



**EVALUACIÓN DE LA SINCRONIZACIÓN DEL CICLO CELULAR DE CULTIVOS
PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS PARA LA OBTENCIÓN DE CLONES
EMBRIONARIOS BOVINOS POR LA TÉCNICA DE CLONACIÓN MANUAL (CM)**

NATALIA ANDREA GÓMEZ MORALES

Directora

ZULMA TATIANA RUIZ-CORTÉS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ANIMALES LÍNEA FISIOLÓGIA DE LA REPRODUCCIÓN
Y LA LACTANCIA
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
2014**



AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación Biogénesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, a la empresa privada Ganadería Rio Grande S.A.S, a la planta de beneficio Central Ganadera, al laboratorio de Citometría de la Universidad de Antioquia y al laboratorio de biología y desarrollo molecular, Universidad de Fortaleza, Brasil.

Tabla de contenido

Resumen General	6
General Summary	7
Introducción general	8
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Marco teórico general	11
Capítulo 1	20
Artículo: Comparing manual cloning, parthenogenesis, and IVF techniques for the production of bovine embryos and their quality	
Capítulo 2	40
Artículo: Evaluación de la sincronización del ciclo celular de cultivos primarios de fibroblastos para la obtención de clones embrionarios bovinos por la técnica de clonación manual (CM)	
Lista de Tablas	
Capítulo 1	
Table 1: Development of bovine embryos produced through manual cloning, parthenogenesis, and <i>in vitro</i> fertilization.	
Table 2: Embryo quality. Number of cells per embryo produced through manual cloning, parthenogenesis, and <i>in vitro</i> fertilization.	

Capítulo 2

Tabla 1: Porcentaje de fibroblastos en diferentes fases del ciclo celular sometidos a tres diferentes métodos de cultivo: RS restricción de suero, AC alta confluencia, RS+AC combinación de los dos métodos.

Tabla 2: Producción de clones según el método de sincronización del fibroblasto donante de núcleo.

Tabla 3: Calidad embrionaria según número de células por clon producidos con fibroblastos sometidos a diferentes tratamientos de sincronización celular.

Tabla 4: Desarrollo embrionario de clones bovinos, partenotos con zona pelúcida PCZP, partenotos sin zona pelúcida PSZP y embriones fertilizados in vitro FIV y número total de blastómeras que conforman un embrión.

Lista de figuras

Capítulo 1

Figure 1: Setting up the primary fibroblast culture

Figure 2: Standardizing the manual cloning process

Figure 3: Cleavage and production of parthenogenetic and cloned embryos

Figure 4: Evaluation of cell numbers via fluorescent Hoechst staining

Capítulo 2

Figura 1: Cultivo de fibroblastos y evaluación de viabilidad celular por medio de la tinción azul de tripano

Figura 2. Amplificación del gen de vimentina.

Figura 3: Fibroblastos endoreplicantes

Figura 4: Producción de embriones y evaluación del número de células por medio de tinción fluorescente Hoechst

Lista de Abreviaturas

CM: Clonación Manual

HMC: Hand Made Cloning

MII: Metafase II

TN: Transferencia nuclear

TNCS: Transferencia nuclear de célula somática

FIV: Fertilización *in vitro*

IVF: *In vitro* fertilization

IA: Inseminación artificial

SOV: Superovulación

ZP: Zona pelúcida

WOW: Well of the well

MPF: del inglés Maturation Promotor Factor, factor promotor de la maduración

DMSO: Dimetilsulfóxido

PCZP: Partenote con zona pelúcida

PSZP: Partenote sin zona pelúcida

PNZ: Parthenote without zona pellucida

PZ: Parthenote with zona pellucida

RS: Restricción de suero

AC: Alta confluencia

Resumen General

La clonación es una valiosa herramienta para la obtención de animales de alto valor genético y/o fenotípico, animales en vía de extinción y transgénicos, además permite el estudio de los procesos biológicos que ocurren en el desarrollo embrionario temprano. Sin embargo, hasta la fecha la eficiencia de esta técnica es relativamente baja; trabajos que busquen entender y mejorar los porcentajes de embriones y nacidos vivos son valiosos para enriquecer esta tecnología. En el proceso de clonación por transferencia nuclear, el tipo, el origen y la condición en la que se encuentre la célula donante del núcleo es uno de los factores que más afecta el éxito de esta técnica. Es necesario que exista una sincronía y compatibilidad espacial y temporal entre el citoplasma del oocito receptor y el núcleo de la célula donante; así, la reprogramación nuclear y el desarrollo embrionario temprano podrán iniciarse y culminarse de la manera adecuada. En la transferencia nuclear, la etapa ideal del ciclo celular en la que debe estar la célula donante es G0/G1, cuando se utilizan oocitos receptores no activados en metafase II (MII). Para ello se utilizan diversos métodos de sincronización entre los que se destacan la restricción de suero y la alta confluencia en el cultivo celular. Hasta el momento en el medio científico no se ha llegado a un consenso general de cuál de ellos presenta los resultados más favorables. Es por esto que en este trabajo se planteó realizar una estandarización y caracterización del cultivo de fibroblastos bovinos a partir de explantes obtenidos por biopsia de oreja, y se compararon tres métodos de sincronización del ciclo celular (restricción de suero, alta confluencia celular y la combinación de ambos) por 24, 48 o 72 horas en cultivo. Estos fibroblastos se utilizaron como donantes de núcleo para la evaluación del potencial de desarrollo *in vitro* y calidad de los embriones producidos por medio de la clonación manual (CM); además se compararon todos los resultados con los embriones producidos por fertilización *in vitro* y partenogénesis.

General Summary

Cloning is a valuable tool for the production of animals of high genetic and phenotypic value, endangered species and transgenic animals. Additionally, it allows the study of biological process that occurs in the early embryo development. However, until the date, the efficiency of the technique remains low. Therefore the importance to continue studies that allow to understand and improve the percentage of embryos and life births. During the cloning process by nuclear transfer, the type, origin and condition of the nuclear donor cell is one of the factors that affects the success of this technique. Temporal and spatial synchrony between the receptor oocyte cytoplasm and the nucleus of the donor cell is imperative for the nuclear reprogramming and the early embryo development to occur successfully. During nuclear transfer, the ideal cellular cycle stage of the donor cell is G0/G1 when using receptor oocytes not activated in MII. Different methods of synchronization can be used, including serum starvation and high confluence of cell culture. To date, there is no consensus concerning the most favorable synchronization method. In this study we performed a characterization and standardization of bovine fibroblast culture from ear biopsy and we compared three methods of cellular cycle synchronization (serum starvation, high confluence and the combination) during 24, 48 or 72 hours of cell culture. The fibroblasts were used as nuclei donors for the evaluation of the potential *in vitro* development and quality of embryos produced by manual cloning method (MC) and compared all the results with the results of embryos produced by in vitro fertilization and parthenogenesis.

Introducción General

La clonación por transferencia nuclear (TN) es una herramienta que permite la multiplicación de animales de alto valor genético y fenotípico para fines productivos, rescatar a los que están en peligro de extinción (Lewis et al., 2004; Bordignon, 2011), y producir animales transgénicos con propósitos agropecuarios o biomédicos (Paterson et al., 2003; Zhang y Piedrahita, 2014). Esta tecnología es también un gran instrumento para el estudio de procesos biológicos, tales como la reprogramación nuclear, la epigenética, la activación del embrión y el desarrollo pre - postnatal, el crecimiento y la supervivencia (Vieira et al., 2012). En la actualidad, el método más utilizado para la obtención de clones es la transferencia nuclear de célula somática (TNCS) la cual requiere el uso de micromanipuladores, personal calificado y alta inversión en equipos y capacitación (Wilmut et al., 2002; Ross y Feltrin, 2014). Se han desarrollado nuevos métodos de TN que buscan ampliar el uso de esta metodología y disminuir los costos asociados a ella; es así como surgió la técnica de clonación manual (CM) conocida en el mundo como “Hand Made Cloning” (HMC); la enucleación se realiza manualmente; y la ventaja es que no es necesario un micromanipulador para la enucleación y la transferencia de la célula donante, haciendo el proceso de clonaje relativamente más sencillo y reduciendo sus costos (Vajta et al., 2001; Vajta, 2007). Tanto la CM como la TNCS presentan buenas tasas de producción de embriones, incluso algunas similares a las obtenidas por fertilización *in vitro* (FIV) (Campbell, 2007; Kent-First et al., 2014), pese a esto los porcentajes de preñez y animales nacidos vivos son aún muy bajos, sumado a que existen múltiples anomalías en el desarrollo embrionario, fetal y neonatal, lo que convierte a la clonación somática en una técnica aún ineficiente (Vajta y Gjerris, 2006). En el mundo científico existe un gran interés por estudiar los factores técnicos y biológicos que afectan el proceso, especialmente a nivel de la célula donante de núcleo y los procesos de reprogramación (Wells, 2010). Se ha hipotetizado que una de las principales causas en las fallas de desarrollo en la clonación es la

reprogramación incorrecta o incompleta del núcleo donante. Hasta el momento poco se entiende de los eventos celulares y moleculares que podrían estar involucrados en la reprogramación genómica de una célula somática adulta, que le permita dirigir el desarrollo embrionario y fetal. Lo que se tiene claro es que es esencial que exista una coordinación de la etapa del ciclo celular de la célula donante y el citoplasma del oocito receptor para lograr un desarrollo exitoso pos reconstrucción (Wells et al., 2003). Se han utilizado diversos productos y protocolos con la finalidad de lograr una correcta sincronización del ciclo celular de la célula donante permitiendo que se detenga en G₀/G₁, etapas ideales para la reconstrucción embrionaria, cuando el oocito receptor se encuentra detenido en MII. Dentro de los métodos más utilizados se destacan la restricción de suero (Wilmut et al., 1997; Khammanit et al., 2008; Goto et al., 2013), que actúa sobre las células haciendo que estas se detengan en G₀, suspendiendo la transcripción; y la alta confluencia celular que ocasiona la inhibición del ciclo por contacto de las células (Zetterberg y Skold, 1970; Johnson et al., 1993; Boquest et al., 1999; Gerger et al., 2010). Estas dos metodologías han sido utilizadas en varias especies con diversos resultados, por ejemplo en bovinos. Gerger et al. (2010) encontraron que al utilizar fibroblastos en CM con aumento progresivo de la confluencia celular, el porcentaje de blastocistos se incrementó de forma lineal. Por otro lado, la restricción de suero ha sido efectiva en diferentes experimentos permitiendo una buena sincronización del ciclo (Wilmut et al., 1997; Katska et al., 2002). Sin embargo, otros investigadores encontraron que su uso podría generar la activación de procesos pro-apoptóticos lo que desencadena fragmentaciones del ADN y por tanto-detrimento en el desarrollo embrionario (Collas et al., 1992; Peura, 2001). En muy pocos trabajos se ha reportado la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células donantes de núcleo. Hasta el momento persisten las dudas acerca de cuál es el mejor método de sincronización de un cultivo primario de fibroblastos, y cuál es la relación entre ellos y el desarrollo y la calidad embrionaria después de la clonación. Un mejor entendimiento de la compatibilidad entre el ciclo celular del citoplasma receptor y el núcleo de la célula

donante, permitirá el perfeccionamiento del proceso de clonaje lo que se verá reflejado en un aumento en su eficiencia. Por ello en este proyecto se evaluaron tres métodos de sincronización del ciclo celular, restricción de suero, alta confluencia celular y una combinación de ambos métodos en un cultivo primario de fibroblastos bovinos; y se evaluó la capacidad de desarrollo *in vitro* y la calidad de los embriones obtenidos después de la reconstrucción con células sincronizadas.

Objetivo general

Evaluar la eficiencia de la sincronización del ciclo celular de fibroblastos bovinos donantes de núcleo y la capacidad de desarrollo *in vitro* de embriones clonados manualmente reconstruidos con estas células.

Objetivos específicos

- Evaluar y comparar la eficiencia de tres métodos de sincronización del ciclo celular sobre el cultivo primario de fibroblastos.
- Determinar la capacidad y calidad de desarrollo *in vitro* de embriones clonados manualmente, con fibroblastos sincronizados con un método que presente altos porcentajes de células en G0/G1.

Marco teórico

La fertilización *in vitro* y la producción *in vivo* de embriones hacen parte del grupo de biotecnologías que han sido utilizadas para optimizar la eficiencia reproductiva de diferentes especies de interés pecuario, aumentando con ello el número de crías por año, acelerando el mejoramiento genético y permitiendo un mayor aprovechamiento de los recursos (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006). Uniéndose a estas ha surgido otra técnica de reproducción asistida de tipo asexual, la clonación, la cual permite la obtención de uno o varios individuos a partir del núcleo de una célula somática o embrionaria de otro individuo, de modo que estos son genéticamente idénticos o casi idénticos al original (Campbell et al, 1996; Ross y Feltrin, 2014)

La clonación tiene un gran potencial en sistemas de producción animal, ya que además de permitir la multiplicación de animales de alto valor genético y fenotípico (Laible y Wells, 2007), evita la pérdida de genes que expresan características de interés, como ocurre cuando los animales son apareados por monta natural o reproducidos por biotecnologías convencionales como la inseminación artificial (IA), la fertilización *in vitro* (FIV) y la superovulación (SOV) (Heyman et al., 2005). Por otra parte, permite la generación de avances científicos frente a animales que han sido fruto de procesos de transformación genética (transgénesis). En este aspecto, los principales esfuerzos se han centrado en la producción de clones de las líneas celulares modificadas genéticamente para obtener productos específicos de alto valor en la leche, como medicamentos de uso humano, proteínas de la sangre, antígenos para la producción de anticuerpos y en un futuro alimentos especializados o nutraceuticos (Paterson et al., 2003; Niemann et. al, 2005; Masih et. al, 2014). La producción de animales transgénicos también abre la posibilidad de obtener animales con resistencia a enfermedades como la mastitis (Wall et al., 2005; Laible, 2011), o producción de toros que generen descendencia solamente femenina o masculina (Faber et al., 2003). La implementación de la clonación podría significar la reinscripción al sistema productivo de

animales que por diversas razones quedaron fuera de este (animales castrados, fuera de edad reproductiva, con lesiones anatómicas, muertos, etc.) o preservar e introducir genes nuevos a una población que se encuentra en riesgo de extinción (Loi et al., 2001; Wells, 2004). Por otro lado la clonación es una alternativa para la producción de células tronco embrionarias utilizadas tanto en terapia celular como en modelos de investigaciones biomédicas y de biología del desarrollo (Kanka, 2003; Hall et al., 2013).

La clonación involucra técnicas de manipulación celular que permiten la reprogramación nuclear y la adquisición de totipotencia de una célula diferenciada, con el objetivo de desencadenar el desarrollo embrionario temprano hasta llegar a obtener crías vivas saludables (Vajta et al., 2006). En 1914 Hans Spemann cuestionó la capacidad de una célula de revertir su estado de diferenciación; usó un cabello humano para separar de forma transitoria un embrión de salamandra, aislando el núcleo hacia un lado del embrión y dejando la otra mitad del citoplasma sin núcleo; la parte del citoplasma que contenía el núcleo se dividió normalmente hasta llegar a 16 células, posteriormente soltó el cabello permitiendo que uno de los núcleos migrara hacia la parte enucleada del citoplasma para luego separarlo de nuevo y dividir el embrión en 2 y producir un embrión gemelo, así demostró por primera vez la totipotencialidad de un núcleo trasplantado (Spemann, 1914). Después Briggs y King en 1952 realizaron los primeros intentos de transferencia nuclear de acuerdo con el experimento de Spemann, aislando y transfiriendo el núcleo de una célula somática adulta de rana a un oocito que por su tamaño y ausencia de zona pelúcida permitían realizar el procedimiento con pipetas hechas manualmente; sin embargo no lograron desarrollo a término de los cigotos obtenidos (Briggs y King, 1952). Posteriormente, se hicieron ensayos de clonación en mamíferos y se logró el nacimiento de una oveja a partir de células embrionarias gracias el desarrollo de la enucleación y reconstrucción de oocitos (Willadsen, 1986). La primera clonación exitosa en mamíferos utilizando una célula somática totalmente diferenciada la lograron Wilmut y colaboradores en 1996, lo que permitió superar un

dogma biológico “las células diferenciadas no pueden revertirse a un estado totipotente o pluripotente para dar origen a un nuevo individuo”, lo contrario quedó demostrado con el nacimiento de la oveja Dolly a partir de células de glándula mamaria de un animal adulto por transferencia nuclear de célula somática (TNCS) (Wilmut et al., 1997), convirtiéndose esta en la técnica de clonación más utilizada en el mundo hasta el momento. Básicamente la TNCS consiste en remover el núcleo de un oocito que no ha sido fertilizado y reemplazarlo con el núcleo de una célula somática del donante que va a ser clonado; posteriormente se realiza activación ya sea eléctrica o química, y se procede al cultivo *in vitro* de los embriones. Esta técnica ha sido utilizada en más de 16 especies de mamíferos, entre los cuales se tienen ratones (Ono et al., 2001; Mizutani et al., 2014) conejos (Chesné et al., 2002; Meng et al., 2014) ovejas (Wilmut et al., 1997; Akagi et al., 2014), terneros (Kato et al., 1998; Lanza et al., 2000; Kent-First et al., 2014), cabras (Keefer et al., 2001; Pereira et al., 2013a), y cerdos; (Polejaeva et al., 2000; Lee y Prather, 2014) y está establecida en más de 130 laboratorios en el mundo (Green et al., 2007).

