0)
	$\bar{x}\pm DE$		11.8±2.7	11.2±2.4 (95.4)	18.4±8.2	1.8±1.9	0.4±0.9	9.6±3.7 (79.7)
	6	2	18	15(83.3)	16	1	2	15(83.3)
	7		22	17(77.3)	12	0	10	12(54.5)
	8		20	14(70.0)	8	1	13	6(30.0)
	$\bar{x}\pm DE$		20±2	15.3±1.5 (76.9)	12±4	0.7±0.6	8.3±5.7	11±4.6 (55.9)
	9	3	9	5(55.6)	4	0	5	4(44.4)
	10		12	8(66.7)	4	0	8	4(33.3)
	11		9	5(55.6)	2	0	7	2(22.2)
$\bar{x}\pm DE$	10±1.7		6±1.7 (59.3) ^a	3.3±1.2	0±0	6.7±1.5	3.3±1.2 (33.3) ^a	
12	4	10	3(30.0)	4	1	7	2(20.0)	
13		16	0(0)	2	0	14	2(12.5)	
$\bar{x}\pm DE$		13±4.2	1.5±2.1 (15.0) ^a	3.0±1.4	0.5±0.7	10.5±4.9	2±0 (16.3) ^a	
Grupo Control: partenogénéticos de <i>Ovis aries</i>	1	1	9	9(100)	9	0	0	9(100)
	2		9	8(88.9)	9	0	0	9(100)
	3		14	14(100)	15	1	0	13(92.8)
	4		10	9(90.0)	9	0	1	9(90.0)
	5		13	13(100)	11	0	2	11(84.6)
	6		32	32(100)	12	2	22	8(25.0)
	$\bar{x}\pm DE$	14.55±8.8	14.2±9.1 (96.5)	10.8±2.4	0.5±0.8	4.2±2.2	9.8±1.8 (82.1)	
	7	2	10	8(80.0)	11	2	0	8(80.0)
	8		25	21(84.0)	20	0	5	20(80.0)
	9		11	9(81.8)	15	3	0	8(72.7)
	10		10	8(80.0)	11	2	1	7(70.0)
	11		14	12(85.7)	8	0	6	8(57.1)
	12		13	11(84.6)	23	6	0	7(53.8)
	$\bar{x}\pm DE$	13.8±5.7	11.5±4.9 (82.5)	14.7±5.8	2.2±2.2	2.0±2.8	9.7±5.1 (68.9)	
	13	3	18	12(66.7)	9	2	11	5(27.7)
14	9		0(0)	9	0	0	0(0)	
$\bar{x}\pm DE$	13.5±6.4		6±8.5 (33.3) ^b	9±0	1.0±1.4	5.5±7.8	2.5±3.5 (19.6) ^b	
15	4	14	0(0)	3	0	11	0(0)	
$\bar{x}\pm DE$	14±0	0±0 ^b	3±0	0±0	11±0	0±0 ^b		

Fuente: Elaboración propia. $\bar{x}\pm DE$: Media \pm Desviación estándar. ^{a,b} Literales diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (P<0.05).

Anexo 9. Correlación de la calidad morfológica con la proporción de blastómeros viables y normales en mórulas (96 horas).

Grupo experimental: clones de <i>O. c. mexicana</i> (n=13)			Grupo control: partenogenéticos de <i>O. aries</i> (n=15)		
Código de calidad IETS	Proporción de blastómeros viables	Proporción de blastómeros normales	Código de calidad IETS	Proporción de blastómeros viables	Proporción de blastómeros normales
1	1.00	0.50	1	1.00	0.85
1	1.00	0.80	1	1.00	1.00
1	0.90	0.90	1	1.00	0.25
1	0.94	0.94	1	0.89	1.00
1	0.92	0.85	1	0.90	0.90
2	0.77	0.55	1	1.00	0.93
2	0.83	0.83	2	0.85	0.54
2	0.70	0.30	2	0.84	0.80
3	0.56	0.22	2	0.86	0.57
3	0.67	0.33	2	0.82	0.73
3	0.56	0.44	2	0.80	0.80
4	0.30	0.20	2	0.80	0.70
4	0.00	0.13	3	0.67	0.28
r =	<u>0.937</u>	<u>0.845</u>	3	0.00	0.00
			4	0.00	0.00
			r =	<u>0.869</u>	<u>0.778</u>

Fuente: Elaboración propia

r = Correlación de Pearson con un nivel de significancia de 0.05.

Anexo 10. Viabilidad de embriones en estadio de blastocistos (192 horas).

Grupo	Calidad morfológica	Blastómeros viables/totales (Proporción de viabilidad)	Promedio	
Grupo experimental: Clones de <i>Ovis canadensis mexicana</i> (n=12)	1	39/40 (0.97)	0.95	
	1	57/62 (0.91)		
	1	51/51 (1.0)		
	1	24/25 (0.96)		
	1	46/49 (0.93)		
	2	35/41 (0.85)	0.85	
	2	78/90 (0.86)		
	2	28/32 (0.87)		
	2	56/64 (0.87)		
	2	42/52 (0.80)		
	3	50/78 (0.64)	0.71	
	3	54/70 (0.77)		
			r = 0.913	
	Grupo Control: partenogénéticos de <i>Ovis aries</i> (n=14)	1	57/58 (0.98)	0.95
1		58/63 (0.92)		
1		45/46 (0.97)		
1		40/41 (0.97)		
1		40/42 (0.95)		
1		42/46 (0.91)		
2		42/47 (0.89)	0.85	
2		60/73 (0.82)		
2		22/25 (0.88)		
2		24/29 (0.82)		
2		49/58 (0.84)		
2		79/90 (0.87)		
3		36/50 (0.72)	0.74	
3		25/33 (0.75)		
		r = 0.945		

Fuente: Elaboración propia

r = Correlación de Pearson con un nivel de significancia de 0.05.



EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE
ENBRIONES CLONES DE *Ovis*
canadensis mexicana

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 6 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
DR. ALFREDO TREJO CORDOVA
DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA



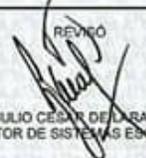
SARAHÍ HERNÁNDEZ MARTÍNEZ
ALUMNA

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL
DE: SARAHÍ HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

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

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DR. ALFREDO TREJO CORDOVA

SECRETARIO

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA