

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

Evaluación de la expresión de un gen de función trofoblástica (Interferón tau) en embriones producidos *in vitro* de ovino doméstico y de híbridos de borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*).

TESIS

**Que para obtener el grado de Doctora en
Biología Experimental
Presenta:**

M. en C. María de los Ángeles Palma Irizarry

Directora de Tesis

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez

Asesores

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Dr. Salvador Romo García

Diciembre 2012



EVALUACION DE LA EXPRESION DE UN GEN DE FUNCION TROFOBlastICA (INTERFERON TAU) EN EMBRIONES PRODUCIDOS *in vitro* DE OVINO DOMESTICO Y DE HIBRIDOS DE BORREGO CIMARRON (*Ovis canadensis mexicana*)

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 10 del mes de diciembre del año 2012 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ
DR. VICENTE MADRID MARINA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de , se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MARIA DE LOS ANGELES PALMA IRIZARRY

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

APROBAR

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

2012

MARIA DE LOS ANGELES PALMA IRIZARRY
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

VOCAL

DR. VICENTE MADRID MARINA

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

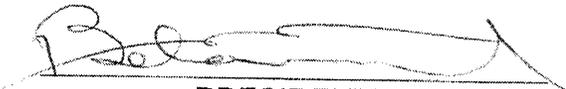
Evaluación de la expresión de un gen de función trofoblástica (Interferón tau) en embriones producidos *in vitro* de ovino doméstico y de híbridos de borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*).

que presentó

M. en C. María de los Ángeles Palma Irizarry

El día 10 de Diciembre del año 2012

Sinodales:


PRESIDENTE

Dr. José Miguel Betancourt Rule


SECRETARIO

Dr. Vicente Madrid Marina


VOCAL

Dr. Pablo G. Damián Matsumura


VOCAL

Dr. Eduardo Casas Hernández

**El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.
CONACYT Beca: 203345**

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

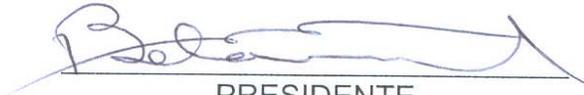
Evaluación de la expresión de un gen de función trofoblástica (Interferón tau) en embriones producidos *in vitro* de ovino doméstico y de híbridos de borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*).

que presentó

M. en C. María de los Ángeles Palma Irizarry

El día 10 de Diciembre del año 2012

Sinodales:


PRESIDENTE

Dr. José Miguel Betancourt Rule


SECRETARIO

Dr. Vicente Madrid Marina


VOCAL

Dr. Pablo G. Damián Matsumura


VOCAL

Dr. Eduardo Casas Hernández

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Yvonne Claudine Ducolomb Ramírez
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I

ASESORES

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura
Departamento de Biología de la Reproducción UAM-I

Dr. Salvador Romo García
FES Cuautitlán-UNAM

Agradecimientos

Al CONACYT por el otorgamiento de la beca no. 203345 y al posgrado en Biología Experimental de la UNAM.

A mi tutora la Dra. Yvonne Ducolomb que es una gran maestra y amiga y ha sido un modelo a seguir por su incomparable capacidad profesional y su gran calidad humana.

Al Dr. Pablo Damián Matsumura, al Dr. Miguel Betancourt Rule y al Dr. Salvador Romo García por su invaluable guía y apoyo en este trabajo.

Especialmente a Guillermo Perales mi "Sensei", que tuvo toda la paciencia del mundo conmigo, y logro un milagro..... que un veterinario analizara secuencias de genes.

Al Dr. Vicente Madrid Marina que creyó en mí, me dio todo su apoyo y me dijo algo que no voy a olvidar el resto de mi vida "estoy orgulloso de ti".

A mis hijas que tuvieron que vivir en carne propia las consecuencias de querer ser mamá e investigadora.

A Humberto González, el ángel de la guarda que me salva siempre en el último momento.

A mi mamá y a mis amigos especialmente a Víctor y Lalo, Zayil e Irma, a Alfred, Alberto, Marisol y al Dr. Pepe Moreno que me escucharon y me tuvieron paciencia en todos los momentos en que me desalentaron el sin número de dificultades que se presentaron en este trabajo.

A Jesús, mi mejor amigo, mi único amor, mi gran maestro, mi acierto, mi equivocación, mi norte, mi guía, mi perdición...

Le agradezco al universo porque a través de la aventura que fue este doctorado me permitió encontrar la libertad, la paz y la verdadera amistad.

Índice

COMITÉ TUTORAL	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Resumen	vii
Abstract	viii
Introducción	1
Aspectos de conservación de especies en peligro de extinción	1
Aspectos biológicos del borrego Cimarrón.....	2
Efecto de la reproducción asistida en el manejo de poblaciones ex situ	3
Reproducción asistida en especies amenazadas	7
Ventajas y desventajas en el uso de técnicas de reproducción asistida en especies amenazadas.....	7
Avances en tecnologías de reproducción asistida en especies amenazadas.....	10
Bancos de germoplasma.....	10
Obtención de semen, criopreservación e inseminación artificial.	11
Transferencia de embriones.....	12
Gestación interespecie.....	13
Producción de embriones <i>in vitro</i>	22
Otras técnicas y sus aplicaciones futuras.....	23
Antecedentes.....	28
Interferón tau.....	30
Estructura de Interferón tau (IFNT)	37
Regulación de la expresión de IFNT	41
Fertilización <i>in vitro</i>	47
Hipótesis.....	49
Objetivo general.....	50
Objetivos particulares	50
Justificación	51
Material y Métodos	52
Diseño del experimento	52
Obtención de embriones <i>in vitro</i>	53
Preparación de medios	53
Colección de ovarios y maduración <i>in vitro</i>	54
Medio de Fertilización (Tris-Buffered-Medium, TBM).....	55
Fertilización <i>in vitro</i>	55
Obtención de semen ovino	55
Valoración de la maduración meiótica y fertilización.....	56
Cultivo de embriones producidos <i>in vitro</i>	57
Colección <i>in vivo</i> de embriones.....	58
Protocolo de superovulación para la obtención de blastocistos híbridos.....	60

Extracción de mRNA.....	60
Síntesis de cDNA.....	61
PCR punto final.....	61
PCR Tiempo real.....	62
Extracción de DNA.....	63
Reacción en cadena de la polimerasa del IFNT	64
Clonación de productos de PCR de Interferón tau.....	65
Secuenciación y análisis de la secuencia del gen de IFNT.....	65
Análisis Estadístico	66
Resultados.....	67
Desarrollo de blastocistos de borregos híbridos de Cimarrón.....	67
Análisis del RT- PCR semicuantitativo.....	68
Análisis del RT- PCR cuantitativo.	71
Amplificación, clonación y secuenciación.	72
Comparación de las secuencias de aminoácidos y análisis filogenético.	73
Discusión	77
Conclusiones	91
Perspectivas	92
Literatura citada	93

Resumen

La principal señal en el reconocimiento materno de la gestación en rumiantes es el interferón tau (IFNT). En el presente trabajo se obtuvieron blastocistos de borregos domésticos (*Ovis aries*) y de borregos híbridos de Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) tanto *in vivo* como *in vitro*, y la expresión del gen de IFNT se determinó por RT-PCR semicuantitativo y cuantitativo. La FIV de borregos híbridos de Cimarrón, produjo un menor número de blastocistos que los que se obtuvieron con borregos domésticos. Los blastocistos de borregos híbridos de Cimarrón producidos *in vivo* e *in vitro* mostraron una expresión menor de IFNT comparada con la de los blastocistos de borregos domésticos. Adicionalmente, se clonó y secuenció el gen de IFNT de borrego Cimarrón, borrego Pelibuey e híbrido de Cimarrón-Pelibuey, aislado de DNA genómico. Dos secuencias nuevas de IFNT de borrego Cimarrón, dos de Pelibuey y una de híbrido fueron descubiertas y reportadas al GenBank. La secuencia obtenida del borrego híbrido de Cimarrón mostró 100% de identidad con una de las secuencias de Cimarrón reportadas en este trabajo, por lo que se deduce que éste es el alelo que dicho animal heredó del borrego Cimarrón. Las secuencias de Pelibuey y Cimarrón mostraron alta identidad entre si, 98% y 95% respectivamente, fue incluso mayor que con el resto de las secuencias del género *Ovis* reportadas anteriormente. Esta alta identidad entre secuencias puede ser una posible explicación del éxito del reconocimiento materno de la gestación en la hibridación de dichas especies. Este estudio reporta por primera vez diferencias en la expresión de IFNT en blastocistos de borregos híbridos en comparación con blastocistos de borregos domésticos y la identificación de alelos del gen de IFNT en Cimarrón, Pelibuey e híbridos de ambos, y muestra que el modelo de híbridos ovinos, puede representar una herramienta valiosa para el estudio de los mecanismos del reconocimiento materno de la gestación en rumiantes.

Abstract

The major signal for maternal recognition of pregnancy in the ruminant species is interferon tau (IFNT). In the present study, *in vivo* and *in vitro* domestic and hybrid blastocysts were obtained, and IFNT expression was measured by semi quantitative RT-PCR and quantitative RT-PCR method. Hybrid *IVF* produced less blastocyst than domestic sheep *IVF*. *In vivo* and *in vitro* hybrid embryos showed lower expression of IFNT when compared with domestic blastocyst controls. Additionally, IFNT genes isolated from genomic DNA obtained from both, parental species and from a hybrid sheep were cloned and sequenced. Two novel sequences of IFNT of Bighorn sheep, two sequences of Pelibuey sheep and one sequence of a hybrid were obtained. The hybrid sequence showed a 100% of identity with one of Bighorn sheep reported in this study, concluding that, this sequence is the allele inherits from the Bighorn sheep. The sequences of Bighorn sheep and Pelibuey sheep showed high identity, 98% and 95% respectively, highest than the sequences in *Ovis* group reported previously. This high identity could explain the maternal recognition of pregnancy success in hybridization between these species. This study reports, for the first time, differences in IFNT expression in hybrid blastocysts and novel alleles of the IFNT gene in Bighorn sheep, Pelibuey sheep and hybrid, and demonstrates that hybrid sheep model may be a valuable tool for the study of mechanisms in maternal recognition of pregnancy in wild and domestic ungulates.

Introducción

Aspectos de conservación de especies en peligro de extinción

La diversidad biológica es la clave para conservar la vida como la conocemos, el crecimiento de las poblaciones humanas ejerce una presión extraordinaria sobre los ecosistemas, lo que produce su destrucción a gran escala (Wildt et al. 1997).

En las regiones megadiversas (donde hay abundancia genética, de especies y ecosistemas) como nuestro país, dominan los patrones globales de extinción (Pimm et al. 1995). Así, en México se extinguieron en el siglo pasado 42 especies de vertebrados según la Unión Internacional para la Conservación (IUCN por sus siglas en inglés, IUCN 2003), lo que coloca a nuestro país entre uno de los 4 países con más especies en amenaza de extinción (IUCN 2007). Por tanto, ante la acelerada disminución de la biodiversidad global, cada país deberá conservar las especies que lo habitan.

Los biólogos conservacionistas sostienen que la preservación (protección estricta) es la mejor forma de conservar la biodiversidad, ya que al mantener grandes extensiones de tierra libres de la intervención humana se podrían proteger muchas especies, desafortunadamente esto no ocurre en el presente y tampoco ocurrirá en el futuro (Soulé et al. 1991). Muchas batallas para preservar diversos hábitats se han perdido. Fue imposible

frenar la destrucción de las selvas en las que habitaban 8 diferentes subespecies de tigre (*Panthera tigris*), que se reconocieron como en peligro por la IUCN en 1969; tres de ellas se encuentran ahora extintas (*P. t. vigata*, *P. t. sondaica* y *P. t. balica*), y una más está catalogada como en peligro crítico (*P. t. altaica*) pues existen menos de 80 individuos en vida libre (Jackson 1993). Con hábitats cada vez más pequeños y alterados, las especies que viven en ellos son más vulnerables a la depresión endogámica, a epizootias, a desastres naturales, e incluso a cambios sociales y políticos. Para ayudar a conservar la biodiversidad se ha propuesto comenzar por proteger a los ecosistemas completos, con sus poblaciones animales y comunidades vegetales (conservación *in situ*), pero también a las especies en situación especial (programas de conservación *ex situ* en zoológicos y otras instituciones) y, eventualmente fomentar la reproducción asistida y criopreservación de material genético por medio de bancos de germoplasma (Soulé et al. 1991).

Aspectos biológicos del borrego Cimarrón

El borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*) pertenece al orden *Artiodactyla*, a la familia *Bovidae* y a la subfamilia *Caprinae*, sin duda es un digno exponente de la “megafauna carismática” de nuestro país, además se encuentra dentro de las 14 especies de fauna, consideradas en México como prioritarias, por el Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el Sector Rural de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, bajo el status de protección especial

(Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres, CITES II).

Existen alrededor de 6 mil ejemplares de tres subespecies, clasificadas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como: *O. c. Mexicana* “vulnerable”, *O. c. Cremnobates* “en peligro de extinción” y *O. c. Weemsi* “críticamente en peligro”; su área de distribución actual corresponde a menos del 30 % de la históricamente conocida. En el norte de México el borrego Cimarrón existía en las regiones más desérticas, desde Baja California a Coahuila, pero actualmente se localiza principalmente en la Península de Baja California y en la extremidad occidental del estado de Sonora (Leopold 1990; SEMARNAP 1997).

Efecto de la reproducción asistida en el manejo de poblaciones ex situ

Para realizar reproducción asistida en una población en cautiverio es necesario conocer aspectos de utilidad para el manejo de una población, además de la biología de la especie (Lacy 1997).

Algunos de los conceptos más relevantes para el manejo de poblaciones son:

El Tamaño Mínimo Viable que se define como el número de individuos necesario, de cualquier especie y en cualquier hábitat, para tener un 99% de probabilidad de sobrevivir por 1000 años (Primack 1993). A pesar de contar con una población de alrededor de 6000 ejemplares de borrego Cimarrón, los hábitats de éstos han sido fragmentados, lo que provoca

una subdivisión de las poblaciones, que podría poner en peligro a largo plazo la supervivencia de la especie, ya que estas poblaciones pierden su variabilidad intrasubpoblacional (Lacy 1997; Mills y Smouse 1994). Uno de los ejemplos mejor documentados de determinación del Tamaño Mínimo Poblacional fue el realizado con 120 borregos Cimarrón en el desierto del suroeste de Estados Unidos. En este estudio se siguió la dinámica de una parte de esta población sin manejo alguno y se observó que las poblaciones de 50 animales o menos son incapaces de sobrevivir por más de 50 años (Berger 1990).

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan las poblaciones pequeñas es un rápido decremento en número de individuos, lo que conduce a la extinción local debido a la pérdida de la variabilidad genética, la consanguinidad y la deriva génica (fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural cambiando las características de las especies en el tiempo (Kaeuffer et al. 2007).

Esto puede ser provocado por fluctuaciones demográficas debido al cambio en los índices de natalidad y mortalidad, cambios medio ambientales, resultado de variaciones en la predación, competencia e incidencia de enfermedades y catástrofes naturales (Primack 1993; Lacy 1987).

Los “cuellos de botella” genéticos ocurren cuando una población se reduce en tamaño, de forma tal que los animales que sobreviven no poseen una serie de alelos que les permiten reproducirse y sobrevivir. Un caso bien documentado es el de los leones del cráter del Ngorongoro, en donde una

población que ya presentaba pocos alelos, pierde la heterocigosis (Parker 1992). En estos casos, cuando unos pocos individuos pertenecientes a una población grande forman una nueva población, esta población está destinada a desaparecer debido a que posee una variabilidad genética mucho menor (Ryman y Laike 1991). Algo similar sucede en cautiverio, ejemplos clásicos de poblaciones con “cuellos de botella” son los cheetas, los leones asiáticos, los hurones de patas negras y los pandas gigantes. El efecto de “cuello de botella” seguido por consanguinidad, desencadena una serie de consecuencias bien conocidas como son, un alto porcentaje de anomalías espermáticas y una alta incidencia de mortalidad de las crías, debido a una depresión endogámica que es difícil de observar en poblaciones silvestres (Ryman y Laike 1991). Otra consecuencia importante son fallas en la respuesta inmune, esto es debido a que al perderse variabilidad genética los animales pierden los loci que juegan un papel importante en la defensa contra enfermedades, ya que al parecer la variación genética acumulada de los loci de la interacción virus-huésped, es un fenómeno adaptativo de las poblaciones.

Por medio de estudios de moleculares se ha observado que los borregos Cimarrón poseen una diversidad genética limitada, esto les ha afectado de manera que presentan una respuesta inmune nula contra *Pasteurella*. Al parecer la cepa que provoca la mayor mortalidad es la *Pasteurella haemolytica* Biotipo A2 (Silflow et al. 1994). Por otro lado, la presencia del virus sincitial respiratorio en borregos Cimarrón, que ha resultado ser

endémico de estas poblaciones, los hace aún más vulnerables a las neumonías por *Pasteurella spp* (O`Brian y Evermann 1988).

A partir de otros estudios orientados a encontrar relaciones filogenéticas entre los borregos Cimarrón y los borregos domésticos, también se ha encontrado que la variabilidad genética de los Cimarrón es mucho más reducida que la de los borregos domésticos (Forbes et al. 1995). Las recomendaciones que se han emitido para evitar el riesgo de contagio de *Pasteurella* y otras enfermedades a partir del ganado doméstico al Cimarrón, están relacionadas con evitar a toda costa la exposición de los ejemplares silvestres con otros ungulados, en especial con los borregos domésticos (Foreyt 1989).

Aunado a lo antes descrito, se mencionan como causas que ponen en peligro de extinción al borrego Cimarrón en México la cacería furtiva, la destrucción y fragmentación de su hábitat (SEMARNAT 2000) y el desplazamiento por especies domésticas (Onderska y Wishart 1982; 1984). Asimismo, otros aspectos más sutiles como la variación demográfica lo pueden llevar a la extinción, por ejemplo como las hembras de borrego Cimarrón se caracterizan por ser monotocas, la baja tasa reproductiva que esto conlleva hace sensible a la población al efecto de la competencia con animales domésticos, que le aventajan en tasa reproductiva y adaptabilidad a las actividades humanas, a los cambios medio ambientales, principalmente a la disponibilidad de alimento y en menor escala a la depredación (SEMARNAT 2000).

Reproducción asistida en especies amenazadas

La utilidad de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) en el contexto de especies en peligro de extinción está en facilitar el manejo genético de poblaciones naturales y de programas de cría en cautividad. Las especies amenazadas constituyen con frecuencia poblaciones pequeñas y aisladas, en las que falta flujo génico. Por otra parte, los programas de cría en cautividad de especies en peligro de extinción cuentan, en general, con pocos individuos fundadores.

En ambas situaciones son más frecuentes los cruces entre individuos emparentados, fenómeno que se conoce como consanguinidad. Los animales consanguíneos son más vulnerables frente a parásitos y enfermedades, y además sufren problemas reproductivos.

Para evitar la consanguinidad, es necesario conseguir el intercambio de material genético entre poblaciones que se encuentran aisladas, así como maximizar los apareamientos entre individuos poco relacionados.

Las TRA, por su parte, permiten el intercambio de gametos entre poblaciones, incluso en aquellas que geográficamente están muy separadas.

Ventajas y desventajas en el uso de técnicas de reproducción asistida en especies amenazadas.

Las TRA son aquellas encaminadas a obtener un mayor número de crías de animales valiosos o a lograr descendencia de animales infértiles o subfértiles. Algunas de estas técnicas están ampliamente difundidas en la

ganadería y la medicina como la inseminación artificial y el congelamiento de semen, la transferencia de embriones y la fertilización *in vitro* (FIV). Otras como la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) y la transferencia nuclear se han vuelto cada vez más frecuentes (Betteridge 2006).

Algunos investigadores consideran que la aplicación de las TRA en fauna silvestre representan una opción viable a corto y mediano plazo, para la conservación de especies en peligro de extinción (Wildt et al. 1992; Lasley et al. 1994), estas técnicas presentan las siguientes ventajas:

- a) Disminuyen los costos facilitando la movilización de material genético y mitigando el efecto de presiones por selección artificial.
- b) Extienden el intervalo generacional. La diversidad genética sólo se pierde cuando los animales no pueden reproducirse, al criopreservar germoplasma los genes no mueren, y puede utilizarse en el futuro. Además, a partir del material genético pueden hacerse estudios que proporcionen información para la conservación de la especie (Leibo 1994; Ryder et al. 2000).
- c) Incrementan la eficiencia reproductiva en cautiverio, ya que en programas reproductivos de cooperación entre zoológicos es posible maximizar la diversidad genética cuando se manejan de forma cuidadosa las poblaciones de especies raras (Hutchins 1991; Miller 2004).

- d) Resuelven problemas de espacio en los zoológicos y evitan que más animales sean extraídos de vida libre para sustentar la diversidad genética de las poblaciones en cautiverio (Ballou 1992).

Sin embargo, tanto la conservación *ex situ* como algunas de las TRA desarrolladas tienen también desventajas, por ejemplo:

- a) Los animales mantenidos en cautiverio se adaptan a él, y pueden sufrir cambios en las piezas dentarias o en algunas enzimas digestivas debido a la dieta en los zoológicos, lo que dificulta regresarlos a vida libre (Crossley 2001; Montoya et al. 2006).
- b) Los individuos pierden las habilidades necesarias para la supervivencia, que debían ser aprendidas de sus padres, los más comúnmente afectados son los mamíferos sociales y las aves (Kleiman et al. 1989; Chivers et al. 1991).
- c) A diferencia de las poblaciones *ex situ*, las poblaciones *in situ* sólo poseen una parte de los genes totales de la especie, lo que los pone en desventaja al tratar de adaptarse de nuevo a su habitat natural (Ballou et al. 1984).
- d) Al intervenir favoreciendo la reproducción de animales que de forma natural posiblemente no lograrían hacerlo, los descendientes pueden no ser los animales mejor adaptados a su medio, lo que interfiere en la selección natural de la especie (Primack 1993).
- e) Para que una población *ex situ* se mantenga por sí misma, necesita tener un número mínimo de animales. Usando algunos marcadores

moleculares pueden elegirse los animales más prometedores para fundar una nueva población *ex situ*. La mayoría de las poblaciones *ex situ* ya son altamente consanguíneas, sin embargo esto también puede ser revertido utilizando técnicas de biología molecular (Saura et al. 2008).

- f) Los esfuerzos de conservación *ex situ* requieren seguimiento, fondos y apoyo gubernamental, lo que no siempre ocurre.

Avances en tecnologías de reproducción asistida en especies amenazadas

En los últimos años ha existido un primordial interés para preservar especies amenazadas y en peligro de extinción por lo que se ha recurrido a utilizar TRA especialmente como herramienta para la conservación de gametos masculinos, femeninos que sean susceptibles de ser utilizados en el futuro para la producción de embriones de calidad para ser transferidos a receptoras ya sea de la misma especie u otra filogenéticamente relacionada que finalmente produzcan crías viables. A continuación se mencionan algunas de las técnicas empleadas en la reproducción asistida.

Bancos de germoplasma

Se refiere a la colección, procesamiento, transporte y almacenamiento así como al uso de gametos, embriones y tejidos en la conservación *in situ* y *ex situ* (Holt 1999). Con un banco de germoplasma (BG) usado de manera correcta, se puede desacelerar la pérdida de variabilidad genética de una

población en cautiverio por medio de la introducción de nuevo material genético, sin necesidad de extraer más individuos de vida libre.

Para su formación debe contarse con suficiente información sobre la historia natural y reproductiva de las especies, así como la distribución geográfica y el origen de los individuos, además de tener dominio sobre las TRA a utilizarse. Es importante la accesibilidad a los donadores y por supuesto, llevar un estricto registro de los materiales almacenados. También es fundamental que se tomen medidas de seguridad para proteger el BG, como dividir las muestras y conservarlas en lugares diferentes, previniendo la total destrucción del mismo. Algunos ejemplos de BG son el Frozen Zoo™ del Zoológico de San Diego (Conservation and Research for Endangered Species, CRES Project 2007), el que existe en el Wild Breeding Resource Center en África (Holt 1999), y el Animal Gene Storage Resource Center en Australia (AGSRA 2007).

Obtención de semen, criopreservación e inseminación artificial.

La colección de semen puede realizarse por medio de una vagina artificial, por electroeyaculación, o mediante el lavado de la cola del epidídimo (postmortem). Otra opción es recuperar el semen después del coito, como en marmosetas y rinocerontes (Morrel et al. 1998; O'Brien y Roth 2000).

La criopreservación de semen se ha llevado a cabo en diferentes especies usando diferentes diluyentes comerciales dependiendo de la especie y éstos varían en las concentraciones de los crioprotectores como el glicerol. Por ejemplo, en bovinos se usa un 5%, en cérvidos no más de un

4%, en cerdos un 3%, en ratones 1.8%, en la chinchilla 6% y en marsupiales se usan concentraciones mayores. Sin embargo, en rinocerontes blancos se ha observado que el glicerol no es adecuado (Holt 2000).

La inseminación artificial (IA) es el método más empleado entre las TRA. Se ha usado en muchas especies silvestres, por ejemplo en bovinos, cérvidos y carnívoros (Holt et al. 1996; Jalkanen y Lindeberg 1998; Montfort et al. 1993; Pope 2000). Cuando no es posible atravesar el cérvix con un catéter para depositar el semen, se utiliza la inseminación intrauterina por laparoscopia. Ésta técnica se ha empleado en borregos salvajes, cérvidos y felinos, sin embargo no es posible utilizarla en animales de gran tamaño. Al depositar el semen directamente en el útero se aumentan las posibilidades de fertilización, especialmente cuando se realiza con semen congelado, esto se ha demostrado en felinos (Swanson et al. 1995). En E.U.A se ha establecido con éxito un programa de IA en hurones de patas negras (*Mustela nigripes*) que ha permitido la propagación y reproducción de esta especie en peligro (Wildt et al. 1997).

Transferencia de embriones.

La transferencia de embriones (TE) se basa en la recolección de los embriones de una hembra “donadora” y su transplante a las hembras “receptoras” que se sincronizan, para establecer y desarrollar la gestación. Ya que es necesario que la donadora produzca una mayor cantidad de embriones que en condiciones naturales, su superovulación es indispensable, para lo que se utilizan la gonadotropina coriónica equina

(eCG) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Swanson et al. 1995). La respuesta de cada hembra a estas hormonas es muy variable (Schiewe et al. 1991). La mayoría de los tratamientos prácticos para sincronizar el celo en rumiantes, se basan en la administración de progesterona o progestágenos solos o en combinación con prostaglandina F2 alfa. Con la aplicación de estas hormonas la presentación de los estros ocurre en la mayoría de las donadoras y de las receptoras casi al mismo tiempo (Scudamore et al. 1991). Esta técnica se ha probado en algunos antílopes africanos como el antílope sable (*Hippotragus niger*), en jirafas, así como en diferentes especies de venados, bóvidos silvestres y camélidos. Además, en felinos se ha podido inducir la ovulación en cualquier momento del ciclo estral usando gonadotropina coriónica humana (hCG) o eCG (Gordon 1977; Loskutoff et al. 1995). Una forma de monitorear la respuesta y las dosis utilizadas, es la medición de esteroides en las heces fecales, fundamental en fauna silvestre (Othen et al. 1999; Ashworth et al. 1992; Thompson y Montfort 1999). El uso de la TE en especies amenazadas, requiere contar con receptoras que no estén en peligro de extinción, que en general, pertenecen a una especie o subespecie filogenéticamente cercana, para lograr la gestación interespecie.