En la TNCS la zona pelúcida (ZP) se conserva, ésta cubierta flexible, transparente acelular del oocito es considerada como un importante apoyo en la mayor parte del desarrollo hasta el día 6-8 (dependiendo de la especie), cuando los embriones normalmente eclosionan y salen de ella (Vanroose et al., 2000). Para eliminar el núcleo original y transferir el nuevo es necesario realizar manipulaciones delicadas dentro de la ZP y para ello son esenciales instrumentos especiales y costosos como los micromanipuladores; el uso de estos y la preparación de micropipetas utilizadas durante el proceso son tareas difíciles y requieren un entrenamiento especial, mano de obra altamente calificada y una inversión considerable (Vajta et al., 2006). En los últimos años algunos grupos de investigación se han dedicado a desarrollar nuevos métodos de transferencia nuclear que permitan ampliar el uso de esta metodología y disminuir los costos asociados a ella; es así como a partir del trabajo de Peura et al. (1998)

comparando el efecto del volumen citoplasmático en el desarrollo embrionario temprano fusionando citoplastos con blastómeras, surgió la técnica de Hand Made Cloning (HMC) o clonación manual (CM) que posteriormente fue perfeccionada y adaptada para células somáticas por Vajta et al., 2001; 2003. Esta metodología consiste esencialmente en la fusión de oocitos madurados *in vitro* enucleados (citoplastos) con una célula somática (fibroblasto, célula epitelial, muscular, granulosa, entre otras) del animal a clonar; por medio de un choque eléctrico y posterior activación química para inducir la división celular y así obtener un clon embrionario, el cual si es transferido a una hembra receptora y si se tiene un nacimiento exitoso la cría debe tener similitud genética y fenotípica con el donante de la célula somática fusionada (Vajta et al., 2001, 2003, 2005). El cultivo *in vitro* de embriones sin zona pelúcida puede parecer peligroso en principio, pero con modificaciones en el cultivo como el sistema pozo a pozo (WOW-Well-of-the-Well) desarrollado por Vajta y colaboradores, el cual consiste en la creación de pequeños pozos con una punta de acero en la parte inferior de platos de cultivo de cuatro pocillos, se ha logrado crear un microambiente óptimo para el embrión y este se desarrolla de la forma adecuada; con este sistema se han logrado de aceptables a excelentes tasas de desarrollo (Vajta et al., 2000; 2005).

Existen diferencias en la reconstrucción y cultivo de los embriones clonados por CM y por TNCS, a pesar de ello las tasas de blastocitos para CM oscilan entre 18 y 36%, porcentajes similares a los obtenidos por la técnica convencional de clonaje (Teciirlioglu et al., 2005). El número de células y los análisis microscópicos indican que los embriones clonados obtenidos por ambas técnicas son de calidad equivalente.

La CM ofrece ventajas frente a la TNCS en cuanto a que se tiene la posibilidad de acrecentar el volumen del citoplasma a través de la fusión de tres citoplastos lo que aumenta el número de células de los blastocitos (Delaney et al., 2007), además se puede realizar agregación de embriones aumentando con ello los factores de reprogramación, lo que podría significar una mejor calidad embrionaria y un buen

desarrollo temprano (Vajta et al., 2003; Ribeiro et al., 2009; Mezzalana et al., 2011). A pesar de los datos que se tienen hasta la fecha todavía es demasiado pronto para saber si la CM será capaz de reemplazar la forma tradicional de clonaje, pero la tecnología parece tener un potencial considerable de ser estandarizada y automatizada (Vajta et al., 2005). Entre tanto, en las técnicas de clonaje TNCS y CM persisten problemas asociados con anomalías, mortalidad embrionaria y neonatal, lo que reduce su eficiencia y estabilidad (Cibelli et al., 2002; Constant et al., 2006; Bertolini et al., 2007). En el caso de los bovinos, el porcentaje de nacimientos de terneros clonados por embrión transferido varía entre 5-10% (Wilmut et al., 2000; Cheng et al., 2011), valores muy inferiores al promedio que se obtiene por FIV 35-45% (Kruip y Den Daas, 1997; Isobe et al., 2014). Se cree que estas posibles fallas puedan deberse a la reprogramación del genoma donante, a la técnica utilizada o a ambas.

En la actualidad existe un gran interés por estudiar y esclarecer las diversas variables que están involucradas en el proceso de clonación como son la especie, edad y condición corporal del animal, calidad de los oocitos, metodologías, sistemas de cultivo, el origen y el estado de la célula donante de núcleo (Wells, 2010). En estos últimos aspectos aún no se tiene claro cuál es origen o tipo de célula ideal para la transferencia nuclear; sin embargo, se sabe que tienen una gran influencia sobre el éxito o fracaso del proceso de clonación (Galli et al., 2003; Powell et al., 2004; Batchelder et al., 2005).

Las células somáticas donantes son derivadas de diversos tejidos de animales en diferentes estadios de desarrollo (fetos, animales recién nacidos, jóvenes o adultos, e incluso de animales fallecidos en un período relativamente corto después de la muerte) (Vajta et al., 2006). Gran parte de los investigadores utilizan las células fetales como donantes de núcleo para obtener animales clonados, debido a que al parecer estas células presentan menos daños genéticos y una mayor habilidad proliferativa en comparación con las células adultas (Miyoshi et al., 2004); sin embargo, existen datos que demuestran que las células adultas pueden producir embriones clonados con igual

o mayor eficiencia que las células fetales utilizando la técnica convencional TNCS (Chesné et al., 2002; M. C. Gómez et al., 2004; B. C. Lee et al., 2005). Sumado a esto, el uso de las células fetales como donantes de núcleo no permite conocer el verdadero genotipo y fenotipo de éstas y sólo se le puede comparar con el de los progenitores de forma independiente.

Se han logrado animales nacidos vivos a partir de varios de tejidos diferenciados para adultos. (Oback y Wells, 2002, Daniel et al., 2008). Células somáticas se han obtenido de varios tipos celulares como cúmulus, fibroblastos, células de Sertoli entre otras (Campbell et al., 2007). Los diversos tipos de tejidos parecen presentar diferencias en la generación de descendencia. Los fibroblastos son las células más comúnmente utilizadas en la clonación de mamíferos pues son células mesenquimales no especializadas, capaces de una extensa proliferación, reparación de tejidos y la diferenciación en una variedad de otros tejidos conectivos tales como hueso, cartílago y músculo (Oback y Wells, 2007); además, su uso se ha extendido debido a la facilidad de recolección y propagación en el cultivo. Sin embargo, la eficiencia de estas células o de cualquier otra en el proceso de clonación depende en gran parte del animal donante (edad y estado corporal), de las técnicas de cultivo y los métodos de sincronización del ciclo celular. Es de suma importancia que cada laboratorio que pretenda estandarizar y establecer protocolos de clonación por TN, tenga pleno conocimiento de todas las características del cultivo primario o línea celular establecida para los procedimientos, con el fin de minimizar la variabilidad y poder garantizar resultados constantes en cuanto a la calidad y estado de la célula donante de núcleo.

Otro de los tópicos que se mencionó anteriormente que también es de gran interés en las investigaciones actuales y que se cree es una de las causas en la falla del desarrollo de los embriones clonados es la reprogramación incompleta o errónea del núcleo donante. Aunque muchos grupos de investigación han logrado clonar animales exitosamente, aún se tiene información limitada acerca de los mecanismos de

reprogramación nuclear en los embriones clonados (Vajta et al., 2006). Para que ocurra una embriogénesis normal en la transferencia nuclear es esencial que el patrón de expresión génica del núcleo donante se re programe a un estado comparable al de un cigoto pos fertilización (Reik et al., 2003); esto implica un proceso de “borrado-reescritura” (Gao et al., 2007), donde debe haber modificaciones epigenéticas y una organización de la cromatina que permita la inactivación de genes específicos para la diferenciación del tipo celular y reactive los genes involucrados con el desarrollo embrionario, los cuales deben ser activados en los tejidos, en la cantidad y en los tiempos correctos (Wells, 2010). Existen diversas estrategias que permiten preparar la célula donante de núcleo antes de la NT con el fin de lograr una reprogramación nuclear como someter dichas células a agentes modificadores de la cromatina por ejemplo la tricostatina (Saini et al., 2014); o el uso de células previamente reprogramadas conocidas como IPS (Ensenat-waser, Ph, Pellicer, & Simon, 2009).

Para que la reprogramación suceda de forma correcta es necesario que exista una coordinación entre la célula donante del núcleo y el citoplasma del oocito receptor (Wells et al., 2003); de hecho, la asincronía funcional y molecular entre el núcleo donador y los componentes ooplasmáticos conducen a una reprogramación inadecuada después de la clonación por TNCS. Esto ha sido demostrado por varios grupos, al estudiar embriones mamíferos clonados que presentaron una configuración epigenética anormal asociada a alteraciones fenotípicas y fisiológicas durante el desarrollo (Xue et al., 2002; Reik, et al., 2003; Beaujean et al., 2004). Esto confirma la hipótesis de que las fallas a nivel de expresión génica y desarrollo embrionario son causadas por una reprogramación inadecuada del genoma donador. Se considera que esto es causado por una transición errónea del perfil de expresión génica manteniéndose la “memoria” del estado epigenético previo (Ng and Gurdon, 2005). Una medida funcional de que la reprogramación se llevó a cabo de forma correcta es que los embriones reconstruidos sobreviven y generan una descendencia de animales sanos (Wells, 2010).

La fase del ciclo celular en la que se encuentre la célula donante de núcleo, al parecer es uno de los sucesos que tiene una gran relevancia en el proceso de reprogramación genómica. La mayoría de investigadores utilizan las células en la fase G₀ o en la G₁ (Gibbons et al., 2002), ya que estas fases del ciclo son consideradas más apropiadas para una adecuada reprogramación del genoma, sin duda debido a las diferencias en el contenido de ADN de los núcleos donantes, que varía en función de la fase del ciclo celular (Campbell et al., 1996; Kubota et al., 2000; Liu et al., 2004); además porque se transfiere a oocitos frescos con niveles altos del factor de promoción de la maduración (MPF), con el fin de condensar normalmente los cromosomas y mantener la ploidía correcta de los embriones posteriores al final del primer ciclo celular. El uso de células donantes en otras fases del ciclo generalmente altera o impide el desarrollo embrionario, por ejemplo en la fase S ocurre una condensación prematura de los cromosomas lo que ocasiona la “destrucción” del ADN (Collas et al., 1992), y las fases G₂/M causan problemas con el número cromosómico (aneuploidías) (Campbell et al., 1996). Uno de los aspectos donde se tiene un gran interés de estudio son los métodos para la sincronización del ciclo celular de la célula donante de núcleo. Hasta la fecha se han utilizado diversos protocolos como la restricción de suero (Wilmot et al., 1997; Goto et al., 2013) y la alta confluencia celular que ocasiona la inhibición del ciclo por contacto de las células (Zetterberg y Skold, 1970; Johnson et al., 1993; Boquest et al., 1999; Gerger et al., 2010). Sin embargo; estas dos metodologías presentan una gran variación en el tiempo de sincronización del ciclo celular y aún son un poco impredecibles, además que se requiere de un cierto grado de experiencia y conocimiento del linaje celular o el tipo de célula donante que se está usando (Choresca et al., 2009) y número de pasajes óptimos. Por otra parte, se ha implementado el uso de sustancias químicas como alternativa para la sincronización de ciclo celular que pueden bloquearlo de forma directa o indirecta como la roscovitina (Gibbons et al., 2002), el dimetilsulfóxido (DMSO) (Hashem et al., 2006), la

cicloheximida (Goissis et al., 2007), 2- metoxiestradiol (Urakawa et al., 2004), entre otros. Estos agentes sincronizadores son efectivos pero parecen tener una interferencia con otros procesos celulares ya que tiene potenciales efectos tóxicos, lo que puede inducir la muerte celular (Koo et al., 2009), además tienen consecuencias inesperadas para el desarrollo posterior (Gibbons et al., 2002).

Los procedimientos para la selección de células en G₀/G₁ presentan ventajas y limitaciones y a pesar de las condiciones un poco desfavorables, los métodos de restricción de suero y alta confluencia actualmente son muy utilizados (Campbell et al., 2007; Sun et al., 2008). La restricción de suero se utiliza con el fin de inducir el estado quiescente (G₀) en las células en cultivo disminuyendo la tasa de transcripción lo que facilita la reprogramación y por tanto el desarrollo; sin embargo la relación entre la restricción de suero, la reprogramación y el aumento en la eficiencia de clonaje todavía está bajo estudio (Wells, 2010). Algunos investigadores han planteado que su uso puede ir en detrimento del desarrollo embrionario temprano por causar daños a nivel nuclear de la célula donante (Collas et al., 1992; Peura, 2001); sin embargo en otras investigaciones se han reportado buenos resultados (Wilmot et al., 1997; Katska et al., 2002).

En cuanto al método de alta confluencia celular en cultivo, cambios en las condiciones de cultivo pueden atrasar o acelerar el crecimiento celular lo que resulta en una población celular subóptima para el clonaje, especialmente cuando los cultivos pueden estar sub-confluentes (Campbell et al., 1996; Cho et al., 2005; Choresca et al., 2009). Sun et al. (2008) demostraron que una elevada proporción de células en G₀/G₁ (91,4%) estaban presentes en cultivos celulares con alta confluencia en la fase estacionaria de la curva de crecimiento celular (>95% confluencia), y esta proporción cae significativamente (59,3%) cuando los cultivos estaban en la fase logarítmica de crecimiento (50-60% confluencia). Todavía, la relación entre el nivel de confluencia celular en una placa de cultivo próximo a la fase estacionaria de la curva de crecimiento

celular y el desarrollo embrionario después de la clonación debe ser mejor caracterizada.

Hasta la fecha son pocos los estudios que muestran la relación entre el estado del ciclo celular de la célula donante y el porcentaje y calidad de embriones producidos por CM a partir de dichas células. La citometría de flujo proporciona cuantificación automática de una serie de parámetros con altísima calidad, la medición de un solo parámetro como el contenido de ADN suministra información relativa a la distribución de las células en las fases G0/G1, S, y G2/M, lo que permite conocer en qué estado del ciclo celular se encuentra la mayoría de la población celular.

Una comprensión más completa del ciclo celular de las células donantes de núcleo podría conducir a mejoras en la eficiencia de los procedimientos de transferencia nuclear

Capítulo 1

Artículo 1. Comparación de las técnicas de clonación manual, partenogénesis y FIV en la producción y calidad de embriones bovinos

El objetivo de este primer artículo es mostrar de una forma clara y sencilla cómo se lleva a cabo la técnica de clonación manual y todo lo que implica está, desde el establecimiento del cultivo primario de fibroblastos hasta la evaluación de la calidad de los clones embrionarios. Se explica cómo se estandarizaron todos los procedimientos en el laboratorio de reproducción de la Facultad de Ciencias Agrarias, permitiendo sentar un precedente de estandarización y aplicación de este tipo de tecnologías en el país. Además, se realizó un estudio comparativo de la producción de clonación manual con la de embriones por fertilización *in vitro* y por partenogénesis donde se obtuvieron resultados muy interesantes y alentadores que permiten pensar en la creación de nuevas líneas de investigación. (Artículo en proceso de ser sometido)

HAND MADE CLONING BOVINE EMBRYOS, PARTHENOGENESIS AND *IN VITRO* *FERTILIZATION: A COMPARISON*

Gómez NA, Ramírez MM, Ruiz-Cortés ZT.

Biogenesis Research Group, School of Agricultural Sciences, University of Antioquia.

Carrera 77 N° 65-87, Bloque 46-202, AA 1226, Medellín – Colombia.

E-mail: biogenesis1995@gmail.com

Abstract

Handmade cloning (HMC) is a tool that allows for the multiplication of animals with outstanding genetics and phenotypes. This technique permits the creation of transgenic animals for agricultural and biomedical purposes. Moreover, the process of HMC and oocyte activation through parthenogenesis as a control leads to the possibility of studying biological processes such as cell reprogramming, epigenetics, embryo genome activation and pre- and post-natal development. **Objective:** The objective of this study was to standardize the process of bovine HMC in Colombia and to compare the resultant embryo production with parthenogenesis and *in vitro* fertilization (IVF). **Results:** An *in vitro* culture of fibroblast cells was established with optimal characteristics, allowing the genetic material to be used in the process of cloning. The parthenote group without zona pellucida (PNZ) exhibited a higher cleavage rate compared with the other groups ($p < 0.05$). The number of blastomeres was greater in the IVF group (109.81 ± 11.70) compared with the parthenote with zona pellucida (PZ; 73.73 ± 7.09), PNZ (78.16 ± 7.65) and clone (CL; 77.5 ± 8.23) groups ($p > 0.05$). Embryo production in the CL, PZ, PNZ and IVF groups was not significantly different (29.7, 37.6, 33.8 and 35.2% respectively). **Conclusions:** The HCM technique was successfully standardized in the laboratory. The resultant embryo production was similar between groups. The findings of this work give rise to different routes for studying embryology

and contribute to the optimization of this technique for commercial purposes in Colombia.

Keywords: Assisted Reproduction techniques, cellular biology, parthenote, cloning

1. INTRODUCTION

In Colombia, the *in vitro* production of embryos (IVPE) has recently become a prominent basis for the development of research activities and commercial processes. Additionally, IVPE is fundamental for the study and understanding of various biological phenomena and mechanisms, from oocyte maturation, sperm cell capacitation and fertilization, to the initial steps in embryonic development. As such, it is critical for developing new perspectives in various commercial applications and biotechnologies, including cloning.

Cloning by nuclear transfer (NT) is a tool that allows the production of multiple animals of high genetic and phenotypic stock, the rescue of animals on the verge of extinction (Lewis et al., 2004) and the production transgenic animals for agricultural or biomedical purposes (Paterson et al., 2003). This technology is also instrumental in the study of biological processes such as nuclear reprogramming and epigenetics, embryo activation and development, and pre-and postnatal development, growth and survival (Vieira et al., 2012). Currently, the most popular method used to create clones is somatic cell nuclear transfer (SCNT), which requires the use of micromanipulators, qualified personnel, and large investments in equipment and capacitation (Wilmut et al., 2002). New methods for NT have been developed with the aim of increasing the use of this methodology and decreasing the costs associated with it, leading to a technique known as handmade cloning (HMC). The advantage of this kind of manual cloning (MC) is that it can be performed without the use of micromanipulators for the enucleation and transfer of donor cells, making the process simpler and reducing associated costs (Vajta et al., 2001). In manual cloning using higher number of oocytes is required than in

conventional cloning technique, besides the fusion of multiple ooplasm introduces a new problem, mitochondrial heteroplasmy (Imsoonthornruksa et al., 2012; Justin, 2014)

Both MC and SCNT result in acceptable rates of embryonic production, similar to those obtained through *in vitro* fertilization (IVF) (Campbell, 2007). Nevertheless, the percentages of bovine pregnancy and live births achieved using these techniques are still very low (resulting in a percentage of viable offspring between 5 and 15%) (Rodriguez-Osorio et al., 2012), and multiple abnormalities in embryonic, fetal, and neonatal development make somatic cloning an inefficient technique (Vajta and Gjerris, 2006). As a result, the scientific community has stressed the need to understand the diverse factors that affect these processes, resulting in wide ranging efforts to simplify and standardize cloning techniques to obtain more significant data.

One of the factors that most significantly affects the success of cloning is the type, lineage, and condition of the nuclear donor cell (of the animal to be cloned) (Galli et al., 2003; Hoffert et al., 2005; Powell et al., 2004). Various cell types have been used as nuclear donors; however, fibroblasts are most often used in mammalian cloning due to the ease of their collection and propagation in cellular cultures (Oback and Wells, 2007). It is of the utmost importance that each laboratory that seeks to standardize and establish NT cloning protocols has a clear understanding of all of the characteristics of the primary culture or cell lineage established through the applied procedures, with the goal of minimizing variability and guaranteeing consistent results regarding the quality and condition of nuclear donor cells. Another important aspect that must be considered in manual cloning is that oocytes are highly manipulated and subjected to processes that can affect counter to their cellular viability. It is therefore critical to apply parallel techniques, such as the production of parthenogenetic embryos, ultimately resulting in control over the quality of the selected oocytes and their capacity to be chemically activated and to allow early embryonic development to occur. Parthenogenesis is a phenomenon of unquestionable biological interest, where the growth and development

of embryos occurs without spermatid fertilization. Parthenogenesis is not a natural method of reproduction in mammals; rather, it is artificially induced by chemically or electrically activating oocytes (Kharche and Birade, 2013). The use of a control group of parthenotes without a zona pellucida can help elucidate whether the degradation of the zona negatively influences clone development, while use of a group that does possess an intact zona pellucida can allow for control over chemical activation and provide information on whether this step interferes with cloning.

Due to the relative ease of execution and low cost of the MC, this technique has been proposed as a desirable alternative to research cloning in Colombia, and its future implementation at the commercial level has been suggested. However, only one informal report from Colombia discusses the production of water buffalo clones using MC (Ganadero, 2014), and no birthing data exist for bovine clones created for investigative or commercial purposes using either SCNT or MC. Thus, the objectives of this study were to establish the conditions (infrastructure, equipment, reagents, and other materials) and standardize the protocols necessary for performing manual cloning in Colombia and to compare production rates and embryonic quality between embryos produced through MC against those obtained via *in vitro* fertilization and through parthenogenesis.

2. MATERIALS AND METHODS

Generation of primary cultures of fibroblasts

Fifteen ears from heifers were recovered from a local slaughter house. The tissues were transported in PBS with a 20mg/ml of streptomycin and 12,52mg/ml of penicillin (SP). After washing and plucking each ear, the tissue was cut into slices (~3 mm thick), transferred to a 6-well plate (4-5 slices per well) containing 1 mL of DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) an (SP). The slices were incubated at 38.8°C under 5% CO₂ and 90% relative humidity. When plates reached >90% confluence, which occurred approximately 2

weeks after culturing, the explants were removed, and the cells were detached using 0.25% trypsin and 5 mM EDTA for 2-3 minutes. The cells were then transferred to a T25 culture flask and were frozen in medium composed of DMEM supplemented with 20% SBF and 10% DMSO in 0.25 mL straws at a concentration of 30,000 cells/straw for later reconstruction via MC. The straws were then stored in liquid nitrogen (-196°C) (see Figure 1).

Cellular viability. During the transfer and freezing-unfreezing process, cellular viability was determined using 0.4% trypan blue in a 1:1 solution. The number of living (unstained) and dead (stained) cells was evaluated (Hall et al., 2006; Freshney, 2000).

Standardizing manual cloning

***In vitro* maturation (IVM).** Oocytes were aspirated from the ovaries of cows sacrificed at a local animal processing plant. The ovaries were transported in sterile 0.9% saline solution at 30°C. Follicles between 2 and 7 mm in diameter were aspirated with an 18 gauge needle. The follicular liquid was placed in 15 mL conical tubes and was allowed to decant for 20 minutes. Cumulus-oocyte complexes (COCs) with homogenous ooplasm, a round morphology and a minimum of three layers of flattened granulosa cells were selected for in IVM (Leibfried and First, 1979). Maturity was carried out in 70 µL of TCM-199 maturation medium supplemented with 10% FBS, 24.9 mM pyruvate, 1 µg/mL LH and 20 µg/mL FSH. Twelve oocytes were placed in each drop and were incubated under 5% CO₂ at 38.8°C and 90% humidity for 20 hours.

After the 20th hour, cumulus expansion was evaluated visually, and two groups of cells were retrieved to initiate parthenogenesis and cloning. The remaining oocytes were inseminated as stated below.

***In vitro* fertilization (IVF).** Cryopreserved semen from a single bull (BON sire) was used for all replicates, it was thawed in water at 35°C for one minute, then placed in sperm-TALP medium and centrifuged to remove the excess diluent used in the freezing

process. The sample was resuspended in fertilization medium (fert-TALP) supplemented with 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ heparin, 45 $\mu\text{L}/\text{mL}$ PHE (penicillamine-hypotaurine-epinephrine), and 24.9mM pyruvate and then centrifuged a second time. After adjusting the final concentration to $1\text{-}2 \times 10^6$ spermatozoa/mL, a 10 μL aliquot was deposited in each 50 μL drop of fert-talp medium containing oocytes.

Parthenogenesis. A portion of the mature oocytes (20-50/per replicate) possessing polar bodies but lacking cumulus cells were selected. The oocytes were divided into two groups. The first was deposited in drops of base medium (TCM199 Sigma M-2520 plus 2.62mM mg/MI NaHCO_3 plus 24.9mM pyruvate plus 10% FBS plus 1X Penicillin/streptomycin) (BM) for six hours. The second group was placed in drops of BM plus 0.5% pronase-E (protease) in serum-less BM plus 0.01% PVA (Polyvinyl alcohol); to degrade the ZP, the oocytes were removed from this medium when 20 to 30% showed thinning or deformation at the zona. Both groups were chemically activated in drops of BM containing 5 mM ionomycin for 5 min, then incubated in CR2 medium (Feugang et al., 2009) with 2% FBS, 0.3% BSA and 2 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) under oil for 4 hours and transferred to culture *in vitro*. The parthenotes lacking a zona pellucida were cultivated under the “well of the well” (WOW) system and were prepared with a 4-well plaque containing 400 μL of CR2 medium and 200 μL of mineral oil in each well; small punctures were made at the bottom of each well to create the microwells. The parthenotes with a zona pellucida were cultivated in a well containing only CR2 medium.

Obtaining cytoplasts. The COCs were stripped using a soft pipette. Oocytes in which the first polar body (PB) had already divided out were selected and washed in drops of BM. The oocytes were then incubated for one hour in drops of BM plus 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ demecolcine to induce nuclear protrusion and perform enucleation. The ZP was removed by exposing the oocytes to 0.5% pronase in serum-less BM and 0.01% PVA. A total of 1 to 2 oocytes lacking the ZP were placed in microdrops of 5 μL of BM plus 5

mg/mL cytochalasin B (CCB) covered in mineral oil (60-80 drops/plaque). The oocytes were divided based on the visualization of protrusion, attempting to remove as little cytoplasm as possible. Division was performed with an Ultra Splitting Sharp blade (Bioniche, Montréal, QC, Canada) (see Figure 2).

Embryonic reconstruction. A 100 mm Petri dish was prepared with 4-5 drops of BM and 3 drops of serum-less BM and 500 µg/mL PHA (phytohemagglutinin). One drop of BM received approximately 10 cytoplasts, while another received the fibroblast suspension previously subjected to treatment with 0.25% trypsin and washed with BM. A total of 4-6 cytoplasts were transferred to a drop of PHA, 2-3 of which were later transferred to the cellular suspension, where a sealed capillary tube was used to carefully guide each cell toward a single round cell (fibroblast) until they merged. The cells were subsequently returned to the drop of PHA, where each duet (cytoplast-cell) was deposited close to a single cytoplast until a triplet was formed (cytoplast-cell-cytoplast) (see Figure 2).

Electrofusion and activation. Each triplet (cytoplast-cell-cytoplast) was horizontally oriented in a BLS fusion chamber (GSS-250, 250 µm distance between electrodes) covered in ME (fusion medium). Two 1kV/cm square-wave pulses were administered at 20 µs/pulse to fuse the membranes using a BLS CF.150B electrofusor. The presumed zygotes were removed from the chamber, then washed in drops of BM and individually incubated in ~5 µL drops of BM under mineral oil for 30 to 45 minutes; the fusion rates were evaluated visually by verifying the formation of a single structure. Within 26-30 hours of the initiation of IVM, the presumed zygotes were activated chemically in the same way as in the parthenogenesis procedure (see Figure 2).

In vitro culture (IVC). After activation, the presumed zygotes were washed a number of times in CR2 culture medium containing 0.374mM pyruvate, 5% FBS and 50 mg/mL BSA and cultured using the WOW system. An embryo was deposited in each well and cultured at 38.8°C under 5% CO₂ and 90% relative humidity for 7 days (see Figure 2).

Evaluating development rates. After 72 hours of culture, the rate of cellular division (cleavage) was visually evaluated, taking into account zygotes showing as little as one division (2 cells). On day 7, the embryo production rates of all four groups (clones, parthenotes with and without a zona pellucida and IVF embryos) were evaluated, taking into account the states of development from the morula to the expanded blastocyst. The states of development and the quality of embryo morphology were evaluated according to the guidelines of the IETS (Stringfellow and Seidel, 1998) (see Figure 3).

Staining to determine number of blastomeres. Embryos from all groups were fixed in 70% alcohol and subjected to staining with 10 µg/mL Hoechst stain for 5 min to determine the total number of blastomeres. Counting was performed under a Zeiss fluorescent microscope. To minimize error, two researchers performed the procedure twice each, and their values were averaged to provide a blastomere count for each embryo (see Figure 4).

Unless otherwise specified, all of the reagents listed above were from SIGMA Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Statistics

The Saphiro-Wilk and Levene tests were used to check for normality and homogeneity of variance, respectively. Post hoc ANOVA was performed to determine differences in the average percentages of cleavage, number of embryos, and number of cells among the clones, parthenotes, and IVF embryos. The data were analyzed with IBM SPSS Statistics version 22.0.

Primary fibroblast culture

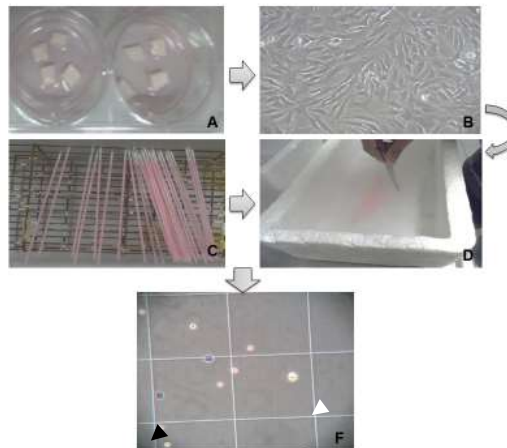


Figure 1. A. Explant culture of bovine ear cartilage, sliced at a thickness of ~3 mm. B. 40X magnification of a bovine fibroblast culture. C-D. Freezing the fibroblasts using 0.25 mL straws. F. Visual evaluation using trypan blue (the white arrow indicates a living cell and the black arrow a dead cell).