Gestación interespecie.

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la aplicación de TRA en especies amenazadas es la falta de hembras receptoras capaces de gestar con éxito un embrión de la especie de interés.

La gestación interespecie (GI) ocurre cuando existe un producto híbrido en desarrollo o cuando se transfiere un embrión a una hembra que no pertenece a la misma especie, a diferencia de la gestación intraespecífica en la que la madre y la cría pertenecen a la misma especie (Thompson y Montfort 1999).

Los factores que influyen en el éxito o fracaso de una GI son poco conocidos. Es más complejo aún el estudio de estos factores en fauna silvestre y existen pocos estudios sobre el tema, debido al reducido número de animales disponibles para la investigación, a los riesgos que involucra el manejo de estas especies y a la reticencia de algunas instituciones a la implementación de TRA.

Aún así, algunos investigadores han propuesto la hibridación como un método de estudio de la cercanía genética entre individuos de diferentes miembros de una misma familia, como es el caso de los camélidos, en los que se han producido híbridos entre las diferentes especies de camélidos americanos (alpacas, llamas, vicuñas y guanacos), entre los camélidos del viejo mundo (dromedarios y camellos bactrianos) y también entre los del nuevo y viejo mundo (llama x dromedario), probando de este modo que tienen un ancestro común (Skidmore et al. 1999) El estudio de la GI puede conducir a desarrollar una herramienta valiosa en biotecnología y también en la conservación de especies en peligro de extinción (Betteridge 2006; Wildt et al. 1992). Se ha propuesto el uso de hembras híbridas como receptoras de embriones de especies amenazadas a partir del fracaso de

transferir embriones de cabra pirenaica y de borrego Cimarrón a receptoras de especies domésticas (Thompson y Montfort 1999; Fernández-Árias et al. 1999).

La GI es un evento que se ha llevado a cabo durante años en animales domésticos por intervención humana (Mejía et al. 2001). Algunos autores sostienen que la hibridación en la naturaleza ha formado nuevas especies excepto en mamíferos (Bernischke y Rider 1985), mientras que otros afirman que no es un mecanismo de formación de las mismas (Zeh y Zeh 2000). A continuación se describen casos de GI en diferentes grupos de mamíferos:

Équidos

Tal vez los híbridos más conocidos son las mulas, que derivan de la cruce de una yegua con un burro y la cruce recíproca llamada burdégano (caballo x burra). La literatura habla de la imposibilidad de las mulas para tener crías, lo que ha influido en la creencia general, que señala a los híbridos producidos entre diferentes especies como animales estériles. En el caso de las mulas, la diferencia en su número cromosómico (caballo $2n=64$, burro $2n=62$), provoca crías aneuploides (Storer et al. 1975) con fallas en la meiosis, lo que causa infertilidad. Las mulas macho son estériles, los cortes histológicos de sus testículos y estudios morfológicos del semen lo demuestran. En las mulas hembra adultas los ovarios son fibrosos debido a la ausencia parcial o total de células germinales y sólo ocasionalmente presentan cuerpos lúteos. Por lo tanto, es poco probable

que una mula ovule normalmente. Sin embargo, en algunos casos las mulas han sido utilizadas como receptoras de embriones de caballo o de burro, dando como resultado el nacimiento de algunas crías de ambas especies (Storer et al. 1975).

Existen otros híbridos equinos, por ejemplo híbridos de caballo x cebra de Grevy o de Grant, que presentan fallas en la espermatogénesis similares a las de las mulas. En cambio, los híbridos entre caballo de Przewalskii y caballo doméstico son fértiles, así como los híbridos entre burros silvestres y domésticos (Davies et al. 1985). Se han transferido con éxito embriones de caballo a burra y viceversa (Davies et al. 1985), así como embriones de cebra a yeguas y a burras, originando el nacimiento de un potro en el caso de la yegua receptora y, en la pérdida de la gestación en el día 292, en el caso de la burra receptora, aunque en este último hubo pérdida de la gestación (Allen et al. 1985). También se han transferido embriones de *E. przewalskii* a caballos Ponis con el nacimiento de cuatro potros, en donde el 78 % de los embriones transferidos produjeron una gestación, señalándose al método de transferencia no quirúrgico como el de mejores resultados (Bennet y Foster 1985; Kidd et al. 1985).

Bóvidos

En los bóvidos, existen una serie de hibridaciones interespecie. Una característica distintiva de las hembras híbridas bovinas es que tienen fertilidad normal y que los machos son, en algunos casos, infértiles (Pope et al. 1988, Rosnina et al. 2002).

Los números diploides del búfalo de pantano y del búfalo de río son de 48 y 50 respectivamente, el híbrido tiene un cariotipo intermedio $2n=49$, con uno de los cromosomas fusionados, provocando diferentes anomalías a lo largo del desarrollo. Sin embargo, en estos híbridos tanto la hembra como el macho son fértiles (Rosnina et al. 2002).

Otro ejemplo de transferencias interespecie es el de embriones de Gaur (*Bos gaurus*) a vacas domésticas, obteniendo el establecimiento de la gestación de tres de los nueve embriones transferidos (Pope et al. 1988).

También en la transferencia de embriones se ha realizado en antílopes orix cimitarra (*Orix dammah*), con el objetivo de implementar la técnica para luego utilizar este conocimiento en las especies y subespecies de orix que están en inminente peligro como por ejemplo el orix árabe (*Orix leucorix*) que actualmente está extinto en vida libre (Pope et al. 1991).

Ovinos y Caprinos

Entre algunas especies del género *Ovis*, se han logrado hibridaciones y GI exitosas. En la mayoría de las especies del género *Ovis* el número cromosómico es el mismo, 54 cromosomas ($2n=54$), este es el caso de los borregos domésticos (*Ovis aries*), los borregos Muflón (*Ovis gmelini musimon*), el borrego Rojo Armenio (*Ovis orientalis*), el borrego Dall (*Ovis dalli*) y el borrego Cimarrón (*Ovis canadensis*) (Pope et al. 1991).

Entre especies de ovinos cuya duración de la gestación es similar, por ejemplo, entre muflones y borregas domésticas, con gestaciones de 153 días y 149 días respectivamente, se han realizado hibridaciones por monta

dirigida o IA y se han obtenido crías viables mediante la TE de Muflón a domésticas (Rosnina et al. 2002; Hoffman y Woolf 1973). De la misma manera, se han obtenido híbridos entre Muflón y borregos Argali (*Ovis argali*) (Hooffman y Woolf 1973). También se ha logrado la producción de crías de borrego rojo armenio (*Ovis orientalis*), mediante la FIV y la TE a ovejas domésticas (Bunch y Cox 1980).

En otro trabajo se trataron de hibridar berberiscos (*Amotragus lervia*) con ovejas domésticas y con cabras, no se obtuvo ninguna gestación con ovejas y nacieron crías híbridas con cabras, lo que demuestra que aún siendo un género intermedio entre *Ovis* y *Capra*, existe una cercanía filogenética mayor con *Capra* que con *Ovis* (Fernández-Árias et al. 1996).

En cambio, en especies con gestaciones de diferente duración como serían los borregos Dall (*Ovis dalli*), cuya gestación dura en promedio 175 días, la transferencia de sus embriones a ovejas domésticas tuvo diagnósticos negativos de gestación en un primer ensayo, mientras que un trabajo posterior la TE a las mismas ovejas receptoras terminó con muertes embrionarias tempranas y con pérdidas fetales durante diferentes etapas de la gestación (Coonrod et al. 1994).

En E.U.A. y Canadá, que comparten con México el hábitat del borrego Cimarrón, se tiene el reporte de la existencia de alrededor de cuarenta híbridos con borregas domésticas, resultado de un cruzamiento accidental y de una hibridación experimental de la que se obtuvieron crías hembras. Estas hembras recibieron posteriormente monta con Cimarrón y también produjeron crías (Buckrell et al. 1990). Se sabe de la hibridación de

borregos Argali-Muflón con borregos Cimarrón (Buckrell et al. 1990) y de la hibridación de un macho Dall con hembra Cimarrón, cuya cría hembra recibió monta de Cimarrón y parió una cría viable (Young y Manville 1960). En el Centro Ecológico de Sonora hay crías híbridas de la primera generación filial (F1) entre borrego Cimarrón y ovejas domésticas de raza Pelibuey (*Ovis canadensis* x *Ovis aries*) estas ovejas fueron elegidas para hibridarse con el borrego Cimarrón debido a que esta raza mexicana que tiene su origen en África presenta características muy deseables como alta fertilidad y prolificidad (González et al 1987). Además de que tienen un anestro muy corto y poco profundo, por otro lado al ser borregos de pelo era probable que al cruzarse con el borrego Cimarrón las crías heredarán esta característica común, esto es deseable ya que al cruzarse con borregos domésticos de lana los animales resultantes presentan una combinación de ambos tipos de capa lo que les confiere un aspecto desagradable. La fertilidad de los híbridos de borrego Cimarrón con Pelibuey ha sido demostrada al tener crías, tras recibir monta de otros híbridos o a través de la inseminación artificial con borrego Cimarrón. Datos preliminares obtenidos en estas borregas híbridas, muestran su capacidad para mantener una gestación más larga, ya que al ser inseminadas con Cimarrón y gestar crías híbridas 3/4 Cimarrón (F2), la preñez se mantuvo en una hembra 161 días y en otra 162 días (Skidmore et al. 1999).

El uso de hembras híbridas como receptoras de embriones se probó con buenos resultados en un proyecto realizado en España para el rescate de

la cabra montés o Íbice español (*Capra pyrenaica hispanica*), en el cual se logró el nacimiento de tres crías al transferir 2 embriones a cada receptora híbrida (*Capra pyrenaica hispanica x Capra hircus*), las receptoras eran una F1 y dos F2. Se obtuvieron un 100% de gestaciones y 50% de crías viables (Hoefs y Nowlan 1997). En contraste, en un ensayo previo, en el que únicamente habían nacido dos crías de cabra montés después de la transferencia de cincuenta y tres embriones (38% de receptoras diagnosticadas gestantes, 3.8% de crías viables) a cabras domésticas (*Capra hircus*) se atribuyó la pérdida de las gestaciones a incompatibilidad placentaria, a rechazo inmunológico, o a la diferencia de alrededor de 10 días en la duración de la gestación entre ambas especies del género *Capra* (Fernández-Árias et al. 2001).

Finalmente en el 2000 la última Ibex española murió, muestras de fibroblastos de tejido cutáneo fueron criopreservadas y en el 2009, después de muchos intentos, nació una hembra producto de la transferencia de núcleos obtenidos de las muestras tomadas de este último ejemplar de la especie. Desafortunadamente el clon vivió 7 minutos, su muerte se debió a complicaciones pulmonares atribuibles a la clonación, evento muy común en los neonatos producto de esta técnica. Cabe señalar que la hembra receptora era una híbrida (*Capra pyrenaica hispanica x Capra hircus*), resulta interesante que el único animal que ha sido clonado de una especie extinta haya nacido de esta forma y nos hace pensar no solo sobre la utilidad de estos animales como receptoras de embriones, sino en la línea de tiempo que describe a esta especie para

reflexionar si la clonación es una herramienta viable para la conservación o no, el Íbice español se extinguió en el 2000, su resurrección fue en el 2009 y se extinguió nuevamente 7 minutos después (Folch et al. 2009).

Más recientemente se realizó un experimento en el cuál por medio de fertilización *in vitro* se obtuvieron embriones híbridos de Tahr árabe con cabras domésticas, esta es una especie que está clasificada como en inminente peligro de extinción y es objeto de un programa de recuperación. Los embriones fueron transferidos a 4 cabras domésticas de las cuales se detectaron gestantes a 3 de ellas, el objetivo de este experimento fue obtener receptoras híbridas para recibir embriones de Tahr (Idris et al. 2010).

Carnívoros

Embriones de visón europeo (*Mustela lutreola*) se han transferido con éxito a recipientes híbridos de esta especie con hurones salvajes europeos (*Mustela putorius*) (Amstislavsky et al. 2004). Es importante indicar que se hicieron cruzas recíprocas, siendo fértiles todos los animales resultantes de estas cruzas. Este reporte es el único que existe sobre receptoras híbridas de transferencia de embriones interespecie en carnívoros. Hay que señalar que existe un parentesco cercano entre las dos especies hibridadas.

El desarrollo de la transferencia de embriones interespecie en otros animales silvestres también se ve limitado por la dificultad de contar con receptoras compatibles, o por la imposibilidad de obtener embriones u

ovocitos sin comprometer la integridad de las hembras como es el caso de los cánidos. La compleja estructura del oviducto no permite que éste sea lavado para obtener los embriones para transferir y la única forma de obtenerlos es mediante la disección de la estructura, lo que es inviable en cánidos silvestres, como es el caso del lobo mexicano (Farstad 2000).

Producción de embriones *in vitro*

Es el método más eficiente en la propagación de pequeñas poblaciones pero sin duda el más costoso. Las técnicas de maduración y fertilización *in vitro* (MIV) y (FIV) que se realizan en laboratorios de todo el mundo presentan considerables ventajas prácticas, ya que partir de ovocitos obtenidos de animales sacrificados se pueden producir un número considerable de embriones. La MIV y FIV proveen las bases para implementar otras técnicas como la clonación por transferencia nuclear y la manipulación del genoma (Bavister et al. 1992). Sin embargo, los investigadores se han encontrado con algunos obstáculos como tasas de fertilidad bajas, fallas en la implantación, aumento en la duración de la gestación, síndrome de neonatos gigantes y hepatomegalia, que se han atribuido al uso de sueros con los que se suplementan los medios de cultivo, aunque no se sabe exactamente qué componentes causan estas alteraciones (Bavister et al. 1992; Jacobsen et al. 2000). Otro de los retos a superar en la FIV en fauna silvestre es el desconocimiento de la embriología de muchas especies. Esta técnica se ha intentado en algunas especies silvestres como son: la Ballena Jorobada (*Balaenoptera acutorostrata*) (Fukui et al. 1997), el Elefante africano (*Loxodonta africana*)

(Kidson et al. 1995), el Gorila (*Gorilla gorilla*) (Pope 1997), y Cebras (*Equus burchelli* y *Equus zebra*) (Meintjes et al. 1997). La FIV se hace de forma más rutinaria en Ciervo Rojo debido a su valor comercial y semi-domesticación (Berg et al. 2004).

Otras técnicas y sus aplicaciones futuras.

Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)

Esta técnica consiste en inyectar un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito maduro. En el humano ha cobrado importancia en pacientes con espermatozoides que presentan baja o nula movilidad haciendo posible la fertilización. Aunque ya se han tenido avances en algunas especies salvajes, como en el Macaco cola de león (Cranfield et al. 2000), el Gorila (Lanzendorf et al. 1992) y el Jaguarundi (Pope 2000), esta técnica depende del cultivo *in vitro* de embriones, de la transferencia y disponibilidad de receptoras adecuadas para ellos.

Uso de espermatogonias

Los animales en cautiverio mueren por múltiples razones. La muerte de neonatos y animales prepúberes es especialmente grave, ya que no tuvieron la oportunidad de contribuir con su información genética a la siguiente generación. En el caso de los machos que no comenzaron la espermatogénesis o no pudieron terminarla, la criopreservación de semen no es posible (Larson y Gram 1976). El trasplante de espermatogonias podría ser una opción en estos casos, se trata de depositar las

espermatogonias en los tubos seminíferos del receptor, por medio de inyección en los tubos eferentes en roedores, o en la rete testis en especies mayores, usando ultrasonografía (Brinster y Zimmermann 1994). En la actualidad existen reportes en cerdo y cabra (Honaramooz et al. 2002, Honaramooz et al. 2003), toro (Izadyar et al. 2003), monos del género *Cynomolgus* (Schlatt et al. 2002). Esto se ha hecho de forma heteróloga (cuando el donador y el receptor no son de la misma especie) en rata (Clouthier et al. 1996), perro y conejo (Dobrinski et al. 1999), y papiones (Oehninger 2005), usando por lo general ratones como receptores. En especies emparentadas se ha obtenido producción de espermatozoides (Park 2003). En especies no muy cercanas, las espermatogonias han colonizado los tubos seminíferos pero no se producen espermatozoides (Comizzoli et al. 2000). Por lo tanto, la limitante más obvia es la disponibilidad de receptores emparentados y compatibles.

Criopreservación de tejido testicular

Esta técnica ha recibido atención ya que en pacientes con azoospermia obstructiva (donde se producen espermatozoides, pero debido a un daño físico en el testículo no están presentes en el eyaculado) es una alternativa que se está explorando. Usando espermatozoides aislados de tejido testicular criopreservado se han obtenido algunos nacimientos en seres humanos (Park et al. 2003), en rata y ratón (Shinohara et al. 2002).

La criopreservación de tejido testicular podría optimizar la obtención de muestras en especies silvestres y aumentar la cantidad de descendientes de algunos individuos en particular. Cuando un animal muere o es castrado, sus testículos usualmente se desechan, pero si se toma en cuenta que a partir de éstos es posible obtener tejido, este procedimiento podría ser usado como una técnica de campo, al congelar tejidos de animales abatidos en cacería.

Clonación por Transferencia Nuclear.

Consiste en introducir el material genético de la célula a clonar en un ovocito previamente enucleado sin su propio material genético. Se considera que el ovocito tiene la capacidad de reprogramar el programa de expresión génica celular, reiniciándolo de alguna manera, de forma que la célula nueva resultante será capaz de dar lugar a cualquier otro tipo celular. Se han clonado algunos animales silvestres como el Gaur y el Banteng (*Bibos banteng*), dos bovinos silvestres cuyos clones fueron transferidos a receptoras domésticas (*Bos taurus*). En el caso del Gaur, la cría nacida vivió un par de días y murió de una infección neumónica severa, que no fue atribuible al proceso de clonación mismo (Lanza et al. 2000). También se ha intentado la clonación del Bongo de montaña, por medio de la transferencia de núcleos de células somáticas a ovocitos enucleados de vaca, culminando el experimento con el desarrollo de blastocistos, que desafortunadamente no fueron viables (Lee et al. 2004). En un primer estudio, por medio de transferencia de núcleos de células

somáticas de gatos salvajes africanos a ovocitos enucleados de gata doméstica se logró el desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocisto, pero no se detectaron gestaciones en las receptoras domésticas. Posteriormente una gata doméstica parió 3 hembras clonadas de gato salvaje africano (Gómez et al. 2003).

La clonación de borregos Argali (*Ovis ammon*) y Muflón ha despertado un mayor interés por la gestación interespecie, ya que embriones clonados han sido transferidos a borregas domésticas: en el caso de los Argali, con el establecimiento de una gestación (White et al. 1999) y en el caso del Muflón, con el nacimiento de una cría saludable (Loi et al. 2001).

También se ha intentado la producción de embriones por transferencia nuclear interespecífica. Por ejemplo, se han producido embriones clonados de osos Panda utilizando ovocitos enucleados de coneja y se lograron algunas gestaciones utilizando conejas como receptoras. Sin embargo, las gestaciones fueron interrumpidas, concluyéndose que se necesitan más estudios sobre el efecto de las mitocondrias de coneja sobre el metabolismo celular del oso Panda, lo que además plantea diversas consideraciones bioéticas (Chen et al. 2002)

La aplicación de TRA como herramientas para la conservación se ve limitada por muchos factores. Deben considerarse numerosos aspectos bioéticos y el éxito depende en gran medida de la generación de conocimiento más detallado de la fisiología reproductiva de los animales, particularmente de los silvestres, conocimiento que en muchos casos aún

no existe. Las condiciones de cautiverio y la poca accesibilidad del material biológico que además se encuentra en lugares dispares, incrementa la dificultad de los procesos. Además, el que los animales silvestres sean más susceptibles al estrés, requiere el desarrollo de más y mejores técnicas no invasivas. Otra limitante es la dificultad de conformar grupos multidisciplinarios y la poca disponibilidad de recursos para la investigación. Ninguna de estas técnicas, por más exitosa que resultase, puede sustituir la necesidad de contar con programas más eficaces de educación ambiental y de conservación de los hábitat, especialmente en países como el nuestro. Si esto no es tomado como una verdadera prioridad, no tendrá ningún sentido la aplicación de ninguna técnica, ya que sería una solución muy pobre a un problema muy complejo.

Antecedentes

La utilización de TRA en fauna silvestre como una herramienta en la conservación ha sido ampliamente discutida por diferentes autores (Wildt et al. 1992). Sin embargo poco se ha avanzado en este tema en materia de gestación interespecie, sobre todo en las similitudes y diferencias fisiológicas y endocrinológicas que se puedan presentar entre gestaciones inter e intraespecie y con ello orientar el uso de estas prácticas. Una importante limitante en este tipo de estudios es la dificultad para realizar muestreos sin comprometer la integridad del producto y/o de la madre por lo que la aplicación de TRA podría ayudar a superar dicha limitación. Además, la búsqueda de receptoras para transferir embriones de una especie en peligro, a una que no se encuentre amenazada, enfrenta importantes vacíos en el conocimiento sobre temas como la importancia de la cercanía filogenética entre donadora y receptora, las diferencias en la duración de la gestación, diferencias en la placentación y el rechazo inmunológico de la receptora al embrión transferido. Algunos investigadores (Fernández-Árias et al. 2001; Mejía et al. 2001) han producido hembras híbridas dentro de los géneros *Capra* y *Ovis* respectivamente, para ser usadas como receptoras de embriones, ya que existe una considerable diferencia en la duración de la gestación.

La gestación de una oveja doméstica es de 5 meses, mientras que la de una oveja Cimarrón es de 6 meses (Turner y Hansen 1980), por lo que una hembra doméstica sería incapaz de completar el desarrollo de un feto

de Cimarrón por sí misma (gestación interespecie), mientras que una híbrida de ambas especies posiblemente sí lo sería. Algunos trabajos indican que efectivamente estas híbridas tienen la capacidad para ser mejores receptoras. Sin embargo, poco se sabe sobre los eventos biológicos que sustentan las gestaciones de embriones híbridos, por lo que resulta importante desarrollar proyectos que permitan comprender mejor los procesos de interacción madre-embrión o feto y todo aquello que sea capaz de interferir con esta comunicación (Fernández-Árias et al. 2001, Mejía et al. 2001).

El reconocimiento materno de la gestación y la implantación es un periodo crítico a superar por el embrión híbrido (Bernirschke y Ryder 1985). El Interferón tau (IFNT) es sin duda el producto trofoblástico más importante, ya que es la señal responsable, por parte del embrión del reconocimiento materno de la gestación en rumiantes (Parent et al. 2003). Se sabe que la expresión del gen IFNT se ve afectada por algunas condiciones a las que son sometidos los embriones y se ha planteado el modelo de embriones producidos *in vitro* a partir de híbridos entre animales domésticos y silvestres como una alternativa para obtener información cuando no es posible obtener embriones ni *in vivo* ni *in vitro* de una especie amenazada (Rasmussen et al. 2005). En los embriones híbridos no se conoce si existen alguna alteraciones en la expresión del gen IFNT.

Interferón tau

Una variedad de moléculas han sido reconocidas como importantes o esenciales en los procesos reproductivos, entre ellas los interferones representan una clase importante de citocinas. Los interferones fueron descritos primero por su habilidad para responder o prevenir una infección viral en diferentes tipos celulares, y ahora están claros los tipo I ($\alpha, \beta, \delta, \tau, \omega$) y tipo II (γ) que existen en los genomas de los vertebrados y que funcionan en una variedad de procesos no inmunes (Lefevre et al. 1993). En algunas especies los interferones son producido por el embrión en elongación o la placenta, jugando un papel facilitador durante la gestación por medio de la regulación de genes de expresión uterina (Fowler et al. 1980). En los años 80 se describieron mecanismos importantes en la gestación relacionados con la producción de interferones que se expresan en el ratón y en la placenta humana, así como en el endometrio. Otro ejemplo de mecanismos importantes mediados por interferones en la gestación es la producción de IFNG por parte de las células NK uterinas que esta implicada en controlar la desidualización y promover la formación de la arteria espiral en la placenta humana (Leonard 2006). En porcinos, el IFNG y IFND se producen en copiosas cantidades por el trofoectodermoo durante el periodo de la unión al útero, la función de estos interferones no es clara (Roberts et al. 1999).

En los últimos 25 años se le ha puesto singular atención a un nuevo IFN producido por el trofoectodermoo en los embriones de los rumiantes

alrededor del periodo de implantación. Primero se le llamó Trofoblastina pero luego su nombre cambió a IFNT. Lo que más distingue al IFNT es la especificidad con la que se expresa en el trofoblasto y que no tiene respuesta a la infección viral (Ealy et al. 2009).

El IFNT tiene efectos luteotrópicos implicados en el reconocimiento materno de la gestación (RMG), término usado para describir la forma en la cual la madre responde fisiológicamente a la presencia de un producto en su tracto reproductivo (Demmers et al. 2001).

Los rumiantes poseen ovulación espontánea y utilizan los sistemas uterinos para controlar la vida del cuerpo lúteo (CL) y el subsecuente retorno a estro. En vacas no gestantes, la prostaglandina F2 alfa ($PGF_{2\alpha}$) es liberada por el endometrio y viajan a los ovarios debido a un mecanismo local y causan la regresión del CL. La fuente lútea de oxitocina provee una retroalimentación negativa durante la luteólisis donde la oxitocina es liberada en respuesta a la estimulación de $PGF_{2\alpha}$ y causa liberación pulsátil de $PGF_{2\alpha}$. El epitelio glandular es una fuente primaria de $PGF_{2\alpha}$ en la luteólisis, y la oxitocina actúa en estos tejidos blanco por unión a un receptor de membrana plasmática que es expresado tarde en el diestro coincidente al inicio de la luteólisis (Ealy et al 2009).

Durante la gestación temprana en todos los rumiantes, el IFNT actúa en el útero al interrumpir la vía de luteólisis antes descrita para que el CL siga siendo funcional. El receptor de IFNT es el mismo que se ha descrito para los IFN tipo I o receptor alfa (IFNAR) que se encuentra en el borde apical del epitelio luminal y glandular del útero en la gestación temprana. Una de

las vías primarias que agonistas del IFNT para que continúe la función del CL es previniendo la liberación de PGF2 α . El IFNT controla la expresión del receptor de estrógenos (Spencer et al. 1995).

El IFNT promueve la función lútea por medio de la regulación del metabolismo uterino de varias prostaglandinas. En sistemas de cultivo de células endometriales de los ovinos, donde se proveen dosis bajas de IFNT (<1 microgramo/ml) se inhiben la producción de PGF2 α y de PGE2, mientras que dosis altas de IFNT (>1 microgramo/ml) incrementan la producción de PGE2 sin impactar los niveles de PGF2 α (Pratt et al. 1977).

La PGE2 es una luteotropina y un luteoprotector y su producción por parte del endometrio y el embrión en elongación probablemente sirve como mecanismo secundario que mantiene sostiene la función del CL. Evidencia de que el INFT controla la producción de prostaglandina se ha observado en el útero (Pratt et al. 1979).

En experimentos en vacas ciclando en los días 14 al 16 post-estro se incrementan la producción del mRNA de ciclooxigenasa2 (COX2) y los niveles de proteína comparados con los de protaglandina H2 sintetasa, esto limita el proceso enzimático que controla la síntesis de PGE2 y PGF2 α y convierte el ácido araquidónico en PGH2 (Arosh et al. 2004). La aplicación de IFNT no altera la expresión del mensajero ni los niveles de proteína de la enzima responsable de convertir PGH2 a PGE2 (prostaglandina E sintetasa) pero hace que disminuya la expresión endometrial del mensajero de la proteína que convierte PGH2 en PGF2 α (prostaglandin F sintetasa) (Arosh et al. 2004).

La mayor parte de los estudios *in vitro* e *in utero* en rumiantes soportan la teoría de que el metabolismo basal de prostaglandina es modificado por IFNT a favor de mantener el CL funcional (Ealy et al. 2009).

En ovinos, el RMG ocurre alrededor de los días 12 al 14 de la gestación (Senger et al. 2005). En ovejas no gestantes, alrededor de los días 12 al 15 del ciclo estral, ocurre la destrucción del CL (Stewart et al. 1989) por la liberación pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$ (Flint et al. 1986, Putney et al. 1988). En ovejas gestantes hay una secreción basal tónica de esta hormona, a diferencia de la vaca y la cabra en las que deja de producirse por completo, por lo que en la oveja es suficiente para mantener el CL con un cambio en el patrón de secreción de esta prostaglandina de pulsátil a tónico (Zarco et al. 1988).

Los embriones ovinos, entre los días 10 al 21 de la gestación producen IFNT. El IFNT mantiene la liberación de $\text{PGF2}\alpha$ en un promedio no mayor de 1.3 pulsaciones/ hora entre los días 14 y 15 de la gestación, ya que suprime el desarrollo de mecanismos luteolíticos del epitelio del endometrio, como son la inhibición de la expresión del receptor de estrógenos ($\text{ER}\alpha$) de forma directa, y de forma indirecta al inhibir el receptor de oxitocina (OTR), cuando esto ocurre se bloquea también a la enzima ciclooxigenasa (COX2) que evita la presencia de ácido araquidónico, principal sustrato de la $\text{PGF2}\alpha$. Con todo esto favorece el mantenimiento de la gestación (Kim et al. 2003). Un segundo mecanismo en el reconocimiento de la gestación, que coincide con el incremento en la producción del IFNT, es la transformación morfológica del embrión, que

pasa de tener una forma esférica y un diámetro de alrededor de 140 μm , a una forma tubular y posteriormente filamentosa, que llega a medir entre 140 y 190 μm en el día 15 de la gestación (Roberts et al. 1992).

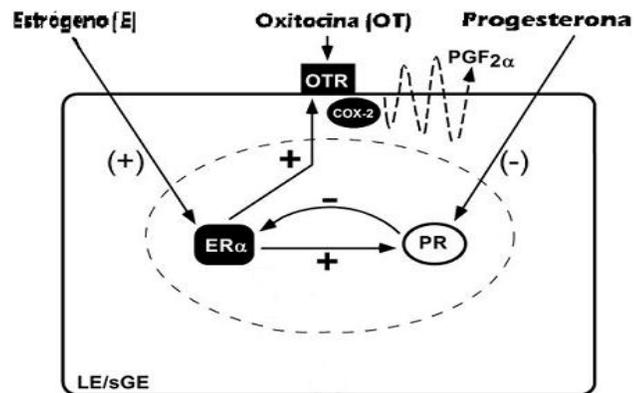
Este IFNT actúa de forma paracrina, ya que es producido por las células del epitelio del trofoblasto y sus receptores se encuentran en el endometrio, por lo que es absorbido por el epitelio del lumen uterino y de las glándulas uterinas (Thatcher et al. 1986, Bazer et al. 1994).

Se ha visto que el IFNT se expresa *in vitro* y su producción por el embrión puede ser afectada por el ambiente de cultivo, ya que se incrementa con la presencia de células endometriales y otros factores como el sexo del embrión, el genotipo paterno o la manipulación de los mismos puede afectar también la secreción de IFNT (Kubisch et al. 2001; Rizos et al. 2004).

La pérdida temprana de las gestaciones en los rumiantes ocurre por una sub-óptima producción de IFNT o la falla del sistema materno en reconocer y responder a la señal de IFNT. La mayoría de las gestaciones que fallan ocurren en las primeras seis semanas de la gestación y se estima que entre el 10 y el 40% de ellas se pierden alrededor del reconocimiento materno de la gestación en rumiantes (Ealy et al. 2009).

De manera muy reciente se han estudiado los papeles de P4 e IFNT desde una nueva perspectiva, especialmente en el efecto de la expresión de genes en el endometrio uterino por proteínas secretorias y por transportar y liberar nutrientes en el lumen uterino para asegurar el desarrollo del embrión en elongación y el éxito de la gestación (Bazer et

al. 2012). Una serie de nutrientes selectos como por ejemplo son argininas y SPP1 (fosfoproteína 1) activan las vías metabólicas mTOR y la adhesión focal del embrión al útero necesaria para el crecimiento y el desarrollo así como la diferenciación del trofoectodermo durante el periodo crítico de implantación en la gestación. La P4 exógena acelera el desarrollo del embrión, incrementa la abundancia de nutrientes selectos, induce la regulación a la baja de PGR en el epitelio uterino y aumenta la secreción de IFNT y progestamedinas para regular la función del epitelio uterino. Este efecto temprano de P4 en el histotrofo aumenta el desarrollo del embrión y el éxito de la gestación tanto en animales como en humanos. Adicionalmente, IFNT altera los las vías metabólicas de modelos murinos actuando en contra de la obesidad y la diabetes y resultados no publicados proveen una base para la futura investigación de los mecanismos que podrían usarse para prevenir y tratar enfermedades inflamatorias (Bazer et al. 2012). El mecanismo de acción de IFNT se describe en la figura **A**.



Oveja ciclando

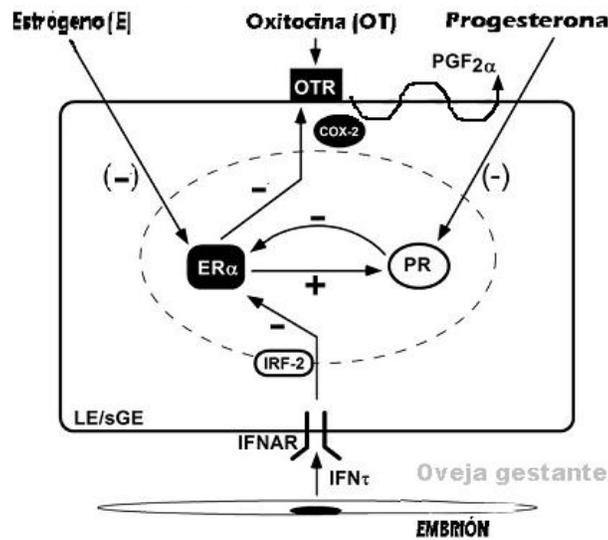


Figura A. Mecanismo de acción de IFNT. EL IFNT suprime el desarrollo de mecanismos luteolíticos del epitelio del endometrio, como son la inhibición de la expresión del receptor de estrógenos (ER α) de forma directa, y de forma indirecta al inhibir el receptor de oxitocina (OTR), cuando esto ocurre se bloquea también a la enzima ciclooxigenasa (COX2) que evita la presencia de ácido araquidónico, principal sustrato de la PGF $_{2\alpha}$. Con todo esto favorece el mantenimiento de la gestación (Adaptado de Spencer et al. 1996).

Estructura de Interferón tau (IFNT)

Recientemente se han descrito 21 variantes polimórficas de IFNT ovino, 12 de bovino y 16 de caprino que se transcriben en los embriones durante la gestación temprana (GenBank 2012). Sin embargo en el ovino, se sabe que diferentes isoformas de ovIFNT poseen diferentes actividades biológicas, incluyendo la habilidad de prevenir la destrucción del cuerpo lúteo (Winkelman et al. 1999). Estas variantes polimórficas de IFNT ovino han mostrado diferencias en su nivel de expresión así como en su actividad biológica. Estas variantes están agrupadas en tres distintos tipos A, B, C que se forman en los arboles filogenéticos. Las variantes de los tipos A y B son las que presentan actividad biológica, las variantes tipo C son pseudogenes o poseen poca actividad biológica (Ealy et al. 2001).

La determinación de las secuencias del gen de IFNT en más especies de ungulados puede facilitar un mayor entendimiento de cómo el IFNT evolucionó como una señal crucial durante la gestación temprana (Rasmussen et al. 2005).

La estructura del IFNT está íntimamente ligada a la de otros interferones tipo 1 como el interferón alfa, beta y omega, de este último evolucionó justo cuando los rumiantes divergieron del resto de los mamíferos. La proteína completa de IFNT tiene 172 amino ácidos, posee un péptido señal el cual como en otras proteínas es una secuencia corta e hidrofóbica de amino ácidos que hace que la proteína sea transportada y secretada.

La proteína madura de IFNT posee 161 amino ácidos (Demmers et al. 2001, Roberts et al. 2003).

La estructura del IFNT como la de otros interferones tipo 1 consiste en 5 alfa hélices designadas como hélices A (residuos consenso 4-21), B (51-67), C(79-93), D(115-134), E(138-158). A las regiones que interconectan las hélices conocidas como asas se les denomina con el nombre de las hélices que interconectan, por lo que existen en estas moléculas las asas AB, BC, CD, DE. Cada hélice y asa pose una región N Terminal, una región media y una región C terminal. La proteína tiene cisteínas en las posiciones 1, 29, 99 y 139 éstas se unen entre sí de la siguiente manera la Cys1 con Cys99 y la Cys29 con la Cys139. Se sabe que el segundo puente disulfuro entre Cys29 y Cys139 puede ser importante en la proximidad de los giros AB y DE, y también es importante en las actividades biológicas y de unión a receptor (Jarpe et al. 1994). En las secuencias de IFNT se observa una región altamente conservada en el asa hidrofílica AB (residuos 24-48) y en una región más hidrofóbica entre los residuos 120 al 144, que se observa en todos los mamíferos, así como en el IFNT de los rumiantes (Rajaravindra et al. 2008).

Las proteínas que carezcan de alguna de esas cisteínas pueden tener su actividad antiviral, afinidad de membrana y actividad antiproliferativa disminuida o completamente abolida (Li y Roberts 1994). Esto indica que estas actividades no están directamente relacionadas con la actividad antiluteolítica en la proteína de IFNT (Winkelman et al. 1999; Rajaravindra et al. 2008).

Estos residuos altamente conservados del asa AB, la hélice D y el asa DE se han predicho como sitios de unión a los IFNR2 (receptor 2 de los IFN). La hélice A así como la hélice C se proponen como un sitio de interacción con IFNR1. Sin embargo, las muchas diferencias estructurales entre IFNT y los IFN Alfa en la hélice B y el asa BC sugieren que la región envuelta en es la función única de hormona antiluteolítica de IFNT ovino (Radhakrishnan et al. 1999).

La información sobre la actividad biológica de diferentes variantes IFNT es muy limitada. Se ha reportado que la variante p3 del IFNT ovino es más potente que otras clases de IFNT ovino como la p8 (Ealy et al. 1998).

Las variantes p3 y p8 tienen solo tres sustituciones de aminoácidos en la posición 101 (Asp por Gly), 107 (Lys por Glu) y 128 (Hys por Tyr). Ya que se encuentran próximas a la presunta región de unión al receptor un cambio de Tyr por Hys en la posición 128 le confiere al IFNT la capacidad de detener la luteolisis (Winkelman et al. 1999).

Se sabe que el IFNT existe en forma glicosilada y no glicosilada. Así como existen dos formas con masa molecular de 20 y 22 kDa, las dos formas previenen la luteolisis (Bazer et al. 1994). En los bovinos las variantes contienen un sitio potencial de glicosilación en la Asn78.

Se han secuenciado 9 variantes del IFNT en el búfalo (*Bubalus bubalis*) pero solo se han observado 4 variantes con el sitio potencial de glicosilación en Asn78 Como los bovinos, el IFNT de *Bos frontalis* contiene este sitio Asn78, por el contrario en los caprinos se encuentran formas glicosiladas y no glicosiladas en las que esta presente Asp78 en vez de

Asn78 (Rajaravindra et al. 2008).

En ovinos, algunas variantes poseen Asn78 pero ninguna de ellas se ha encontrado glicosilada (Winkelman et al. 1999). De las 21 variantes de IFNT ovino solo 8 variantes que pertenecen a los tipos B y C tienen el Asn78 conservado. El sitio potencial de glicosilación Asn78 esta ausente en las de tipo A. La glicosilación es importante en las modificaciones post-transcripcionales en las células eucariontes lo que influye en la estructura y la función biológica de las proteínas incluyendo su estabilidad, secreción, interacción con receptor y su subsecuente actividad biológica.

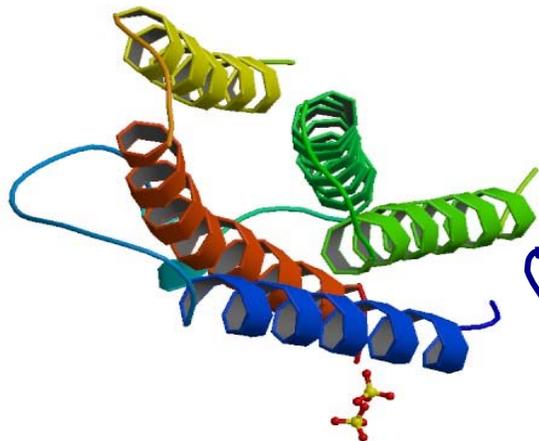


Figura 1. Estructura de Interferón-tau. En amarillo se observa la hélice A, en rojo la hélice B, en azul la hélice C, en verde oscuro la hélice D, en verde claro la hélice E.

Regulación de la expresión de IFNT

La razón por la cual IFNT durante la evolución se convirtió en factor del reconocimiento materno de la gestación en rumiantes, permanece como mera especulación. Pero la evidencia apunta a que los rumiantes convirtieron este sistema facilitador de algún otro muy antiguo a partir de componentes esenciales de este. El patrón único de expresión de IFNT es regulado por una región del promotor/ “enhancer” que es distinta de otros tipos de interferones I. Basado en el análisis filogenético el IFNT este evolucionó del IFNW hace 36 millones de años, poco después de la evolución del suborden Ruminantia de otros artiodáctilos. El IFNT se ha identificado por ejemplo por medio de Southern blot en especies dentro las familias Bovidae, Cervidae, Giraffidae y otras (Roberts et al 2003) por lo que se sabe hasta hoy es el mecanismo universal de RMG en mamíferos. Al día de hoy el IFNT presenta alrededor de 80% de identidad en las secuencias de nucleótidos con las respectivas regiones codificantes del gen de IFNW, pero las similitudes cesan alrededor del nucleótido 130 río arriba del inicio de la transcripción y alrededor del nucleótido 120 río abajo del codón de paro. Probablemente ocurrieron una serie de inserciones en el IFNW ancestral e hicieron que el IFNT perdiera su capacidad de actuar contra virus, pero el IFNT ganó la habilidad de expresarse en el trofoectodermo (Roberts et al. 2003).

El gen IFNT comienza a expresarse en la etapa de blastocisto y la proteína es detectable en el medio a partir de la eclosión (Día 6-8)

(Demmers et al. 2001). La expresión del IFNT por célula se incrementa marcadamente en el blastocisto en crecimiento y cuando comienza la elongación a partir del día 8. Esta asociación se ha observado durante el crecimiento de los embriones elongados *in vivo* sobre la producción de IFNT y en los niveles de p4 en suero en la madre (Roberts et al. 1992). Además en los embriones producidos *in vitro* se incrementa marcadamente la producción de IFNT si se añade al medio de cultivo fluido uterino de ovejas que estén en la fase secretoria del ciclo estral. Finalmente la ausencia de secreciones glandulares uterinas en ovejas resulta en la falla de la elongación del embrión y una marcada reducción de la producción de IFNT. Estos datos sugieren la presencia de factores en las secreciones uterinas que pueden ser capaces de regular la expresión del gen de IFNT de manera coordinada con el crecimiento y el estado hormonal de la madre. De forma razonable se infiere que estos factores se unen a la superficie del trofoblasto a receptores y que activan la vía de transducción de señales que regulan la activación constante de IFNT (Ezashi et al. 2004). Con esta información y con el conocimiento de que el IFNT posee una estructura similar a los otros interferones tipo 1 funcionales, incluyendo el motivo de unión a receptor, se descubrió que la regulación de la expresión del gen de IFNT además obedece a los factores reguladores externos comunes a los demás interferones tipo 1. En la actualidad se sabe que un componente clave en la expresión de IFNT es el factor de transcripción Ets 2, un factor muy ubicuo que regula la

expresión de otros factores placentarios de varias especies, incluyendo el lactógeno II en el ratón y hCG beta en humanos (Ezashi et al. 2001).

La expresión de IFNT está regulada primariamente por el complejo de secuencias regulatorias donde está contenido el sitio de unión a Ets 2 que se localiza en 79-70 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Ezashi et al. 1998, 2001). Los promotores Ets 2 no son característicos de IFNT, sino que se encuentran en muchos genes incluyendo el activador del plasminógeno de tipo urokinasa (uPA) que se expresa en el trofoectodermo, este sistema juega un papel central en la degradación de la matriz extracelular, la migración celular y en el potencial de invasividad celular (Stacey et al. 1995).

La proteína Mx es una de las moléculas que ejerce regulación positiva en la expresión del gen de IFNT, es secretada en el lumen epitelial, el epitelio glandular, el estroma y el miometrio, y es un componente importante en la respuesta de los interferones I. La presencia de esta proteína se asocia al aumento en la producción de este interferón y de progesterona, por lo que también interviene en la comunicación de la madre y el embrión (Ott et al. 1998). Así mismo por lo menos otros dos factores están envueltos en la regulación de la expresión de IFNT. El Cdx2 es un conocido factor de transcripción requerido por el trofoectodermo para su desarrollo. Este factor está localizado en el trofoectodermo durante el desarrollo de embrión ovino y se sobre-expresa en células de cultivo de líneas celulares cuando se adiciona IFNT en presencia de Ets 2 y proteína activadora 1 (AP-1). Un segundo factor Dlx3 es un cofactor del dominio de homeobox

que se requiere en la placenta en desarrollo del ratón. Este se expresa en varios mamíferos, incluidas las líneas celulares del trofoectodermo de bovinos y actúa en cooperación con Ets2 para optimizar la transcripción de IFNT (Ezashi et al. 2008).

Por otro lado un factor materno que pudiera regular negativamente la expresión del gen de IFNT es la producción tardía de progesterona después de la ovulación o una baja producción durante la fase lútea, que disminuye la capacidad del embrión para producir IFNT y además provoca un pobre desarrollo del embrión (Mann et al. 1999).

Es claro que Ets2 es el componente central en el circuito transcripcional de IFNT en el trofoectodermo, sin embargo el control temporal de expresión de IFNT está dado por otros factores. La expresión del gen esta restringida al trofoectodermo lo que probablemente ocurre en gran medida por la actividad regulatoria de Cdx2, Dlx3 y potencialmente de otros factores de regulación trofoectodermo- específicos (Ealy et al 2009). La expresión de IFNT es difícil de cuantificar pero algunas ideas han tomado fuerza, como que al menos dos mecanismos están envueltos en limitar la expresión temprana de IFNT en el embrión en desarrollo. La ausencia de Cdx2 y Dlx3 durante los estadios iniciales compromete la habilidad del embrión de producir IFNT (Leaman et al. 1994). Así como el bloqueo funcional de Ets2 existe durante los estadios iniciales, el Oct4 (factor 4 de transcripción de unión a octámeros) interrumpe la actividad del promotor de IFNT inducida por Ets2. Oct4 es muy conocido como marcador de pluri-potencialidad en las células embrionarias más tempranas, células

germinales embrionarias, y células madre embrionarias y adultas (Ralston et al. 2008). Oct4 inhibe la expresión de otros factores durante la gestación temprana. Por ejemplo, Oct4 inhibe a Cdx2 en embriones de ratón y células madre embrionarias. La expresión de Oct4 está restringida a la masa celular interna después de la formación del blastocisto en el ratón. Sin embargo, se ha detectado Oct4 en el trofoectodermo de blastocistos en bovinos y cerdos, y Oct4 que tiene reacción inmune puede ser detectada en el trofoectodermo en los días 10 de gestación o aproximadamente 3 días después de la formación del blastocisto, pero algunos días antes del incremento masivo del mensajero de IFNT (Ralston et al. 2008).

Para resumir la falta de expresión de IFNT después de la formación del blastocisto, puede ser causada por la combinación de la represión del gen de Oct4 y por la actividad de Ets2 y la falta de actividad de Cdx2 y Dlx3. Así como el lento incremento en el mensaje de IFNT entre los días 7 y 14 de la gestación puede ser causado por la reducción y la eventual pérdida de Oct4 en el trofoectodermo (Ealy et al. 2009).

Permanece poco claro como la pérdida de la represión de Oct 4 es el mecanismo único involucrado en generar el surgimiento de la transcripción alrededor de los días 12-13 de la gestación de la oveja. Como ya se mencionó, la expresión de Oct 4 cesa unos días antes del pico de expresión de IFNT. Esto sugiere que existe un control adicional para mediar el surgimiento de la expresión de IFNT. Se ha mencionado a FGF2 un factor de crecimiento que se produce en el epitelio luminal endometrial

que ocurre en los días 12-13 después del estro en ovejas y que juega un importante en maximizar la transcripción durante la gestación temprana. La importancia de este evento en el desarrollo del embrión no ha sido bien examinada (Michael et al. 2006).

Un concepto alternativo es que el epiblasto juega un papel muy importante en la regulación de la expresión de IFNT. Los embriones producidos *in vitro* usualmente muestran niveles de supervivencia menores que sus contrapartes *in vivo* después de la transferencia. Algunos embriones *in vitro* tienen un epiblasto detectable al día 14 de la gestación y este epiblasto es de menor tamaño que el de los embriones *in vivo*. Pocas gestaciones prosperan como resultado de transferir embriones que no tienen epiblasto detectable. Sin embargo, en rumiantes todavía no se encuentra una relación clara entre el trofoblasto y la formación del epiblasto, en embriones en los que no se forma esta estructura la placentación no ocurre (Dorniak et al. 2012).

En realidad, poco se ha hecho para determinar por que deja de producirse IFNT cuando el embrión se une al útero. No es sorprendente que los genes placentarios se expresen cuando esto ocurre,, una serie de factores de unión celular están involucrados con la placentación y un nuevo linaje de células de la placenta emergen del trofoectodermo en este momento en la gestación. Cada uno de estos procesos ocurren durante el tiempo en que se desarrolla la placenta y parecen ser los responsables de la rápida terminación de la transcripción del IFNT (Spencer et al. 2004).

Fertilización *in vitro*

Durante muchos años se ha trabajado buscando reproducir artificialmente los eventos de la maduración de ovocitos, la fertilización *in vitro* y el desarrollo embrionario temprano. Así, lo que en principio sólo tenía fines de investigación, en los últimos años se ha comenzado a utilizar con propósitos comerciales (Bavister et al. 1992).

Los resultados de producción *in vitro* de embriones en distintas especies fueron mejorando significativamente a medida que avanzaron los conocimientos acerca de sus requerimientos. Para ello, fue necesario transformar los medios de cultivo primitivos, muy complejos y suplementados frecuentemente con suero, en medios más definidos (donde se conocen todos los componentes), en los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del efecto que genera sobre el desarrollo embrionario, su sobrevivencia post-criopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables.

Estas técnicas se realizan en laboratorios de todo el mundo, pues presentan considerables ventajas prácticas ya que un número considerable de embriones pueden ser producidos a partir de ovocitos obtenidos de los ovarios de animales sacrificados con horas de anticipación cuando éstos son conservados de manera adecuada y la técnica está montada con eficiencia. Además, la MIV y FIV proveen las bases para implementar otras técnicas como la clonación por transferencia

nuclear y la manipulación del genoma (Bavister et al. 1992). Estas ventajas se han aprovechado al utilizarse en especies silvestres como es el caso de los Muflones europeos (Berlingher et al. 2005), el Ciervo Rojo (Locatelli et al. 2005) y Gato Indio del Desierto (Pope 2000), entre otros.

El proceso de producción *in vitro* de embriones puede dividirse en tres pasos fundamentales, en orden cronológico son: maduración de ovocitos, fecundación de ovocitos maduros, cultivo de embriones. Estos tres pasos comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno el éxito o el fracaso del siguiente. Luego de la MIV, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 horas de comenzada la maduración. De estos, aproximadamente el 80% es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto o blastocisto expandido luego del cultivo durante 6-7 días. Esto indica que el cultivo embrionario, correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción *in vitro*, es el período en el que se establece el mayor porcentaje de pérdida del sistema. A su vez, durante esta etapa, se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos (Enrigh et al. 2000; Lonergan et al. 2003).

Hipótesis

La adecuada expresión del gen de IFNT es determinante en el reconocimiento de la gestación en rumiantes. La expresión del gen de IFNT se afecta de forma negativa cuando existe en el embrión un genotipo paterno distante al de la madre, por lo que al utilizar híbridos para producir blastocistos la expresión será menor en estos que en domésticos. Este fenómeno se observará en blastocistos híbridos producidos tanto *in vivo* como *in vitro*, validando el modelo *in vitro* para el estudio de la gestación interespecie en la etapa preimplantacional.

Objetivo general

Determinar la expresión del gen de IFNT en blastocistos de ovino doméstico e híbridos de Cimarrón producidos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Objetivos particulares

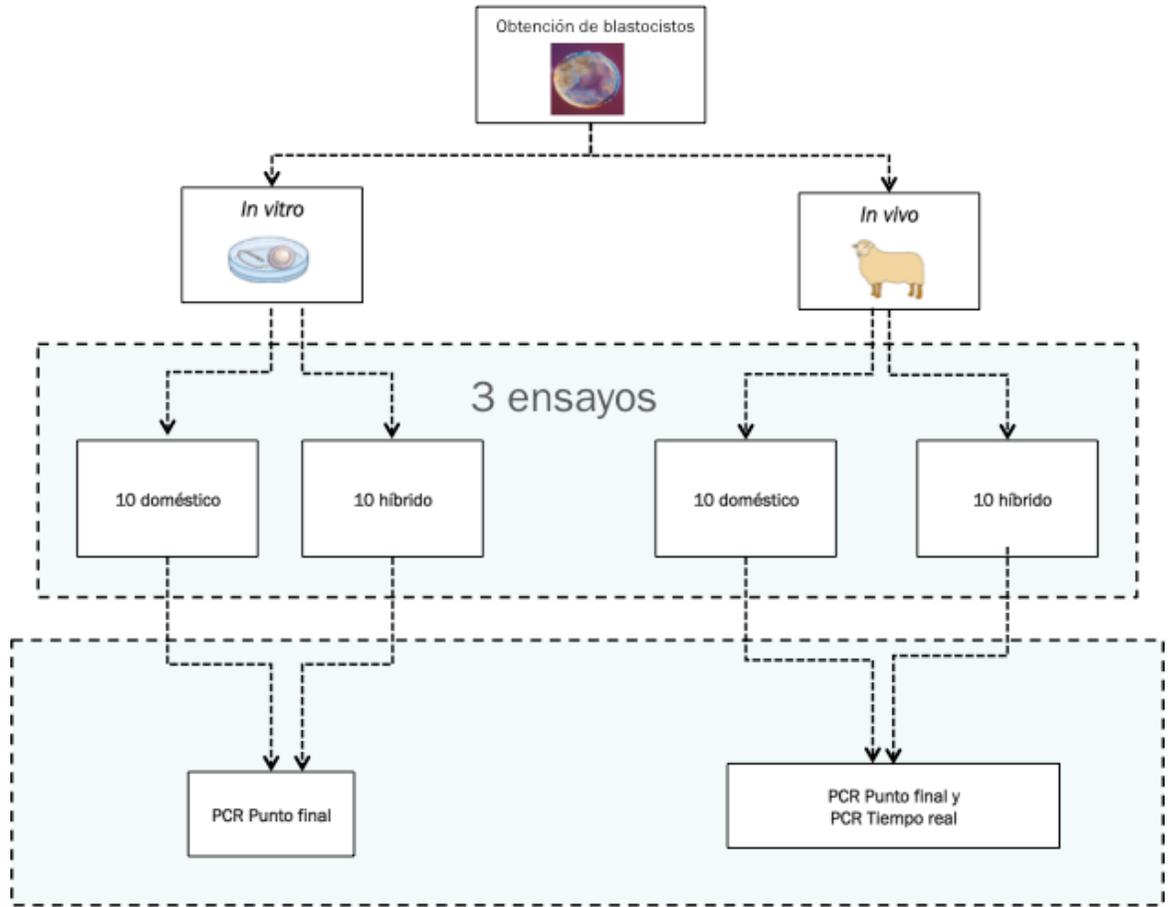
- Obtener *in vitro* e *in vitro* blastocistos de ovinos domésticos e híbridos de doméstico x 1/4 Cimarrón, mediante FIV.
- Producir *in vivo* blastocistos de ovinos domésticos e híbridos de doméstico x 1/2 Cimarrón.
- Cuantificar la expresión del gen de IFNT en los blastocistos obtenidos *in vitro* e *in vivo* mediante las técnicas de RT-PCR y Q-PCR.
- Determinar las secuencias de las variantes de los genes de IFNT de borregos Cimarrón, domésticos e híbridos y compararlas con las de otras especies emparentadas

Justificación

La utilización de TRA en especies en peligro se enfrenta entre otros retos a la utilización de receptoras de especies no amenazadas, pero poco se sabe de las razones por las cuales no hay éxito, en especial de lo que ocurre con el reconocimiento materno de la gestación. Ya que el IFNT es el responsable de este fenómeno en rumiantes, un modelo que permitiría su estudio es la obtención de embriones *in vitro* de ovinos domésticos y de híbridos de doméstico x Cimarrón para medir la expresión del gen de IFNT. Por otro lado las variantes del gen de IFNT en borregos Cimarrón, Pelibuey y de los híbridos entre ambos no se habían descrito antes y pueden ayudar a comprender el mecanismo de acción de esta molécula.

Material y Métodos

Diseño del experimento



Obtención de embriones *in vitro*

A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Los COCs y los embriones se incubaron a 38.5 °C con 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación.

Preparación de medios

Un día antes del experimento de maduración de ovocitos de ovino doméstico, se prepararon 100 UI de heparina en 3 ml de medio de cultivo TCM-199 con HEPES (*In vitro* SA. de CV. México) y 0.1% de alcohol polivinílico (PVA), para la colección de ovocitos.

Se adicionó factor de crecimiento epitelial (EGF) al medio de maduración de ovocitos, este se preparó en TCM-199 sin HEPES a una concentración final de 10 ng/ml, se filtró y se hicieron alícuotas de 100 µl.

El medio de cultivo TCM-199 sin HEPES (*In vitro* SA. de CV. México) se suplementó con PVA 0.1%, D- glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.157 mM y antibióticos (penicilina 75 µg/ml, estreptomina 50 µg/ml). Posteriormente, a cada 10 ml de este medio se le adicionaron 100 µl del EGF antes preparado (concentración final 10 ng/ml) de acuerdo con Wang (1998).

Un día antes del experimento, cajas de cultivo de cuatro celdas se llenaron con 500 ML de medio TCM-199/celda. Se cubrieron con aceite mineral (Fisher IL, E.U.A) previamente lavado en solución salina 0.9% y se incubaron durante 24 horas a 38 °C y 5% de CO₂ en aire humidificado.

Colección de ovarios y maduración *in vitro*

Los ovarios se colectaron en el rastro “El Rojo” ubicado en Texcoco, Estado de México, a partir de ovejas domésticas recién sacrificadas y se transportaron en un termo al laboratorio en solución de NaCl al 0.9%, a una temperatura de 37 °C en un tiempo menor a 2 horas. Una vez en el laboratorio, se realizaron dos lavados con 100 ml de solución salina fresca. Los folículos ováricos con un diámetro de 2 a 8 mm se puncionaron y aspiraron, utilizando una jeringa hipodérmica desechable de 10 ml con aguja hipodérmica de calibre 21 para la obtención del líquido folicular que contenía los complejos ovocitos-células del cúmulo (COC).

Bajo el microscopio estereoscópico se seleccionaron los COC, eligiéndose aquellos que presentaban ovocitos con el citoplasma uniforme y rodeados por al menos dos capas completas de las células del cúmulo. Los ovocitos seleccionados, se colocaron en las celdas que contenían 500 µl de medio de maduración (TCM-199 suplementado) cubierto con aceite mineral, y finalmente se les agregaron 0.5 µg/ml de hormona luteinizante (LH) y 0.5 µg/ml de hormona folículo estimulante (FSH). Las cajas se incubaron a 38 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad a saturación, durante 22 a 24 horas.

Medio de Fertilización (Tris-Buffered-Medium, TBM)

Se prepararon 100 ml de medio TBM, que se utilizó en un tiempo no mayor a tres semanas, 48 horas antes de la fertilización se suplementó con cafeína 2.5 mM y BSA fracción V (Libre de ácidos grasos) al 0.4%. Este medio se incubó por 24 horas a 38 °C, con 5% de CO₂ %, antes de preparar una caja de 4 celdas con gotas de 250 µl de medio de fertilización, cubiertas con aceite mineral y se incubó a 38 °C con 5% de CO₂ % y humedad a saturación por otras 24 horas (Abeydeera et al. 1998 a,b).

Fertilización *in vitro*

Transcurrido el tiempo de maduración, los COC se lavaron tres veces en gotas de medio TBM antes de ser colocados en las cajas de cultivo que se prepararon con anterioridad y posteriormente se incubaron durante el tiempo en que se prepararon los espermatozoides.

Obtención de semen ovino

El semen fresco se obtuvo a partir de machos domésticos o híbridos, de fertilidad probada, mediante una vagina artificial, se evaluaron sus características macroscópicas (volumen, color, movimiento masal) el semen se diluyó (1:10/v:v) en medio Tris, glucosa y yema de huevo (Triladyl, Minitube Alemania), se congeló a una concentración de 100 millones de espermatozoides/ml en pajillas de 0.25 ml en N₂ líquido, hasta su utilización. El semen congelado se transportó al laboratorio de Biología

Celular de la UAM-Iztapalapa donde se llevó a cabo la FIV. Cuatro pajillas se descongelaron por inmersión en agua a 37 °C durante 20 seg. El semen descongelado se diluyó en 10 ml de una solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco (DPBS) suplementada con BSA fracción V al 0.1%, 75 µg/ml penicilina G y 50 µg/ml de estreptomicina a un pH de 7.2-7.3. La suspensión se centrifugó a 61 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se diluyó 1:1 con DPBS y se centrifugó a 1900 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular se diluyó con 10 ml de DPBS y se centrifugó dos veces más en las mismas condiciones. Finalmente, el paquete celular fue diluido en 100 µl de mTBM.

Después de hacer las diluciones apropiadas en medio de fertilización, 250 µl de esta suspensión de espermatozoides se agregaron a la celda de fertilización que contenía 250 µl de mTBM con 30 a 40 COC, para obtener así la concentración final de 0.5×10^5 espermatozoides/ml. Los gametos se coincubaron durante 20 horas (Rizos et al. 2004).

Valoración de la maduración meiótica y fertilización

Transcurrido el tiempo de coincubación, los COC se lavaron y se les quitó todo residuo de células del cúmulo y espermatozoides en medio TL-Hepes -PVA modificado. Con una pipeta Pasteur y bajo un microscopio estereoscópico, se tomaron grupos de 5 a 10 ovocitos y se presionaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Posteriormente, cada grupo se fijó en una solución de etanol - ácido acético (3:1) durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, los ovocitos se tiñeron con una solución de

acetorceína al 0.1%. Inmediatamente después, se realizó la observación de los pronúcleos utilizando un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos (Abeydeera et al. 1998^a).

La determinación de la maduración y fertilización se evaluó de la siguiente manera:

a.- Inmaduros : Aquellos ovocitos que presenten la Vesícula Germinal.

b.- En vías de maduración: Ovocitos que presenten cromosomas en Metafase I.

c.- Madurados: Los ovocitos que presenten un cuerpo polar y/o cromosomas visibles en Metafase II.

d.- Fertilizados: Los ovocitos que presenten pronúcleos y cuerpos polares.

Cultivo de embriones producidos *in vitro*

Después del tiempo de coincubación los COCs se lavaron tres veces en gotas 50 µl de medio de desarrollo North Carolina State University 23 (NCSU-23), para retirar los espermatozoides y las células cúmulo residuales; de 30 a 40 ovocito se transfirieron a una caja de 4 celdas que contenía 500 µl de medio de desarrollo previamente cubiertas con aceite mineral y se incubaron en las mismas condiciones antes mencionada durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo a cada celdas se adicionaron 50 µl de de suero fetal bovino, y se incubaron durante 5 a 6 días más para que los embriones llegaran a la etapa de blastocisto, lo cual debe suceder alrededor del día 7 u 8 de cultivo (considerando el día de la FIV como día 1). Las incubaciones se efectuaron a 38 °C, 5% CO₂, en aire humidificado.

Colección *in vivo* de embriones

Se utilizaron 32 ovejas adultas de raza Suffolk con edades de 4 a 6 años que fueron sincronizadas con esponjas vaginales de 20 mg de FGA (Chronogest, Intervet) durante 12 días y superovuladas con 200 mg de FSH (Folltropin-V, Bioniche) en esquema decreciente (ver esquema) administrado durante 4 días, iniciando 2 días antes del retiro de la esponja y finalizando 1 día después. Las hembras recibieron monta natural cada 8 horas mientras permanecieron receptivas.

La recolección de embriones se realizó mediante laparotomía medio ventral el día 7 posterior al estro, previa dieta por 24 horas y anestesia con xilazina (0.45 mg/kg/PV) y ketamina (2.0 mg/kg/PV). Una vez anestesiadas se rasuró, lavó y desinfectó la región abdominal, para posteriormente realizar una incisión de aproximadamente 3 cm de largo y 2 cm anterior a la ubre sobre la línea media para entrar a la cavidad abdominal. Antes de exteriorizar los cuernos uterinos se evaluó la respuesta a la superovulación mediante la revisión de los ovarios, contando el número de los cuerpos lúteos y verificando su calidad (normales o en regresión). Posteriormente se exteriorizó el útero y se lavó cada cuerno por separado, utilizando una sonda de Foley (calibre 10 Fr) que se introdujo en la base del cuerno mediante una punción realizada con un catéter intravenoso (14G x 5½) para recuperar el medio de lavado (Vigro Complete Flush Solution. AB Technology, EUA). A través de otro catéter intravenoso (18G x 1¼) insertado en la punta del cuerno uterino,

se administraron 40 ml del medio que se colectaron en un filtro concentrador. Concluida la recolección de los embriones, el útero se regresó a la cavidad abdominal y se suturó la incisión. Los embriones fueron conservados en una solución de mantenimiento (Vigro Holding Plus. AB Technology, EUA) y evaluados morfológicamente en un microscopio estereoscópico, clasificándose de acuerdo a su grado de desarrollo y calidad en ovocitos, mórulas y blastocistos; excelentes (1), buenos (2), regulares (3) y no transferibles (4).

Protocolo de superovulación para la obtención de blastocistos

híbridos.

- Día 1 COLOCAR ESPONJA (8 AM)
- Día 8 FSH 2.0 ML (8 AM), 1.5 ML (8 PM)
- Día 9 1.5 ML (8 AM), 1.5 ML (8 PM)
- Día 10 1.5 ML (8 AM), 1.0 ML (8 PM)
- Día 11 0.5 ML (8 AM)
- Día 10 RETIRAR ESPONJA (8 AM)
- Día 11 DETECTAR ESTRO Y MONTA (8 AM, ½ DÍA, 8 PM)
- Día 12 DETECTAR ESTRO Y MONTA (8 AM, ½ DÍA, 8 PM)
- Día 13 REPONER ESPONJA (8 AM)
- Día 16 DIETAR (8 PM SIN ALIMENTO)
- Día 17 DIETAR (8 AM SIN ALIMENTO Y SIN AGUA)
- Día 18 RECOLECTAR EMBRIONES (AM/PM) + PGF2 α (1.5 ML)
- Día 19 PGF2 α 1.0 ML (8 AM)

Extracción de mRNA

Se utilizó el estuche comercial Illustra Quick Prep m RNA Micro (LG Inglaterra), en 3 lotes de 10 blastocistos congelados de borrego doméstico y 3 lotes de 10 blastocistos de borregos híbridos de Cimarrón. Los blastocistos obtenidos *in vitro* e *in vivo* se lavaron 3 veces en PBS, se colocaron en grupos de 10 en un tubo Eppendorf en un volumen mínimo de PBS y se sumergieron en N₂ líquido para su congelamiento súbito

(snap freezing), para luego ser almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se siguieron las instrucciones del fabricante y se cuantificó la cantidad de mRNA obtenido por medio de espectrofotometría a 260 nm.

Síntesis de cDNA

Se tomaron $10\mu\text{l}$ del mRNA obtenido y cuantificado y se pusieron en un tubo Eppendorf de $0.2\text{ }\mu\text{l}$, se le añadieron $0.5\mu\text{l}$ de oligo dt, $0.25\text{ }\mu\text{l}$ de RNAsin, $1.25\mu\text{l}$ de H_2O grado molecular, se mantuvo a 65° C por 5 minutos, después se añadió $4\text{ }\mu\text{l}$ de solución amortiguadora 5X, $4\mu\text{l}$ dNTPs y $1\mu\text{l}$ enzima RT (Fermentas). Se colocó en baño María 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener el cDNA.

PCR punto final

Se usaron cebadores diseñados a partir de una secuencia conocida de ovinos no. de acceso: DQ149979 para amplificar IFNT (5' TGCAAGAGAAGGGATACAGCGACT y 3' AAGGTGGTTGATGAAGTGAGGGCT). y cebadores diseñados para tiempo real a partir de una secuencia conocida en ovinos de beta actina como gen constitutivo (5'ATCCTGCGGCATTCACGAAACT y 3' ACCGTCTTGCGTAGAGGTCTTT) no. de acceso: AY996048. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron para fijar las condiciones ideales de amplificación. En un volumen total de $25\text{ }\mu\text{l}$ se añadió 500 ng cDNA, 10X de solución amortiguadora para PCR, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM de dNTP y $0.15\text{ }\mu\text{M}$ de Taq polimerasa (Fermentas

Internacional Inc. Boston EUA), 1 µl de cebador sentido y 1 µl de cebador anti-sentido a una concentración de 20 pmoles (IBT, UNAM, Cuernavaca México).

Se realizaron gradientes de temperatura utilizando un termociclador de gradiente con las siguientes temperaturas de alineamiento: 54, 56, 58, 60 por 35 ciclos. Después de ver el resultado del gradiente de temperatura se escogió la temperatura óptima de 56 °C para IFNT y 56 °C para beta actina. El protocolo de amplificación se fijó de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, el alineamiento se hizo usando la temperatura que se fijó en el gradiente por 1 minuto y extensión a 72 °C por 1 minuto, así como un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 minutos. El producto de PCR se visualizó en un gel de electroforesis de agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE al 1X y se tiñó con bromuro de etidio.

PCR Tiempo real

La cuantificación de la expresión del gen del IFNT se hizo por RT- PCR en tiempo real, analizando cada muestra y control por duplicado. Los cebadores y la sonda fueron diseñados en el programa Universal Probe Library (Roche Applied Science, Mannheim Alemania). Para la estandarización y curvas patrón para cada uno de los cebadores usados, se usó un termociclador en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems, Foster City California EUA) y el estuche comercial FastStart Taqman

Probe Master ROX (Roche Applied Science, Mannheim Alemania). La reacción de PCR se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante, en que se añadieron 900 nM de cada cebador a la reacción más la sonda 67 para IFNT y la sonda 70 en el caso de beta actina y la muestra (cDNA blastocistos híbrido) o el control (cDNA blastocistos doméstico). El protocolo de amplificación consistió en una preincubación de 50 °C por 2 minutos, la cuantificación se hizo con un paso inicial de activación de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificación para IFNT de 60 °C y para beta actina de 60 °C por 1 minuto. Se confirmaron los tamaños de los productos por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Siempre se hizo un control negativo omitiendo la adición de cDNA a los PCR.

El método comparativo CT se usó para cuantificar los niveles de expresión. La normalización se hizo con el control endógeno beta actina. El valor de ΔCT se determinó restando de cada muestra el valor de ΔCT del gen problema (IFN tau). Para el cálculo de $\Delta\Delta CT$ se usó la muestra con el valor más alto de ΔCT como constante arbitraria de sustracción de los otros valores de ΔCT . Los cambios en la expresión relativa del gen se determinaron usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Extracción de DNA

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de una hembra de borrego Cimarrón albergada en el Zoológico de Chapultepec la Cd. de México, que fue previamente entrenada para obtener muestras sin anestesia. Una hembra Pelibuey y una hembra híbrida $\frac{1}{2}$ Cimarrón

también fueron colectadas bajo el mismo procedimiento. Se obtuvieron células mononucleadas de sangre periférica usando Ficoll-Paque PLUS (Amersham Bioscience) para separación por gradiente de densidad.

El DNA genómico se aisló con el estuche comercial Genomic DNA Purification Kit (Fermentas Internacional Inc. Boston USA). La calidad e integridad del DNA genómico se determinó usando un gel de electroforesis de agarosa (0.7%) y visualizado bajo la luz UV después de teñirlo con bromuro de etidio.

Reacción en cadena de la polimerasa del IFNT

Las muestras de DNA se amplificaron por PCR con los cebadores específicos, basados en la secuencia del gen de IFNT AF238612, reportados por Rizos et al., (2004):

5' GCCCTGGTGCTGGTCAGCTA y 3' CATCTTAGTCAGCGAGAGTC .

Las amplificaciones se hicieron en 25 μ l, siguiendo las recomendaciones esenciales del proveedor de la enzima usando 100 ng/ μ l de DNA como templado 2.5 μ l de solución amortiguadora 10x de PCR, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 10 pmol de cada cebador y 0.15 μ l de Taq polimerasa (Fermentas). Los ciclos se corrieron usando una ciclo de desnaturalización por 5 min a 95 °C, entonces se realizaron 30 ciclos: desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 58 °C por 30 segundos y un minuto a 72 °C de elongación; finalmente, un ciclo a 72 °C por 10 minutos. Para verificar las amplificaciones de PCR, alícuotas de 5 μ l de producto de PCR

se visualizaron un gel de electroforesis de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Clonación de productos de PCR de Interferón tau

Los productos de PCR de IFNT se clonaron en un vector pTZ57R/T incluido en el estuche InsTAclone PCR cloning kit (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Clonas positivas recombinantes se identificaron usando discriminación por coloración azul o blanca. Después la presencia del inserto se confirmó por purificación de plásmido y restricción por endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*, se visualizó por medio de electroforesis usando un gel de agarosa al 1%.

Secuenciación y análisis de la secuencia del gen de IFNT.

Los plásmidos con inserto se purificaron con el estuche GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) y se secuenciaron en ambas direcciones, usando el secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi). Las condiciones del ciclo estándar de la reacción de Sanger se hicieron con los cebadores estándar (M13/pUC forward and reverse) que incluía el estuche de clonación (InsTAclone PCR cloning kit, (Fermentas). Un análisis BLAST (GenBank 2012) de las secuencias obtenidas se hizo, y las secuencias de aminoácidos de IFNT se dedujeron de cada secuencia de nucleótidos y se realizó un alineamiento contra las secuencias de las especies de rumiantes ungulados disponibles en la

base de datos del banco de genes. Las secuencias se agruparon por género y en el caso de *Bos taurus*, dos grupos el 1 y 2 se hicieron basados en sus similitudes (Tabla 1), usando el método de Clustal en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis *MEGA* v. 4.0 (Tamura et al. 2007).

Se hizo un árbol filogenético con la sustitución de nucleótidos y la corrección de Jukes y Cantor (1969) para análisis múltiples, los valores de identidad se usaron para determinar el significado evolutivo del dendograma usando el programa *MEGA* versión 4 (Tamura et al. 2007).

Análisis Estadístico

El porcentaje de división y blastocistos fue analizado usando la prueba de chi cuadrada. La expresión del gen de IFNT por RT-PCR semicuantitativo fue analizada por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de una comparación múltiple usando el método Student-Newman-Keuls. Las diferencias mayores de $P < 0.05$ se consideraron significativas.

Resultados

Desarrollo de blastocistos de borregos híbridos de Cimarrón

El promedio de recuperación de embriones del grupo de ovejas domésticas cubiertas con el borrego doméstico fue 7.1 embriones por donadora y 3.4 blastocistos por donadora.. El grupo de ovejas domésticas cubiertas con el macho 1/2 híbrido de Cimarrón fue de 7.0 embriones por donadora y de 3.2 blastocistos por donadora, no se observó diferencia estadística ($P>0.05$) entre grupos. Para el análisis de la expresión del gen del IFNT en tiempo real (Q-PCR) se inseminó un grupo de ovejas domésticas con semen de borrego Cimarrón, el promedio de obtención de embriones fue de 5.2 embriones por donadora y 2.1 blastocistos por donadora. Comparando este grupo con los grupos anteriores existe diferencia estadística entre el grupo inseminado con borrego doméstico y el grupo inseminado con Cimarrón ($P<0.05$) y entre el grupo inseminado con híbrido $\frac{1}{2}$ Cimarrón y el grupo inseminado con Cimarrón ($P<0.05$).

En la producción de embriones *in vitro* se colectaron un total de 774 COC. El porcentaje de maduración fue de 94 % y el porcentaje de fertilización fue de 76.7 % usando semen de borrego doméstico y 73.5% con semen de borrego híbrido. No se observaron diferencias estadísticas en este experimento ($P>0.05$). En otro experimento el porcentaje de división total

fue de 74.14 % en embriones domésticos y 71% en embriones de borregos híbridos de Cimarrón sin presentar diferencia estadística ($P>0.05$). El porcentaje de embriones que llegaron a blastocistos fue de 43.9 % en borregos domésticos y 23.2 % en los cruzamientos con borregos híbridos, hubo un menor número de blastocistos híbridos de borrego Cimarrón que domésticos ($P<0.05$), cuando se evaluó el desarrollo embrionario 192 horas después de comenzado el cultivo (Figura 1R).

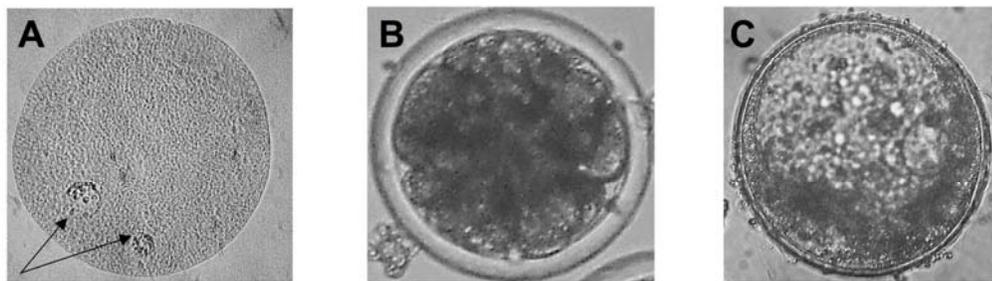


Figura 1R. Cigoto de un híbrido de borrego Cimarrón teñido con acetorceína donde se muestran los pronúcleos femenino y masculino (flechas negras) 20 horas después de la FIV; B. Mórula híbrida después de 94 horas de desarrollo; C. Blastocito híbrido 196 horas después de la FIV.

Análisis del RT- PCR semicuantitativo.

La expresión del IFNT se detectó en el cDNA de blastocistos de tres lotes (cada uno formado por 10 blastocistos) de cada uno de los siguientes grupos: borrego doméstico y borrego $\frac{1}{4}$ híbrido de Cimarrón obtenidos *in vivo*; borrego doméstico y borrego $\frac{1}{4}$ híbrido de Cimarrón producidos *in vitro*.

La expresión de IFNT en los blastocistos producidos *in vivo* fue 2.2 veces mayor en los de borregos domésticos que en los de híbridos de borrego Cimarrón. La expresión de los blastocistos producidos *in vitro* fue 2.7 veces mayor en los de borregos domésticos que en los de borregos híbridos de Cimarrón (Figura 2R). La expresión del gen de IFNT por RT-PCR semicuantitativo fue analizada por medio de un ANOVA seguido de una comparación múltiple usando el método Student-Newman-Keuls. Las diferencias mayores de $P < 0.05$ se consideraron significativas.