Standardizing the manual cloning process

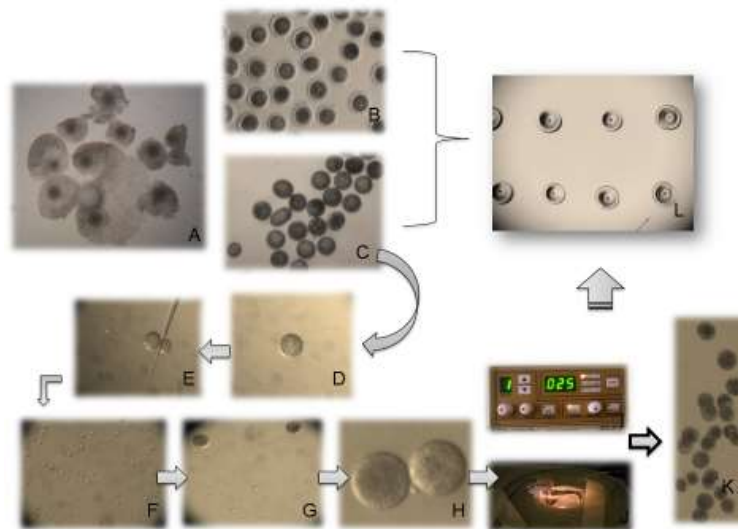


Figure 2. A. Oocytes 20 h after the initiation of IVM. B. Stripped oocytes. C. Oocytes with no zona pellucida. D-E. Enucleation. F. Nuclear donor fibroblasts. G-H. Reconstruction. H: Triplet

(cytoplasm-cell-cytoplasm). I-J. Electrofusion. K. Triplet Fusion. The bracket indicates the transition to culture.

Cleavage and production of parthenogenetic and cloned embryos

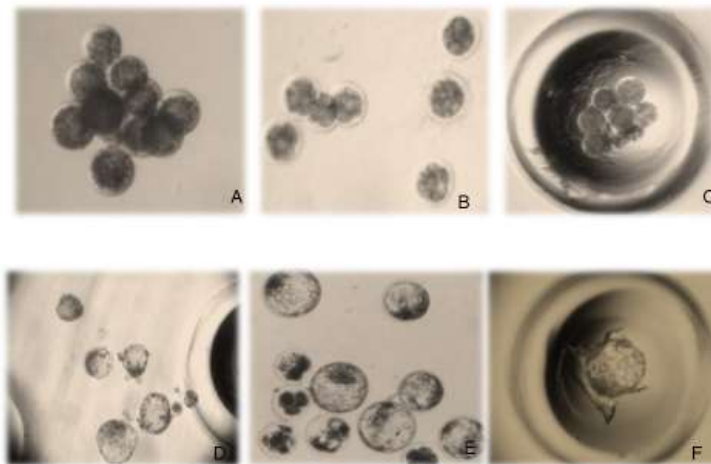


Figure 3. A. Clone cleavage. B. Cleavage of parthenotes with a ZP. C. Cleavage of parthenotes lacking a ZP. D. Cloned embryos outside of microwells. E. Parthenogenetic embryos with a ZP. F. Parthenogenetic embryos lacking a ZP.

Evaluation of cell numbers via fluorescent Hoechst staining

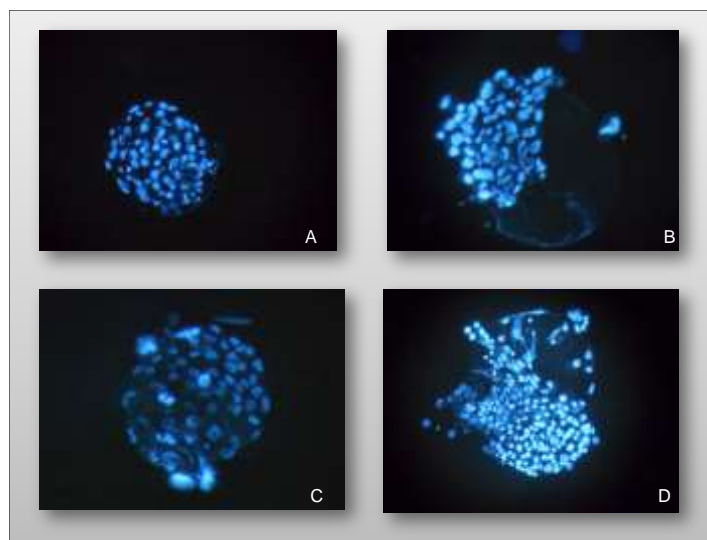


Figure 4. A. Cloned embryo. B. Parthenogenetic embryo with a ZP. C. Parthenogenetic embryo lacking a ZP. D. Embryo produced through IVF. All panels are at 10X magnification.

3. RESULTS

Primary cell culture

After creating 15 sets of heifer ear cartilage explants over six months, a culture of viable fibroblasts to be used as nuclear donors for the MC procedure was produced. The cells were able to be stored by freezing with DMSO in liquid nitrogen until they were needed for the cloning procedure.

In vitro embryo production

Table 1 provides a summary of the *in vitro* embryo development observed over 7 days. Cleavage in the group of parthenotes with no zona pellucida was significantly different from that in the other groups (cloned embryos, parthenotes with a zona pellucida, and IVF embryos). There was no significant difference in the percentages of embryos produced among the groups.

Groups	N. Oocytes / Oocytes reconstructed	Cleavage (%)	Production of embryos(%)
CLONES	165	76.73 ± 4.58 ^b	29,72 ± 3.14
PARTHENOTES WITH ZONE	201	75.23 ± 3.32 ^b	37.64 ± 2.76
PARTHENOTES WITHOUT ZONE	187	89.37 ± 2,64 ^a	33.88 ± 3.04
IVF	898	75.32 ± 2.41 ^b	35,22 ± 2.79

(a,b) Different letters between the rows indicate statistically significant difference $p < 0.05$

Table 1. Development of bovine embryos produced through manual cloning, parthenogenesis, and *in vitro* fertilization

Embryo quality

A total of 56 embryos were processed and analyzed to determine the total number of blastomeres. The average number of cells per embryo in each group is shown in Table 2. The number of blastomeres in the IVF group was statistically significantly different with respect to the other groups (see Table 2).

Table 2. Embryo quality. Number of cells per embryo produced through manual cloning, parthenogenesis, and *in vitro* fertilization

Groups	N° promedio de blastomeras
CLONES	77.5±8.23 ^a
PARTHENOTES WITH ZONE	73.73±7,09 ^a
PARTHENOTES WITHOUT ZONE	78.16±7.65 ^a
IVF	109.81±11.70 ^b

(a,b) Different letters between the rows indicate statistically significant difference $p < 0.05$

4. DISCUSSION

Individual laboratory conditions and *in vitro* production systems can influence parameters such as morphology, physiology, and development in both clones and IVF embryos (Farin et al., 2004). According to the results of the present study, we achieved

standardization in the production of clones through manual cloning, or “handmade cloning”, under specific local conditions, from the creation and storage of primary fibroblast cultures to obtaining viable transferable blastocysts.

The first phase of this standardization process consisted in obtaining cultures of somatic cell nucleus donors. Fibroblasts were chosen for this purpose due to the ease of obtaining them and their high *in vitro* proliferation. To date, viable offspring have been produced from differentiated tissues. (Obach and Wells, 2002, Daniel et al., 2008). (Campbell et al., 2007). These various types of tissue appear to present differences in offspring generation. Fibroblasts are the most commonly used cells in mammalian cloning, as they are unspecialized mesenchymal cells capable of extensive proliferation, tissue repair, and differentiation into a variety of other connective tissues, such as bone, cartilage, and muscle (Obach and Wells, 2007). The use of these cells has also become widespread due to the ease of their collection and propagation in culture.

Parthenogenetically activated embryos serve as a good control for the *in vitro* system of production, emphasizing the use of suitable media to satisfy their nutritional needs during the different stages of the development of presumed zygotes and future embryos. In this study, the parthenogenetic embryos whose zona pellucida was removed before activation showed a significant increase in their percentage of cleavage relative to embryos that retained the zona, cloned embryos, and *in vitro* fertilized embryos ($p < 0.05$), though this did not have an effect on subsequent blastocytic development. These results are not consistent with other studies, in which there were no significant differences in the kinetics of development observed during the first rounds of cleavage (Myauchi, 2012; Paffoni et al., 2008). However, it has been suggested that the first divisions after activation of the oocyte depend specifically on the content inherited by the oocyte, with little participation from the spermatozoon. In another study (Gómez et al., 2009), contrary to what was reported here, a significant difference was found in the rate of initial development in embryos produced using IVF, suggesting that many biological

aspects of parthenogenetic embryos are still unknown, constituting a potential subject for future research.

One of the more interesting results of the present study was the observed percentage of bovine clone embryo production, as a higher percentage of blastocytes was obtained compared with other studies (29% vs. 19%) (Forell, 2008), and this percentage was not statistically significantly different from that in the group of embryos generated through *in vitro* fertilization, which was between 30 and 35%, typical of commercial levels (Almeida, 2008).

Determining the number of cells that make up the embryo (blastomere) is usually considered indicative of the quality and viability of the embryo. Human studies suggest that the cellular mass that forms the blastocyst is indicative of its implantation potential (Dumoulin et al., 1999). In the present study, the number of blastomeres in the blastocytes formed following IVF was significantly greater than in the embryos activated parthenogenetically and in the cloned embryos (109.8 vs. 73.7, 78,1 and 77,5). The observed values are equivalent to or greater than those obtained in other studies in both *in vitro* fertilized embryos and cloned bovine embryos (Moraes et al., 2002; Totey et al., 1996). This indicates that the applied system of production is efficient in both the production of blastocytes and the obtained embryo quality, defined based on the number of blastomeres (Im et al., 2006). The smaller number of blastomeres found in parthenogenetic embryos and clones could be due to their requiring a greater number of or additional nutrients in the developmental media. Another possibility is that the greater amount of manipulation the oocytes undergo during the procedure, as they are exposed to high stress conditions (protein degradation, cytoplasm removal, exposure to different chemical components and electrical shock), could be detrimental to their development and might be reflected in the lower number of blastomeres in these embryos.

Although the primary objective of this study was to use parthenogenetic embryos as the control for measuring the quality of cloning, the results produced in the group of

embryos generated using parthenotes lacking the zona pellucida paves the way for future research on embryo quality, such as that reported by Hirayama et al. (2014). This study demonstrated that the transfer of embryos fertilized *in vitro*, along with parthenogenetic embryos, could aid in maternal recognition, with increased INT-tau production being observed until day 40 of gestation, in addition to generating investigations into MC transgenesis, such as that conducted in goats by Pereira et al. (2013).

The *in vitro* production of bovine embryos in Colombia has become a pioneering biotechnology for genetic improvement. However, due to pressure from various public and private institutions, there are few published reports with statistical validation, and research on this subject in Colombia is scarce compared with other countries (Restrepo, 2008). As of this writing, there is only one available report on the cloning of buffalo using SCNT for commercial ends, which was performed in a different Colombian department (Santander). The authors reported a 23% pregnancy rate (3/13 clones transferred) for over sixty days with a perfect developmental state in April 2014 (Ganadero, 2014).

5. CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS

Manual cloning is an efficient and relatively simple alternative to traditional embryogenetic techniques that require the use of micromanipulators. This particular biotechnology provides promising prospects for molecular research on genetic reprogramming and for studying genetic expression, epigenetics, and optimization techniques for commercial and research goals (Gómez et. al, 2014 in preparation; Taylor-Robinson et al., 2014).

This study contributes to the development of innovation, differentiation, and improvement processes at the level of assisted bovine reproductive biotechnologies in

Colombia, providing scientific support for increasing knowledge nationwide under local conditions. Additionally, these results demonstrate an efficient system, establishing the minimal conditions for performing MC and opening the door to future research into cloning.

In this regard, efforts to conduct new research into assisted reproductive biotechnologies in this country should be directed toward optimizing existing procedures, for example, establishing somatic cell cultures from donor animals from whom biopsies are obtained in the field, perfecting oocyte maturation and enucleation processes for cloning and parthenogenesis, and improving fusion, activation, and culture temperature parameters for the embryos. Future research directions could include studying why the presence of the zona pellucida or lack thereof influences embryo development *in vitro*, or why there are differences in gene expression that could influence the development of *in vitro* fertilized, parthenogenetically created (with or without zona pellucida), and cloned embryos.

Acknowledgements

We thank Colciencias, the Young Investigators and Innovators program, and Ganadería Rio Grande S.A.S for their participation in awarding the Young Investigator fellowship.

We also acknowledge the 2013-2014 Sustainability Strategy of the University of Antioquia, awarded to the Biogenesis Group.

BLIOGRAPHY

Almeida, A. B. (2008). *Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez Embriões partenogénéticos podem ajudar o reconhecimento materno da gestação*. Universidade de São Paulo.

- Campbell, K. H. S. (2007). Ten years of cloning: questions answered and personal reflections. *Cloning and Stem Cells*, 9(1), 8–11.
- Campbell, K. H. S., Fisher, P., Chen, W. C., Choi, I., Kelly, R. D., Lee, J. H., & Xhu, J. (2007). Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*, 68(214-231).
- Daniel, S. M., Raipuria, P., & Sarkhel, B. C. (2008). Efficiency of cloned embryo production using different types of cell donor and electric fusion strengths in goats. *Small Ruminant Research*, 77(1), 45–50.
- Dumoulin, J. C., Meijers, C. J., Bras, M., Coonen, E., Geraedts, J. P., & Evers, J. L. (1999). Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 14(2), 465–9.
- Farin, C. E., Farin, P. W., & Piedrahita, J. A. (2004). Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. *Animal Reproduction Science Sci.*, 84, 53–62.
- Feugang, J., Camargo-Rodríguez, O., Memili, E., (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121, 141–149
- Forell, F. (2008). *Otimização dos sistema de produção de clones por transferência nuclear com a utilização de oócitos vitrificados e diferentes tipos celulares como doadores de núcleo*. UFRGS.
- Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique* (pp. 309–321).
- Galli, C., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2003). Introduction to cloning by nuclear transplantation. *Cloning and Stem Cells*, 5(4), 223–32.
- Ganadero, C. (2014). Colúfalos de Colombia obtiene avance mundial en genética animal.
- Gómez, E., Caamaño, J. N., Bermejo-Alvarez, P., Díez, C., Muñoz, M., Martín, D., ... Gutiérrez-Adán, A. (2009). Gene expression in early expanded parthenogenetic and in vitro fertilized bovine blastocysts. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(6), 607–14.

- Gómez, N. A., Ramirez, M. M., & Ruiz-Cortés, Z. T. (2014). Comparación de las técnicas de clonación manual partenogénesis y FIV en la producción y calidad de embriones bovinos. *En Preparación*.
- Hall, V. J., Ruddock, N. T., Cooney, M. a, Korfiatis, N. a, Tecirlioglu, R. T., Downie, S., ... French, A. J. (2006). Production of a cloned calf using zona-free serial nuclear transfer. *Theriogenology*, 65(2), 424–40.
- Hirayama, H., Moriyasu, S., Kageyama, S., Sawai, K., Takahashi, H., Geshi, M., ... Minamihashi, A. (2014). Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 81(8), 1108–15.
- Hoffert, K. a, Batchelder, C. a, Bertolini, M., Moyer, A. L., Famula, T. R., Anderson, D. L., & Anderson, G. B. (2005). Measures of maternal-fetal interaction in day-30 bovine pregnancies derived from nuclear transfer. *Cloning and Stem Cells*, 7(4), 289–305.
- Im, G. S., Seo, J. S., Hwang, I. S., Kim, D. H., Kim, S. W., Yang, B. C., Prather, R. S. (2006). Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. *Molecular Reproduction and Development*., 73(9), 1094–101.
- Imsoonthornrukxa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., Parnpai, R., Ketudat-Cairns, M. (2012). Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. *Mitochondrion*, 12, 506–513.
- Justin, C. (2014) Mitochondrial DNA: Its transmission from gametes and embryos. *Principles of Cloning*, 429-439.
- Kharche, S. D., & Birade, H. S. (2013). Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production : A review, 2013(February), 170–182.
- Leibfried, L., & First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Reprod. Fert. Vol.*, 49, 76–86.
- Lewis, I., French, A., Tecirlioglu, R., Vajta, G., McClintock, A., Nicholas, K., ... Trounson, A. (2004). Commercial aspects of cloning and genetic modification in cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44, 1105–1111.

- Moraes, G., Silva, S., Dos Santos, D., Pasin, M., Pereira, L., Mezzarila, A., ... Silva, C. (2002). Producao in vitro de embriões bovinos com soro de egua em diferentes fases do estro. *Acta Scientiae Veterinariae*, 30(1), 1–8.
- Myauchi, T. A. (2012). *Aspectos biológicos do desenvolvimento pré-implantacional de embriões*. Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas.
- Oback, B., & Wells, D. (2002). Many Are Called , but Few Are Chosen Choice of Nuclear Donor, 4(2).
- Oback, B., & Wells, D. N. (2007). Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? *Molecular Reproduction and Development*, 74(5), 646–54.
- Paffoni, a, Brevini, T. a L., Gandolfi, F., & Ragni, G. (2008). Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta*, 29 Suppl B, 121–5.
- Paterson, L., DeSousa, P., Ritchie, W., King, T., & Wilmut, I. (2003). Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Animal Reproduction Science*, 79(3-4), 137–143.
- Pereira, a. F., Feltrin, C., Almeida, K. C., Carneiro, I. S., Avelar, S. R. G., Neto, a. S. A., ... Bertolini, M. (2013a). Analysis of factors contributing to the efficiency of the in vitro production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). *Small Ruminant Research*, 109(2-3), 163–172.
- Powell, a M., Talbot, N. C., Wells, K. D., Kerr, D. E., Pursel, V. G., & Wall, R. J. (2004). Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 71(1), 210–6.
- Restrepo, G. R. (2008). *Bioteecnologias reproductivas aplicables a la produccion bovina en Colombia*. (Editor Pol, pp. 55–72). Medellin.
- Rodriguez-Osorio, N., Urrego, R., Cibelli, J. B., Eilertsen, K., & Memili, E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology*, 78(9), 1869–86.
- Stringfellow, D. A., & Seidel, S. M. (1998). Manual of International Embryo Transfer Society (IETS). 3rd Ed. (IETS, Maryland Heights, MO), 173.
- Taylor-Robinson, A. W., Walton, S., Swain, D. L., Walsh, K. B., & Vajta, G. (2014). The potential for modification in cloning and vitrification technology to enhance genetic progress in beef cattle in Northern Australia. *Animal Reproduction Science*.

- Totey, S. M., Daliri, M., Appa, K. B., Pawshe, C. H., Taneja, M., & Chillar, R. S. (1996). Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. *Theriogenology*, *45*, 521–33.
- Vajta, G., & Gjerris, M. (2006). Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Animal Reproduction Science*, *92*(3-4), 211–30.
- Vajta, G., Lewis, I. A. N. M., Hyttel, P., Thouas, G. A., & Trounson, A. O. (2001). Short Communication, *3*(2), 89–95.
- Vieira, F. K., Forell, F., Pereira, R., Aguiar, L. H. De, Feltrin, C., Neto, S. G., ... Bertolini, M. (2012). In Vitro Development and Cell Allocation After Aggregation of Syngeneic Wild Type and Fluorescence-Expressing Bovine Cloned Embryos, *40*(May), 1–8.
- Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P., Dinnyes, A., King, T., Paterson, L., ... Young, L. (2002). Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, (6907), 583–6.

Capítulo 2

Artículo 2: Evaluación de la sincronización del ciclo celular de cultivos primarios de fibroblastos para la obtención de clones embrionarios bovinos por la técnica de clonación manual (CM)

El objetivo de este segundo artículo fue mostrar los resultados de la evaluación de tres tratamientos de sincronización del ciclo celular del cultivo primario de fibroblastos (restricción de suero, alta confluencia y la combinación de ambos en tres tiempos: 24, 48 y 72h) y su efecto sobre la producción de clones embrionarios. Igualmente, comparar la producción de embriones con aquella obtenida por fertilización *in vitro* y por partenogénesis. (Artículo en proceso de ser sometido)

EVALUACIÓN DE LA SINCRONIZACIÓN DEL CICLO CELULAR DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS PARA LA OBTENCIÓN DE CLONES EMBRIONARIOS BOVINOS POR LA TÉCNICA DE CLONACIÓN MANUAL (CM)

Gómez NA, Ramírez MM, Ruiz-Cortés ZT

Grupo de Investigación Biogénesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia. Carrera 77 N° 65-87, Bloque 46-202, AA 1226, Medellín – Colombia.

E-mail: biogénesis1995@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

La técnica de transferencia nuclear de célula somática (TNCS) es considerada, hasta el momento, el instrumento más efectivo no solo para estudiar los fenómenos de reprogramación celular sino también como herramienta para la creación de animales clonados y transgénicos de varias especies de interés productivo logrando avances en las áreas biomédicas y agropecuarias (Vajta et al 2007, Whitworth and Prather 2010, Zhao et al. 2010b). Sin embargo, la eficiencia de estas biotecnologías en cuanto a producción de embriones y nacimientos de animales completamente sanos aún es baja e inestable. Estas limitaciones han sido atribuidas a variedad de factores donde uno de los más importantes es la reprogramación de la célula donante (Mohana K, et al 2013). Hasta el momento poco se entiende de los eventos celulares y moleculares que podrían estar involucrados en la reprogramación genómica de una célula somática adulta, que le permita dirigir el desarrollo embrionario y fetal; lo que se tiene claro es que es esencial que exista una coordinación de la etapa del ciclo celular de la célula donante y el citoplasma del oocito receptor para lograr un desarrollo exitoso pos reconstrucción (Wells et al., 2003).

En la transferencia nuclear las etapas ideales del ciclo celular en las que debe estar la célula donante son G0/G1, cuando se utilizan oocitos receptores no activados en

metafase II (MII). Para ello se utilizan diversos métodos de sincronización entre los que se destacan la restricción de suero (Wilmot et al, 1997; Goto et al., 2013), y la alta confluencia en el cultivo celular (Zetterberg y Skold, 1970; Johnson et al., 1993; Boquest et al., 1999; Mezzalira et al., 2011)), pero hasta el momento en el medio científico no se ha llegado a un consenso general de cuál de ellos presenta los resultados más favorables. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la sincronización del ciclo celular de fibroblastos bovinos donantes de núcleo y la capacidad de desarrollo *in vitro* de embriones clonados manualmente reconstruidos con estas células y comparar esta producción con la de embriones bovinos obtenidos por fertilización *in vitro* y partenogénesis.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del cultivo primario de fibroblastos

En la planta de beneficio local se recolectó una sola oreja completa de una novilla, se transportó en PBS con 20 mg/ml de estreptomina y 12,53mg/ml de penicilina (EP). Después de lavar y depilar la oreja, se diseccionó en partes de ~3 mm de grosor, las cuales fueron transferidas a un plato de 6 pozos (4-5 explantes por pozo) con 1 mL de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF, Gibco) y (EP). Se incubaron a 38.8°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa hasta alcanzar >90% de confluencia lo que ocurrió aproximadamente a las 2 semanas de cultivo (ver fotografía 1, A). Se retiraron los explantes y se desprendieron las células con 0,25% tripsina y 5mM EDTA de 2 a 3 min. Se realizó un pasaje en un frasco de cultivo T25, cuando se obtuvo aproximadamente 100% de confluencia se congelaron las células con medio DMEM suplementado con 20% SBF y 10% DMSO en pajillas de 0,25 mL con 200.000 cels/pajilla para los tratamientos de sincronización celular y 30.000 cels/pajilla para el proceso de reconstrucción en CM. Las pajillas fueron almacenadas en nitrógeno líquido (-196°C).

Viabilidad celular. Durante el pasaje y el proceso de congelación y descongelación se determinó la viabilidad celular por medio de la tinción con azul de tripano 0,4% relación 1:1, donde se evaluaba la cantidad de células vivas (células no teñidas) y las células muertas (células teñidas)(Hall et al., 2006)(Freshney, 2000) (ver figura 1, B).

Cultivo de fibroblastos y evaluación de viabilidad celular por medio de la tinción azul de tripano

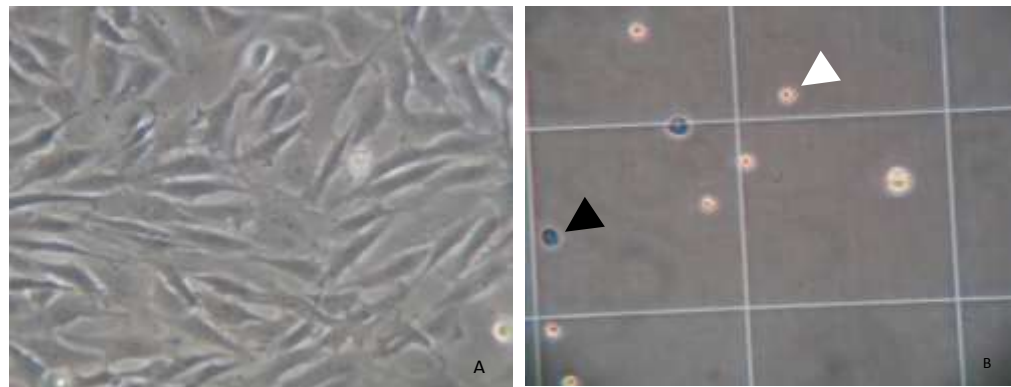


Figura 1. A. Cultivo primario de fibroblastos con 100% de confluencia. B. Evaluación de la viabilidad celular con azul de tripano (flecha blanca indica célula viva, flecha negra célula muerta).

Amplificación del gen de la vimentina

Con el fin de corroborar que el tipo de células que se aislaron y cultivaron eran fibroblastos se realizó extracción y análisis del ADN para determinar si expresaban el gen de la vimentina proteína de filamentos intermedios característica de este tipo de células. Para el aislamiento del ADN las células fueron lavadas 2 veces con PBS para eliminar restos de medio de cultivo que pudieran interferir con la PCR, el pellet fue resuspendido en 200 μ l de PBS y la extracción del ADN total se realizó empleando el kit DNeasy Blood and Tissue kit (QUIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación del gen vimentina en *Bos tauros* se diseñaron primers a partir de la secuencia del cDNA del gen vimentina *bubalus bubalis* (número de acceso XM 006052364.1). La reacción de PCR fue realizada empleando 2.5 mM de MgCl₂, 1X de buffer 10X con Tris-HCl, tritón X-100 y KCl (pH 8.8) (Fermentas, CA, USA), 0.15 mM de cada primer, 0.5 mM de cada dNTP , 1.5 U de Taq ADN polimerasa (5 UI/ul, Fermentas Taq ADN polimerasa recombinante, CA, USA), 5 µl de ADN y se ajustó con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µl.

La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador PTC 200 (Perkin-Elmer Inc., San Jose, CA, USA); las condiciones térmicas consistieron de una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 7 minutos seguido de 30 ciclos de desnaturación a 95°C por 30 segundos, una temperatura de annealing de 54°C annealing 1 min y extensión a 72°C por un minuto. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% conteniendo 0.5 ug/ml de bromuro de etidio y fueron detectados bajo luz UV empleando un fotodocumentador (Modelo M-10E, UVP, Upland, CA, USA) (ver figura 2).

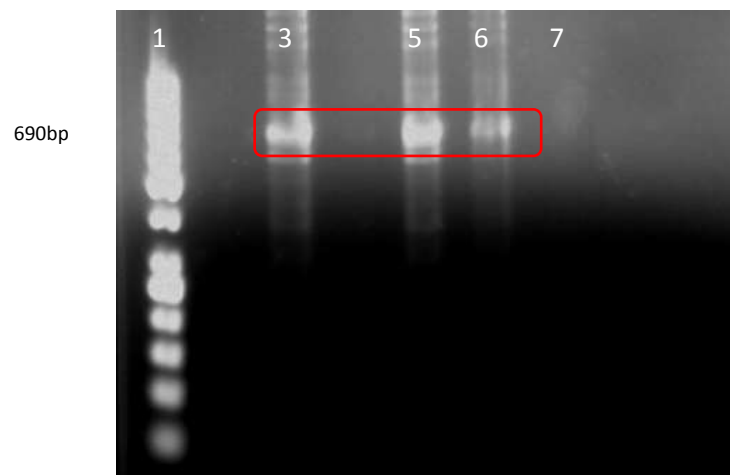


Figura 2. Amplificación del gen de vimentina. 1. Marcador de peso molecular 50pb (MWM). 3, 5 y 6 gen del vimentina. 7. Control negativo

Tratamientos de sincronización celular y evaluación por citometría de flujo

Una vez establecido el cultivo pos-descongelación se realizó un pasaje en un frasco T25 y al alcanzar un ~ 90-100% de confluencia se procedió a tripsinizar, evaluar viabilidad celular y sembrar 10 pozos con 1,5ml de medio a una concentración de 40.000cel/ml en platos de 6 pozos. El mismo día del establecimiento de este cultivo se tripsinizó un primer pozo para evaluación del ciclo celular en un tiempo de 0 horas.

Restricción de suero (RS): Cuando en tres de los pozos se alcanzó ~ 50-60% de confluencia se sustituyó el medio (DMEM con 20% SBF) por uno suplementado con 0,5% de SBF, a las 24h se tripsinizó uno de los pozos y las células se fijaron y tiñeron para ser evaluadas por citometría de flujo, se repitió el mismo procedimiento a las 48 y 72 horas.

Alta confluencia en el cultivo (AC): Cuando en tres de los pozos se alcanzó >95% de confluencia se tripsinizó uno de los pozos y las células se fijaron y tiñeron para ser evaluadas por citometría de flujo, se repitió el mismo procedimiento a las 48 y 72 horas.

Restricción de suero + alta confluencia en el cultivo (RS+AC): En un solo cultivo se llevaron a cabo de forma simultanea los procedimientos de restricción de suero + alta confluencia (80-90%) y se realizó la preparación de las células en los mismos tiempos.

Citometría de flujo: Después de tripsinizar las células se fijaron con etanol al 90%; luego se resuspendieron con una solución 0,01% yoduro de propidio (Sigma) y 2 mg/ml de RNasa A y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad (Taylor y Milthorpe, 1980). Se llevaron al citómetro de flujo y se analizaron las salidas de este por medio del software Flow Jo. Se hizo la discriminación de los dobletes haciendo el análisis de FSC-H vs FSC-A sobre el diodo. Los eventos con el doble de señal en FSC-A la misma en FSC-H, fueron considerados como agregados. Se realizaron cinco repeticiones del experimento total.

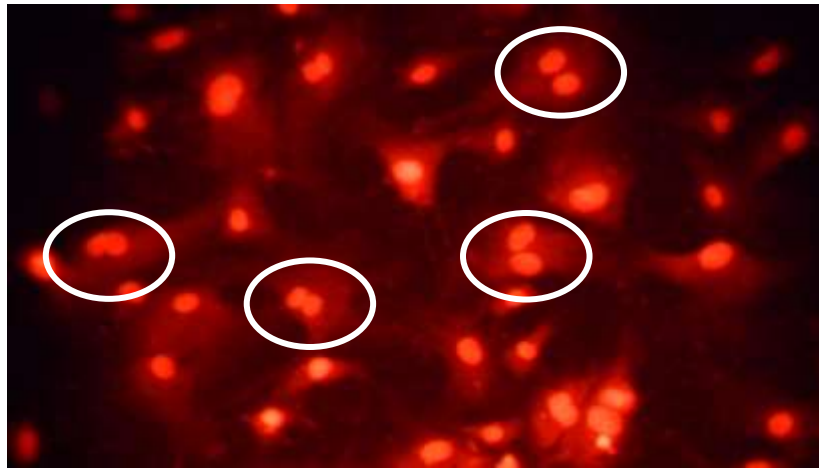


Figura 3. Fibroblastos endoreplicantes teñidos con Ioduro de propidio, los círculos blancos señalan los las células con doble núcleo.

Producción de embriones *in vitro*

Se realizaron en total 12 rutinas de producción de embriones por clonación manual, fertilización *in vitro* y partenogénesis.

Maduración *in vitro* (MIV). Los oocitos se obtuvieron a partir de ovarios de hembras bovinas sacrificadas en la planta de beneficio local. Los ovarios fueron transportados en solución salina estéril al 0.9% a 30°C. Se aspiraron los folículos entre 2 y 7 mm de diámetro con una aguja calibre 18G; el líquido folicular se depositó en un tubo cónico de 15 mL y se dejó decantar por 20 min. Los complejos *cumulus*-oocito (CCO's) ooplasma homogéneo, morfología redonda y mínimo tres capas de células de granulosa compactas fueron seleccionados para el proceso de MIV (Leibfried y First, 1979). La maduración se realizó en gotas de 70 μ L de medio de maduración TCM-199 suplementado con 10% SFB, 0,24mM piruvato, 1 μ g/mL LH y 20 μ g/mL FSH; se colocaron aproximadamente 12 oocitos por gota y se incubaron a 5% de CO₂, 38.8°C y 90% humedad por 20 horas.

Después de 20h de MIV se evaluó visualmente la expansión del cúmulus y se tomaron dos grupos para iniciar el proceso de partenogénesis y clonación. Los oocitos restantes fueron fertilizados como se explica a continuación.

Fertilización *in vitro* (FIV). El semen criopreservado de un solo toro de raza BON fue utilizado para todas las réplicas. Una pajuela por proceso se descongeló en agua a 35°C por un minuto, se depositó en medio sperm-talp y se centrifugó con el fin de retirar excesos del diluyente empleado para su congelación. La muestra fue resuspendida en medio de fertilización (fert-talp) suplementado con heparina 12 µL/mL, PHE (pencilamina, hipotaruina, epinefrina) 45 µL/mL, piruvato 24,4mM y centrifugada por segunda vez; después de ajustar la concentración final a $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/mL se depositaron 10 µL en cada microgota de 50 µL de medio fert-talp que contenían a los oocitos.

Partenogénesis. Se tomaron parte de los oocitos madurados (20-50/por replica), sin células del cúmulus y con cuerpo polar. Se dividieron en dos grupos iguales; el primero de ellos se dispuso en gotas de medio base (MB: TCM199 Sigma M-2520 con 2,62mM mg/MI NaHCO_3 , 0,24mM piruvato, 10% SBF y 1X penicilina/streptomocina) hasta cumplir las 26 h de maduración, mientras el segundo se le sometió a gotas de MB con 0,5% de pronasa-E (proteasa) en MB sin suero y 0,01% PVA (Polivinilalcohol); con el fin de degradar la ZP; se retiraron los oocitos de este medio cuando 20 al 30% presentaron zonas de adelgazamiento o deformación. Completado el tiempo (~26 h de MIV) ambos grupos se activaron químicamente en gotas de MB + 5 mM de Ionomicina por 5 min, luego se incubaron en medio CR2 con 2% SBF, 0,3% BSA y 2 mM de 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP) bajo aceite durante 4h y se llevaron a cultivo *in vitro*. Los partenotes sin zona se cultivaron bajo el sistema pozo a pozo -WOW, para el cual se preparó una placa de 4 pozos con 400 µL de medio CR2 y 200 µL de aceite mineral en cada uno y se realizaron punciones sobre el fondo de cada pozo para generar los micropozos, y los partenotes con zona pelúcida se cultivaron en un pozo en medio CR2.

Clonación manual

Obtención de citoplastos. Se desnudaron los CCO's por medio de pipeteo suave, se seleccionaron los que habían expulsado el primer cuerpo polar (CP) y se lavaron en varias gotas de MB. Se incubaron por 1h en gotas de MB y 10ug/ml de Demecolcina para la formación de protrusión nuclear y realización de enucleación. Se retiró la ZP exponiendo los oocitos a 0,5% de pronasa en MB sin suero con 0,01% PVA (Polivinilalcohol). Se dispusieron de 1 a 2 oocitos libres de ZP en microgotas de 5 μ L de MB con 5 mg/MI Citocalasina (CCB) cubiertas con aceite mineral (60-80 gotas/placa); los oocitos se dividieron con base a la visualización de la protrusión intentando eliminar la menor cantidad de citoplasma posible. La división se realizó de manera manual con una cuchilla *Ultra Splitting Sharp* (Bioniche).

Reconstrucción embrionaria. Se preparó una placa de Petri de 100 mm con 4-5 gotas de MB, 3 gotas de MB sin suero con 500 μ g/MI de PHA (Fitohepatoglutinina). En una gota de MB se depositaron aproximadamente 10 citoplastos y en otra la suspensión de fibroblastos previamente sometida a 0,25% tripsina y lavada con medio MB. Se transfirieron 4-6 citoplastos a una gota de PHA, luego se pasaron de 2-3 de ellos a la gota de suspensión celular; con un capilar sellado se hizo rodar cada citoplasto muy cerca de una sola célula redonda (fibroblasto) hasta que se unieran. Luego, se regresó a la gota de PHA y cada dúo (citoplasto-célula) se dispuso cerca de un solo citoplasto hasta que se unieran formando un trío (citoplasto-célula-citoplasto).

Electrofusión y activación. En la cámara de fusión BLS modelo GSS-250 (250 μ m de distancia entre los electrodos) cubierta con medio ME (medio de fusión), se orientó cada trío de forma horizontal (citoplasto-célula-citoplasto); se realizaron dos pulsos de onda cuadrática de 1kV/cm, 20 μ s/pulso para la fusión de membranas, por medio del eletrofusor BLS CF.150B. Se retiraron los presuntos cigotos de la cámara y se lavaron en gotas de MB y se incubaron individualmente en gotas \sim 5 μ L de MB bajo aceite mineral durante 30 a 45 min, se evaluó visualmente la tasa de fusión verificando la

formación de una sola estructura. Luego se activaron químicamente entre las 26 – 30 h pos inicio de la MIV de la misma forma como se explicó en el proceso de partenogénesis.

Cultivo *in vitro* (CIV). Después de la activación, los presuntos cigotos se lavaron varias veces en medio de cultivo CR2 con 33µg/mL piruvato, 5% SBF y 50mg/mL BSA; se procedió al cultivo de estos bajo el sistema WOW donde se depositó un embrión en cada uno y se cultivaron a 38.8°C, con 5% CO₂ y 90% de humedad relativa por 7 días (ver figura 4.A).

Evaluación de tasas de desarrollo. A las 72h de cultivo se evaluó visualmente la tasa de división celular (clivaje) teniendo en cuenta los cigotos a partir de 2 células; al día 7 se evaluó la tasa de producción de embriones tanto para clones, partenotes con y sin zona pelúcida y embriones de FIV, teniendo en cuenta los estadios de desarrollo desde mórula hasta blastocisto expandido. Los estadios de desarrollo y la calidad morfológica embrionaria se evaluaron de acuerdo con las directrices de la IETS (Stringfellow y Seidel, 1998).

Coloración para determinación del número de blastómeras. Los embriones obtenidos en todos los grupos se fijaron en alcohol al 70%, fueron sometidos a coloración con 10 µg/mL de Hoechst por 5 min para la determinación del número total de blastómeras. El conteo se realizó bajo microscopio de fluorescencia; para minimizar el error de lectura dos observadores hicieron el procedimiento dos veces, y posteriormente se promediaron los valores para asignar el número de blastómeras a cada embrión (ver figura 4.B).

A menos de que se especificara una procedencia distinta, los reactivos proceden de SIGMA Aldrich, St. Louis, MO, USA.

Producción de embriones y evaluación del número de células por tinción fluorescente

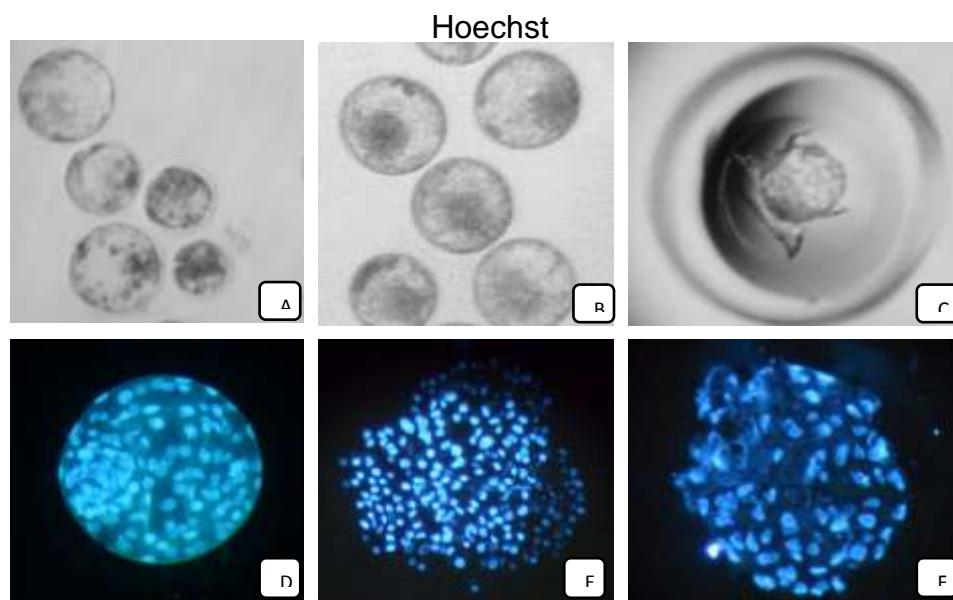


Figura 4. A. Embriones partenogénicos con ZP. B. Embriones producidos por FIV. C. Clon producido por CM. Tinción con Hoechst para evaluación de la celularidad: D Embrión partenogénico con ZP. E. Embrión por FIV y F. Clon. Fotos representativas.

Estadística

Se realizaron las pruebas de Saphiro Wilk y de Levene para probar los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas respectivamente; posteriormente se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un test de Tukey para determinar diferencias entre los porcentajes promedio de fibroblastos en fases G0/G1, clivaje, número de

embriones y número de blastómeras entre los clones, partenotes y embriones de FIV. Los datos se analizaron con el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 22.0.

3. RESULTADOS

Evaluación de la sincronización del ciclo celular de fibroblastos por medio de citometría de flujo.

Al analizar los datos de citometría de flujo se encontraron tres poblaciones: unas con menor contenido de ADN, hipodiploides (Bajos), otras que, conservando la linealidad, daban señales en picos de mayor de 4N, que se consideraron endoreplicantes (Altos), lo cual se verificó mediante microscopía de fluorescencia con la tinción con Ioduro de Propidio (figura 3). Excluyendo las regiones de los endoreplicantes y de las células hipodiploides, se consideran únicamente aquellas que tenían 2 N y 4 N, sobre las que se hizo la integración del modelo de ciclo celular (Medios) (Grafico 1). Después de comparar los porcentajes de células en las fases G0/G1 en los diferentes tratamientos y tiempos (0h, RS24h, RS48h, RS72h, AC24h, AC48h, AC72h, RS+AC24h, RS+AC48h, RS+AC72h) no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0,05$) (Tabla 1). Sin embargo el grupo de inicio 0h fue donde se presentó el mayor número de células en G0/G1 (Gráfico 1).

Tabla 1. Porcentaje de fibroblastos en diferentes fases del ciclo celular sometidos a tres diferentes métodos de cultivo: RS restricción de suero, AC alta confluencia, RS+AC combinación de los dos métodos.

Fase del ciclo celular (%)	Tiempo	G0/G1	S	G2/M
INICIO	0	50,47	18,62	30,90
RS	24	30,25	8,74	61,02
	48	31,53	12,63	55,83
	72	41,93	16,75	41,32

AC	24	26,02	26,99	46,99
	48	33,10	23,55	43,33
	72	28,69	34,04	37,26
RS+AC	24	34,49	19,57	45,94
	48	41,01	19,26	39,73
	72	40,37	13,66	45,98

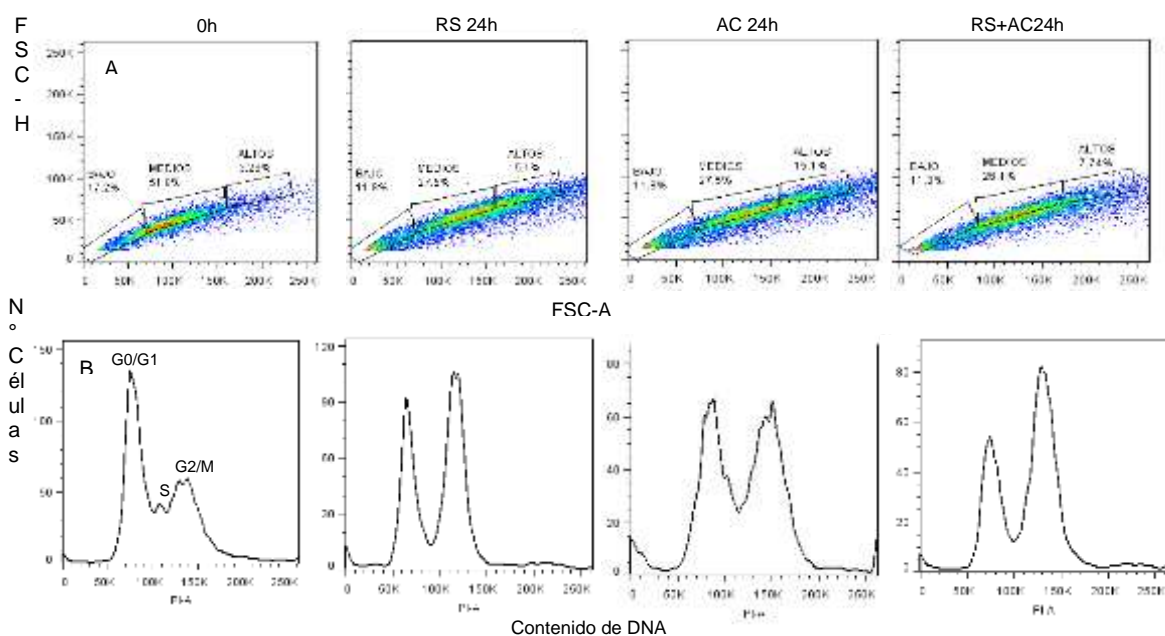


Grafico 1. A. Distribución de las poblaciones celulares bajas, medias y altas, según tipo de cultivo. B. Histogramas del ciclo celular según el tipo de cultivo

Producción de embriones bovinos clonados con fibroblastos sometidos a diferentes tratamientos de sincronización del ciclo celular

Debido a que no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células en G0/G1 entre los diferentes tratamientos, la producción de los clones se realizó con fibroblastos de los grupos de 0 horas, RS, AC y RS+AC a las 24 horas. Los resultados de clivaje y de porcentaje de clones se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Producción de clones según el método de sincronización del fibroblasto donante de núcleo.

Método de sincronización (Horas)	% de clivaje de embriones clonados	% de producción de embriones clonados	P
0	80,3	37,9	0,575
RS 24	66,5	29,5	0,363
AC 24	75,6	19,3*	0,024
RS+AC 24	60,1	30,9	0,264

*dentro de la misma columna indica diferencia estadísticamente significativa comparado con los otros 3 tratamientos, $P < 0,05$.

Calidad embrionaria de los clones

Se procesaron los clones obtenidos a partir de los fibroblastos donantes de núcleo sometidos a los diferentes tratamientos de sincronización del ciclo celular para determinar el número total de blastómeras, el promedio de células por clon en cada grupo se muestra en la tabla 3. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los grupos (Tabla 3).

Tabla 3. Calidad embrionaria según número de células por clon producidos con fibroblastos sometidos a diferentes tratamientos de sincronización celular.

Grupos	Número de blastómeras
0 horas	68,15 ± 9,8
RS 24 horas	62,33 ± 12,7

AC 24 horas	79,91 ± 12,7
RS+AC 24 horas	61,31 ± 11,06

Comparación de la producción global de clones con embriones partenogénéticos y fertilizados *in vitro*

En la evaluación del desarrollo temprano de clones, embriones partenogénéticos con y sin zona pelúcida y fertilizados *in vitro*, fue comparado el porcentaje de clivaje sin encontrar diferencias significativas entre los grupos (Clones, PCZP, PSZP y FIV). En cuanto al porcentaje de producción de embriones fue encontrada diferencia estadística significativa entre el grupo de clones y el de partenotos con zona pelúcida ($P=0,036$) siendo mayor para partenotos. Entre los otros grupos (Clone vs. PSZP y FIV) la producción de embriones fue similar (Tabla 4).