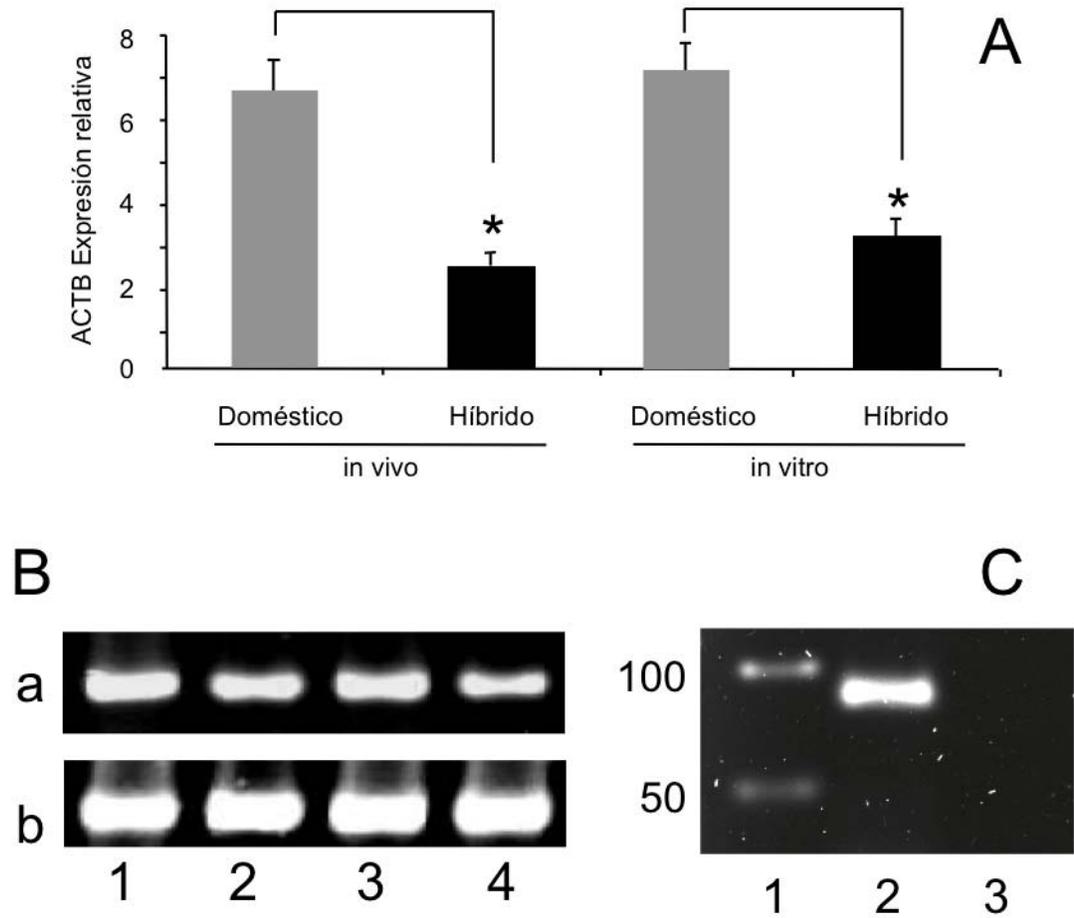


Figura 2R. Geles representativos de la expresión de IFNT en blastocitos de híbridos borrego Cimarrón producidos *in vitro* e *in vivo*. A) Expresión de IFNT en blastocitos. B) 1a. Expresión del IFNT en blastocitos de borrego doméstico producidos *in vitro*; 2a. Expresión del IFNT en blastocitos de borrego doméstico producidos *in vivo*; 3a. Expresión del IFNT en híbridos blastocitos de borrego Cimarrón producidos *in vitro*; 4a. Expresión del IFNT en híbridos blastocitos de borrego Cimarrón producidos *in vivo*; 1-4b. Control endógeno de Beta actina para cada muestra, respectivamente. C) 1. 50pb DNA ladder, 2. RT positivo, 3. RT negativo.

Análisis del RT- PCR cuantitativo.

La expresión del IFNT se detectó en el cDNA de tres lotes de blastocistos de borrego doméstico y tres lotes de blastocistos de borrego híbrido de Cimarrón obtenidos *in vivo*. La expresión de los blastocistos fue 2.8 veces mayor en los blastocistos de borregos domésticos que en los de híbridos (Tabla 1; Figura 3R). La expresión del gen de IFNT por RT-PC cuantitativo fue analizada por medio de una ANOVA seguida de una comparación múltiple usando el método Student-Newman-Keuls. Las diferencias mayores de $P < 0.05$ se consideraron significativas.

Tabla1. Resultados de RT-PCR cuantitativo de 3 lotes de 10 blastocistos de híbridos de borrego Cimarrón (H1, H4, H5) comparados con 3 lotes de 10 blastocistos de borrego doméstico producidos *in vivo* (D2, D3, D4).

Muestra	Beta actina Ciclos	IFNT Ciclos	ACTINA MEDIA	TAU MEDIA	TAU/ACTINA	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
D2	41.393	43.15						
D3	36.67	42.26						
D4	46.12	44.07	41.395	43.165	1.04	1.77	0	1
H1	35.94	41.92	39.17	42.42666667	1.08314186	3.256666667	1.486666667	0.35
H4	37.07	41.42						
H5	44.5	43.94						

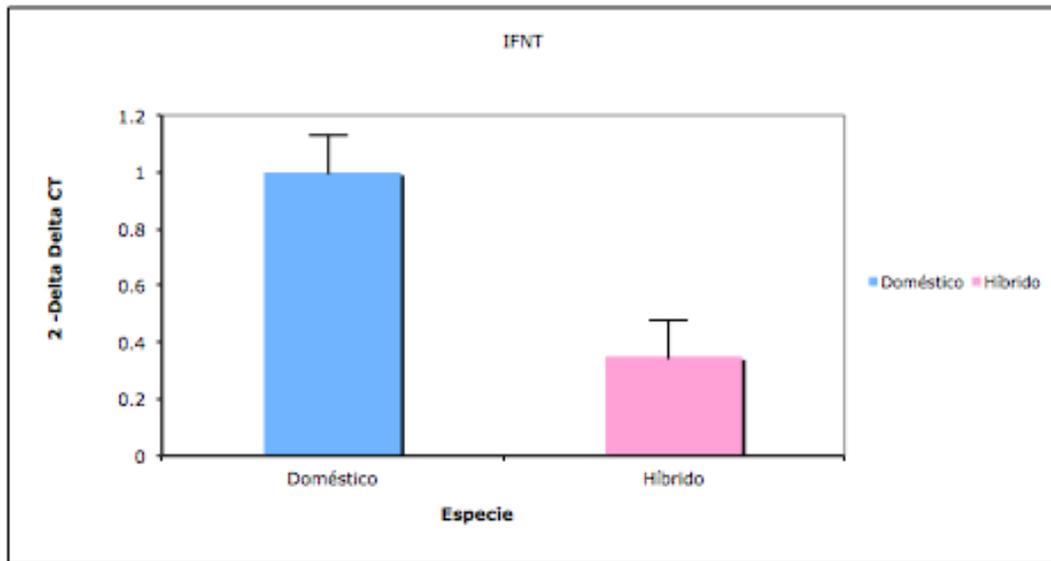


Figura 3R. Expresión del gen de IFNT en blastocistos de borrego doméstico y de borrego híbrido de Cimarrón.

Amplificación, clonación y secuenciación.

La calidad e integridad del DNA genómico que se obtuvo de cada muestra tuvo una concentración de 700 ng/l y un cociente $260/280 > 1.0$ en promedio. El gel electroforesis de agarosa del amplicón reveló un fragmento de 564 pb aproximadamente. El tamaño del amplicón se confirmó por secuenciación. Del Cimarrón se obtuvieron un total de 5 clonas que se secuenciaron y dos de ellas fueron prometedoras. En el caso del borrego Pelibuey se obtuvieron dos secuencias diferentes de cinco que fueron analizadas. En el caso del híbrido, se analizaron 10 clonas y todas resultaron idénticas. Finalmente se encontraron cinco diferentes secuencias, estas no empataron exactamente con ninguna secuencia de IFNT del banco de genes descritas anteriormente. Como resultado estas secuencias nuevas se sometieron a la base de datos del

banco de genes como sigue: borrego Cimarrón: cimIFNT A(FJ666056) y cimIFNT B(FJ666057); borrego Pelibuey: pelIFNT A(FJ666058) y pelIFNT B (FJ666061); borrego híbrido Cimarrón: hibIFNT (FJ666059).

Comparación de las secuencias de aminoácidos y análisis filogenético.

Los valores de identidad de la deducción de aminoácidos de la proteína madura de IFNT reportadas en este estudio y las variantes de IFNT de otras especies de rumiantes previamente reportadas se muestran en la Tabla 2.

Las secuencias obtenidas cimIFNT A y B tuvieron 98% de identidad entre ellas. Las secuencias de Cimarrón cimIFNT A y B, mostraron 97% y 95% de identidad con el grupo *Ovis* respectivamente, y ambas, tuvieron una menor identidad con el grupo 2 de *Bos taurus*. La identidad mayor de cimIFNT A y B, con otras secuencias de ungulados silvestres fue con *Ovibos moschatus* (86-88%).

La secuencia de pelIFNT A mostró alta identidad con las secuencias cimIFNT A y B, 98% y 95% respectivamente. Cuando se comparan con los ungulados silvestres la más alta identidad es con *Ovibos moschatus* (88%).

La secuencia pelIFNT B mostró una identidad baja con el grupo (89%), cimIFNT A y B (71%) y pelIFNT A (69%) y alta identidad con el grupo *Bos*

taurus subgrupo 2 (91%), pelIFNT B tuvo 90% de afinidad con la secuencia del rumiante silvestre *Bos frontalis*.

La única secuencia de híbrido (hibIFNT) mostró alta identidad con las secuencias del género *Ovis* (97%), y la menor con el subgrupo 2 de *Bos taurus*. En la comparación con los ungulados silvestres, la secuencia más cercana fue la de *Ovibos moschatus*. La secuencia hibIFNT tiene 100 % de identidad con cimIFNT A.

Tabla 2. Porcentajes de identidad de las secuencias reportadas en este trabajo contra todas las secuencias de IFNT reportadas hasta el momento en el Genbank.

Especie	Grado de identidad de las secuencias de amino acidos.			
	hibIFNT (FJ666059)	cimIFNT A (FJ666056)	cimIFNT B (FJ666057)	pelIFNT A (FJ666058)
hibIFNT	100%			
cimIFNT A	98%	98%		
cimIFNT B	98%	98%	95%	
pelIFNT A				
<i>Ovis aries</i>				
mayor	97% (M88770)	97% (M88770)	95% (M88770)	98% (M88770)
menor	88% (AF158817)	74% (M73245)	74% (M73245)	74% (M73245)
<i>Capra hircus</i>				
mayor	92% (AY357327)	92% (AY357327)	90% (AY357327)	92% (AY357327)
menor	71% (DQ154135)	71% (DQ15413)	88% (M73243)	71% (DQ154135)
Bovine subgroupA				
mayor	80% (XM_871285)	80% (AF238612)	78% (X65539)	81% (BOVTPH1A)
menor	78% (NM_001031765)	78% (AF196325)	75% (NM_001031765)	80% (AF196324)
Bovine subgroupB				
mayor	76% (XM_001250215)	76% (XM_001250215)	75% (XM_001250215)	75 % (XM_001250215)
menor	69% (XM_593584)	69% (XM_593584)	68% (XM_593584)	68% (XM_593584)
<i>Bubalus bubalis</i>				
mayor	82% (AY535404)	82% (AY535404)	80% (AY535404)	82% (AY535404)
menor	71% (EF503726)	71% (EF503726)	70% (EF503726)	71% (EF503726)
Ungulados Salvajes				
<i>Bison bison</i> (AY643747)	78%	78%	75%	79%
<i>Bos Frontalis</i> (AY665674)	76%	76%	76%	75%
<i>Cervus elaphus</i> (AJ000638)	74%	74%	73%	72%
<i>Moschus</i> (DQ139308)	71%	71%	77%	71%
<i>Ovibos</i> (M73244)	88%	88%	86%	88%
<i>Giraffa</i> (GCU55050)	76%	76%	74%	76%
<i>Bos grunniens</i> (AY455289)	80%	80%	78%	81%

El dendograma se hizo con base en un alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos del gen IFNT con todas las especies

disponibles en el banco de genes, éstas muestran tres grupos (Figuras 4R y 5R).

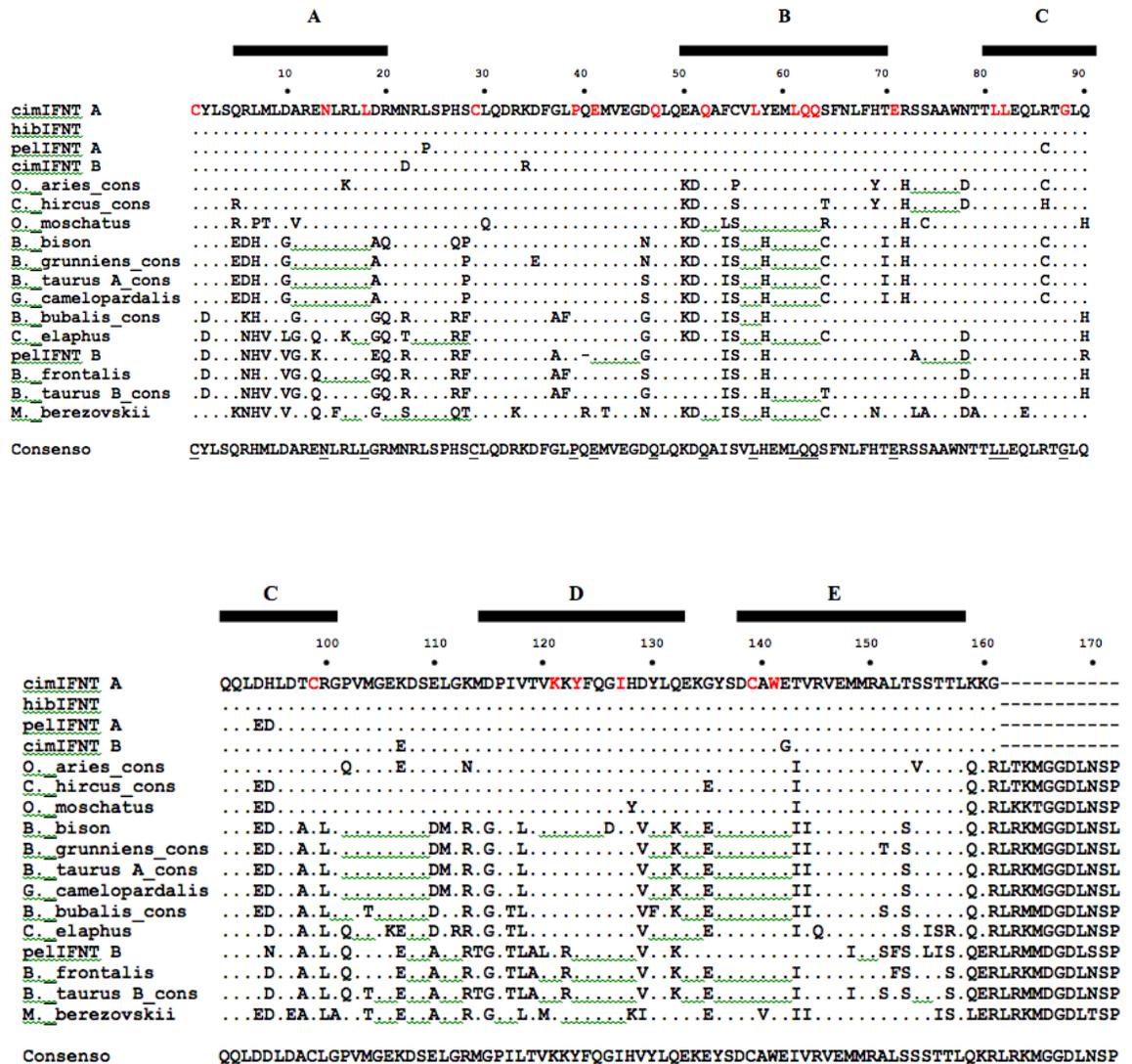


Figura 4R. Alineamiento de amino ácidos de la proteína madura de IFNT de borregos Cimarrón, híbridos, domésticos y otros rumiantes salvajes. Las barras negras indican la localización de las alfa hélices A,B,C,D y E. Los residuos subrayados son los más altamente conservados en la secuencia consenso en las 82 secuencias reportadas de IFNT en el GenBank hasta hoy. Las secuencias consenso de cada especie fueron deducidas de las secuencias disponibles en el GenBank.

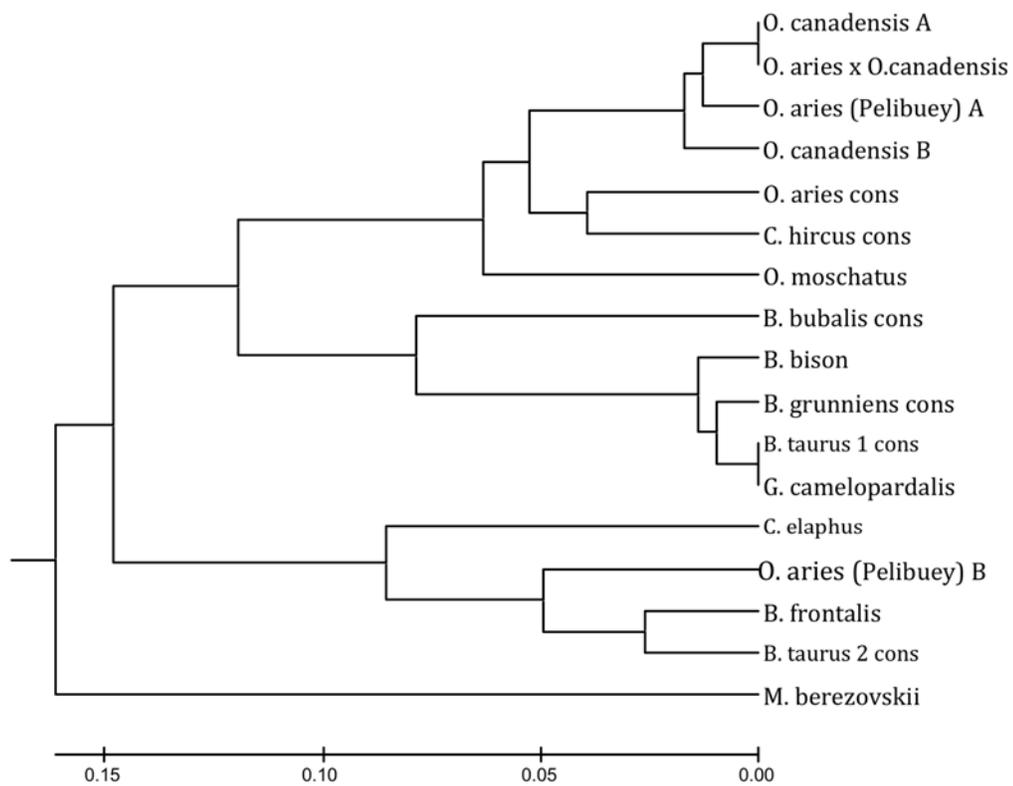


Figura 5R. Árbol filogenético construido con base en las secuencias de aminoácidos de la proteína madura de IFNT (Alineamiento Figura 4R).

Discusión

Los borregos cimarrones y los domésticos se han hibridado en el pasado y los productos resultantes son fértiles (Bunch y Workman, 1988). A pesar de que éstas no son especies muy cercanas filogenéticamente, tienen el mismo número cromosómico (Delgadillo et al. 2000; Hiendleder et al. 2002). Dentro del género *Ovis* se han producido, con la participación del hombre, numerosos cruzamientos interespecie dando como resultado crías viables y fértiles en la mayoría de los casos. Hay evidencias que sostienen que algunas especies y subespecies de borregos salvajes (conocidos como el grupo de la meseta del Usturt) resultaron de la hibridación natural entre poblaciones relacionadas con el *O. vignei nigrimontana* (Hiendleder et al. 2002). Sin embargo en algunos casos existen mecanismos biológicos que limitan la viabilidad de los híbridos, ya que en los mamíferos la hibridación no es en general un mecanismo de especiación. Se sabe que los híbridos en mamíferos presentan una serie de incompatibilidades genómicas, en la formulación de la “Teoría del empuje de la viviparidad” se describe la gestación de híbridos en los mamíferos como una “arena fisiológica para un conflicto genómico ausente en las especies que ponen huevos”. Este planteamiento explica como la rápida divergencia en los mamíferos fue dada por la gestación, debido a la manipulación que el genoma fetal ejerce sobre la fisiología materna, en los híbridos los conflictos se agudizan en el caso de los genes

exclusivos del cromosoma Y, los genes heredados del padre y en los que existe impronta génica o “imprinting”. Así mismo los mamíferos usaron como estrategia evolutiva la rápida diferenciación de números cromosómicos característicos de cada especie, otro mecanismo que impide la hibridación pero que en el caso de algunas especies de borregos que poseen el mismo número cromosómico la permite (Zeh y Zeh 2000). En términos generales es correcto afirmar que la gestación inter-especie es menos viable que la gestación intra-especie (Bernirschke y Ryder 1985; Skidmore et al. 1999).

La aplicación de TRA en el manejo de poblaciones de animales en peligro de extinción requiere la suficiente información especie-específica de la fisiología de los gametos y los embriones para una serie de procedimientos que deben ser completados de manera eficiente y exitosa. Un modelo que puede ser utilizado como herramienta en la conservación ex situ es la fertilización heteróloga (donde el espermatozoide y el ovocito pertenecen a especies diferentes). Por ejemplo, para evaluar la capacidad fertilizante de espermatozoides de especies en peligro, o para obtener embriones híbridos ya que la obtención de semen es menos invasiva en términos generales que la de ovocitos y es de vital importancia no comprometer la integridad de las hembras donadoras de especies amenazadas (Herrick et al. 2010). Otra técnica que puede ser usada para producir embriones es la inseminación artificial y posteriormente estos embriones se pueden utilizar para estudiar la fisiología reproductiva de especies que están en peligro de extinción.

Producción de embriones híbridos de borrego Cimarrón

En este estudio los embriones $\frac{1}{4}$ de borregos híbridos de Cimarrón producidos *in vitro* no mostraron diferencias estadísticas en el porcentaje de fertilización y de división embrionaria comparadas con el grupo de embriones de borregos domésticos. Por lo que es posible pensar en el caso de los embriones de borregos híbridos $\frac{1}{4}$ Cimarrón las diferencias en la fertilidad de los animales híbridos no están dadas necesariamente a nivel de la penetración del espermatozoide y/o de la fertilización. Así mismo, no encontramos diferencia en el número de embriones producidos *in vivo* por oveja. Es decir, entre ovejas domésticas cubiertas por el macho de borrego doméstico y el grupo de las ovejas cubiertas con macho híbrido de borrego Cimarrón. Pero en el grupo de ovejas domésticas inseminadas con semen congelado de borrego Cimarrón se observa una clara disminución tanto en la cantidad de embriones $\frac{1}{2}$ Cimarrón producidos como en el porcentaje de blastocistos. Los decrementos en cantidad de embriones y blastocistos de borregos híbridos $\frac{1}{2}$ Cimarrón coinciden con otros reportes en los que se muestra que los porcentajes de fertilización, de división y número de blastocistos disminuyen al llevarse a cabo la fertilización *in vitro* heteróloga (Owiny et al. 2009). Esto podría estar dado en el caso que la especie del ovocito y el espermatozoide no están relacionados de forma cercana (Roth et al. 1998; Owiny et al. 2009).

Sin embargo en otros cruzamientos los resultados son contradictorios, en un estudio de fertilización *in vitro* heteróloga, donde se usaron ovocitos bovinos y semen de bisonte, no se observaron diferencias en porcentaje de fertilización, de división y número de embriones (McHugh y Rutledge, 1998); mientras que en otro trabajo en que se utilizó la misma cruce se ven claras diferencias en estos parámetros (Rasmussen et al. 2005) por lo que aún no es muy claro aún el papel que juega la distancia filogenética en estos hallazgos, y si otros factores como intrínsecos a los animales, como estado nutricional, edad o consanguinidad afectan la producción de embriones sin que se hayan determinado. En el presente trabajo se observó una diferencia estadística en el número de blastocistos en embriones de borregos $\frac{1}{4}$ híbridos de Cimarrón (23%) con respecto a los blastocistos de borregos domésticos (44%). Ya que la activación del genoma es crítica en la transición de mórula a blastocisto, si existe una falta de transición del genoma materno al genoma embrionario en el estadio de 8 células (Elder y Dale 2000) esto podría ser responsable del arresto en el desarrollo en embriones híbridos (Owiny et al. 2009), debido a una falta de compatibilidad alélica entre especies.

Expresión del gen de IFNT en blastocistos de híbridos de borrego Cimarrón.

El IFNT promueve la función lútea por medio de la regulación del metabolismo uterino de varias prostaglandinas. En sistemas de cultivo de células endometriales de ovinos, donde se les adicionaron dosis bajas de

IFNT se inhiben la producción de PGF2 α y de PGE2, mientras que en dosis altas se incrementa la producción de PGE2 sin impactar los niveles de PGF2 α (Pratt et al. 1977). La PGE2 es una luteotropina y un luteoprotector y su producción por parte del endometrio y el embrión en elongación probablemente sirve como mecanismo secundario que mantiene la función del CL. En el útero se ha observado evidencia de que el INFT controla la producción de prostaglandina (Pratt et al. 1979). Por lo que una falla en la producción de IFNT podría desencadenar la destrucción del CL en la madre, provocando la muerte del embrión híbrido. La mayor parte de los estudios *in vitro* e *in utero* en rumiantes apoyan la teoría de que el metabolismo basal de prostaglandina es modificado por IFNT a favor de mantener el CL funcional (Ealy et al. 2009) por lo que los niveles de IFNT insuficientes tendrían un efecto devastador en la gestación de los híbridos.

La expresión de IFNT es difícil de cuantificar pero algunas ideas han tomado fuerza, como que al menos dos mecanismos están involucrados en limitar la expresión temprana de IFNT en el embrión en desarrollo, no es descabellado pensar que alguno de estos mecanismos sea el que este afectado en embriones híbridos ya que aunque no exista una incompatibilidad alélica en el gen de IFNT en híbridos si puede existirla en otros genes que regulan a IFNT y que no son materia de este estudio, es claro que son necesarios más trabajos para determinar la causa del decremento en la expresión del gen de IFNT en híbridos. Ya que la ausencia de Cdx2 y Dlx3 durante los estadios iniciales compromete la

habilidad del embrión de producir IFNT (Leaman et al. 1994). Así como el bloqueo funcional de Ets2 existe durante los estadios iniciales, el Oct4 detiene la actividad del promotor de IFNT inducida por Ets2. Oct4 es muy conocido como marcador de pluri-potencialidad en las células embrionarias mas tempranas, células germinales embrionarias, y células madre embrionarias y adultas (Ralston et al. 2008). Oct4 inhibe la expresión de otros factores durante la gestación temprana. Por ejemplo, Oct4 inhibe a Cdx2 en embriones de ratón y células madre embrionarias. La expresión Oct4 esta restringida a la masa celular interna después de la formación del blastocisto en el ratón. Sin embargo, Oct4 se ha detectado en el trofoectodermo de blastocistos en el bovinos y cerdos y la inmunoreactiva Oct4 puede ser detectada en el trofoectodermo sobre los días 10 de gestación o aproximadamente 3 días después de la formación del blastocisto pero algunos días antes del incremento masivo del mensajero de IFNT (Ralston et al. 2008). Una posible explicación de por que observamos una expresión menor en IFNT es que la expresión del híbrido comience de manera tardía. Sin embargo, la expresión de IFNT está supeditada a la formación del blastocisto y regulada por Oct4 por lo que al comenzar las células embrionarias a diferenciarse en diversos tipos celulares el IFNT se expresa en mucho mayor medida. Otra explicación posible es que los embriones híbridos posean un menor número de células por lo que se puede producir una menor cantidad de IFNT (Kubisch et al. 1998).

Esto sugiere que existe un control adicional para mediar el surgimiento de la expresión de IFNT. Se ha mencionado a FGF2 un factor de crecimiento que se produce en el epitelio luminal endometrial que ocurre en los días 12-13 después del estro en ovejas y que juega un papel importante en maximizar la transcripción durante la gestación temprana. La importancia de este evento en el desarrollo del embrión no ha sido bien examinada (Michael et al. 2006). En este estudio se produjeron embriones tanto *in vitro* como *in vivo*, observándose en ambos casos la disminución en la expresión sin encontrarse diferencias estadísticas entre modelos, por lo que pensamos que en este estadio embrionario no es un factor uterino el que está involucrado en las diferencias de expresión de IFNT.

En realidad poco se ha hecho para determinar por qué deja de producirse IFNT cuando el embrión se une al útero. No es sorprendente que los genes placentarios se expresen cuando inicia la placentación como por ejemplo el PAG (glicoproteínas asociadas a la gestación) este factor se reporta como el de mayor importancia en la gestación de los rumiantes después del IFNT, producido por las células binucleadas y en gestaciones interespecie se produce en grandes cantidades de manera compensatoria (Fernández-Arias et al. 1999), así mismo una serie de factores de unión celular están involucrados con la placentación y un nuevo linaje de células de la placenta emergen del trofoectodermo en este momento en la gestación. Cada uno de estos procesos ocurren durante el tiempo en que se desarrolla la placenta y parecen ser los responsables de la rápida terminación de la transcripción del IFNT (Spencer et al. 2004). Es posible

que en el caso de los híbridos el periodo crítico de aposición del embrión al útero se vea afectado, especialmente cuando se han observado anomalías en la formación de la placenta en híbridos, pero serán necesarios más estudios para poder determinarlo (Brown et al. 2012).

Los resultados del análisis semi-cuantitativo de la expresión de blastocistos *in vivo* mostraron 2.2 veces más expresión en blastocistos domésticos que en blastocistos de borregos 1/4 híbridos de Cimarrón y para *in vitro* 2.7 veces mayor ($P < 0.05$) en blastocistos domésticos que en blastocistos de borregos 1/4 híbridos de Cimarrón. Esto es un dato relevante ya que a la fecha no se han reportado diferencias en la expresión del IFNT en híbridos de borrego cimarrón, comparado con borregos domésticos en las en las mismas condiciones.

Los resultados del análisis cuantitativo de la expresión del gen de IFNT muestran un nivel de expresión 2.8 veces mayor ($P < 0.05$) en blastocistos de borrego doméstico comparados con blastocistos de borrego híbrido que fueron producidos *in vivo*. Estos niveles menores pueden afectar el RMG como describió Rizos et al. (2004). Es una noción generalizada que los niveles de RNAm de este transcrito son mayores en blastocistos de buena calidad (Rizos et al. 2003). Kubisch y colaboradores en el 2001, encontraron que el genotipo paterno afecta la expresión del IFNT en bovinos domésticos. Aunque no se han descrito diferencias en la expresión de IFNT en ovinos debido al genotipo paterno antes, es posible pensar que en el caso de los híbridos de borrego Cimarrón es precisamente el genotipo del padre el causante de que se presente una

menor expresión del gen de IFNT en blastocistos de borregos híbridos de Cimarrón y que a su vez este fenómeno sea dañino para el RMG. Los resultados del presente estudio coinciden con los obtenidos por Kubisch y otros, sugiriendo que una menor expresión del gen de IFNT en embriones híbridos puede ser una causa de pérdidas tempranas en la gestación. A pesar de que la expresión del gen de IFNT se ve afectada en blastocistos híbridos posiblemente debido al genotipo paterno y de que la fertilidad es menor en híbridos, no es posible adjudicarle a un solo gen la falta de éxito en la fertilidad interespecie.

Secuenciación del gen de IFNT en borrego Cimarrón, Pelibuey y sus híbridos

A la fecha, 21 variantes de IFNT ovino se caracterizaron por secuenciación de DNA de los blastocistos o de DNA genómico (Leaman y Roberts et al. 1992, Winkelman et al. 1999). Estas variantes polimórficas de IFNT ovino han mostrado diferencias en su nivel de expresión así como en su actividad biológica. Filogenéticamente estas variantes están agrupadas en tres distintos tipos A, B, C. Las variantes de los tipos A y B son las que presentan actividad biológica, las variantes tipo C son pseudogenes o poseen poca actividad biológica (Ealy et al. 1998).

A pesar que todas variantes clase C han sido clonadas de DNA genómico y no se han detectado en cDNA (Roberts et al. 1992) la variante SHP010TP que es predominante en la expresión del IFNT un IFNT de tipo A se ha encontrado de forma común en DNA genómico. A pesar que las

secuencias obtenidas en este estudio son de DNA genómico, presentan alta identidad con las secuencias de tipo A y B que son activas (94.2 a 98.8%).

Las secuencias del gen del IFNT obtenidas en este estudio de borrego Cimarrón, de borrego Pelibuey y de un híbrido de ambos, mostraron mayor identidad con el grupo *Ovis* al que pertenecen. De forma interesante, se encontró una secuencia nueva pelIFNT B, que mostraba mayor identidad con *Bos taurus* subgrupo B que con el grupo *Ovis*.

El alineamiento de las proteínas maduras de Cimarrón, Pelibuey y del híbrido de ambos con todas las secuencias disponibles en el banco de genes se muestran en la Figura 4R. El dendograma (Figura 5R) obtenido de este alineamiento muestra ramificaciones similares a otros estudios reportados anteriormente (Rajaravindra et al. 2006).

La proteína de IFNT de varias especies estudiadas posee un residuo muy conservado de Cys en 4 diferentes posiciones (1, 29, 99, 139) y un residuo Ser- Leu- Gly precediendo la posición -1 Cys. En las secuencias de IFNT se observa una región altamente conservada en el asa hidrofílica AB (residuos 24-48) y en una región más hidrofóbica entre los residuos 120 al 144, que se observa en todos los mamíferos así como en IFNT de los rumiantes

La secuencias pelIFNT B tiene un codón de paro en la posición 41, dos codones de paro después (posición 43) seguido de una metionina, que podría iniciar una proteína más corta (Radhakrishnan et al. 1999). Sin embargo, la proteína de la secuencia pelIFNT B carece de toda la región

de la alfa hélice A y las cisteínas 1 y 29, necesarias por los puentes disulfuro, razón por la cual suponemos que no es una proteína funcional. Por lo que es posible que la secuencia pellFNT B sea un pseudogene (Ealy et al. 2006).

Los residuos altamente conservados del asa AB, la hélice D y el asa DE se han predicho como sitios de unión a los IFNR2 (receptor 2 de los IFN). La hélice A así como la hélice C se proponen como un sitio de interacción con IFNR1. Sin embargo, las muchas diferencias estructurales entre IFNT y los IFN Alfa en la hélice B y el asa BC sugieren que la región envuelta en es la función única de hormona antiluteolítica de IFNT ovino (Radhakrishnan et al. 1999).

Ya que las secuencias cimIFNT A y cimIFNT B se obtuvieron del mismo animal, se supone que éstas corresponden a dos alelos. Las secuencias de cimIFNT A y cimIFNT B tienen solo 4 cambios de aminoácidos, uno de ellos en el giro hidrofílico, entre las hélices A y B, sin embargo, éste mantiene la carga positiva del residuo (Arg 34 Lys) (Senda et al. 1992).

Se sabe que IFNT existe en forma glicosilada y no-glicosilada. Así como existen dos formas con masa molecular de 20 y 22 kDa y ambas formas son biológicamente activas (Bazer et al. 1994). En los bovinos las variantes contienen un sitio potencial de glicosilación en la Asn78. Se han secuenciado 9 variantes del IFNT en el búfalo (*Bubalus bubalis*) pero solo se han observado 4 variantes con el sitio potencial de glicosilación en Asn78. Como los bovinos, el IFNT de *Bos frontalis* contiene este sitio Asn78, por el contrario en los caprinos se encuentran formas glicosiladas y

no glicosiladas en las que esta presente Asp78 en vez de Asn78 (Rajaravindra et al. 2008).

En ovinos, algunas variantes poseen Asn78 pero ninguna de ellas se ha encontrado glicosilada (Winkelman et al. 1999). De las 21 variantes de IFNT ovino solo 8 variantes que pertenecen a los tipos B y C tienen el Asn78 conservado. Mientras que el sitio potencial de glicosilación Asn78 está ausente en las de tipo A. La secuencia deducida de amino ácidos de hibIFNT, cimIFNT A, cimIFNT B y pelIFNT A contiene Asn78, propuesto como un potencial sitio de glicosilación, por otro lado, pelIFNT B presenta Asp78 (Anthony et al. 1988; Winkelman et al. 1999; Rajaravindra et al. 2008). La glicosilación es importante en las modificaciones por transcripcionales en las células eucariontes lo que influye en la estructura y la función biológica de las proteínas incluyendo su estabilidad, secreción, interacción con receptor y su subsecuente actividad biológica.

La secuencia de IFNT obtenida del híbrido es 100% igual a cimIFNT A, por lo que es posible que sea éste sea el alelo heredado del Cimarrón. Resultados similares obtuvieron otros investigadores en embriones híbridos de ganado bovino y bisonte (Rasmussen et al. 2005).

La secuencia pelIFNT A mostró alta identidad con cimIFNT A y B, (98 and 95% respectivamente), por lo que es una posible explicación de por qué es exitoso el reconocimiento materno de la gestación en estos híbridos.

Las secuencias reportadas en este estudio contienen Cys1 - Cys99 y Cys 29 – Cys139 pares que forman los puentes disulfuro. Se sabe que el segundo puente disulfuro entre Cys29 y Cys139 puede ser importante en

la proximidad de los giros AB y DE y también es importante en las actividades biológicas y de unión (Jarpe et al. 1994).

Los reportes sobre la actividad biológica de diferentes variantes IFNT es muy limitada. Se ha reportado que la variante p3 del IFNT ovino es más potente que otras clases de IFNT ovino como la p8 (Ealy et al. 1998).

Las variantes p3 y p8 tiene solo tres sustituciones de aminoácidos en la posición 101 (Asp por Gly), 107 (Lys por Glu) y 128 (Hys por Tyr). Ya que se encuentran próximas a la presunta región de unión al receptor un cambio de Tyr por Hys en la posición 128 le confiere la capacidad al IFNT de detener la luteolisis (Winkelman et al. 1999).

Todas las secuencias excepto pelIFNT B tienen 161 amino ácidos de la proteína madura. La delección de la cisteína en el codón 159 de estos genes da como resultado cambios en los codones (Gln-Lys), 160 (Glu-Lys), 161 (Arg-Gly) y 162 (codón de paro), estos genes contienen Trp en vez de Ile en la posición 143.

Esto indica que estas actividades no están directamente relacionadas con la actividad antiluteolítica en la proteína de IFNT en borrego Cimarrón, Pelibuey y en el híbrido de ambos. Adicionalmente todas las secuencias estudiadas presentan Hys128, ésta es probablemente responsable de la actividad antiluteolítica en la variante p3 de IFNT (Winkelman et al. 1999; Rajaravindra et al. 2008). El análisis de las secuencias obtenidas en este estudio del IFNT de borrego Cimarrón, Pelibuey y del híbrido de ambos, muestra que desde el punto de vista estructural las secuencias podrían ser

completamente funcionales a excepción de la secuencia pellFNTB que pensamos puede ser un pseudogene.

Conclusiones

- Específicamente el modelo de híbridos de borrego Cimarrón tanto *in vitro* como *in vivo* puede ser usado como herramienta para estudiar la fisiología de la gestación en la etapa preimplantacional, que es especialmente difícil de estudiar en especies en peligro de extinción debido a los retos que plantea cualquier manejo invasivo de las mismas.
- Es posible plantear la posibilidad de que la menor cantidad de IFNT producido por los blastocistos de borregos híbridos de Cimarrón sea una explicación de por que la fertilidad es menor en este tipo de gestaciones interespecie.
- La secuencia de IFNT obtenida del híbrido de borrego Cimarrón es 100% igual a cimIFNT A, por lo que es posible que sea el alelo heredado del Cimarrón.
- Las secuencias de borregos Pelibuey y Cimarrón muestran una alta identidad entre sí, 98% y 95% respectivamente, que es incluso mayor que con el resto de las secuencias del genero Ovis reportadas anteriormente. Esta alta identidad entre secuencias puede ser una posible explicación del éxito del reconocimiento materno de la gestación en la hibridación de estas especies.

Perspectivas

- Identificar que alelo de IFNT se expresa en los embriones híbridos.
- Transferir embriones de borrego Cimarrón a receptoras híbridas.

Literatura citada

1. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN. 1998^a. Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev*; 51: 395-401.
2. Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS, Day BN. 1998^b. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol Reprod*; 58: 1316-1320.
3. AGSRA. Australian Frozen Zoo: <http://www.agsrca.srivilasa.com>. 2007.
4. Allen WR, Kidd J, Boyle MS, Antczak DF. 1985. Between-species transfer of horse and donkey embryos: A valuable research tool. *Equine Embryo Transfer. EVJ* ;(Suppl 3): 53-62.
5. Amstislavsky S, Aalto J, Järvinen M, Lindeberg H, Valtonen M, Zudova G, Ternovskaya Y. 2004. Transfer of European mink (*Mustela lutreola*) embryos into hybrid recipients. *Theriogenology*;62(3):458-467.
6. Anthony RV, Helmer SD, Sharif SF, Roberts RM, Hansen PJ, Thatcher WW, Bazer FW, 1988. Synthesis and processing of ovine trophoblast protein-1 and bovine trophoblast protein-1, conceptus secretory proteins involved in the maternal recognition of pregnancy. *Endocrinology*. 123, 1274–1280.
7. Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, MacLaren LA, Fortier MA. 2004. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology*; 145:5280– 5293.
8. Ashworth CJ. 1992. Synchrony embryo-uterus. *Anim Reprod Sci*; 28:259-267.
9. Ballou JD. 1984. Strategies for maintaining genetic diversity in captive populations through reproductive technology. *Zoo Biology*; 3 :311-323.

10. Ballou JD. 1992. Potential contribution of cryopreserved germplasm to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology*; 28:19-25.
11. Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*; 37:127-146.
12. Bazer FW, Kim J, Song G, Ka H, Tekwe CD, Wu G. 2012. Select nutrients, progesterone, and interferon tau affect conceptus metabolism and development. *Ann N Y Acad Sci*; 1271:88-96.
13. Bazer FW, Ott T and Spencer TE. 1994. Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: Signals from the trophoblast. *Theriogenology*; 41: 79-94.
14. Bennet SD and Foster WR. 1985. Successful transfer of zebra embryo to a domestic horse. *Equine Embryo Transfer. EVJ;(Suppl 3): 78-79.*
15. Berg DK, Beumont SE, Berg MC, Asher GW. 2004. Red deer calves born from in vitro produced blastocyst fertilized and cultured in deer synthetic oviductal fluid. *Theriogenology*; 59: 189-205.
16. Berger J. 1990. Persistence of different-sized populations: An empirical assessment of rapid extinctions in bighorn sheep. *Conservation Biology*; 1: 91-98.
17. Berlingher F, Leoni GG, Bogliolo L, Bebbere D, Succu S, Rosati I, Ledda S, Naitana S. 2005. *In vivo* in vitro fertilizing capacity of cryopreserved European mouflon (*Ovis gmelini musimon*) spermatozoa used to restore genetically rare and isolated populations. *Theriogenology*; 63:902-911.
18. Bernirschke K and Ryder OA. 1985. Genetic aspects of equids with particular reference to their hybrids. *Eq. Vet. J.*; 3: *Equine Embryo Transfer*:1-10.
19. Betteridge KJ. 2006. Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives. *Theriogenology*; 65 :905-913.
20. Brinster RL and Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994; 91: 11298-11302.

21. Brown JD, Piccuillo V, O'Neill RJ. 2012. Retroelement Demethylation Associated with Abnormal Placentation in *Mus musculus* × *Mus caroli* Hybrids. *Biol Reprod*; 86:1-10.
22. Buckrell BC, Gartley CJ, Mehren KG, Crawshaw GJ, Johnson WH, Barker IK, Balke J, Coghill C, Challis JR, Goodrowe KL. 1990. Failure to maintain interspecific pregnancy after transfer of Dall's sheep embryos to domestic ewes. *J. Reprod. Fertil.*; 2: 387-394.
23. Bunch TD and Cox LM. 1980. Argali-mouflons- Gambling with genes. *Wild Sheep Int.*; 2: 9-12.
24. Bunch TD and Workman GW. 1988. Hybridization of desert Bighorn and Argali-Mouflon wild sheep. *Desert Bighorn Counc. Trans*;32: 16-18.
25. Chen DY, Wen DC, Zhang YP, Suna QY, Hana ZM, Liua ZH, Shib P, Lia JS, Xiangyub JG, Liana L, Koua ZH, Wua YQ, Chenc YC, Wangd PY, Zhangd HM. Interspecies Implantation and Mitochondria Fate of Panda-Rabbit Cloned Embryos. *Biol Reprod* 2002;(67), 637-642.
26. Chivers DJ. Guidelines for re-introductions: procedures and problems. In: *Beyond captive breeding: re-introducing endangered mammals to the wild*. 1st ed Oxford UK: Oxford, Clarendon Press; 1991: 89-99.
27. Comizzoli P, Mermillod P, Mauget R. 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev*; 40(5):493-504.
28. Coonrod SA, Flores-Foxworth G, Moreno JF, Westhusin M, Byrd SR, Kraemer DC. 1994. Birth of armenian red sheep (*Ovis orientalis*) lambs to domestic sheep (*Ovis aries*) following interspecific transfer of IVM-IVF derived embryos. *Theriogenology*; 41:182.
29. Cranfield MR, Bavister BD, Boatman DE, Berger NG, Schaffer S, Kempse SE, Ialleggio DM, Smart J. 2000. Assisted reproduction in the propagation of the endangered lion-tailed macaque (*Macaca silenus*). *Proc. XI Congr. Nal. Med. Vet. Chile* : 1-16.

30. CRES Project: San Diego Zoo Conservation Programs:
http://www.cres.sandiegozoo.org/projects/gr_frozen_zoo.html. 2007.
31. Crossley DA and Miguélez MM. 2000. Skull size and cheek-tooth length in wild-caught and captive-bred chinchillas. *Archives of Oral Biology*;46(10): 919-928.
32. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*; 381:418–421.
33. Davies CJ, Antczak DF, Allen WR. 1985. Reproduction in mules: Embryo transfer using sterile recipients. *Equine Embryo Transfer. EVJ; (Suppl 3): 63-67.*
34. Delgadillo CC, Mejía VO, Berruecos VJM, Vasquez PC. 2000. Estudio morfológico de los cromosomas del borrego Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*), Tabasco o Pelibuey (*Ovis aries*) y su cruce. *Vet Mex*; 34: 27-37.
35. Demmers KJ, Derecka K, Flint A. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*; 121: 41-49.
36. Dobrinski I, Avarbock MR and Brinster RL. 1999. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol. Reprod* ;(61):1331–1339.
37. Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. 2012. Biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *J Anim Sci*. 2012.
38. Ealy AD, Green JA, Alexenko AP, Keisler DH, Roberts RM. 1998. Different ovine interferon-tau genes are not expressed identically and their protein products display different activities. *Biol Reprod*; 58:566– 573.
39. Ealy AD, Lanson SF, Liu L, Alexenko AP, Winkelman GL, Kubisch HM, Bixby JA, Roberts R. 2001. Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. *Endocrinology*; 142: 2906–2915.
40. Ealy AD, Pennington KA, Rodina TM. 2006. Interferon-tau Polymorphisms and Their Potential Functions in Ruminants. *ARBS Annu REV Biomed. Sci*; 8: 9-18.

41. Ealy AD, Yang QE. 2009. Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. *Am J Reprod Immunol*; 61: 95–106
42. Elder K, Dale B. 2000. First stages of development. In: *In vitro* fertilization. 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 66-77.
43. Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs. *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*; 54:659–673.
44. Ezashi T, Ealy AD, Ostrowski MC, Roberts RM. 1998. Control of interferon-tau gene expression by Ets-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:7882–7887.
45. Ezashi T, Ghosh D, Roberts RM. 2001. Repression of Ets-2-induced transactivation of the tau interferon promoter by Oct-4. *Mol Cell Biol*; 21:7883–7891.
46. Ezashi T, Das P, Gupta R, Walker A, Roberts RM. 2008. The role of Homeobox protein distal-less 3 and its interaction with ETS2 in regulating bovine interferon-tau gene expression-synergistic transcriptional activation with ETS2. *Biol Reprod*; 79:115–124.
47. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 2000;53(1):175-186.
48. Fernández-Arias A, Alabart JL, Folch J, Beckers JF. 1999. Interspecies pregnancy of Spanish Ibex (*Capra pyrenaica*) in domestic goat (*Capra hircus*) recipients induces abnormally high plasmatic levels of pregnancy-associated glycoprotein. *Theriogenology*; 51:1419-1430.
49. Fernández-Arias A, Folch J, Alabart JL, Ramon JP. 1996. Successful interspecific embryo transfer between Spanish Ibex (*Capra pyrenaica*) and domestic goat (*Capra hircus*) using micro-osmotic pumps for FSH administration. *Theriogenology*; 45:247.
50. Fernández-Arias A, Roche A, Alberio R, Alabart JL, Folch J. 2001. Use of hybrids as recipients in interspecies embryo transfer in the capra genus.

- Proceedings of the Annual Conference. International Embryo Transfer Society. Theriogenology; 55: 383.
51. Flint A, Sheldrick E, Theodosios D, Wooding F. 1986. Ovarian peptides: role of luteal oxytocin in the control of estrous cyclicity in ruminants. *J Anim Sci*; 62: 62-71.
 52. Folch J, Cocero MJ, Chesne P, Alabart JL, Dominguez V, Cognie Y, Roche A, Fernandez-Arias A, Marti JI, Sanchez , Echegoyen E, Beckers JE, Sanchez A, Bonastre F, Vignon X. 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*;71:1026-1034.
 53. Forbes SH, Hogg JT, Buchanan FC, Crawford AM, Allendorf FW. 1995. Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Mol.Biol. Evol.*; 12:1106-1113.
 54. Foreyt WJ. 1989. Fatal *Pasteurella haemolytica* pneumonia in bighorn sheep after direct contact with clinically normal domestic sheep. *AJVR* ; 50:341-344.
 55. Fowler AK, Reed CD, Giron DJ. 1980. Identification of an interferon in murine placentas. *Nature*; 286:266–267.
 56. Fukui Y, Mogoe T, Ishikawa H, Ohsumi S. 1997. In vitro fertilization of minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology*; (47):399.
 57. GenBank. 2012. www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
 58. Gómez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser B, Pope CE. Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol. Reprod.* 2003;(69):1032-1041.
 59. González A, Murphy BD, de Alba MJ, Manns JG. 1987. Endocrinology of the postpartum period in the pelibuey ewe. *J. Anim. Sci.* 64: 1717-1724.
 60. Gordon I. 1977. Application of synchronization of estrus and ovulation in sheep. Symposium of Management of Reproduction in Sheep and Goats. Madison Wisconsin, USA.; 15-28.

61. Herrick JR, Campbell M, Levens G, Moore T, Benson K, D'Agostino J, West G, Okeson DM, Coke R, Portacio SC, Leiske K, Kreider C, Polumbo PJ, Swanson WF. 2010. *In vitro* Fertilization and Sperm Cryopreservation in the Black-Footed Cat (*Felis nigripes*) and Sand Cat (*Felis margarita*). *Biol Reprod*; 8: 552–562 .
62. Hiendleder S, Kaufe B, Wassmuth R, Janke B. 2002. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidences for domestication from two different subspecies. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 269: 893-904.
63. Hoefs M and Nowlan U. 1997. Hybridization of thinhorn and bighorn sheep, *Ovis dalli* x *O. canadensis*. *Canadian Field Naturalist* ;111(4): 647-648.
64. Hoffman, RS and Woolf A. 1973. G-Band Patterns as Chromosomal markers, and the interpretation of Chromosomal Evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia*; 29: 117-119.
65. Holt WV, Abaigar T, Jabbour HN. 1996. Oestrus asynchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reprod. Fert. Dev.*; 8:1215-1222.
66. Holt WV. 2000. Fundamental aspect of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*; 53:47-58.
67. Holt WV, Pickard AR. 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev. Reprod*; 4: 143-150.
68. Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats. *Mol. Reprod. Dev.* 2003;(64): 422–428.
69. Honaramooz A, Megee SO, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biol. Reprod.* 2002; (66): 21–28.
70. Hutchins M and Wiese RJ. 1991. Beyond genetic and demographic management: the future of the species survival plan and related American

Association of Zoological Parks and Aquariums conservation efforts. Zoo Biology; 10: 285-292.

71. Idris Anas MK, Shukla H, ArabiHA, SinghS.2010. Developmental Potential of Hybrid Arabian Tahr X Goat Embryos Produced *In vitro* and Implanted into Domestic Goat Recipients. Biol Reprod; 83 : 683.
72. IUCN. IUCN The World Conservation Union. <http://www.iucn.org>. 2003.
73. IUCN. IUCN The World Conservation Union. <http://www.iucn.org>. 2007.
74. Izadyar F, Den Ouden K, Stout TA, Stout J, Coret J. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. Reproduction 2003;(126): 765–774.
75. Jackson P. Tiger conservation moves again to center stage. In : Jackson P. Ed. Cat News Bougy, Switzerland: IUCN- World Conservation Union Species Survival Commission`s Conservation Breeding Specialist Group; 1993: 2-11.
76. Jacobsen H, Schmidt M, Holm P, Sangild PT, Vajta G, Greve T, Callesen H. 2000. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from in vitro produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. Theriogenology; 53(9): 1761-1769.
77. Jalkanen L and Lindeberg H. 1998. Succesful embryo transfer in the silver fox (*Vulpes vulpes*) Anim. Reprod. Sci.; 54:139-147
78. Jarpe MA, Johnson HM, Bazer FW, Ott TL, Curto EV, Krishna NR, Pontzer CH. 1994. Predicted structural motif of IFNT. Prot. Eng.; 7: 863–867.
79. Kaeuffer R, Coltman DW, Chapuis JL, Réale D and Pontier D. 2007. The effects of cyclic dynamics and mating system on the effective population size of an island mouflon population. Mol Ecol;16: 4482-4492.
80. Kidd J, Boyle MS, Allen WR, Shephard A, Summers PM. 1985. Transfer of exotic equine embryos to domestic horses and donkey. Equine Embryo Transfer: EVJ ;(Suppl 3): 80-83.

81. Kidson A, Loskutoff NM, Raath C, Wood CA, Williams KR, van Shalwyk JO, Dyché WK, Barry DM, Bartells P. 1995. Age and parity dependent differences in ovary activity and maturity in african elephant. *Theriogenology*; (43):246.
82. Kim S, Choi Y, Bazer FW, Spencer TE. 2003. Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon tau independent of signal transducer and activator of transcription 1. *Endocrinology*;144: 5203-5214.
83. Kleiman DG. 1989. Reintroduction of Captive Mammals for Conservation. *BioScience*;39(3):152-161.
84. Kubisch HM, Larson MA, Ealy AD, Murphy CN, Roberts RM. 2001. Genetic and enviromental determinants of IFNT secretion by *in vivo* and *in vitro* derived bovine blastocyst. *Anim Reprod Sci*; 66:1-13.
85. Kubisch HM, Larson MA, Roberts RM. 1998. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by *in vitro*-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev*;49:254-60.
86. Lacy RC. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J Mam*; 78:320-335.
87. Lanza RP, Cibelli JB, Díaz F, Morales CF, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. 2000. Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2: 79-90.
88. Lanzendorf SE, Holmgren WJ, Schaffer N, Hatasaka H, Wentz AC, Jeyendran RS. 1992. In vitro fertilization and gamete micromanipulation in the lowland gorilla. *J. Assist. Reprod. Genet* ;(9): 358–364.
89. Larson EV and Graham EF. Freeze-drying of spermatozoa. *Dev. Biol. Stand.* 1976;(36), 343–348.
90. Lasley BL, Loskutoff NM, Anderson GB. 1994. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. *Theriogenology* 1994;41: 119-132.

91. Leaman DW, Cross JC, Roberts RM 1994. Multiple regulatory elements are required to direct trophoblast interferon gene expression in choriocarcinoma cells and trophoblast. *Mol Endocrinol*; 8:456–468.
92. Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB, Fanton JW, Wolf DP. 2004. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature*; (428): 137–138.
93. Lefevre F, Martinat-Botte F, Guillomot M, Zouari K, Charley B, La Bonnardiere C. 1990. Interferon-gamma gene and protein are spontaneously expressed by the porcine trophoblast early in gestation. *Eur J Immunol*; 20:2485–2490.
94. Leibo SP. 1994. *In vitro* fertilization of oocytes by 37-year old cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology*; 42: 1257-1262.
95. Leonard S, Murrant C, Tayade C, van den Heuvel M, Watering R, Croy BA. 2006. Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification – facts and hypotheses – a review. *Placenta*; 27:S40–S46.
96. Leopold AS. 1990. *Fauna Silvestre de México*. Ed. PaxMéxico. 2da Edición. 595-600.
97. Li Z and Roberts RM. 1994. Structure-function related sheep in the interferon-t (IFN-T) *J.Biol.Chem.* 269, 24826-833.
98. Loi P, Ptak G, Barboni B, Fuika J, Cappai P, Clinton M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology*; 19(10): 962-964.
99. Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP. 2003. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev* ;41(5):427-37.
100. Loskutoff NM, Bartels P, Meintjes M, Godke RA, Schiewe MC. 1995. Assisted reproductive technology in non domestic ungulates: a model approach to preserving and management the genetic biodiversity. *Theriogenology*;43:3-12
101. McHugh A. and Rutledge JJ. 1998. Heterologous fertilization to characterize spermatozoa of the genus *Bos*. *Theriogenology* 50: 185–193.

102. Mejía VO, Cervantes MJ, Peña RM, Palma IM, Cinco FF, Gurrola DI. 2001. Características reproductivas en híbridos de Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana* x *Ovis aries*). II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Producción Ovina. Yucatán, México. 5.
103. Meintjes M, Bezuidenhout C, Bartels P, Visser DS, Meintjes J, Loskutoff NM, Fourie FL, Barry DM, Godke RA. 1997. In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from freerengig Burchell's zebra y Hartmann zebra. J. Zoo.Wild. Med; 28:251-259
104. Michael DD, Alvarez IM, Ocon OM, Powell AM, Talbot NC, Johnson SE, Ealy AD. 2006. Fibroblast growth factor-2 is expressed by the bovine uterus and stimulates interferon-tau production in bovine trophoctoderm. Endocrinology; 147: 3571-3579.
105. Miller B, Conway W, Reading R, Wemmer C, Wildt D, Kleiman D, Monfort S, Rabinowitz A, Armstrong B, Hutchins M. 2004. Evaluating the conservation mission of zoos, aquariums, botanical gardens and natural history museums. Conservation Biology;18:86-93.
106. Mills S and Smouse PE. 1994. Demographic consequences of inbreeding in renmant populations. The American Naturalist. 144: 412-431.
107. Montfort SL, Asher GW, Wildt DE, Wood TC, Schiewe MC, Williamson LR, Bush M, Rall WF. 1993. Succesful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen thawed spermatozoa. J. Reprod. Fertil.;99:459-465.
108. Montoya CA, Letermea P and Lallec JP. 2006. A protein-free diet alters small intestinal architecture and digestive enzyme activities in rats Reprod. Nutr. Dev; 46: 49-56
109. Morrell JM, Nubbemeyer R, Heistermann M, Rosenbush J, Kuderling I, Holt W, Hodges JK. 1998. Artificial insemination in Callitrix jachus using fresh or cryopreserved sperm. Anim. Reprod. Sci.; 52:165-174

110. O'Brien SJ and Evermann JF. 1988. Interactive Influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *TREE*; 3: 254- 258.
111. O'Brien JK and Roth L. 2000. Postcoital sperm recovery and cryopreservation in the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*) and application to gamete rescue in the African black rhinoceros (*Diceros bicornis*) *J. Reprod. Fertil*;118:263-271.
112. Onderska DK and Wishart WD. 1982. Experimental contact transmission of *Pastereulla haemolytica* from clinically normal domestic sheep causing pneumonia in Rocky Mountain bighorn sheep. *J. Wildlife Diseases*; 24:663-667.
113. Onderska DK and Wishart WD. 1984. A major bighorn sheep die-off from pneumonia in Southern Alberta. *Bienn.Symp. North. Wild Sheep and Goat Council*; 3: 356-363
114. Othen LS, Bellem AC, Gartley CJ, Auckland K, King WA, Liptrap RM, Goodrowe KL.1999. Hormonal control of oestrus cyclicity and attempted superovulation in wood bison. *Theriogenology*; 52: 313-323.
115. Ott TL, Yin J, Wiley AA, Kim HT, Gerami Naini B, Spencer TE, Bartol FF, Burghart RC, Bazer FW. 1998. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein sheep (*Ovis aries*).*Biol. Reprod*; 59:784-794.
116. Owiny OD, Barry DM, Agaba M, Godke RA. 2009. *In vitro* production of cattle-buffalo hybrid embryos using cattle oocytes and African buffalo (*Syncerus caffer caffer*) epididymal sperm. *Theriogenology*; 71: 884–894.
117. Parent J, Villeneuve C, Alexenko AP, Ealy AD, Fortier MA. 2003. Influence of different isoforms of recombinant trophoblastic interferons on prostaglandin production in cultured bovine endometrial cells. *Biol Reprod*; 68: 1035-1043.
118. Park YS, Lee SH, Song SJ, Jun JH, Koong MK, Seo JT. 2003. Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men with obstructive azoospermia. *Fertil. Steril*;(80): 526–530.

119. Parker MA. 1992. Outbreeding depression in a selfing annual. *Evolution* 46: 837-841.
120. Pimm SL, Ruseell GJ, Glittleman JL, Brooks TM. 1995. The Future of Biodiversity. *Science*; 269:347-350.
121. Pope CE, Dresser BL, Kuehn C, Kramer LW, Giullespie D. 1988. Live birth of a gaur (*Bos gaurus*) calf following nonsurgical embryo transfer to a Holstein (*Bos taurus*) recipient. *Theriogenology*;29: 289.
122. Pope CE, Gelwicks EJ, Burton M, Reece R, Dresser BL. 1991. Nonsurgical embryo transfer in the Scimitar-horned orix (*Orix dammah*): Birth of a live offsprings. *Zoo Biology*;10: 43-51.
123. Pope CE, Dresser BL, Chin NM, Liu JH, Loskutoff NM, Behnke EJ, Brown C, McRae MA, Sinoway CE, Campbell MK, Cameron KN, Owens OM, Johnson CA, Evans RR, Cedars MI. 1997. Birth of a western lowland gorilla following in vitro fertilization and embryo transfer. *Am. J. Prim*; 41:247-260.
124. Pope CE. 2000. Embryo technology in conservation efforts of endangered felids. *Theriogenology*; 53: 163-174.
125. Pratt BR, Butcher RL, Inskeep EK. 1977. Antiluteolytic effect of the conceptus and of PGE₂ in ewes. *J Anim Sci*; 45:784–791.
126. Primack RB. 1993. *Essentials of Conservation Biology*. 1st ed. Sunderland MA, USA: Sinauer Associates Inc. Publishers.
127. Pryor JH, Looney CR, Romo S, Kraemer DC, Long CR. 2011. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching *Theriogenology*.; 75:24-33
128. Radhakrishnan R, Walter LJ, Subramaniam PS, Johnson HM, Walter MR. 1999. Crystal structure of ovine interferon-tau at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 286, 151–162.
129. Rajaravindra KS, Das PJ, Sukumar K, Ghosh SK, Mitra A. 2008. Molecular

- characterization of novel variants of interferon tau (IFNT) gene in Garole breed of sheep (*Ovis aries*). Anim.Reprod. Sci.;104: 238-247.
130. Ralston A, Rossant J. 2008. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. Dev Biol 2008; 313:614–629.
131. Rasmussen TA, Ealy AD, Kubisch HM. 2005. Identification of bovine and novel interferon-tau alleles in the American plains bison (*Bison bison*) by analysis of hybrid cattle x bison blastocysts. Mol Reprod Dev; 70: 228-234.
132. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP and Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol. Reprod. 68: 236-243.
133. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira P, O'Meara C, Fair T, Evans AC, Boland MP, Lonergan P. 2004. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. Mol Reprod Dev.; 69:381-386.
134. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira P, O'Meara C, Fair T, Evans AC, Boland MP, Lonergan P. 2004. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. Mol. Reprod. Dev.; 69: 381-386.
135. Roberts RM, Cross JC, Leaman DW 1992. Interferons as hormones of pregnancy. Endocr Rev; 13:432– 452.
136. Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T. 1999. Trophoblast interferons. Placenta; 20:259– 264.
137. Roberts RM, Ezashi T, Rosenfeld CS, Ealy AD, Kubisch HM. 2003. Evolution of the interferon-tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. Reprod Suppl; 61:239–251.

138. Rosnina Y, Jainudeen MR, Hafez EFE. Genética de la incapacidad reproductiva. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 8va ed México: McGraw Hill-Interamericana; 2002: 325-326.
139. Roth TL, Weiss RB, Buff JL, Bush LM, Wildt DE, Bush M. 1998. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). Biol Reprod; 58: 475–82.
140. Ryder OA, Mc Laren A, Brenner S, Zhang Y, Berschke K. 2000. DNA Banks for Endangered Animal Species. Science; 288:275-277.
141. Ryman N and Laike L. 1991. Effects of supportive breeding on the genetically effective population size. Conservation Biology; 8: 888-890.
142. Saura M, Pérez-Figueroa A, Fernández J, Toro MA, Caballero A. 2008. Preserving Population Allele Frequencies in Ex Situ Conservation Programs. Conservation Biology; 22: 1277-1287.
143. Schiewe MC, Fitz TA, Brown JL, Stuart LD, Wildt DE. 1991. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2 α receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. J Reprod Fertil; 93:19-30.
144. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H. 2007. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. Hum. Reprod; 17: 3039–3045.
145. Schlatt S, Foppiani L, Rolf C, Weinbauer GF, Neischlag E. Germ cell transplantation into x-irradiated monkey testes. Hum. Reprod. 2002; 17: 55–62.
146. Scudamore CL, Robinson JJ, Aitken RP, Kennedy DJ, Ireland S, Robertson IS. 1991. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. Theriogenology; 35: 329-337.

147. SEMARNAP. 1997. Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el Sector Rural 1997-2000. Instituto Nacional de Ecología. México. 207 pp.
148. SEMARNAT. 2000. Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable del borrego Cimarrón (*Ovis canedensis*) en México. SEMARNAT. México. pp 111-116.
149. Senda T, Shimazu T, Matsuda S, Kawano G, Shimizu H, Nakamura KT, Mitsui Y. 1992. Three-dimensional crystal structure of recombinant murine interferon-Beta. *EMBO J*; 9: 3193-3201.
150. Senger PL. Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions Inc. 2^a Ed. 2005
151. Silflow RM, Foreyt WJ, Lagerquist JE. 1994. Evaluation of the cytotoxicity of various isolates of *Pasteurella haemolytica* from bighorn sheep and other ungulate populations. Proceedings of the Biennial Symposium of the Northern Wild Sheep and Goat Council; 9:1-6.
152. Skidmore JA, Billah M, Binns M, Short RV. Hybridizing old and new world camelids: *Camelus dromedarius* x *Lama guanicoe*. *Proc R Soc. B* 1999; 266 : 649-256.
153. Soulé M.1991. Conservation: tactics for a constant crisis. *Science*; 253: 744-750.
154. Spencer TE, Bazer FW. 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*; 53:1527-1543.
155. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*; 128:657-668.
156. Spencer TE, Ott TL, Bazer FW. 1996. tau-Interferon: pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med*; 213:215-229.

157. Storer T, Usinger R, Stebbins R, Nybakken J. Evolución orgánica. En: Zoología General. 1era ed. Barcelona, España: Ed. Omega; 1975: 287.
158. Swanson WF, Horohov DW, Godke RA. 1995. Production of exogenous gonadotrophin neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. J. Reprod.Fertil.; 10: 35-41.
159. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol;24:1596-1599.
160. Thatcher WW, Bazer FW, Sharp DC, Roberts RM. 1986. Interrelationships between uterus and conceptus to maintain corpus luteum function in early pregnancy: sheep, cattle, pigs and horses. J Anim Sci; 62 (Suppl 2): 25-46.
161. Thompson KV and Montfort SL. 1999. Synchronization of oestrous cycles in sable antelope. Anim. Reprod Sci; 57:185-197.
162. Turner J and Hansen C. 1980. The Desert Bighorn. It's Life, History, Ecology and Management. The University of Arizona Press, USA. 145-151.
163. Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Evans RC, Bunch TD. 1998. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. SRR; 29: 83-88.
164. White KL, Bunch TD, Mitalipov S, Reed WA. 1999. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei in to the domestic sheep(*Ovis aries*) enucleated oocytes. Cloning;1:47-54.
165. Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA, Howard J. 1992. Embryogenesis in conservation biology or, how to make an endangered species embryo. Theriogenology; 37: 161-184.
166. Wildt DE, Rall WF, Critser JK, Monfort SL, Seal US. 1997. Genome resources banks: living collections for biodiversity conservation. Bioscience; 47: 689-698.
167. Winkelman GL, Roberts RM, Peterson AJ, Alexenko AP, Ealy AD. 1999. Identification of the expressed forms of ovine interferon tau in the peri-

- implantation conceptus: sequence relationships and comparative biological Activities. *Biol. Reprod.*; 61, 1592–1596.
168. Young SP and Manville RH. 1960. Records of Bighorn Hybrids. *J. Mammalogy*; 41: 523-525.
169. Zarco L, Stabenfeldt GH, Kindhain H, Quierke JF, Granström E. 1984. Persistence of luteal activity in the non-pregnant ewe. *Anim.Reprod.Sci.*; 7:245-267.
170. Zeh DW and Zeh JA. 2000. Reproductive mode and especiation: the viviparity-driven conflict hypothesis. *Bioassay*; 22:938-946

Identification of novel variants of interferon-tau gene in Bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*), Pelibuey sheep (*Ovis aries*) and its expression in hybrid blastocysts (*Ovis canadensis* × *Ovis aries*)

M. Palma-Irizarry¹, P. Damian-Matsumura², M. Betancourt³, S. Romo⁴, G. Perales⁵, A. Lagunas-Martínez⁵, M. V. Madrid-Marina⁵, O. Mejía⁶, and Y. Ducolomb^{3,7}

¹UAM-I, Av San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina Del. Iztapalapa México D.F. C.P. 09340. México;

²Departamento de Biología de la Reproducción UAM-I, Av San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina Del. Iztapalapa México D.F. C.P. 09340. México; ³Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I, Av San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina Del. Iztapalapa México D.F. C.P. 09340. México; ⁴FES Cuautitlán-UNAM. Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, Edo de México. C.P. 54714. México; ⁵Lab. Virología Molecular CISEI-INSP. Universidad No. 655, Col. Santa María Ahuacatlán, Cerrada los Pinos y Caminera. Cuernavaca, Edo de Morelos. C.P. 62100. México; and ⁶CEIEPO FMVZ-UNAM. Km 53.1 Carretera Federal México-Cuernavaca, Municipio de Huitzilac. Tres Marías. Edo de Morelos. C.P. 62515. México.

Received 4 March 2011, accepted 15 May 2012.

Palma-Irizarry, M., Damian-Matsumura, P., Betancourt, M., Romo, S., Perales, G., Lagunas-Martínez, A., Madrid-Marina, M. V., Mejía, O. and Ducolomb, Y. 2012. Identification of novel variants of interferon-tau gene in Bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*), Pelibuey sheep (*Ovis aries*) and its expression in hybrid blastocysts (*Ovis canadensis* × *Ovis aries*). *Can. J. Anim. Sci.* 92: xxx-xxx. The major signal for maternal recognition of pregnancy (MRP) in ruminants is interferon-tau (IFNT). Four novel sequences of the IFNT gene were isolated from genomic DNA obtained from blood samples of Bighorn, Pelibuey or the hybrid ewes. The deduced amino acid sequence of the hybrid ewe showed 100% identity with one Bighorn sheep IFNT sequence, suggesting that this sequence was inherited from Bighorn sheep. The high degree of identity between Pelibuey and Bighorn sheep sequences could be a possible explanation for the successful MRP in some Bighorn hybrid pregnancies. In vivo and in vitro domestic sheep (*Ovis aries*) and hybrid sheep (*Ovis aries* × *Ovis canadensis*) blastocysts were obtained, and IFNT expression was measured by semiquantitative RT-PCR. In vivo and in vitro hybrid blastocysts showed lower expression of IFNT when compared with domestic blastocysts. In conclusion this study showed that there exists an effect of hybridization on IFNT expression and this can affect the MRP.

Key words: Bighorn sheep, interspecies pregnancy, interferon-tau

Palma-Irizarry, M., Damian-Matsumura, P., Betancourt, M., Romo, S., Perales, G., Lagunas-Martínez, A., Madrid-Marina, M. V., Mejía, O. et Ducolomb, Y. 2012. Identification des nouvelles variantes du gène de l'interféron-tau du Mouflon d'Amérique (*Ovis canadensis mexicana*), du mouton Pelibuey (*Ovis aries*) et leur expression dans les blastocystes hybrides (*Ovis canadensis* × *Ovis aries*). *Can. J. Anim. Sci.* 92: xxx-xxx. Le signal principal pour l'identification maternelle de la grossesse (MRP) chez les ruminants est l'interféron-tau (IFNT). Quatre nouvelles séquences génomiques de l'IFNT ont été isolées de l'ADN génomique obtenue à partir d'échantillons de sang de brebis du Mouflon d'Amérique, Pelibuey ou de brebis hybrides. La séquence d'acides aminés déduite de la brebis hybride était 100% identique à celle de l'IFNT du Mouflon d'Amérique suggérant que cette séquence ait été héritée du Mouflon d'Amérique. Le haut degré de similarité des séquences entre le Pelibuey et le Mouflon d'Amérique pourrait possiblement expliquer le succès de la MRP lors de certaines grossesses chez des hybrides du Mouflon d'Amérique. Des blastocystes de brebis domestiques (*Ovis aries*) et de brebis hybrides (*Ovis aries* × *Ovis canadensis*) ont été obtenus in vivo et in vitro et l'expression de l'IFNT a été mesurée par RT-PCR semi quantitatif. Les blastocystes des hybrides obtenus in vivo et in vitro ont montré une expression de l'IFNT inférieure à celle des blastocystes des brebis domestiques. En conclusion, cette étude a montré qu'il existe un effet de l'hybridation sur l'expression de l'IFNT et que cela peut affecter le MRP.

Mots clés: Mouflon d'Amérique, grossesse inter espèce, interféron tau

Assisted reproduction techniques play a significant role in safeguarding endangered animal species. However, the successful use of these techniques in one animal

species cannot easily be transferred to another (Wildt 2009). One of the most important assisted reproduction techniques is to produce embryos and transfer them to

⁷Corresponding author: (e-mail: duco@xanum.uam.mx)

Abbreviations: ACTB, beta actin; IFNT, interferon-tau; MRP, maternal recognition of pregnancy; PGF_{2α}, prostaglandin F_{2-α}

another species recipient female. However, in wild animals it is difficult to apply these techniques because of the lack of knowledge about their physiology and the inability to obtain oocytes and embryos due to the risks of managing females in captivity.

Hybrid crosses between domestic and wild animals are currently used for studies of evolution, phylogenetic relationships, clinical studies of diseases that affect wild species (Hoffman and Woolf 1973; Cox 1977; Guigen et al. 2000) and conservation of endangered species (Fernández-Arias et al. 2001). Hybrid females have been shown to be effective recipients, as in the case of the first cloning of the extinct Spanish Ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) (Folch et al. 2009).

The Bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) is one of the 14 high-priority wild species especially protected in México with a CITES II status (Snape et al. 2001; <http://www.cites.org/>). For this reason, female hybrids of Bighorn and domestic sheep have been proposed as embryo recipients. Although the Bighorn hybrids are viable, their pregnancies are often problematic. As has been observed, they are subject to a higher level/degree of embryo reabsorption and lower fertility and prolificity rates than intraspecific pregnancies, which is perhaps due to the phylogenetic distance between parental species (Mejía-Villanueva et al. 2008). To overcome this problem, it is necessary to find a compatible domestic breed to produce Bighorn hybrids. The Pelibuey breed, originally from Africa and quite common in México, is a hair domestic breed, highly fertile, prolific, and has short and shallow seasonal anestrus (González et al. 1987). For these reasons, the Pelibuey might be a good candidate to produce Bighorn sheep hybrids.

Interferon tau (IFNT) is a major secretory protein produced in unusually large amounts by the embryonic trophoblast during the critical period of maternal recognition of pregnancy (MRP) in ruminants. IFNT acts in a paracrine manner on the endometrium to inhibit development of the endometrial luteolytic mechanism required for pulsatile release of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), thereby ensuring continued production of progesterone by the ovarian corpus luteum. Additionally, IFNT stimulates a number of genes in a cell-specific manner within the endometrium that are implicated in uterine receptivity and conceptus development (Spencer et al. 2008).

IFNT, a novel member of the type I IFN family, shares many characteristics with other interferons, including their antiviral and antiproliferative properties. Moreover, it possesses antiluteolytic activity and trophoblast-specific expression (Ealy et al. 1998). The mechanism of expression in IFNT is well documented in domestic ruminants (Spencer et al. 2008). IFNT, secreted from the blastocysts, acts as a primary signal for MRP, but there is no information about its role in their wild counterparts, and the effect of hybridism on expression of IFNT is unknown. Since

MRP is a crucial event in hybrid pregnancy success, the aim of this study is to analyze the IFNT expression in hybrid blastocysts (*Ovis canadensis* × *Ovis aries*) obtained both in vitro and in vivo, and to compare the sequences of the IFNT gene, obtained after cloning and sequencing DNA from Bighorn sheep, domestic Pelibuey sheep, and the hybrid, to determine their phylogenetic distance.

MATERIALS AND METHODS

IFNT Cloning and Sequencing

Genomic DNA was isolated from blood samples of Bighorn, Pelibuey and hybrid (Bighorn × Dorset) ewes using a Genomic DNA Purification Kit[®] and subjected to PCR amplification with specific IFNT primers (Rizos et al. 2004). The IFNT PCR product was cloned with the InsTAclone PCR cloning Kit[®] Plasmids according to the manufacturer's protocols and the plasmid containing inserts were purified with the GeneJet Plasmid Miniprep Kit[®] and sequenced. The three kits and the *Pfu* polymerase used in the PCR assay were obtained from Fermentas International Inc, Boston, MA, and were used according to the manufacturer's protocols.

The sequences were obtained using ABI PRISM automatic sequencer, 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi) performed at the Molecular Biology Laboratory (Division Biology and Health Sciences, UAM-I). BLAST analysis (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) of the resulting sequences were done, and the amino acid sequences of IFNT were deduced from each nucleotide sequence and aligned with sequences of ruminant ungulate species available in the GenBank database. Sequences were chosen based in their similarities using the Clustal method of Molecular Evolutionary Genetics Analysis *MEGA* v. 4.0 (Tamura et al. 2007). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987). The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of the taxa analyzed. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches (Felsenstein 1985). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al. 2004) and are in the units of the number of base substitutions per site. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 363 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted in *MEGA4* (Tamura et al. 2007).

In vitro and In vivo Embryo Production

Oocyte Collection and Maturation

Ovaries were collected from Pelibuey ewes at a local slaughterhouse and transported to the laboratory in 0.157 M NaCl solution containing 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ penicillin G potassium salt and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin sulfate salt, maintained at 25–28°C. To get immature oocytes, cumulus cells-oocyte-complexes (COC) were aspirated from 2 to 8 mm ovarian follicles with an 18-gauge needle fixed to a 10-mL disposable syringe. The follicular fluid was collected in a 50-mL conical tube containing modified Tyrode solution supplemented with 10 mM sodium lactate, 0.50 mM HEPES and 0.01% polyvinyl alcohol (TL-HEPES-PVA) at a pH of 7.3 to 7.4 (Wang and Niwa 1995), and 4 UI heparin/ml (Inhepar PISA, Mexico).

Oocytes surrounded by a compact cumulus mass and uniform cytoplasm were selected and washed three times in 500- μL drops of protein-free maturation medium (TCM 199) with Earle's salts and 26.2 mM sodium bicarbonate (In Vitro, Mexico), supplemented with 0.1% PVA, 3.05 mM D-glucose, 0.91 mM sodium pyruvate, 0.57 mM cysteine, 10 ng mL^{-1} epidermal growth factor, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LH and 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ FSH, previously covered with mineral oil (Fisher Scientific, USA) (Wang and Niwa 1995). Fifty oocytes were placed in each well of a four-well dish (Nunc, Denmark) containing 500 μL of maturation medium previously covered with mineral oil and incubated at 38.5°C with 5% CO_2 in air and humidity at saturation for 24 h (Rizos et al. 2004).

In vitro Fertilization

After IVM, COC were washed three times in 500- μL drops of modified Tris-buffered medium (mTBM), supplemented with 0.4% BSA fraction V and 2.5 mM caffeine. This medium was used for IVF (Abeydeera et al. 1998). Thirty oocytes were placed in each well of a four-well dish in 250 μL of mTBM, covered with mineral oil and incubated for 30 min until insemination.

Semen samples from Dorset and hybrid (Bighorn \times Dorset) rams were obtained using an artificial vagina. Sperm motility was evaluated: only samples with a minimum motility of 80% were selected. Five milliliters of semen were further diluted with the same volume of Dulbecco's PBS (DPBS) (Gibco, USA), supplemented with 0.1% BSA fraction V, 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ penicillin G potassium salt and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin sulfate salt at a pH of 7.2. This suspension was centrifuged at 61 $\times g$ for 5 min. The supernatant was diluted 1:1 with DPBS a second centrifugation at 1900 $\times g$, which allowed semen to precipitate, as previously reported (Abeydeera et al. 1998; Ducolomb et al. 2009). Finally, the pellet was diluted in 100 μL of mTBM, and after appropriate dilution, 250 μL of sperm suspension were added to 250 μL of medium containing oocytes to give a final sperm concentration of 5 $\times 10^5$ cells mL^{-1} . In each

experiment, half of the oocytes were inseminated with Dorset or hybrid sperm. Gametes were co-incubated for 20 h under the above-mentioned conditions (Rizos et al. 2004).

Embryo Culture

After the co-incubation period, presumptive zygotes were washed three times in 500 μL NCSU-23 (North Carolina State University) development medium (Petters and Wells 1993), supplemented with 0.4% fatty acids-free BSA to remove cumulus cells and sperm by gentle pipetting. Then, 30–40 presumptive zygotes per well were transferred to a four-well dish containing 500 μL of medium, previously covered with mineral oil and incubated at 38.5°C with 5% CO_2 in air and humidity at saturation.

Embryo cleavage and blastocyst development were evaluated under an inverted microscope (Olympus Optical, Japan), at 72 and 168 h post-fertilization, respectively. For the IFNT expression study, only blastocysts with excellent (1) and good (2) morphological quality [International Embryo Transfer Society (IETS) 1998] were considered.

In vivo Embryo Recovery

Two groups of 16 Pelibuey ewes were synchronized with progestogen-impregnated intravaginal sponges (FGA: Chrono-gest 40[®]; Intervet, the Netherland) during 12 d, and superovulated with a total dosage of 200 mg of FSH (Foltropin[®], Bioniche Animal Health, ON) in six applications every 12 h, beginning 2 d before FGA sponge removal (Mejía et al. 2000). During the responsive behavior, ewes were bred naturally; one group was mated with Dorset and the other with the hybrid (Bighorn \times Dorset) ram. The ewes were anesthetized with 0.44 mg kg^{-1} xilazine (Sedazine[®], Fort Dodge Animal Health, IA) and 1 mg kg^{-1} ketamine (Ketaset[®], Fort Dodge Animal Health, IA; Mejía-Villanueva et al. 2008). Embryo recovery was performed by laparotomy 7 d after the first mating. Blastocysts with quality grades 1 and 2 were selected (IETS 1998).

The experimental and surgical procedures were in compliance with the Policy Statements for Animal Use in Science of the Canadian Council on Animal Care.

Poly (A+) RNA Isolation and RT-PCR

A total of 120 quality grades 1 and 2 blastocysts (IETS 1998) were selected and separated into four groups: domestic (Pelibuey \times Dorset) in vitro, domestic (Pelibuey \times Dorset) in vivo, hybrid (Pelibuey \times Bighorn/Dorset) in vitro and hybrid (Pelibuey \times Bighorn/Dorset) in vivo. Each group containing three pools with 10 blastocysts. Poly (A+) RNA was isolated from each pool using the Quickprep *Micro* mRNA Purification Kit[®] (GE Healthcare, Amersham, UK) according to the manufacturer's protocols and treated with DNase (DNA-free Kit[®] Ambion, Austin, TX, USA).

One hundred nanograms of Poly (A+) RNA were used for the first strand cDNA synthesis using 2.5 U μL^{-1} of MuLV reverse transcriptase. Poly (A+) RNA was incubated with 2.5 mM oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) in DEPC-treated water for 10 min at 70°C. The reaction was stopped and re-established with 5 × reaction buffer (250 nM Tris-HCL, pH 8.3, 375 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 50 mM DTT), 1U RNase inhibitor, 2.5 mM of dNTPs in a final volume of 20 μL , and stored at -20°C for later use.

The PCR amplification was performed in 25 μL containing: 1 μL cDNA, 2.5 μL of 10 × PCR Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 mM MgCl₂, 2.5 mM of dNTPs, 20 pmol of each primer and 0.15 μL of Taq DNA polymerase (Invitrogen).

The amplification reactions were carried out in an Eppendorf Master-Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 18, 21, 24, 27, 30 and 35 cycles to establish the dynamic range. The amplification reaction reached the exponential phase at 30 cycles. The PCR primers and conditions are shown in Table 1. A No-RT control and the negative control using water instead of cDNA were included in the experiment. Gels were stained with ethidium bromide and quantified using the Quantity One one-dimensional analysis software (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA). Optical densities were normalized to beta actin (ACTB).

Statistical Analysis

The percentage of cleavage and blastocyst stage embryos was analyzed using the chi-square test. The IFNT expression data assayed by semiquantitative RT-PCR were analyzed by one-way ANOVA followed by multiple pairwise comparisons using the Student-Newman-Keuls method. Differences of $P < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Identification of Novel Variants of IFNT

The sizes of the products (564 bp) amplified from genomic DNA were confirmed by nucleotide sequencing of the cloned PCR products.

Twenty clones were analyzed: five from Bighorn, five from Pelibuey and ten from hybrid sheep. Four novel variants of IFNT were identified (Table 2). Sequences of these novel variants did not completely match (100%) any of the previously reported IFNT sequence from genomic DNA and were submitted in the GenBank

database under the following accession numbers: Bighorn sheep: cimIFNT A (FJ666056) and cimIFNT B (FJ666057); Pelibuey sheep: pelIFNT A (FJ666058); hybrid sheep: hibIFNT (FJ666059). Deduced amino acid sequence alignment of the mature IFNT proteins of Bighorn sheep, Pelibuey and hybrids, along with sequences of all species available in the GenBank, are shown in Fig. 1. Dendrograms were constructed on the basis of these deduced amino acid sequences of IFNT proteins from all species available in GenBank, and appeared to cluster in three main groups (Fig. 2).

In vitro and in vivo Embryo Production

In five replicates, 187 oocytes were inseminated with Dorset semen and 190 with hybrid semen to obtain blastocysts. The percentage of cleavage stage embryos at 72 h was not statistically different between hybrid (71%) and domestic (79%) embryos ($P > 0.05$). However, at 168 h of culture a significant difference ($P < 0.05$) was observed between domestic (44%) and hybrid (23%) embryos in the percentage of embryos that reached the blastocyst stage (Fig. 3). The average recovery with respect to overall embryo yield (7.1 vs. 7.0) and blastocyst stage embryo yield (3.4 vs. 3.2) between the ewes mated with the domestic versus the hybrid rams, respectively, was not significantly different ($P > 0.05$).

IFNT mRNA Expression

According to the densitometric analysis, the IFNT mRNA abundance of in vivo produced domestic blastocysts was 2.2 times higher ($P < 0.05$) than in hybrid blastocysts. In vitro produced blastocysts had IFNT mRNA levels that were 2.7-fold higher ($P < 0.05$) in domestic blastocysts compared with hybrids. The IFNT apparent expression levels did not vary significantly within the domestic or hybrid blastocyst groups whether they were produced in vivo or in vitro (Fig. 4).

DISCUSSION

In general, interspecies gestation is less successful than intraspecies gestation (Bernirschke and Ryder 1985; Skidmore et al. 1999). For this reason, the aim of this study was to clarify the importance of MRP in this phenomenon, which is reported for in vitro derived hybrid Bighorn sheep embryos for the first time.

The genomic sequences described in the current study shared a high degree of identity with known functional IFNT and have all of the previously described IFNT motifs. These sequences of IFNT gene from Bighorn

Table 1. Primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence 5'-3'	Fragment size (bp)	Annealing (°C)
IFNT	Forward	TGCAAGAGAAGGGATACAGCGACT	82	56
	Reverse	AAGGTGGTTGATGAAGTGAGGGCT		
ACTB	Forward	ATCCTGCGGCATTCACGAAACT	84	56
	Reverse	ACCGTCTTGGCGTAGAGGTCTTT		

Table 2. Pair-wise comparisons between the deduced amino acid sequences of the IFNT mature protein in hybrid sheep and other ruminant species²

Ruminant species	Degree of identity at amino acid sequence level			
	hibIFNT (FJ666059)	cimIFNT A (FJ666056)	cimIFNT B (FJ666057)	pelIFNT A (FJ666058)
hibIFNT				
cimIFNT A	<u>100%</u>			
cimIFNT B	98%	98%		
pelIFNT A	98%	98%	95%	
<i>Ovis aries</i>				
Highest	97% (M88770)	97% (M88770)	95% (M88770)	98% (M88770)
Least	88% (AF158817)	74% (M73245)	74% (M73245)	74% (M73245)
<i>Capra hircus</i>				
Highest	92% (AY357327)	92% (AY357327)	90% (AY357327)	92% (AY357327)
Least	71% (DQ154135)	71% (DQ15413)	88% (M73243)	71% (DQ154135)
Bovine subgroupA				
Highest	80% (XM_871285)	80% (AF238612)	78% (X65539)	81% (BOVTPH1A)
Least	78% (NM_001031765)	78% (AF196325)	75% (NM_001031765)	80% (AF196324)
Bovine subgroupB				
Highest	76% (XM_001250215)	76% (XM_001250215)	75% (XM_001250215)	75% (XM_001250215)
Least	69% (XM_593584)	69% (XM_593584)	68% (XM_593584)	68% (XM_593584)
<i>Bubalus bubalis</i>				
Highest	82% (AY535404)	82% (AY535404)	80% (AY535404)	82% (AY535404)
Least	71% (EF503726)	71% (EF503726)	70% (EF503726)	71% (EF503726)
Wild ruminant ungulates				
<i>Bison bison</i> (AY643747)	78%	78%	75%	79%
<i>Bos frontalis</i> (AY665674)	76%	76%	76%	75%
<i>Cervus elaphus</i> (AJ000638)	74%	74%	73%	72%
<i>Moschus</i> (DQ139308)	71%	71%	77%	71%
<i>Ovibos</i> (M73244)	88%	88%	86%	88%
<i>Giraffa</i> (GCU55050)	76%	76%	74%	76%
<i>Bos grunniens</i> (AY455289)	80%	80%	78%	81%

²Comparison between IFNT reported in this study and IFNT variants from other ruminant species previously banked in the GenBank. The major identity is underlined.

and Pelibuey sheep and their hybrids show higher identity with members of the *Ovis* genus to which they belong than with other species. The deduced amino acid sequence of IFNT obtained from the hybrid is 100% identical to cimIFNT A. Therefore, we propose that this sequence may be encoded by the allele present in the hybrid, which was inherited from the Bighorn sheep. A similar finding was obtained in one study investigating cattle × bison hybrid embryos (Rasmussen et al. 2005).

The fact that the pelIFNT A sequence shows a high degree of identity with the cimIFNT A and B sequences (98 and 95%, respectively) is the likely reason for the successful MRP observed in Bighorn hybrid pregnancies.

In the present study, a genealogical analysis showing the evolution of IFNT gene in ruminant was performed and the resulting phylogenetic tree could indirectly show the ruminant species' evolution. Using phylogenetic trees constructed using mtDNA data, Bunch et al. (2006) reported that *O. aries*, the species to which Pelibuey belongs, is in a different clade to that of Bighorn sheep. In contrast, the phylogenetic analysis of IFNT showed that Pelibuey is closer to Bighorn sheep than *O. aries*. The differences observed in both studies

could result from a different function between mtDNA and IFNT gene, a different evolution rate, or because IFNT is subjected to different selection pressures. Interestingly, in the present work, the sequences of *Bubalus bubalis* belong to the *Ovis* clade, while, in another study made with microsatellite, the tree topology revealed a closer proximity of *B. bubalis* to the *O. aries* (sheep) genome than to other domestic species. Although water buffaloes share morphological and biochemical similarities with cattle, the study using the microsatellite sequences places the bubaline species in an entirely new phylogenetic position. The results also suggest that the water buffalo genome shares a common ancestry with sheep and goats after the divergence of subfamily Bovinae (*Bos taurus*) from the family Bovidae (Mattapallil and Ali 1999). The disparities in IFNT phylogenetic analyses may be due to an insufficient numbers of IFNT sequences examined, but, in general, our results agree with those reported by Rajaravindra et al. (2006), who analyzed sequence numbers similar to those in the present study. In other studies, the same number of samples was employed to perform phylogenetic analyses of IFNT (Rajaravindra et al. 2006, 2008)

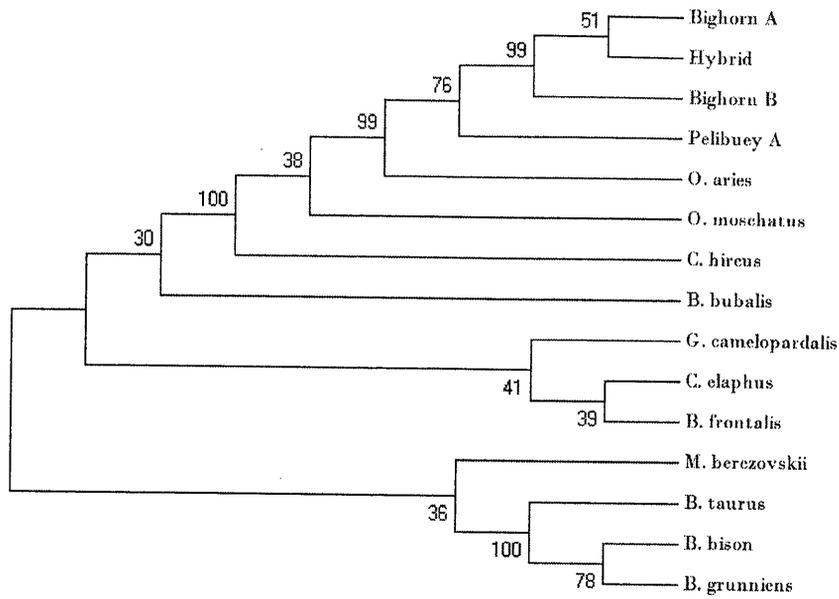


Fig. 2. Ruminant IFNT dendrogram. Evolutionary relationship among amino acid sequences of mature IFNT proteins. The values corresponding to the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches.

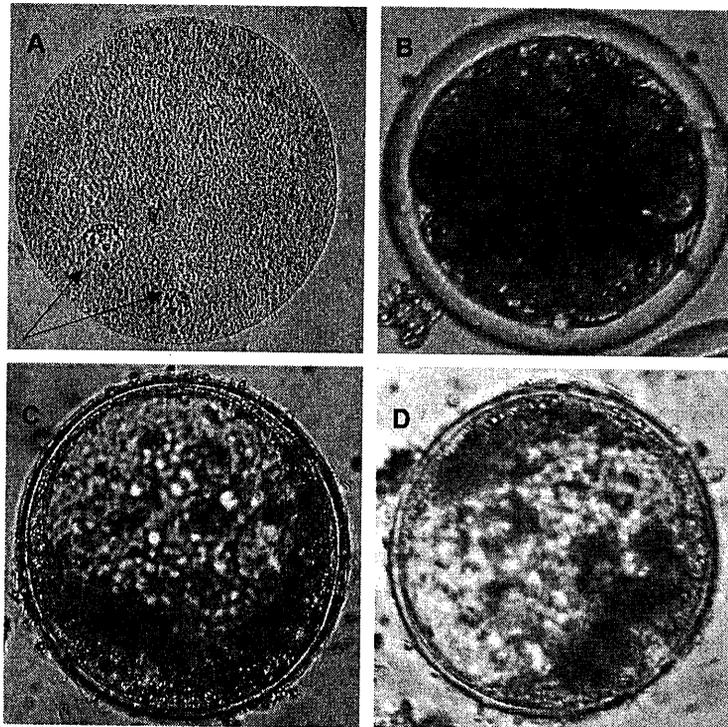


Fig. 3. In vitro derived embryos. (A) Hybrid zygote stained with orcein stain showing female and male pronuclei (black arrow) after 20 h of IVF, (B) hybrid morulae developed at 94 h after IVF, (C) hybrid blastocyst at 168 h after IVF, and (D) domestic blastocyst at 168 h after IVF.

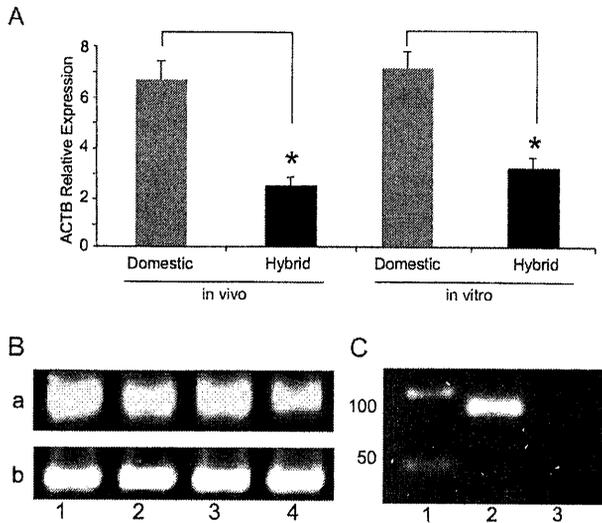


Fig. 4. Semiquantitative RT-PCR of IFNT in domestic and hybrid blastocysts. (A) Relative expression levels are arbitrary absorbance units of ethidium bromide-stained PCR products, expressed as a ratio of transcript: ACTB. (B) Representative gel showing IFNT expression in domestic and hybrid blastocysts produced *in vivo* and *in vitro*. 1a. IFNT expression of *in vivo* produced domestic blastocysts; 2a. IFNT expression of *in vivo* produced hybrid blastocysts; 3a. IFNT expression of *in vitro* produced domestic blastocysts; 4a. IFNT expression of *in vitro* produced hybrid blastocysts; 1–4b. ACTB endogenous controls for each sample. (C) 1. Fifty pb DNA ladder (Fermentas International Inc, Boston, MA); 2. RT positive; 3. RT negative ($P < 0.05$ statistical difference between domestic and hybrid expression).

though in another study, no hybrid embryos developed beyond the early morula stage when cattle oocytes were fertilized with African buffalo epididymal sperm (Owiny et al. 2009). During early embryo development, genomic activation is a critical step in the transition from morula to blastocyst. The lack of transition from the maternal to the embryonic genome at the 8- to 16-cell stage has been suggested as an explanation for the developmental arrest of hybrid embryos (Owiny et al. 2009).

Although the bighorn hybrids are viable, lower fertility is present (Mejía-Villanueva et al. 2008). This occurs in another interspecies gestation such as in camelids and *Capra* genus (Skidmore et al. 1999; Fernández Arias et al. 2001). It is important to find molecular markers that can explain this phenomenon. IFNT is the major signal of MRP, and this event is determinant in the preimplantation stage in ruminants.

To perform IFNT expression analysis in hybrids and domestic embryos, blastocysts of the same quality grades, excellent (1) and good (2), were selected (IETS 1998). To evaluate embryo quality counting, cell number assays were not performed, since these techniques involve the use of non-vital dyes, which do not allow analysis of IFNT expression in the same samples. In

another study, evaluation of the quality grades in blastocysts of IETS was performed by comparing IFNT expression between two species (Rizos et al. 2004). Additionally, because of the difficulty of obtaining hybrid blastocysts, it was not possible to have a larger number of embryos to perform the biochemical and morphological evaluations.

The results of semi-quantitative RT-PCR showed higher levels of IFNT mRNA abundance in both *in vivo* and *in vitro* produced domestic blastocysts compared with the corresponding hybrid blastocysts. This lower apparent expression of IFNT could affect the MRP process, as described by Rizos et al. (2003). In cattle, paternal genotype is a significant determinant of an embryo's ability to develop to the blastocyst stage, and of subsequent IFNT expression (Kubisch et al. 2001), thus supporting the results obtained in the present study. Nevertheless, the molecular mechanism is unknown. The difference in expression levels between domestic and hybrid blastocysts could be due to an allele incompatibility or/and a failure in the regulation of gene expression.

In conclusion, this study reports novel findings about differences in the expression of IFNT between hybrids and domestic blastocysts *in vivo* and *in vitro* and the identification of novel alleles of the IFNT gene, which could affect the MRP. Further studies about IFNT expression during embryo development and its effect on the uterus in interspecies pregnancy in ruminants are needed to understand why only a few hybrid pregnancies are successful.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to CONACYT for PhD fellowship 203345. PAPIIT-UNAM Project IN217209-3 for research funds. Dr. Humberto González-Márquez and Dr. Zayil Salazar from UAM-I and Dr. José Moreno from CISEI-INSP, for manuscript review and technical support. This study was submitted in partial fulfillment of requirements for the PhD degree of Maria Palma Irizarry at UAM-I.

Abeydeera, L. R., Wang, W., Pather, R. S. and Day, B. N. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* **58**: 1316–1320.

Bernirschke, K. and Ryder, O. A. 1985. Genetic aspects of equids with particular reference to their hybrids. *Equine Embryo Transfer. Equine Vet. J.* **3** (Suppl.): 1–10.

BLAST 2008. [Online] Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [2008 Jan. 23].

Bunch, T. D., Wu, C., Zhang, Y. P. and Wang, S. 2006. Phylogenetic analysis of snow sheep (*Ovis nivicola*) and closely related taxa. *J. Hered.* **97**: 21–30.

CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). 2011. [Online] Available: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php> [2011 Oct. 29].

Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep and goat embryo transfer. *Theriogenology* **51**: 105–116.

- Cox, L. M. 1977. Sheep and goats an evolutionary jackpot. 1st ed. Agricultural Experiment Station Publications, Utah State University, Logan UT. pp. 23–26.
- Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., González, G., Altamirano-Lozano, M. and Betancourt, M. 2009. *In vitro* effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. *Cell Biol. Toxicol.* 25: 623–633.
- Ealy, A. D., Green, J. A., Alexenko, A. P., Keisler, D. H. and Roberts, R. M. 1998. Different ovine Interferon-Tau genes are not expressed identically and their protein products display different activities. *Biol. Reprod.* 58: 566–573.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fernández-Arias, A., Roche, A., Alberio, R., Alabart, J. L. and Folch, J. 2001. Use of hybrids as recipients in interspecies embryo transfer in the *Capra* genus. *Proc. Annu. Conf. of IETS. Theriogenology* 55: 383.
- Folch, J., Cocero, M. J., Chesné, P., Alabart, J. L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J. I., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J. F., Bonastre, A. S. and Vignon, X. 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology* 71: 1026–1034.
- González, A., Murphy, B. D., de Alba, M. J. and Manns, J. G. 1987. Endocrinology of the postpartum period in the pelibuey ewe. *J. Anim. Sci.* 64: 1717–1724.
- Guigen, F., Mselli, L., Durand, J., Du, J. and Favier, C. 2000. Experimental infection of mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 6: 456–461.
- Hoffman, R. S. and Woolf, A. G. 1973. Band patterns as chromosomal markers and the interpretation of chromosomal evolution in wild sheep (*Ovis*). *Experientia* 29: 117–119.
- International Embryo Transfer Society. 1998. Manual of the international embryo transfer society. 3rd ed. IETS, Savoy, IL.
- Kubish, H. M., Larson, M. A., Ealy, A. D., Murphy, C. N. and Roberts, R. M. 2001. Genetic and environmental determinants of interferon-tau secretion by *In vivo* and *In vitro* derived bovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* 66: 1–13.
- Mattapallil, M. J. and Ali, S. 1999. Analysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationship between water buffalo (*Bubalus bubalis*) and sheep (*Ovis aries*). *DNA Cell Biol.* 18: 513–519.
- McHugh, J. A. and Rutledge, J. J. 1998. Heterologous fertilization to characterize spermatozoa of the genus *Bos*. *Theriogenology* 50: 185–193.
- Mejía, O., Murcia, C., Valencia, J. and Espinoza, F. 2000. Administración postmonta de acetato de fluorogestrona en ovejas donadoras de embriones. *Vet. Méx.* 31: 129–135.
- Mejía-Villanueva, O., Gual-Sill, F., Nuñez-Saavedra, J., Pérez-Medina, M. and Palma-Irizarry, M. 2008. Esquemas de sincronización y superovulación de ovejas domésticas (*Ovis aries*) como modelo para la transferencia de embriones en borregos Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*). Pages 187–203 in A. F. Sánchez, M. M. G. Hidalgo, W. L. S. Arriaga, and S. W. M. Contreras, eds. *Perspectivas en Zoología Mexicana* Fondo Editorial UJAT, Chiapas, México.
- Owiny, O. D., Barry, D. M., Agaba, M. and Godke, R. A. 2009. *In vitro* production of cattle-buffalo hybrid embryos using cattle oocytes and African buffalo (*Syncerus caffer caffer*) epididymal sperm. *Theriogenology* 71: 884–894.
- Petters, R. M. and Wells, K. D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fert.* 48 (Suppl.): 61–73.
- Rajaravindra, K. S., Mitra, A., Sharma, A. K., Deb, S. M. and Sharma, A. 2006. Molecular characterization of the interferon tau gene of the Mithun (*Bos frontalis*). *Zool. Sci.* 23: 607–611.
- Rajaravindra, K. S., Das, P. J., Sukumar, K., Ghosh, S. K. and Mitra, A. 2008. Molecular characterization of novel variants of interferon tau (IFNT) gene in Garole breed of sheep (*Ovis aries*). *Anim. Reprod. Sci.* 104: 238–247.
- Rasmussen, T. A., Ealy, A. D. and Kubish, M. H. 2005. Identification of bovine and novel interferon-T alleles in the American plains bison (*Bison bison*) by analysis of hybrid cattle × bison blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.* 70: 228–234.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P. and Lonergan, P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68: 236–243.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Moreira, P., O'Meara, C., Fair, T., Evans, A. C., Boland, M. P. and Lonergan, P. 2004. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. *Mol. Reprod. Dev.* 69: 381–386.
- Roth, T. L., Weiss, R. B., Buff, J. L., Bush, L. M., Wildt, D. E. and Bush, M. 1998. Heterologous *In vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Biol. Reprod.* 58: 475–482.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Skidmore, J. A., Billah, M., Binns, M. and Short, R. V. 1999. Hybridizing old and new world camelids: *Camelus dromedarius* × *Lama guanicoe*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 266: 649–256.
- Snape, W. I I I, Senatore, M., Gillon, K., George, S., Muffett, C., Anderson, R. and Kondor, R. 2001. Protecting ecosystems under the endangered species act: the sonoran desert example (VIII. Protection of endangered species and habitat under Mexican law). *Washburn Law Journal.* 41: 14–49.
- Spencer, T. E., Olivier, S. and Wolf, E. 2008. Genes involved in conceptus – endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction* 135: 165–179.
- Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 11030–11035.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- Wang, W. and Niwa, K. 1995. Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zigote* 3: 345–350.
- Wildt, D. 2009. Rescuing endangered animals with assisted reproductive technology. *ART and Animals. SRM.* 7: 21–25.