Calidad embrionaria de todos los grupos

Fue comparado el número total de células (blastómeras) de embriones partenogénéticos con y sin zona pelúcida, clones y fertilizados *in vitro*, encontrando diferencia estadística significativa siendo mayor el número total de células que conforman los embriones fertilizados *in vitro* en comparación con partenogénéticos y clones ($p<0,01$) (Tabla 4).

Tabla 4. Desarrollo embrionario de clones bovinos, partenotos con zona pelúcida PCZP, partenotos sin zona pelúcida PSZP y embriones fertilizados *in vitro* FIV y número total de blastómeras que conforman un embrión.

Grupo	Clivaje (%)	Producción embriones (%)	Número total de células
Clones	69,2 ± 3,4	30,2 ± 2,1 ^{d,b,c}	67,1 ± 6,9 ^b

PCZP	74,2 ± 3,3	38,6 ± 2,1 ^a	80,0 ± 4,8 ^b
PSZP	81,3 ± 3,3	35,0 ± 2,1 ^{a,b}	75,9 ± 5,2 ^b
FIV	73,9 ± 3,7	33,3 ± 2,3 ^{a,b,c}	117,0 ± 5,0 ^a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$ entre grupos

4. DISCUSIÓN

En el proceso de clonación por transferencia nuclear, el tipo, el origen y la condición en la que se encuentre la célula donante del núcleo, es uno de los factores que más afecta el éxito de esta técnica. Es necesario que exista una sincronía y compatibilidad espacial y temporal entre el citoplasma del oocito receptor y el núcleo de la célula donante, para que la reprogramación nuclear y el desarrollo embrionario temprano pueda iniciarse y culminarse de la manera adecuada. En este estudio se cultivaron fibroblastos bajo tres sistemas de cultivo con el fin de sincronizar la mayor cantidad de células en las fases G0/G1 del ciclo celular, las cuales se consideran más apropiadas para una adecuada reprogramación del genoma, sin duda, debido a las diferencias en el contenido de ADN de los núcleos donantes que varía en función de la fase del ciclo celular (Campbell et al., 1996; Kubota et al., 2000; Liu et al., 2004). Es importante mencionar que en el análisis de citometría se hallaron tres poblaciones diferentes de células: hipodiploides las cuales tienen menor cantidad de ADN y es posible que estén sufriendo un proceso de muerte celular. Otra población de endoreplicantes lo cual fue verificado con microscopia de fluorescencia, dichas células tienen mayor cantidad de material genético, es posible que esto se de por las condiciones de cultivo, es por ello que el análisis del ciclo celular solo se efectuó en la población con cantidad de ADN normal entre 2N y 4N.

Se probó restricción de suero, alta confluencia y una combinación de ambos en tres tiempos diferentes (24, 48 y 72h), no fue encontrada ninguna diferencia estadística significativa entre los tratamientos, al contrario de lo reportado en anteriores estudios como el de Sun et al. (2008) donde mostraron una elevada proporción de células en G0/G1 (91.4%) presentes en cultivos celulares con alta confluencia, nosotros no hallamos efecto sincronizante importante en G0/G1 con los tipos de cultivo (RS, AC y RS+AC), aunque los resultados muestran mayor porcentaje de células G0/G1 a las cero horas y un leve aumento en los grupos de RS y RS+AC a las 48 y 72 horas. En el grupo de alta confluencia fue hallada menor cantidad de células en la fase G0/G1 y mayor cantidad en la fase S de síntesis, la cual es la menos indicada para el proceso de clonaje ya que ocurre una condensación prematura de los cromosomas lo que ocasiona la “destrucción” parcial del ADN (Collas et al., 1992). En todos los grupos y tiempos excepto en el inicio se encontraron altos porcentajes de células en las fases G2/M lo que causa problemas con el número cromosómico (aneuploidías) lo que va en detrimento del desarrollo embrionario (Campbell et al., 1996). Una de las posibles razones de la no sincronización celular en las fases G0/G1 es el hecho que el cultivo primario de fibroblastos usado proviene de un único genotipo el cual podría no responder a los tratamientos de sincronización evaluados en este estudio.

Al no encontrar diferencias entre los tratamientos para sincronización celular se decidió realizar el proceso de clonación manual con los cultivos de fibroblastos más sencillos a nivel metodológico: Inicio (0 horas), RS, AC y RS+AC 24 horas. Los porcentajes de clivaje obtenidos en este estudio fueron 80.3% 66.5% 75.6% y 60.1% para 0h, RS, AC y RS+AC 24h respectivamente sin diferencias estadísticas significativas entre los grupos dentro los reportados por otros autores (biblio); en cuanto a la producción de embriones se obtuvieron porcentajes altos en los grupos 0h, RS24h y RS+AC24h (37.9%, 29.5% y 30.9%) respectivamente, excepto en el grupo AC24h (19.3%) con diferencia estadística significativa. En este tipo de cultivo en particular (AC24h) se presentó gran cantidad de fibroblastos en la fase S, puede que esta sea una de las razones del porque el

porcentaje inferior de embriones obtenido. En contraste en el grupo inicio (0h) se presentó el mayor porcentaje de embriones (37.9%) lo que llama la atención ya que en este tipo de cultivo se encontró la más alta cantidad de células en las fases G0/G1 (50.47%), lo que concuerda con los resultados reportados en otros estudios, donde a mayor cantidad de células donantes de núcleo en la fase G0/G1 mayores porcentajes de producción embrionaria (Gerger et al., 2010); aunque en este estudio no se obtuvieron altos niveles de fibroblastos en dichas fases si coincide que a medida que aumentaba la población de células en G0/G1 aumento el porcentaje de embriones. Cabe anotar que en los procesos de producción de clones de este estudio, debido al bajo porcentaje de células en fase G0/G1 existió una alta probabilidad de usar una célula donante de núcleo en otra fase del ciclo celular (S o G2/M), lo cual no afectó el porcentaje de producción de clones y está de acuerdo con otros estudios donde se obtuvieron clones viables con células en dichas fases.

La determinación del número de células que conforman un embrión (blastómera) usualmente es considerada como indicativo de calidad y viabilidad de los mismos (Dumoulin et al., 1999). Los clones de este estudio presentaron un número de células sin diferencias estadísticas significativas entre los grupos, lo que al parecer indica que el tipo del método de sincronización utilizado en la célula donante de núcleo no influye en la calidad embrionaria. Este parámetro se ha considerado como predictor del posterior desarrollo embrionario y éxito en la preñez.

En el presente estudio fueron incluidos dos grupos control de partenotes con y sin zona pelúcida debido a que en la clonación manual los oocitos son altamente manipulados y sometidos a procesos que pueden ir en detrimento de su viabilidad celular, por ello es clave utilizar procesos paralelos como la producción de embriones partenogénéticos con la finalidad de tener un control sobre la calidad de los oocitos seleccionados, su capacidad de activarse químicamente y permitir un desarrollo embrionario temprano (Kharche y Birade, 2013). Se comparó la producción de embriones por CM,

partenogénesis y FIV evaluando los parámetros de clivaje, porcentaje de embriones y número de blastómeras. No se encontró diferencia estadística significativa en el clivaje entre ninguna de las técnicas, en cuanto al porcentaje de embriones solo hay diferencia entre los clones y los embriones partenogenéticos con zona pelúcida, en general los porcentajes de embriones son muy buenos y no distan mucho entre un grupo y otro.

El número de blástomas de los blastocistos producidos por FIV son significativamente mayores comparadas con aquellas que conforman los embriones activados partenogenéticamente y los clones (117.0 vs 80.0 vs 75.9 vs 67.1), los valores observados equiparan y superan los resultados de otros estudios, tanto en embriones fertilizados in vitro como de clones embrionarios bovinos (Moraes et al., 2002; Totey et al., 1996), indicando que el sistema de producción usado es eficiente tanto en producción de blastocistos como en calidad embrionaria definida por número de blastómeras (Im et al., 2006).

Uno de los resultados más interesantes de esta investigación es el porcentaje de producción total de clones embrionarios bovinos, que comparado con otros trabajos supera el porcentaje de producción de blastocistos 30.2% vs 19% (Forell, 2008) y no presenta diferencia estadísticamente significativa con el grupo de embriones fertilizados in vitro, el cual está dentro de un rango de 30 a 35%, a nivel comercial (Almeida, 2008). Esta comparación es un aporte valioso ya que son pocos los estudios de clonación que realizan comparativos con la técnica de FIV, utilizada a nivel comercial desde hace varios años con éxito.

Agradecimientos

A Colciencias y al programa Jóvenes Investigadores e Innovadores y a Ganadería Rio Grande S.A.S por su participación mediante el otorgamiento de la beca-pasantía del Joven Investigador.

A la estrategia de Sostenibilidad 2013-14 de la Universidad de Antioquia otorgada al grupo Biogénesis

Conclusiones generales

Se lograron estandarizar todos los procedimientos requeridos para la obtención de clones embrionarios bovinos a partir de la técnica de clonación manual, desde el establecimiento de cultivos celulares primarios como células somáticas donantes en este caso fibroblastos, disección de oocitos, procesos de electrofusión y activación celular entre otros, en nuestras condiciones locales logrando así el establecimiento de protocolos claros, confiables y con alta repetitividad. La estandarización de métodos de clonación traza los primeros pasos en la replicación de los animales de alto valor genético; lo cual genera un avance científico y tecnológico significativo en la línea de reproducción del grupo de investigación Biogénesis de la Universidad de Antioquia.

En cuanto a las evaluaciones de los métodos de sincronización del ciclo celular de los fibroblastos no se encontró evidencia suficiente para optar por el cultivo con restricción de suero, alta confluencia o la combinación de ambos en ninguno de los tiempos estudiados; se obtuvieron óptimos porcentajes de clivaje y embriones clonados. Además al comparar con otros sistemas de producción de embriones como partenogénesis y FIV la técnica de CM presento excelentes resultados.

Con este trabajo se contribuye a la generación de procesos de innovación, diferenciación y mejoramiento a nivel de biotecnologías reproductivas asistidas en bovinos en el país con validez científica aportando al crecimiento del conocimiento a nivel nacional e internacional.

Bibliografía

- Almeida, A. B. (2008). *Sistema biológico de aumento da taxa de prenhez Embriões partenogénéticos podem ajudar o reconhecimento materno da gestação*. Universidade de São Paulo.
- Boquest, A. C., Day, B. N., & Prather, R. . (1999). Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biology of Reproduction*, *60*(4), 1013–1019.
- Campbell, K. H. S., Mcwhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, *380*(6569), 64–66.
- Collas, P., Pinto-Correia, C., & Ponce de Leon, F. A. (1992). Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, *46*, 501–511.
- Dumoulin, J. C., Meijers, C. J., Bras, M., Coonen, E., Geraedts, J. P., & Evers, J. L. (1999). Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *14*(2), 465–9.
- Forell, F. (2008). *Otimização dos sistema de produção de clones por transferência nuclear com a utilização de oócitos vitrificados e diferentes tipos celulares como doadores de núcleo*. UFRGS.
- Freshney, R. I. (2000). *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique* (pp. 309–321).
- Gerger, R. P. C., Ribeiro, E. S., Forell, F., Bertolini, L. R., Rodrigues, J. L., Ambrósio, C. E., ... Bertolini, M. (2010). In vitro development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. *Genetics and Molecular Research GMR*, *9*(1), 295–302.
- Goto, Y., Hirayama, M., Takeda, K., Tukamoto, N., Sakata, O., Kaeriyama, H., & Geshi, M. (2013). Effect of synchronization of donor cells in early G1-phase using shake-off method on developmental potential of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, *84*(8), 592–9.
- Hall, V. J., Ruddock, N. T., Cooney, M. a, Korfiatis, N. a, Tecirlioglu, R. T., Downie, S., ... French, A. J. (2006). Production of a cloned calf using zona-free serial nuclear transfer. *Theriogenology*, *65*(2), 424–40.

- Im, G. S., Seo, J. S., Hwang, I. S., Kim, D. H., Kim, S. W., Yang, B. C., Prather, R. S. (2006). Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with different combination of chemicals. *Molecular Reproduction and Development.*, 73(9), 1094–101.
- Johnson, R., Downes, C., & Meyn, R. (1993). The synchronization of mammalian cells. In *The Cell Cycle: A Practical Approach*. (In: Fantès, pp. 1–22). New York: Oxford University Press.
- Kharche, S. D., & Birade, H. S. (2013). Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production : A review, 2013(February), 170–182.
- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., & Yang, X. (2000). Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(3), 990–995.
- Leibfried, L., & First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Reprod. Fert. Vol.*, 49, 76–86.
- Liu, C. T., Yu, K. C., & Ju, J. C. (2004). Cell cycle stage analysis of rabbit foetal fibroblasts and cumulus cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(6), 385–390.
- Mezzalira, J. C., Ohlweiler, L. U., Da Costa Gerger, R. P., Casali, R., Vieira, F. K., Ambrósio, C. E., Bertolini, M. (2011). Production of bovine hand-made cloned embryos by zygote-oocyte cytoplasmic hemi-complementation. *Cellular Reprogramming*, 13(1), 65–76.
- Mohan, S., Palanisamy, A., Tsapepas, D. (2012). Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol*; 23: 2061-71.
- Moraes, G., Silva, S., Dos Santos, D., Pasin, M., Pereira, L., Mezzarila, A., ... Silva, C. (2002). Producao in vitro de embrioes bovinos com soro de egua em diferentes fases do estro. *Acta Scientiae Veterinariae*, 30(1), 1–8.
- Stringfellow, D. A., & Seidel, S. M. (1998). Manual of International Embryo Transfer Society (IETS). 3rd Ed. (IETS, Maryland Heights, MO), 173.
- Sun, X., Wang, S., Zhang, Y., Wang, H., Wang, L., Ying, L., Li, N. (2008). Cell-cycle synchronization of fibroblasts derived from transgenic cloned cattle ear skin: effects of serum starvation, roscovitine and contact inhibition. *Zygote (Cambridge, England)*, 16(2), 111–6.

- Totey, S. M., Daliri, M., Appa, K. B., Pawshe, C. H., Taneja, M., & Chillar, R. S. (1996). Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. *Theriogenology*, *45*, 521–33.
- Vajta, G. (2007). Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? *Trends in Biotechnology*, *25*(6), 250–3.
- Wells, D. N., Laible, G., & Tucker, F. C. (2003). Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*, *59*, 45–49.
- Whitworth, K.M., Prather, R.S., (2010). “Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming?,” *Molecular Reproduction and Development*, *77*(12): 1001–1015.
- Wilmut, I., Schnieke, A., McWhir, J., Kind, A., & Campbell, K. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, *385*, 810–3.
- Zetterberg, A., & Skold, O. (1970). Proliferative activity and cytochemical properties of nuclear chromatin related to local cell density of epithelial cells. *Exp Cell Res* *1970*, *62*, 262–268.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* *327*: 1000–1004

Bibliografía (Introducción general y marco teórico)

- Akagi, S., Matsukawa, K., & Onishi, A. (2014). Nuclear Transfer Technology in Cattle, Sheep, and Swine. *Transgenic Animal Technology, Third edit*, 387–398.
- Batchelder, C. A., Hoffert, K. A., Bertolini, M., Moyer, A. L., Mason, J. B., Petkov, S. G., ... Anderson, G. B. (2005). Effect of the Nuclear-Donor Cell Lineage, Type, and Cell Donor on Development of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos in Cattle. *Cloning and Stem Cells*, *7*(4), 238–254.

- Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., & Young, L. (2004). Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, *71*, 185–193.
- Bertolini, M., Bertolini, L. R., Gerger, R. P. C., Batchelder, C. A., & Anderson, G. B. (2007). Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *31*, 391–405.
- Boquest, A. C., Day, B. N., & Prather, R. . (1999). Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biology of Reproduction*, *60*(4), 1013–1019.
- Bordignon, V. (2011). Animal Cloning: State of the Art and Applications. *Comprehensive Biotechnology (second Edition)*, *4*, 441–456.
- Briggs, R., & King, T. J. (1952). Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, *38*, 455–463.
- Campbell, K. H. S. (2007). Ten years of cloning: questions answered and personal reflections. *Cloning and Stem Cells*, *9*(1), 8–11.
- Campbell, K. H. S., Fisher, P., Chen, W. C., Choi, I., Kelly, R. D., Lee, J. H., & Xhu, J. (2007). Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*, *68*(214-231).
- Campbell, K. H. S., Mcwhir, J., Ritchie, W. A., & WILMUT, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, *380*(6569), 64–66.
- Cheng, W.T.K., Liu, B.T., Su, H.Y., Lee, J.W., Wang, C.H, Lee, S.N., Chu, F.H., Yang, D.W., Chen, L.R., Shen, P.C. (2011). Enucleation after fusion and activation enhances the development of reconstructed bovine embryos. *Animal Reproduction Science Sci.*, *129*, 162–170.
- Chesné, P., Adenot, P., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., & Renard, J. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol.*, *20*, 366–9.
- Cho, S. R., Ock, S. A., Yoo, J. G., Mohana Kumar, B., Choe, S. Y., & Rho, G. J. (2005). Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. *Reproduction in Domestic Animals*, *40*(2), 171–176.

- Choresca, C. H. J., Koo, O. J., Oh, H. J., Hong, S. G., Gomez, D. K., Kim, J. H., ... Park, S. C. (2009). Different culture conditions used for arresting the G0/G1 phase of the cell cycle in goldfish (*Carassius auratus*) caudal fin-derived fibroblasts. *Cell Biology International*, 33(1), 65–70.
- Cibelli, J., Campbell, K., Seidel, G., West, M., & Lanza, R. (2002). The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol.*, 20, 13–4.
- Collas, P., Pinto-Correia, C., & Ponce de Leon, F. A. (1992). Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 46, 501–511.
- Constant, F., Guillomot, M., Heyman, Y., Vignon, X., Laigre, P., Servely, J. L., ... Chavatte-palmer, P. (2006). Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biology of Reproduction*, 75(1), 122–130.
- Daniel, S. M., Raipuria, P., & Sarkhel, B. C. (2008). Efficiency of cloned embryo production using different types of cell donor and electric fusion strengths in goats. *Small Ruminant Research*, 77(1), 45–50.
- Delaney, T., Oback, B., & Wells, D. N. (2007). Doubling cytoplasm volume increases embryo development following somatic cell nuclear transfer in cattle. *The 4th Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society (Singapore)*, 75.
- Ensenat-waser, R., Ph, D., Pellicer, A., Ph, D., Simon, C., & Ph, D. (2009). EDITOR ' S CORNER Reprogrammed induced pluripotent stem cells : how suitable could they be in reproductive medicine ? *Fertility and Sterility*, 91(4), 971–974.
- Faber, D. C., Molina, J. A., Ohlrichs, C. L., Van der Zwaag, D. F., & Ferne, L. B. (2003). Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, 59, 125–138.
- Galli, C., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2003). Introduction to cloning by nuclear transplantation. *Cloning and Stem Cells*, 5(4), 223–32.
- Gao, T., Zheng, J., Xing, F., Fang, H., Sun, F., Yan, A., ... Sheng, H. Z. (2007). Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Cell Research*, 17(2), 135–50.

- Gerger, R. P. C., Ribeiro, E. S., Forell, F., Bertolini, L. R., Rodrigues, J. L., Ambrósio, C. E., ... Bertolini, M. (2010). In vitro development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. *Genetics and Molecular Research GMR*, 9(1), 295–302.
- Gibbons, J., Arat, S., Rzucidlo, J., Miyoshi, K., Waltenburg, R., Respass, D., ... Stice, S. (2002). Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biology of Reproduction*, 66(4), 895–900.
- Goissis, M. D., Caetano, H. V., Marques, M. G., De Barros, F. R., Feitosa, W. B., Milazzotto, M. P., ... Visintin, J. A. (2007). Effects of serum deprivation and cycloheximide on cell cycle of low and high passage porcine fetal fibroblasts. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(6), 660–663.
- Gómez, M. C., Pope, C. E., Giraldo, A., Lyons, L. a, Harris, R. F., King, A. L., ... Dresser, B. L. (2004). Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and Stem Cells*, 6(3), 247–58.
- Gómez, N. A., Ramirez, M. M., & Ruiz-Cortés, Z. T. (2014). Comparación de las técnicas de clonación manual partenogénesis y FIV en la producción y calidad de embriones bovinos. *En Preparación*.
- Goto, Y., Hirayama, M., Takeda, K., Tukamoto, N., Sakata, O., Kaeriyama, H., & Geshi, M. (2013). Effect of synchronization of donor cells in early G1-phase using shake-off method on developmental potential of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 84(8), 592–9.
- Green, A., Wells, D., & Oback, B. (2007). Cattle Cloned from Increasingly Differentiated Muscle Cells. *Biol Reprod*, 77, 395–406.
- Hall, V., Hinrichs, K., Lazzari, G., Betts, D. H., & Hyttel, P. (2013). Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 197(2), 128–42.
- Hashem, M. A., Bhandari, D. P., Kang, S. K., Lee, B. C., & Suk, H. W. (2006). Cell cycle analysis of in vitro cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts. *Cell Biology International*, 30(9), 698–703.
- Heyman, Y., Zhou, Q., Lebourhis, D., Chavatte-Palmer, P., Renard, J., & Vignon, X. (2005). Novel approaches and hurdles to somatic cloning in cattle. *Cloning Stem Cells*, 4(47-55).

- Isobe, T., Ikebata, Y., Do, L., Tanihara, F., Taniguchi, M., Otoi, T.. (2014) In vitro development of OPU-derived bovine embryos cultured either individually or in groups with the silk protein sericin and the viability of frozen-thawed embryos after transfer. *Animal Reproduction Science*
- Johnson, R., Downes, C., & Meyn, R. (1993). The synchronization of mammalian cells. In *The Cell Cycle: A Practical Approach*. (In: Fantès, pp. 1–22). New York: Oxford University Press.
- Kanka, J. (2003). Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology*, 59, 3–19.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., ... Tsunoda, Y. (1998). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2095–8.
- Katska, L., Bochenek, M., Kania, G., Ryńska, B., & Smorag, Z. (2002). Flow cytometric cell cycle analysis of somatic cells primary cultures established for bovine cloning. *Theriogenology*, 58(9), 1733–44.
- Keefer, C. L., Baldassarre, H., Keyston, R., Wang, B., Bhatia, B., Bilodeau, a S., ... Karatzas, C. N. (2001). Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction*, 64(3), 849–56.
- Kent-First, M., Beyhan, Z., Ambroggio, J., & First, N. L. (2014). A Historical Perspective of the Cloning of Cattle. *Principles of Cloning (Second Edition)*, 255–271.
- Khammanit, R., Chantakru, S., Kitiyanant, Y., & Saikhun, J. (2008). Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts. *Theriogenology*, 70(1), 27–34.
- Koo, O. J., Hossein, M. S., Hong, S. G., Martinez-Conejero, J. A., & Lee, B. C. (2009). Cell cycle synchronization of canine ear fibroblasts for somatic cell nuclear transfer. *Zygote*, 17(1), 37–43.
- Kruip, T. A. ., & den Daas, J. H. . (1997). In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47(1), 43–52.
- Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Mizoshita, K., Tabara, N., Barber, M., & Yang, X. (2000). Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term

- culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(3), 990–995.
- Laible, G. (2011). Gamete and Embryo Technology | Transgenic Animals. *Encyclopedia of Dairy Sciences, Second Edi*, 637–645.
- Laible, G., & Wells, D. N. (2007). Recent advances and future options for New Zealand agriculture derived from animal cloning and transgenic cattle. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 50(2), 103–124.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Diaz, F., Moraes, C. T., Farin, P. W., Farin, C. E., ... Damiani, P. (2000). Cloning of an Endangered Species (*Bos gaurus*) Using, 2(2).
- Lee, B. C., Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J., ... Hwang, W. S. (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 436(7051), 641.
- Lee, K., & Prather, R. (2014). Cloning Pigs by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Principles of Cloning, Second Edi*, 245–254.
- Lewis, I., French, A., Tecirlioglu, R., Vajta, G., McClintock, A., Nicholas, K., ... Trounson, A. (2004). Commercial aspects of cloning and genetic modification in cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44, 1105–1111.
- Liu, C. T., Yu, K. C., & Ju, J. C. (2004). Cell cycle stage analysis of rabbit foetal fibroblasts and cumulus cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(6), 385–390.
- Loi, P., Ptak, G., barboni, B., fulka, J. J. R., 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.
- Masih, S., Jain, P., El Baz, R., & Khan, Z. (2014). Transgenic Animals and their Applications. *Animal Biotechnology*, 407–423.
- Meng, Q., Polgar, Z., Tancos, Z., Tian, X., & Dinnyes, A. (2014). Cloning of Rabbits. *Principles of Cloning, Second edi*, 227–244.
- Mezzalana, J. C., Ohlweiler, L. U., Da Costa Gerger, R. P., Casali, R., Vieira, F. K., Ambrósio, C. E., Bertolini, M. (2011). Production of bovine hand-made cloned embryos by zygote-oocyte cytoplasmic hemi-complementation. *Cellular Reprogramming*, 13(1), 65–76.

- Miyoshi, K., Rzucidlo, S., Pratt, S., & Stice, S. (2004). Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod.*, 70, 260.
- Mizutani, E., Kishigami, S., & Wakayama, T. (2014). Cloning of Mice. *Principles of Cloning, Second Edi*, 209–226.
- Ng, R. K., & Gurdon, J. B. (2005). Maintenance of epigenetic memory in cloned embryos. *Cell Cycle*, 4(6), 760–763.
- Niemann, H., Kues, W., & Carnwath, J. W. (2005). Transgenic farm animals: present and future. *Revue Scientifique et Technique*, 24(1), 285–298.
- Oback, B., & Wells, D. (2002). Many Are Called , but Few Are Chosen CHOICE OF NUCLEAR DONOR, 4(2).
- Oback, B., & Wells, D. N. (2007). Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? *Molecular Reproduction and Development*, 74(5), 646–54.
- Ono, A., Shimozawa, N., Ito, M., & Kono, T. (2001). Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol Reprod.*, 64, 44.50.
- Paterson, L., DeSousa, P., Ritchie, W., King, T., & Wilmut, I. (2003). Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Animal Reproduction Science*, 79(3-4), 137–143.
- Pereira, a. F., Feltrin, C., Almeida, K. C., Carneiro, I. S., Avelar, S. R. G., Neto, a. S. A., ... Bertolini, M. (2013a). Analysis of factors contributing to the efficiency of the in vitro production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). *Small Ruminant Research*, 109(2-3), 163–172.
- Peura, T., Lewis, I., & Trounson, A. (1998). The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Mol Reprod Dev*, 50, 185–91.
- Peura, T. T. (2001). Serum starvation can cause excessive DNA damage in sheep fetal fibroblasts. *Theriogenology*, 55, 285.
- Polejaeva, I. a, Chen, S. H., Vaught, T. D., Page, R. L., Mullins, J., Ball, S., ... Campbell, K. H. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407(6800), 86–90.

- Powell, a M., Talbot, N. C., Wells, K. D., Kerr, D. E., Pursel, V. G., & Wall, R. J. (2004). Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 71(1), 210–6.
- Reik, W., Santos, F., & Dean, W. (2003). Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 59(21-32).
- Ribeiro, E. D. S., Gerger, R. P. D. C., Ohlweiler, L. U., Ortigari, I., Mezzalira, J. C., Forell, F., ... Bertolini, M. (2009). Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem Cells*, 11(3), 377–386.
- Ross, P. J., & Feltrin, C. (2014). Cloning Animals by Somatic Cell Nuclear Transplantation. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, (307-316).
- Saini, M., Selokar, N. L., Revey, T., Singla, S. K., Chauhan, M. S., Palta, P., & Madan, P. (2014). Theriogenology Trichostatin A alters the expression of cell cycle controlling genes and microRNAs in donor cells and subsequently improves the yield and quality of cloned bovine embryos in vitro. *Theriogenology*, 82(7), 1036–1042.
- Spemann, H. (1914). Uber verz ogerte Kernversorgung von Keimteilen. *Verh. Deutsch. Zool. Ges. Leipzig (Freiburg)*, 24, 216–221.
- Sun, X., Wang, S., Zhang, Y., Wang, H., Wang, L., Ying, L., Li, N. (2008). Cell-cycle synchronization of fibroblasts derived from transgenic cloned cattle ear skin: effects of serum starvation, roscovitine and contact inhibition. *Zygote (Cambridge, England)*, 16(2), 111–6.
- Tecirlioglu, R., Cooney, M., Lewis, I., Korfiatis, N., Hodgson, R., Ruddock, N., ... Downie S, Trounson AO, Holland MK, F. A. (2005). Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod Fertil Dev*, 17, 573–85.
- Urakawa, M., Ideta, A., Sawada, T., & Aoyagi, Y. (2004). Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. *Theriogenology*, 62(3-4), 714–28.
- Vajta, G. (2007). Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? *Trends in Biotechnology*, 25(6), 250–3.

- Vajta, G., & Gjerris, M. (2006). Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Animal Reproduction Science*, 92(3-4), 211–30.
- Vajta, G., Kragh, P. M., Mtango, N. R., & Callesen, H. (2005). Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reproduction, Fertility, and Development*, 17(1-2), 97–112.
- Vajta, G., Lewis, I. A. N. M., Hyttel, P., Thouas, G. A., & Trounson, A. O. (2001). Short Communication, 3(2), 89–95.
- Vajta, G., Lewis, I., Trounson, A., Purup, S., Maddox-Hyttel, P., Schmidt, M., ... Callesen, H. (2003). Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod*, 68(571-8).
- Vajta, G., Peura, T. T., Holm, P., Páldi, a, Greve, T., Trounson, a O., & Callesen, H. (2000). New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 256–64.
- Van Wagtendonk-de Leeuw, A. (2006). Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 65, 914–25.
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Soom, a V, Ysebaert, M. T., Charlier, G., Oostveldt, P. V, & de Kruif, a. (2000). Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biology of Reproduction*, 62(2), 463–9.
- Vieira, F. K., Forell, F., Pereira, R., Aguiar, L. H. De, Feltrin, C., Neto, S. G., ... Bertolini, M. (2012). In Vitro Development and Cell Allocation After Aggregation of Syngeneic Wild Type and Fluorescence-Expressing Bovine Cloned Embryos, 40(May), 1–8.
- Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannermann, D. D., Pursel, V. G., ... Hawk, H. W. (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* , 23, 445–451.
- Wells, D. (2010). Nuclear transfer: the importance of donor and recipient cells for nuclear reprogramming and cloning efficiency in mammals. *Acta Scientiae Veterinarie*, 38(2), 487–507.
- Wells, D. N. (2004). The integration of cloning by nuclear transfer in the conservation of animal genetic resources. In S. G., V. B., S. K.D., & T. S. (Eds.), *Farm Animal Genetic Resources*. (British So, pp. 223–241).

- Wells, D. N., Laible, G., & Tucker, F. C. (2003). Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*, 59, 45–49.
- Willadsen, S. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320, 63–5.
- Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P., Dinnyes, A., King, T., Paterson, L., ... Young, L. (2002). Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, (6907), 583–6.
- Wilmut, I., Schnieke, A., McWhir, J., Kind, A., & Campbell, K. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810–3.
- Wilmut, T., Young, L., DeSousa, P., & King, T. (2000). New opportunities in animal breeding and production- an introductory remark. *Anim. Reprod Scie*, 60(61), 5–14.
- Xue, F., Tian, X., Du, F., Kubota, C., Taneja, M., Dinnyes, A., ... Yang, X. (2002). Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature Genet* 2002, 31, 216–220.
- Zetterberg, A., & Skold, O. (1970). Proliferative activity and cytochemical properties of nuclear chromatin related to local cell density of epithelial cells. *Exp Cell Res* 1970, 62, 262–268.
- Zhang, X., & Piedrahita, J. A. (2014). Advances in the Generation of Transgenic Domestic Species via Somatic Cell Nuclear Transfer. *Principles of Cloning, Second Edi*, 95–106.



Formato 012
Coordinación de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias