



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias-Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

Reprogramación de células somáticas de güiña (*Leopardus guigna*) mediante transferencia nuclear heteroespecífica utilizando ovocitos maduros de gata doméstica (*Felis silvestris catus*)

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

DANIEL MARTÍN VERAGUAS DÁVILA
CHILLÁN-CHILE
2018

Profesor Guía: Lleretny Rodríguez Alvarez
Departamento de Ciencia Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Reprogramación de células somáticas de güiña (*Leopardus guigna*) mediante transferencia nuclear heteroespecífica utilizando ovocitos maduros de gata doméstica (*Felis silvestris catus*)

Aprobada por:

Lleretny Rodríguez Alvarez

Lic. en Microbiología; PhD

Profesora Guía

Fidel O. Castro Reboredo

Ingeniero Zootecnista; MSc., PhD

Evaluador Interno

Fernando Saravia Ramos

Médico Veterinario; MSc., PhD

Evaluador Interno

Ricardo Felmer Dörner

Bioquímico; PhD

Evaluador Externo

Manuel Quezada Orellana

Médico Veterinario; PhD

Director(s) de Programa



*A mi madre, Delia
Mi padre, Daniel
Mi hermana, Etna
A Fivy y Chimuelo.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer primero a mi familia, gracias por apoyarme en este viaje y comprender mis decisiones. A mi mamá Delia gracias por apoyarme durante estos años, tanto emocional como económicamente, gracias por escucharme y motivarme a la distancia sobre todo cuando sentía que no podía continuar. Gracias también por llevar las riendas de la familia y por trabajar día y noche para que yo y mi hermana cumpliéramos nuestras metas. A mi papá Daniel, gracias por apoyarme durante este período, incluso durante los tiempos difíciles de tu enfermedad y disculpa por no poder haber estado presente cuando debía estarlo. Gracias también por haberme inculcado desde pequeño el amor por la biología y los animales, lo cual me ha llevado a emprender este camino, espero haber sido un orgullo para ti y que sigamos compartiendo muchos años más.

También quisiera agradecer al Dr. Fidel Castro y en especial a la Dra. Lleretny Rodríguez, gracias por haber creído en mí y recibirme en su laboratorio desde pregrado cuando no sabía nada sobre biotecnología. Gracias a la Dra. Lleretny, mi tutora de tesis tanto en pregrado como postgrado, por haberme formado en la maravillosa área de la embriología y clonación. Gracias por apoyarme en un área nueva en el laboratorio, de la cual fuimos aprendiendo juntos en el camino y que en los últimos años hemos podido ver los frutos con los nacimientos de Fivy y Chimuelo.

Además, quisiera agradecer a todas las personas que me apoyaron directamente durante este trabajo de investigación, gracias a Paula Gallegos, Constanza Aguilera, Soledad Sáez, Sandra Cuevas, Carolina Sepúlveda, Daniela Doussang, Diana Echeverry y Darling Sáez. A todas, gracias por apoyarme en esta línea investigación, por haberme ayudado tanto en la parte investigativa como de medicina veterinaria facilitándome el trabajo. Sinceramente gracias a todas por su ayuda que en gran parte han hecho posible este momento.

Gracias también a Alejandra Velásquez, por haberme apoyado desde el día uno en el laboratorio de embriología, gracias por ser una gran compañera de trabajo y amiga y por darme consejos cuando más lo necesitaba. También quisiera agradecer a todas las personas con las cuales compartí este tiempo en el Laboratorio de Biotecnología Animal,

gracias a Bárbara Melo, José Manríquez, Joel Cabezas, Edwin Mellisho, Pedro Silva, Felipe Navarrete, Ana Mançanares, Yat Sen Wong y Miguel Gutiérrez.

Gracias también a todas las personas que si bien no son parte este laboratorio, me apoyaron durante este proceso tanto en términos académicos como de amistad, gracias a Evelyn Lara, Andrea Navarro, Carolina Silva, Paulina Pachá, Felipe Peña y José León. A todos gracias por comprender mi carácter y darme su amistad en distintos momentos de este proceso.

Finalmente, quisiera agradecer a la Dra. Martha Gómez, por habernos instruido de manera amable y desinteresada a la Dra. Lleretny y a mí en los temas de fecundación *in vitro* y clonación en felinos. También quisiera agradecer al Dr. Daniel Salamone, por haberme recibido en su laboratorio y permitir que me capacitara en el area de clonación. Gracias a Virginia y Geraldina, por darse el tiempo de enseñarme a clonar durante ese corto periodo. Sin la ayuda de todos ustedes no habría sido posible este trabajo.

Gracias a Todos.

Gracias a CONICYT y a la Beca Doctorado Nacional por financiar mis estudios de d

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO	PÁGINA
INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Ciclo reproductivo de la gata doméstica.....	4
2. Desarrollo embrionario temprano en el gato doméstico.....	5
3. Producción <i>in vitro</i> de embriones felinos.....	6
3.1. Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos de gata doméstica	6
3.2. Producción <i>in vitro</i> de embriones en el gato doméstico	8
3.3. Producción <i>in vitro</i> de embriones en felinos silvestres.....	10
Transferencia nuclear somática heteroespecífica en felinos silvestres.....	12
4. Especies de felinos silvestres endémicos en Chile.....	13
Características y estado de conservación de la güiña.....	14
TNS heteroespecífica posible herramienta de conservación de la güiña	15
5. Factores que afectan la eficiencia de la TNS heteroespecífica.....	16
Influencia de calidad ovocitaria en la eficiencia de la TNSh.....	16
Sincronía entre el citoplasto receptor y el núcleo donante.....	18
Influencia de la distancia filogenética en la TNSh.....	20
Alteraciones epigenéticas en embriones generados por TNSh.....	23
Modificaciones epigenéticas durante el desarrollo temprano.....	23
Alteraciones en el patrón de metilación en los embriones generados por TNS.....	24
Genes relevantes durante el desarrollo embrionario temprano.....	27
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
IV. MATERIALES Y MÉTODO.....	31
IV.1. Diseño experimental.....	31

IV.2. Etapa 1. Experimento 1. Implementación de un protocolo de estimulación ovárica para la generación de ovocitos competentes de gata doméstica.....	38
Animales utilizados y evaluación del estatus reproductivo.....	38
Tratamiento con gonadotrofinas.....	40
Procesamiento de los ovarios y obtención de los complejos cúmulo-ovocito.....	40
Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos (MIV).....	41
Maduración <i>in vivo</i> de ovocitos.....	42
Activación partenogenética.....	42
Cultivo <i>in vitro</i> de embriones.....	43
Tinción de blastocistos.....	44
Evaluación de la expresión génica.....	44
Análisis estadístico.....	46
Etapa 1. Experimento 2. Determinación de un protocolo de inducción de arresto del ciclo celular en células somáticas de gato doméstico y güiña.....	47
Cultivos primarios y aislamiento de líneas celulares de gato doméstico y güiña.....	47
Métodos de sincronización del ciclo celular en fase G0/G1.....	48
Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	49
Análisis de viabilidad celular y apoptosis.....	50
Análisis de apoptosis celular mediante RT-qPCR.....	50
Análisis estadístico.....	51
Etapa 2. Experimento 2.1. Evaluación de la capacidad de desarrollo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de embriones de gato doméstico generados por fecundación <i>in vitro</i>	52
<i>Evaluación del tratamiento con eCG en la generación de embriones de gato por fecundación in vitro</i>	52
Colección de complejos cúmulo-ovocito y maduración <i>in vitro</i>	52
Colección de espermatozoides.....	52

Fecundación <i>in vitro</i>	53
Cultivo <i>in vitro</i> de embriones.....	53
Sincronización de gatas receptoras.....	54
Transferencia de embriones generados <i>in vitro</i>	54
<i>Evaluación del desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación in vitro posterior a la remoción de la zona pelúcida</i>	55
Remoción de la zona pelúcida.....	55
Cultivo <i>in vitro</i> de embriones zona-libre.....	56
Medición del diámetro de los blastocistos y conteo de células totales....	56
Experimento 2.2. Evaluación del desarrollo <i>in vitro</i> de embriones clonados de gato doméstico y güiña.....	57
Preparación de citoplastos receptores.....	57
Células donantes de núcleo.....	57
Transferencia nuclear somática sin la presencia de zona pelúcida.....	58
Activación ovocitaria.....	59
Cultivo de embriones zona-libre.....	59
Análisis del patrón de expresión génica en embriones clonados de güiña y gato doméstico.....	60
Análisis estadístico.....	61
V. RESULTADOS	63
Etapa 1. Experimento 1.1. Implementación de un protocolo de estimulación ovárica para la generación de ovocitos competentes de gata doméstica.....	63
Evaluación del tratamiento con FSH a gatas en anestro sobre la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	63
Evaluación de la calidad morfológica de los CCOs posterior al tratamiento con FSH.....	63
Efecto del tratamiento con FSH a gatas en anestro sobre el patrón de expresión génica de los CCOs inmaduros.....	64

Efecto de la aplicación exógena de FSH a gatas en anestro sobre la capacidad de desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	65
Evaluación de la expresión génica de los blastocistos producidos en el grupo tratado con FSH y el grupo control.....	67
Evaluación del efecto del tratamiento con eCG a gatas en anestro sobre la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	70
Evaluación de la calidad morfológica de los CCOs posterior al tratamiento con eCG.....	70
Efecto del tratamiento con eCG a gatas en anestro sobre el patrón de expresión génica de los CCOs inmaduros.....	72
Evaluación de la maduración <i>in vivo</i> de ovocitos de gata mediante la estimulación ovárica con eCG y hCG	74
Evaluación del efecto de los tratamientos con eCG y eCG-hCG en gatas en anestro sobre la capacidad de desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	75
Evaluación del efecto del tratamiento con eCG y hCG sobre el patrón de expresión génica en los blastocistos generados por activación partenogénica.....	79
Experimento 1.2. Determinación de un protocolo de inducción de arresto del ciclo celular en células somáticas de gato doméstico y güiña.....	81
Análisis del ciclo celular en fibroblastos de gato doméstico y güiña sometidos a distintos tratamientos de inducción de quiescencia.....	81
Análisis de viabilidad celular de los fibroblastos de gato doméstico y güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.....	85
Evaluación de la apoptosis celular en los fibroblastos de gato doméstico y güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.....	87

	<i>Etapa 2. Experimento 2.1. Evaluación de la capacidad de desarrollo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de embriones de gato doméstico generados por fecundación <i>in vitro</i>.....</i>	92
	Evaluación del tratamiento con eCG en la generación de embriones de gato por fecundación <i>in vitro</i>	92
	Evaluación de la capacidad de desarrollo <i>in vitro</i>	92
	Evaluación de la capacidad de desarrollo <i>in vivo</i>	93
	Evaluación del desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación <i>in vitro</i> posterior a la remoción de la zona pelúcida.....	97
	<i>Experimento 2.2. Evaluación del desarrollo <i>in vitro</i> de embriones clonados de gato doméstico y güiña.....</i>	100
	Evaluación de la agregación embrionaria en la generación de embriones de gato doméstico y güiña mediante transferencia nuclear somática.....	100
	Análisis del patrón de expresión de genes de pluripotencia y diferenciación en embriones clonados.....	104
VI.	DISCUSIÓN.....	106
	Generación de un protocolo para la obtención de ovocitos competentes de gata doméstica.....	106
	Sincronización del ciclo celular en fibroblastos de gato doméstico y güiña.....	109
	Evaluación de la calidad y capacidad de desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación <i>in vitro</i>	112
	Cultivo <i>in vitro</i> de embriones de gato doméstico posterior a la remoción de la zona pelúcida.....	114
	Generación de embriones de gato doméstico y de güiña por transferencia nuclear somática zona-libre utilizando el método de agregación embrionaria.....	116
VII.	CONCLUSIONES.....	123
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Medios para la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos y el cultivo <i>in vitro</i> de embriones	43
2. Lista de partidores utilizados para RT-qPCR en las etapas 1 y 2. Secuencia de partidores forward (F) y reverse (R), temperatura de aneling (Ta), tamaño del producto (Prod.; pb: pares de bases), e identificador de secuencia en NCBI.....	61
3. Efecto del tratamiento con FSH a gatas en anestro sobre la calidad de los complejos cúmulo-ovocito.....	63
4. Desarrollo embrionario post activación partenogenética de ovocitos grado I y II, en el grupo tratado con FSH y el grupo control.....	67
5. Efecto del tratamiento con eCG a gatas en anestro sobre la calidad de los complejos cúmulo-ovocito (CCOs).....	70
6. Desarrollo embrionario post activación partenogenética de ovocitos maduros recuperados de gatas tratadas con hCG.....	77
7. Desarrollo embrionario post activación partenogenética de ovocitos grado I y II, en los grupos estro, anestro, eCG y hCG.....	77

8. Resultados del análisis de citometría de flujo (Media \pm DE) en fibroblastos de gato doméstico sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.....	84
9. Resultados del análisis de citometría de flujo (Media \pm DE) en fibroblastos de güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.....	85
10. Resultados del análisis de viabilidad y tamaño celular en fibroblastos de gato doméstico sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.....	86
11. Resultados del análisis de viabilidad y tamaño celular en fibroblastos de güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.....	87
12. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones de gato doméstico generados por FIV posterior al tratamiento con eCG.....	93
13. Desarrollo <i>in vivo</i> de embriones generados por fecundación <i>in vitro</i> posterior al tratamiento con eCG.....	96
14. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones de gato doméstico generados por FIV con zona incluida o posterior a la remoción de la zona pelúcida (Zona libre).....	97
15. Desarrollo <i>in vitro</i> de embriones de gato doméstico y güiña generados por transferencia nuclear somática sin zona pelúcida en cultivo individual o agregado.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº	PÁGINA
EN EL TEXTO	
1. Imágenes de las subespecies de güiña. a) <i>Leopardus guigna tigrillo</i> (Molina, Región del Maule). b) <i>Leopardus guigna guigna</i> (Isla de Chiloé). c) <i>Leopardus guigna guigna</i> individuo melánico (Isla de Chiloé). d) <i>Leopardus guigna guigna</i> (Quetruleufu, Región de la Araucanía) (Napolitano <i>et al.</i> , 2014).....	15
2. Diagrama de flujo de la etapa 1 del diseño experimental.....	37
3. Diagrama de flujo de la etapa 2 del diseño experimental.....	38
4. Características morfológicas de los ovarios y CCOs de los grupos control y FSH. A: par de ovarios inactivos colectados de una gata en anestro del grupo control. B: par de ovarios colectados de una gata en anestro del grupo FSH posterior al tratamiento. C: CCOs inmaduros del grupo control, 4x. D: CCOs inmaduros del grupo FSH, 4x. E: CCOs del grupo control posterior a la MIV, 4x. F: CCOs del grupo FSH posterior a la MIV, 3,2x.....	64
5. Expresión relativa (\pm DE) de <i>FSHR</i> , <i>LHCGR</i> , <i>EGFR</i> , <i>PTGS2</i> , <i>EGR1</i> , <i>GDF9</i> y <i>GATM</i> , en los CCOs grado I y II de los grupos FSH y control (Anestro). Los valores fueron normalizados utilizando la media geométrica de los genes <i>GAPDH</i> y <i>SDHA</i> . (^A , ^B): Superíndices distintos indican diferencia significativa (P<0.05).....	66

<p>6. Conteo de células totales de los blastocistos y blastocistos protruyendo de los grupos control y FSH. A: Número de células totales de los blastocistos y blastocistos protruyendo de los grupos control y FSH, $P < 0,05$. B: Blastocisto del grupo control teñido con Hoechst 33342, 20x. C: Blastocisto del grupo FSH teñido con Hoechst 33342, 20x. D: Blastocisto protruyendo del grupo FSH teñido con Hoechst 33342, 20x...</p>	68
<p>7. Expresión relativa de los genes <i>OCT4</i>, <i>SOX2</i>, <i>NANOG</i>, <i>CDX2</i>, y <i>GATA6</i>. Expresión relativa (\pm DE) en relación al promedio geométrico de <i>GAPDH</i> y <i>SDHA</i>, en blastocistos de gato de 8 días de cultivo, generados en el grupo FSH y el grupo control (Anestro). (^A, ^B): Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0,05$).....</p>	69
<p>8. Características morfológicas de los ovarios y CCOs de los grupos Estro, Anestro y eCG. A: par de ovarios activos colectados de una gata del grupo Estro. B: par de ovarios inactivos colectados de una gata del grupo Anestro. C: par de ovarios colectados de una gata en anestro del grupo eCG posterior al tratamiento. D: CCOs inmaduros del grupo Estro, 4x. E: CCOs inmaduros del grupo Anestro, 3,2x. F: CCOs inmaduros del grupo eCG 2,5x. G: CCOs del grupo Estro posterior a la MIV, 4x. H: CCOs del grupo Anestro posterior a la MIV, 3,2x. I: CCOs del grupo eCG posterior a la MIV, 3,2x.....</p>	71
<p>9. Análisis de expresión génica en CCOs inmaduros de gatas tratadas con eCG. Expresión relativa (\pm DE). Valores fueron normalizados con el gen housekeeping <i>SDHA</i>. ^A, ^B: Superíndices distintos entre columnas de un mismo gráfico indican diferencia significativa ($P < 0,05$).....</p>	73

10. Complejos cúmulo-ovocito recuperados posterior al tratamiento con hCG. A) CCOs inmaduros colectados posterior al tratamiento con hCG. B) CCO madurado <i>in vivo</i> colectado posterior al tratamiento con hCG (3,2x).....	75
11. Tasa de maduración ovocitaria (Media \pm DS) en los grupos estro, anestro, eCG y hCG (hCG y hCG-IVM). ^{A-C} : Superíndices distintos indican diferencia significativa entre barras (P<0,05).....	75
12. Blastocistos y blastocistos protruyendo a los 8 días de cultivo en los grupos estro (A), anestro (B), eCG (C) y hCG (D). Blastocistos teñidos con Hoechst 33342 en los grupos estro (E), anestro (F), eCG (G) y hCG (H) (20x).....	78
13. Conteo de células totales de los blastocistos y blastocistos protruyendo de los grupos estro, anestro, eCG y hCG (Media, Min/Max). Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos (P<0,05).....	78
14. Análisis de expresión génica de los blastocistos y blastocistos protruyendo generados en los grupos Estro, Anestro, eCG y hCG. Los resultados fueron normalizados utilizando el gen housekeeping SDHA (P<0,05). Sobre cada barra se indica el valor de la media de cada grupo. ^{A, B} : Superíndices distintos indican diferencia significativa dentro del mismo gráfico. *: indica tendencia entre dos grupos (P \leq 0,1).....	80
15. Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo en los fibroblastos de gato doméstico (A: células en crecimiento, B: inhibición por contacto, C: privación de suero) y en los fibroblastos de güiña (D: células en crecimiento, E: inhibición por contacto, F: privación de suero).....	82

16. Expresión relativa (Media \pm D.E.) de <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> y de la razón <i>BAX/BCL2</i> en fibroblastos de gato doméstico sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia (Superíndices distintos indican diferencia significativa, $P < 0,05$).....	89
17. Expresión relativa (Media \pm D.E.) de <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> y de la razón <i>BAX/BCL2</i> en fibroblastos de güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia (Superíndices distintos indican diferencia significativa, $P < 0,05$).....	90
18. Nacimientos vivos de gatos domésticos generados por FIV. Primera cría de gato doméstico nacida por FIV (Fivy) con madre receptora y al primer mes de edad (A y B). Segunda cría de gato doméstico nacida por FIV (Chimuelo) con madre receptora y al mes de edad (C y D).....	95
19. Blastocistos de gato doméstico generados por fecundación <i>in vitro</i> (FIV) con y sin la presencia de zona pelúcida. A: Blastocistos de gato doméstico generados por FIV con presencia de zona pelúcida a los 8 días de cultivo (8x). B: Blastocistos de gato doméstico generados por FIV y cultivados sin la presencia de zona pelúcida, 8 días de cultivo (6,3x). C: blastocisto generado por FIV teñido con Hoechst 33342 (20x). D: blastocisto de gato doméstico generado por FIV y sin presencia de la zona pelúcida, teñido con Hoechst 33342 (20x).....	98
20. Diámetro (Media, Min/Max) de los blastocistos de gato generados por FIV sin presencia (Zona Libre) y con presencia de zona pelúcida (Zona Incluida). *: Indica diferencia significativa entre grupos ($P < 0,05$).....	99

21. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones clonados de gato doméstico en el sistema WOW. A) clon de gato cultivado individual (1x). B) clon de gato cultivado en agregado (2x). C) mórula de clones de gato cultivados en agregado (2x). D) blastocisto temprano generado a partir de clones de gato cultivados en agregado (2x).....	101
22. Blastocistos generados en el grupo güiña agregado 2x por transferencia nuclear somática heteroespecífica. A) blastocisto güiña calidad I generado por TNSh. B) blastocisto de güiña calidad II generado por TNSh. C) blastocisto de güiña calidad III generado por TNSh.....	103
23. Diámetro (Min/Max) de los blastocistos generados en los grupos gato individual (Gato 1x) gato agregado (Gato 2x) y güiña agregado (Güiña 2x). *: Indica tendencia entre los grupos ($P \leq 0,1$).....	103
24. Expresión relativa de los genes de pluripotencia <i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> y <i>NANOG</i> y de diferenciación <i>CDX2</i> y <i>GATA6</i> en los blastocistos de gato doméstico generados por fecundación <i>in vitro</i> y transferencia nuclear somática. Los valores fueron normalizados utilizando el gen housekeeping <i>SDHA</i> . ^{A,B} : Superíndices distintos dentro de un gráfico indican diferencia significativa ($P < 0,05$). *: indica tendencia entre dos grupos ($P \leq 0,1$).....	105

RESUMEN

Actualmente existe un aumento en los trabajos de investigación relacionados al desarrollo de técnicas de reproducción asistida en el gato doméstico con el propósito de implementar estas técnicas en especies de felinos amenazados. La güiña (*Leopardus guigna*) es una especie endémica de Chile, clasificada como vulnerable según la lista roja de la IUCN (International Union for Conservation of Nature). Debido a esto, la transferencia nuclear somática heteroespecífica (TNSh) podría ser una potencial herramienta para generar embriones de güiña utilizando ovocitos enucleados de gata doméstica y de esta manera a ayudar a su conservación. Sin embargo, los embriones generados por TNSh presentan un bajo potencial de desarrollo principalmente debido a una ineficiente reprogramación nuclear. Por lo cual la hipótesis de esta tesis fue “la transferencia de células somáticas de güiña a ovocitos de gata doméstica genera embriones clonados con similar morfología y expresión génica a los embriones clonados utilizando células de gato doméstico”.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró que el tratamiento con 200 UI de eCG mejoró la calidad morfológica y el patrón de expresión génica de los complejos cúmulo-ovocito (CCOs) colectados. Por lo cual este protocolo fue seleccionado para la posterior generación de embriones.

En cuanto a la sincronización del ciclo celular, se demostró que tanto los fibroblastos de gato doméstico como de güiña pueden sincronizarse en la fase G0/G1 por medio de los métodos de privación de suero e inhibición por contacto. Sin embargo, en el caso de los fibroblastos de güiña la exposición a estos tratamientos por más de tres días genera un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Por lo cual, se eligió la privación de suero por no más de tres días para la sincronización celular.

Adicionalmente, fue posible demostrar que los embriones de gato doméstico generados por FIV utilizando el tratamiento con eCG son capaces de desarrollarse tanto *in vitro* como *in vivo*, con la generación de crías vivas. Además, se demostró que la remoción de la zona pelúcida no afecta el potencial de desarrollo *in vitro* de los embriones de gato.

Finalmente, se demostró que en los embriones de gato doméstico generados por TNS la agregación embrionaria mejora el potencial de desarrollo *in vitro* aumentando la tasa de blastocistos. En el caso de los embriones de güiña generados por TNSh, solo los

embriones cultivados en agregado lograron alcanzar el estadio de blastocisto en un bajo porcentaje. Al realizar el análisis de expresión génica, se observó que los blastocistos clonados de gato doméstico presentaban una menor expresión de *OCT4* en comparación a los blastocistos generados por FIV. Por otro lado, solo uno de los embriones de güiña generados expresó *OCT4*, sin expresar ninguno de los otros genes de pluripotencia y diferenciación evaluados.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el ovocito de gata doméstica es capaz de reprogramar las células somáticas de güiña a través de la TNSh. Sin embargo, la mayoría de los embriones clonados de güiña quedan detenidos en el estadio de mórula y solo un bajo porcentaje de estos logran alcanzar el estadio de blastocisto al ser cultivados en agregado. Lo cual se podría deber a una ineficiente reprogramación nuclear

Palabras clave: Agregación embrionaria, expresión génica, embriones felinos.



ABSTRACT

Currently, there is an increment in the studies related to the development of assisted reproductive technologies in the domestic cat with the purpose of implement these techniques in the conservation of wild felids. The Kodkod (*Leopardus guigna*) is an endemic species from Chile and is classified as vulnerable by the red list of endangered species of the IUCN (International Union for Conservation of Nature). For these reasons, the interspecific somatic cell nuclear transfer (iSCNT) could be a potential tool for the production of kodkod embryos helping to the preservation of this species. However, it has been described that the embryos generated by iSCNT have a reduced developmental capacity, which might be caused by an inefficient nuclear reprogramming. Whereby the hypothesis of this study was “The transfer of somatic cells from kodkod into enucleated oocytes from domestic cat allows the production of cloned embryos with similar morphology and gene expression pattern to domestic cat cloned embryos”.

According to the results obtained, the treatment with 200 IU of eCG improved the morphological quality and the gene expression pattern of the collected oocytes. For these reasons, the eCG treatment was chosen for the *in vitro* embryo production by IVF, SCNT and iSCNT.

Regarding to the cell cycle synchronization, both domestic cat and kodkod fibroblasts can be arrested in the G0/G1 phase by the contact inhibition and serum starvation treatments. However, in the kodkod fibroblasts the treatment of both contact inhibition and serum starvation for more than three days had a negative effect on the cell viability. For this motive, the serum starvation for 1-3 days was selected for the synchronization of kodkod fibroblasts.

Additionally, the results of this study demonstrated that the domestic cat embryos generated by IVF using the eCG treatment are capable to develop *in vitro* and *in vivo* with the generation of live offspring. Furthermore, the results demonstrated that the zona pellucida removal did not affect the *in vitro* development of domestic cat embryos.

Finally, it was demonstrated that the embryo aggregation improved the developmental competence of the domestic cat embryos generated by SCNT. Regarding to the kodkod embryos generated by iSCNT, only the embryos cultured in aggregates reached the blastocyst stage in a low rate. In the gene expression analysis, was observed that the

domestic cat cloned embryos had a reduced expression of *OCT4* compared to the embryos generated by IVF. On the other side, only one of the kodkod embryos generated expressed *OCT4*, none of the remaining kodkod embryos expressed any of the pluripotency and differentiation genes evaluated.

It can be concluded that the domestic cat oocyte is capable to reprogram kodkod fibroblasts by iSCNT. However, a great proportion of the kodkod embryos remains arrested in the morula stage and a low proportion achieve the blastocyst stage. This might be due to an inefficient nuclear reprogramming by the domestic cat oocyte. More studies are needed to improve the low efficiency.

Keywords: Embryo aggregation, gene expression, felid embryos.



I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha aumentado progresivamente el trabajo de investigación relacionado al uso de variadas técnicas de reproducción asistida en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*). Esto es debido a que el gato doméstico es un valioso modelo para el estudio de enfermedades hereditarias análogas en los humanos (Pope, 2004). Pero principalmente porque se potencia como un modelo para el desarrollo de técnicas de reproducción asistida que puedan ser utilizadas en especies de felinos silvestres amenazados (Wildt, 1992). En la actualidad, 17 especies de felinos silvestres se encuentran clasificadas como amenazadas y 9 están cerca de estarlo según la lista roja de la International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2014). Esto ha motivado el uso de variadas técnicas de reproducción asistida para ayudar a la conservación de estas especies, utilizando al gato doméstico como modelo experimental. Actualmente, la fecundación *in vitro* (FIV) es la técnica más utilizada en la producción *in vitro* de embriones tanto en el gato doméstico como en distintas especies de felinos silvestres. Se ha reportado el nacimiento de crías vivas generadas por FIV en distintas especies de felinos silvestres amenazados, comprobando la eficiencia de esta técnica en la conservación de especies (Pope *et al.*, 2006b; Pope *et al.*, 2012). Sin embargo, la escasa disponibilidad y la dificultad para obtener gametos en estas especies, limitan el uso de la FIV en la reproducción de felinos silvestres amenazados. Frente a este inconveniente, la transferencia nuclear somática (TNS) se proyecta como una técnica que podría ayudar a la reproducción y conservación de especies amenazadas. Shin *et al.* (2002) reportaron el nacimiento del primer gato doméstico generado a través de la transferencia nuclear de una célula diferenciada a un ovocito maduro en metafase II. Lo cual dio precedentes, para la utilización de la transferencia nuclear somática en otras especies de felinos silvestres. La transferencia nuclear somática heteroespecífica (TNSh) es una derivación de la TNS, que consiste en la transferencia de una célula somática de una especie determinada a un ovocito maduro proveniente de una especie distinta. Por esta razón, la TNSh permitiría la utilización de ovocitos de animales domésticos como citoplasto receptor para la generación de embriones de especies amenazadas, eliminando de esta manera, la necesidad de coleccionar gametos en las especies silvestres. En relación a esto, hace más de 10 años se reportó el nacimiento de crías vivas de gato salvaje africano (*Felis silvestris*

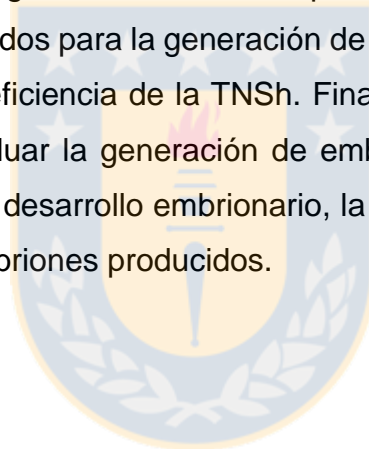
lybica) las cuales fueron generadas mediante TNSh utilizando ovocitos maduros de gata doméstica (Gómez *et al.* 2004). Convirtiéndose en los primeros felinos silvestre nacidos vivos generados mediante transferencia nuclear somática. Esto demostró que a través de la TNSh los ovocitos de gata doméstica pueden reprogramar células somáticas de otras especies de felinos, generando embriones viables que son capaces de desarrollarse a término. Posteriormente, Gómez *et al.* (2008) reportaron el nacimiento de crías vivas de gato de las arenas (*Felis margarita*) a través del mismo método. A partir de entonces, una serie de estudios han descrito la generación de embriones mediante TNSh en distintas especies de felinos (*Prionailurus rubiginosus*, *Felis nigripes*, *Pardofelis marmorata* y *Prionailurus planiceps*). Sin embargo, ninguno de los embriones transferidos logró desarrollarse a término (Gómez *et al.*, 2009b; Thongphakdee *et al.*, 2010).

La baja tasa de desarrollo de embriones generados por TNSh se debe a que la reprogramación de una célula somática en un ambiente heterólogo es un proceso aún ineficiente (Blelloch *et al.*, 2006). Esto está asociado a una serie de factores como son la calidad y competencia de los ovocitos utilizados (Yu *et al.*, 2009), la sincronización del ciclo celular entre el donante de núcleo y el citoplasto receptor (Campbell *et al.*, 1996), y la reprogramación de los patrones de metilación y de expresión génica en los embriones generados por TNS (Dean *et al.*, 2001). Adicionalmente, la TNSh suma otra serie de factores que afectan la eficiencia de reprogramación y la capacidad de desarrollo, los cuales están principalmente relacionados a la distancia filogénica que existe entre las especies que aportan la célula donante de núcleo y el citoplasto receptor. Entre estos se encuentran, la heteroplasma de mitocondrias en los embriones generados por TNSh y las diferencias en el momento de la activación del genoma embrionario entre las especies participantes (Loi *et al.*, 2011). Por estos motivos, se hacen necesarios nuevos estudios que permitan la generación de información para ayudar a mejorar la baja eficiencia de la TNSh.

En Chile, existen cinco especies de felinos silvestres distribuidos a lo largo del territorio. Entre estas, la güiña o Kodkod (*Leopardus guigna*) es la única cuyo estado de conservación es clasificado como vulnerable según la lista roja de especies amenazadas de la IUCN. Debido a su hábitat restringido y a su reducido número poblacional, el estado

de conservación de la güiña se ve fuertemente amenazado por la caza y la tala del bosque nativo (Napolitano *et al.*, 2015). Frente a esta situación, la TNSh se presenta como una potencial herramienta que podría ayudar a rescatar el material genético de la güiña, aportando de esta manera a su reproducción y conservación.

Este trabajo se centrará en evaluar la generación de embriones de güiña mediante transferencia nuclear somática heteroespecífica utilizando ovocitos maduros de gata doméstica como citoplasto receptor. Por lo cual, la primera etapa de este estudio constará de dos experimentos. El primer experimento se centrará en implementar protocolos de estimulación ovárica y producción *in vitro* de embriones en la gata doméstica. Mientras que el segundo experimento se destinará a evaluar la sincronización del ciclo celular en líneas celulares de güiña y gato doméstico. Los protocolos que entreguen los mejores resultados serán seleccionados para la generación de embriones clonados de güiña, con el propósito de mejorar la eficiencia de la TNSh. Finalmente, la segunda etapa de este estudio se centrará en evaluar la generación de embriones de güiña mediante TNSh, analizando la capacidad de desarrollo embrionario, la calidad morfológica y el patrón de expresión génica de los embriones producidos.



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Ciclo reproductivo de la gata doméstica

Para la correcta comprensión y aplicación de las técnicas de reproducción asistida es importante comprender del ciclo reproductivo de la gata doméstica. La gata doméstica es una hembra poliéstrica estacional, cicla continuamente durante la época reproductiva que comprende primavera y verano, cuando hay un aumento de las horas de luz en el día. Durante las estaciones de otoño e invierno, al disminuir las horas de luz diarias, se produce el período anestro estacional, en el cual no hay comportamiento ni actividad reproductiva (Verstegen, 1998; Feldman y Nelson, 2004.). En la gata la ovulación es inducida por la cópula, requiriendo en algunos casos más de un estímulo para asegurar que esta se produzca (Concannon *et al.*, 1980). El ciclo estral consta de cuatro fases: proestro, estro, diestro, y anestro (Feldman y Nelson, 2004).

La fase folicular la comprenden el proestro y el estro, dura en promedio 7,5 días, y se caracteriza por un aumento en los niveles plasmáticos de estradiol 17- β (>20 pg/mL). El proestro es de corta duración (12-48 horas), hay atracción del macho, pero sin aceptación de la monta, y desarrollo folicular (desde 1 a 1,5 mm) con activa síntesis y secreción de estradiol. El estro tiene una duración promedio de 6-7 días, durante este período se produce la aceptación de la monta. Durante el estro se produce la máxima síntesis y secreción de estradiol y desarrollo folicular (desde 1,5 a 2-3 mm) (Feldman y Nelson, 2004). La ovulación es desencadenada producto de la estimulación vaginal que ocurre durante la monta, gatillando un aumento en la liberación de GnRH por la zona medioventral del hipotálamo y aumentando la liberación de LH por la hipófisis. El aumento de LH ocurre 10 min post-monta esta y permanece elevada por 1-8 horas, alcanzado el pico una hora post-monta (Concannon *et al.*, 1980).

La ovulación ocurre 24-48 horas posterior a la administración exógena de gonadotrofinas o GnRH (Verstegen, 1998) y la tasa ovulatoria es de 2-11 ovocitos con un promedio de $5,6 \pm 1,9$ (Tsutsui y Stabenfeldt, 1993). Si no hay ovulación, la gata pasa por un período de interestro que dura en promedio 10 días (rango 1-2 semanas), en el cual hay inactividad ovárica y sexual y el estradiol plasmático desciende a niveles basales (≤ 20 pg/mL) (Shille *et al.*, 1979).

La fase luteal corresponde al diestro, y se caracteriza por la predominancia de progesterona (niveles plasmáticos $>1-2$ ng/mL), la cual es secretada por los cuerpos lúteos (CLs) resultantes de la ovulación inducida por el coito. El diestro puede resultar en pseudopreñez o gestación. Durante la pseudopreñez se produce ovulación pero sin una fertilización exitosa, formándose CLs que perdura en el ovario 35 días aproximadamente. La progesterona secretada por los CLs inhiben la secreción de GnRH y al eje hipotálamo-hipófisis-gonadal. Esta fase es seguida por un período de interestro por lo cual la gata vuelve a ciclar después de 40-50 días (Feldman y Nelson, 2004). La gestación se produce al haber ocurrido una ovulación y fertilización exitosa, permitiendo el desarrollo embrionario. Hasta los 14-20 días los niveles de progesterona son similares a los de la pseudopreñez, luego los niveles aumentan en las gatas preñadas. Los CLs producen progesterona hasta los 40-50 días. A partir de los 40 días la gestación es principalmente mantenida por la progesterona placentaria. La gestación dura en promedio 66 días (rango 56-69) y la camada es en promedio de tres crías (rango 1-5) (Feldman y Nelson, 2004).

2. Desarrollo embrionario temprano del gato doméstico

Posterior a la ovulación el ovocito permanece en el oviducto por 3-4 días y la fertilización se produce en el ampulla dentro de 30 horas post ovulación (Swanson *et al.*, 1994). Luego de llevarse a cabo la fecundación se forma el cigoto, el cual posteriormente comienza a dividirse sucesivamente. Sesenta y cuatro horas después de la cópula, los embriones de gato se encuentran en estadio de 1-4 células. Posteriormente, a los tres días post cópula los embriones se encuentran en estadio de 5-8 células, y a los cuatro días en estadio de 9-16 células. El estadio de mórula se forma al día cinco post cópula, y entre el quinto y sexto día post cópula los embriones migran desde el oviducto al cuerno uterino en estadio de mórula compacta y en menor grado como blastocisto temprano (Swanson *et al.*, 1994). Una vez en el cuerno uterino, al día 8 el blastocisto mide entre 500-600 μm de diámetro. Al día 10 los blastocistos que protruyen completamente miden en promedio 2300x1000 μm de diámetro y los que están por protruir miden entre 1500x1000 μm diámetro (Tsutsui y Stabenfeldt, 1993). Los blastocistos se distribuyen equitativamente entre ambos cuernos y la implantación ocurre entre los días 12-13 post cópula (Tsutsui y Stabenfeldt, 1993; Swanson *et al.*, 1994)

La primera diferenciación celular se produce en el estadio de blastocisto con la formación de dos poblaciones celulares, el macizo celular interno (MCI) y el trofoblasto (TB). El MCI es una población de células pluripotentes que dará origen principalmente a tejido embrionario y también a tejido extraembrionario. Mientras que el TB es la población de células más externa que rodean al blastocele, y que dará origen a tejido extraembrionario. Ambas poblaciones están separadas por la cavidad llamada blastocele. En el estadio de blastocisto tardío ocurre la segunda diferenciación celular, las células más externas del MCI en contacto con el blastocele se diferencian a hipoblasto, el cual posteriormente dará origen a las membranas extraembrionarias. Mientras que células más internas del MCI forman el epiblasto el cual posteriormente dará origen al embrión (Dard *et al.*, 2008; Filliers *et al.*, 2012).

3. Producción *in vitro* de embriones felinos

3.1. Maduración *in vitro* de ovocitos de gata doméstica.

Desde el desarrollo fetal los ovocitos se encuentran arrestados en la profase de la primera división meiótica (profase I), en el estadio de vesícula germinal, lo que puede durar meses o años dependiendo de la especie. El pico preovulatorio de LH reanuda la meiosis del ovocito desencadenando una disminución de los niveles de AMPc en el citoplasma ovocitario y con ello, un aumento en la actividad del MPF (factor promotor de la maduración). Al aumentar la actividad del MPF el ovocito reanuda la meiosis, expulsando el primer cuerpo polar, quedando detenido en la metafase de la segunda división meiótica o metafase II (MII). Se describen dos picos de mayor actividad del MPF, el primero ocurre cuando se reanuda la meiosis y el segundo es un aumento sostenido que ocurre durante el arresto en metafase II. Al momento de la fertilización, disminuye el MPF y el ovocito finaliza la segunda división meiótica (Heikinheimo y Gibbons, 1998; Jaffe y Norris, 2010).

La maduración *in vitro* de ovocitos (MIV) es un procedimiento asociado a las técnicas de producción *in vitro* de embriones. Durante la MIV, ovocitos inmaduros en estadio de vesícula germinal son sometidos a condiciones de cultivo específicas por un tiempo determinado, para que de esta manera logren avanzar al estadio de MII. De esta forma los ovocitos se encuentran aptos para su uso en la producción *in vitro* (PIV) de embriones.

Los ovarios de gata se pueden conseguir fácilmente en una clínica veterinaria y los CCOs pueden ser colectados a partir de estos ovarios sin mayores complicaciones. Por esta razón, la MIV junto con la FIV y transferencia de embriones permiten facilitar el uso del gato doméstico como modelo para la investigación de enfermedades genéticas y biología del desarrollo (Johnston *et al.*, 1989). Además, permite el rescate de material genético en individuos de especies amenazadas que han muerto o que por razones médicas se debieran someter a una ovariectomía (Johnston *et al.*, 1991).

Los primeros estudios sobre MIV de ovocitos de gata doméstica se realizaron a finales de la década de los 80 (Johnston *et al.*, 1989). A partir de entonces, se ha desencadenado un aumento progresivo en los trabajos relacionados a la PIV de embriones de gato. Sin embargo, las condiciones óptimas para la MIV de ovocitos de gata no están completamente definidas. La eficiencia de la MIV de ovocitos de gata es variada, y generalmente baja comparada a la de especies más estudiadas como los animales de producción (>80%), siendo la tasa de MIV de ovocitos de gata de un 40-60% (Farstad, 2000). En relación a esto, se ha descrito que los ovocitos de gata madurados *in vitro* presentan una menor actividad de los factores MPF y MAPK en comparación a los madurados *in vivo*, lo que puede ser debido a una incompleta maduración citoplasmática (Bogliolo *et al.*, 2004). Además, incluso bajo condiciones óptimas de cultivo, los ovocitos de gata madurados y fertilizados *in vitro*, presentan una baja capacidad de desarrollo en comparación a los ovocitos madurados y fertilizados *in vivo*, quedando la mayoría detenidos en el estadio de mórula (Roth *et al.*, 1994). La tasa de fertilización de los ovocitos de gata madurados *in vitro* es menor (40-50%) comparada a la de los ovocitos madurados *in vivo* (60-80%). Además, en el gato doméstico, la tasa de blastocistos generados por FIV a partir de ovocitos madurados *in vitro* es de 10-50%, mientras que en la FIV, al utilizar ovocitos madurados *in vivo* la tasa de blastocistos aumenta a 40-50% (Farstad *et al.*, 2000).

En distintos estudios se ha demostrado que factores como la calidad de los ovocitos (Wood y Wildt, 1997), el tiempo de cultivo (Goodrowe *et al.*, 1991; Kańska-Książkiewicz *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2008), el medio de cultivo y la suplementación de este (Johnston *et al.*, 1993) y la época del año (Spindler y Wildt, 1999) afectan el potencial de los ovocitos de gata para madurar *in vitro*, lo que podría afectar también su desarrollo embrionario posterior.

3.2. Producción *in vitro* de embriones en el gato doméstico

Las técnicas de PIV de embriones en el gato doméstico corresponden a la activación partenogenética (AP), la fecundación *in vitro* (FIV), la inyección espermática intracitoplasmática (ICSI), y la transferencia nuclear somática (TNS).

Activación partenogenética

La AP se caracteriza por ser una técnica simple de realizar que consiste en someter a ovocitos en MII a estímulos físicos, mecánicos, o químicos que aumentan los niveles de Ca^{2+} citoplasmático. Estos estímulos desencadenan una serie de eventos moleculares en el ovocito permitiéndole reanudar la meiosis y comenzar el desarrollo embrionario, sin necesidad del aporte espermático. Sin embargo, estos embriones no son capaces de desarrollarse a término (Grabiec *et al.*, 2007). A pesar de esto, la activación de ovocitos es necesaria para técnicas como la ICSI (Bogliolo *et al.*, 2001) y la TNS, donde el desarrollo embrionario no se induce por el contacto entre el espermatozoide y el ovocito (Kharche y Birade, 2013). Además, la AP es comúnmente utilizada para evaluar la competencia ovocitaria y condiciones apropiadas para el cultivo *in vitro* de embriones (Kharche y Birade, 2013).

Fecundación in vitro

El primer reporte de FIV en el gato doméstico se realizó en 1970 (Hamner *et al.*, 1970). Posteriormente, se demostró que en el gato doméstico, posterior a la FIV, los ovocitos son capaces de sostener el desarrollo a término con el nacimiento de crías vivas (Goodrowe *et al.* 1988). Actualmente la FIV es ampliamente utilizada en la PIV de embriones de gato doméstico y felinos silvestres (Pope *et al.*, 2006), debido a que es un método sencillo y menos costoso en comparación a técnicas como la ICSI y TNS. Sin embargo, los embriones de gato generados por FIV presentan una menor capacidad de desarrollo en comparación a los embriones generados *in vivo* (Roth *et al.*, 1994). El porcentaje de los blastocistos producidos a partir de ovocitos madurados y fertilizados *in vitro* es menor en comparación a los madurados y fertilizados *in vivo* (10-50% vs 50-66% respectivamente) (Farstad, 2000). Además, los embriones de gato doméstico generados *in vitro* generalmente experimentan un bloqueo del desarrollo en el estadio de mórula. Se ha propuesto que el bloqueo del desarrollo en el estadio de mórula, es atribuible a

condiciones deficientes en la MIV de ovocitos y el cultivo de embriones tempranos (Wolfe y Wildt 1996). También, se postula que este desarrollo restringido es debido al escaso conocimiento de los requerimientos de cultivo y de cómo los ovocitos y embriones de gato responden a condiciones específicas (Sananmuang *et al.*, 2011). Sin embargo, existen grupos de investigación que han logrado superar esta problemática, reportando tasas de blastocistos en el gato doméstico de aproximadamente 50-80% al día 6 (Herrick *et al.*, 2007), día 7 y día 8 de cultivo (Freistedt *et al.*, 2001; Karja *et al.*, 2002b; Pope *et al.*, 2006; Pope 2014).

Inyección espermática intracitoplasmática

La ICSI consiste en la microinyección directa de un espermatozoide en el citoplasma ovocitario, es un método más complejo y costoso que la FIV debido a que implica la micromanipulación de gametos. Sin embargo, actualmente está adquiriendo gran relevancia debido a que permite aumentar la eficiencia de la PIV de embriones en los casos de baja motilidad y calidad espermática, lo cual es consistente en varias especies de felinos silvestres (Pope *et al.*, 1998). En el año 1998, se reportó el primer nacimiento de tres crías de gato doméstico mediante ICSI a partir de ovocitos madurados *in vivo* (Pope *et al.*, 1998). Sin embargo la tasa de blastocistos generados en la ICSI es significativamente menor comparada a la FIV (Pope *et al.*, 1998). Posteriormente, se reportó el nacimiento de crías de gato doméstico mediante ICSI a partir de ovocitos madurados *in vitro* (Gómez *et al.* 2000). Sin embargo, al utilizar ovocitos madurados *in vitro* se observó una menor tasa de división y de blastocistos producidos en comparación a utilizar ovocitos madurados *in vivo* (Gómez *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha demostrado que es posible generar embriones de gato mediante ICSI a partir de ovocitos madurados *in vitro* y utilizando semen descongelado de origen epididimal, lo cual podría ser de gran relevancia para la conservación de felinos silvestres amenazados (Bogliolo *et al.*, 2001).

Transferencia nuclear somática

La TNS es una técnica mucho más compleja y presenta una menor eficiencia en comparación a las anteriormente mencionadas, debido a que consiste en utilizar una célula diferenciada como donante de núcleo para un ovocito enucleado que cumple el rol

de citoplasto receptor. A pesar de su baja eficiencia, la TNS ha adquirido gran relevancia debido a que permite preservar completamente la información genética de animales de gran valor (Vajta y Gjerris, 2006). En el año 2002 nació el primer gato doméstico producido mediante transferencia nuclear somática, lo cual se logró al utilizar ovocitos madurados *in vitro* y células del cúmulo como donante de núcleo. Mientras que el uso de fibroblastos adultos como donante de núcleo no generó desarrollo a término de los embriones transferidos (Shin *et al.*, 2002). Posteriormente, fue reportado el nacimiento de crías de gato doméstico mediante TNS al utilizar fibroblastos fetales y fibroblastos adultos como células donantes de núcleo (Yin *et al.*, 2005). No se encontraron diferencias significativas en las tasas de fusión, de división, y de blastocistos al utilizar fibroblastos fetales o adultos como donante de núcleo (Yin *et al.*, 2005).

Los avances en transferencia nuclear somática en el gato doméstico han permitido el desarrollo de estudios de transgénesis en esta especie. En este estudio que ya tiene 10 años, se generaron los primeros gatos domésticos transgénicos mediante TNS, los cuales expresaban la proteína fluorescente roja en todos sus tejidos (Yin *et al.*, 2008). En este caso, el transgén fue introducido en la célula donante de núcleo mediante un vector retroviral. De igual manera, se generó un gato doméstico transgénico para la proteína fluorescente verde mediante TNS, utilizando vectores lentivirales para introducir el transgén en las células donante de núcleo (Gómez *et al.* 2009a). Ambos estudios tienen como objetivo potenciar el uso del gato doméstico como un modelo biomédico para el estudio de enfermedades análogas en los humanos. Demostrando que estas técnicas podrían ser implementadas para generar animales genéticamente idénticos, y que lleven integrados genes correspondientes para enfermedades humanas específicas.

3.3. Producción *in vitro* de embriones en felinos silvestres

El avance en el desarrollo de variadas técnicas de reproducción asistida en el gato doméstico ha potenciado la aplicación de estas técnicas en distintas especies de felinos silvestres, como un método que ayudaría a la conservación de estas especies (Pope *et al.*, 2006a).

Fecundación in vitro en felinos silvestres.

Entre las técnicas de reproducción asistida la FIV se caracteriza por ser una de las más utilizadas en diversas especies de felinos silvestres. Hasta la fecha, se ha reportado el nacimiento de crías vivas mediante FIV en 8 especies de felinos silvestres amenazados. En 1990 se reportó el nacimiento de tres crías vivas de tigre (*Panthera tigris*) mediante la transferencia de embriones generados por FIV a una hembra receptora (Donoghue *et al.*, 1990), convirtiéndose en los primeros felinos silvestres nacidos mediante una técnica de generación *in vitro* de embriones. A partir de entonces, se ha reportado el nacimiento de crías vivas generadas mediante FIV en varias especies de felinos silvestres de pequeño tamaño. En 1993 se produjo el nacimiento de una cría de gato salvaje asiático (*Felis silvestris ornata*) mediante la transferencia de embriones generados por FIV a una gata doméstica receptora (Pope *et al.*, 1993; Pope, 2000). Esto demostró que la gata doméstica puede ser utilizada como vientre receptor para la transferencia de embriones de especies estrechamente relacionadas. En el año 2000, el mismo grupo de investigación reportó el nacimiento de una cría de gato salvaje africano (*Felis silvestris lybica*) mediante FIV. Los embriones generados por FIV fueron posteriormente criopreservados y luego transferidos a una gata doméstica receptora (Pope *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2003), demostrando que la criopreservación de embriones es un método que permitiría conservar la información genética en felinos silvestres amenazados. Posteriormente, se reportó el nacimiento de una cría de gato serval (*Leptailurus serval*) por FIV (Pope *et al.*, 2005). Un año después, el mismo grupo reportó el nacimiento de una cría de gato pescador (*Prionailurus viverrinus*) y cinco crías de gato caracal (*Caracal caracal*) generadas por FIV, siendo tres de estas crías de caracal generadas a partir de la transferencia de embriones criopreservados (Pope *et al.*, 2006b). Más recientemente, en el año 2010 se produjo el nacimiento de dos crías de gato del desierto o gato de las arenas (*Felis margarita*), posterior a la transferencia de embriones generados por FIV (Herrick *et al.*, 2010). En el año 2012, se reportó el nacimiento de tres crías de gato patinegro (*Felis nigripes*) como resultado de la transferencia de embriones criopreservados producidos por FIV a una gata doméstica receptora (Pope *et al.*, 2012). Esta serie de investigaciones a lo largo de las dos últimas décadas, han demostrado fehacientemente que la FIV es una técnica que permite aumentar el potencial reproductivo en distintas especies de felinos silvestres, convirtiéndose a la vez, en una

herramienta de utilidad para la conservación de estas especies. Sin embargo, el uso de la FIV para la conservación de felinos silvestres amenazados también presenta una serie de complicaciones, siendo el principal inconveniente la baja disponibilidad y la dificultad relacionada a la obtención de gametos de estas especies, debido al reducido número poblacional, su escasa distribución, y a todos los resguardos relacionados a su protección.

Transferencia nuclear somática heteroespecífica (TNSh) en felinos silvestres

Frente al limitado número y la escasa disponibilidad de gametos en los felinos silvestres amenazados, la TNSh se potencia como una herramienta que podría ayudar a la conservación de estas especies. El ovocito de gata doméstica es capaz de cumplir el rol de citoplasto receptor para células de felinos silvestres donantes de núcleo, eliminando la necesidad de obtener gametos de estas especies (Gómez *et al.*, 2003). En el año 2003 se produjo el nacimiento del primer gato salvaje africano generado mediante TNSh "Ditteaux", dos meses después nacieron otras dos crías "Miles y Ottis" todos clones del mismo macho de gato salvaje africano, siendo estas las primeras de crías de una especie de felino silvestre nacidas mediante TNSh (Gómez *et al.*, 2004). En el año 2005, Madge y Katie dos clones hembras de gato salvaje africano dieron a luz a cinco y tres crías respectivamente, al ser cruzadas con Ditteaux el primer gato salvaje africano clonado (Audubon Nature Institute). Esto demostró que a través de la TNSh, el ovocito de gata doméstica es capaz de reprogramar células de especies estrechamente relacionadas, y que la transferencia de estos embriones a una gata doméstica receptora permite el nacimiento de crías vivas. Además, se demostró que los animales nacidos por esta vía son capaces de desarrollarse y reproducirse normalmente, para finalmente parir crías saludables. Este acontecimiento abrió las puertas para que numerosos grupos de investigación en todo el mundo comenzarán a utilizar la TNSh para reproducir distintas especies de felinos silvestres amenazados.

Posteriormente, en el año 2008 se produjo el nacimiento de nueve crías aparentemente sanas de gato de las arenas mediante TNSh. Sin embargo, cinco de estas crías murieron dentro de las 24 horas posterior al parto debido a problemas respiratorios, y otras cuatro debido a neumonía por aspiración, la última de estas sobrevivió hasta los dos meses de edad (Gómez *et al.*, 2008). A partir de entonces, se han publicado una serie de

investigaciones en torno al uso de la TNSh en distintas especies de felinos silvestres amenazados, pero ninguno de estos trabajos ha logrado producir gestaciones a término en estas especies. Ultimamente se ha reportado la generación *in vitro* de embriones de gato herrumbroso (*Prionailurus rubiginosus*) y de gato patinegro (*Felis nigripes*) mediante TNSh (Gómez *et al.* 2009b). Estos embriones fueron capaces de desarrollarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Sin embargo, al ser transferidos a una gata doméstica los embriones de gato herrumbroso no generaron gestación, mientras que los embriones de gato patinegro tuvieron una tasa de implantación de solo 2,9%, y los fetos después de un tiempo fueron reabsorbidos entre los días 30-40 de gestación. Posteriormente, se logró generar embriones de gato jaspeado (*Pardofelis marmorata*) y de gato cabeza plana (*Prionailurus planiceps*) mediante la transferencia de células somáticas de estas especies a ovocitos enucleados de gata doméstica (Thongphakdee *et al.* 2010). Estos embriones fueron capaces de desarrollarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, pero no fueron capaces de producir gestación al ser transferidos a una gata doméstica receptora (Thongphakdee *et al.* 2010).

En resumen, se ha demostrado que a través de la TNSh es posible reproducir especies de felinos silvestres amenazados, y que estas crías son capaces de desarrollarse y reproducirse normalmente. Sin embargo, la TNSh es una técnica compleja que aún presenta una baja eficiencia, en la que solo un pequeño porcentaje de embriones transferidos logran desarrollarse a término. Aparentemente esto se ve acrecentado cuando la distancia filogenética entre ambas especies aumenta, por lo cual es evidente, que es necesario realizar más estudios para mejorar la baja eficiencia relacionada a la TNSh.

4. Especies de felinos silvestres endémicos en Chile

En Chile habitan cinco especies de felinos silvestres: el puma (*Puma concolor*), el gato colocolo (*Leopardus colocolo*), el gato de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), el gato jacobita (*Leopardus jacobita*), y la güiña (*Leopardus guigna*) (Iriarte 2008). De acuerdo a la Lista Roja de especies amenazadas de la IUCN: el puma es considerada una especie de preocupación menor, mientras que el gato colocolo y de geoffroyi están cerca de

considerarse especies amenazadas, el gato jacobita se considera una especie en peligro, y la güiña es considerada una especie vulnerable (IUCN, 2014).

Características y estado de conservación de la güiña (Leopardus guigna).

La güiña (*Leopardus guigna*, Molina 1972) es el felino más pequeño que habita en América, con un peso promedio de 2,2 kilos. y la longevidad de la especie supera los 11 años de vida (Nowell y Jackson, 1996). Se describen dos subespecies de güiña *Leopardus guigna guigna* y *Leopardus guigna tigrillo* presentes en el territorio chileno (Napolitano *et al.*, 2014) (Figura 1). Se estima que el área de distribución geográfica de la güiña es de 300.000 Km², la más reducida de cualquier otro felino en América (Napolitano *et al.*, 2015). La güiña presenta una distribución geográfica restringida a las zonas centro y sur de Chile, y a las zonas Andinas adyacentes de Argentina (Redford y Eisenberg 1992). En el sur de Chile el hábitat de la güiña está fuertemente asociado a los bosques Valdivianos y de Araucarias (Dunstone *et al.*, 2002). Debido a su restringida distribución, la güiña es una especie muy susceptible a la pérdida de hábitat, siendo este el principal motivo de su bajo número poblacional (Nowell y Jackson 1996). Se estima que la población efectiva total de la güiña es menor a los 10.000 individuos adultos reproductores, con una tendencia en disminución debido a la pérdida de hábitat y a la persecución. Además, posiblemente no hayan subpoblaciones mayores a los 1000 individuos adultos reproductores (Napolitano *et al.*, 2015). Se sospecha de una declinación en la población de la güiña de al menos 30% en los pasados 18 años, debido a la excesiva destrucción del hábitat para las plantaciones de bosques de pinos. Esta reducción no ha cesado y no es reversible a corto plazo, prediciéndose que también continuará a futuro (Napolitano *et al.*, 2015). Actualmente la güiña está incluida en el apéndice II de la CITES, y es una especie protegida por la legislación Chilena y Argentina (Nowell y Jackson 1996).

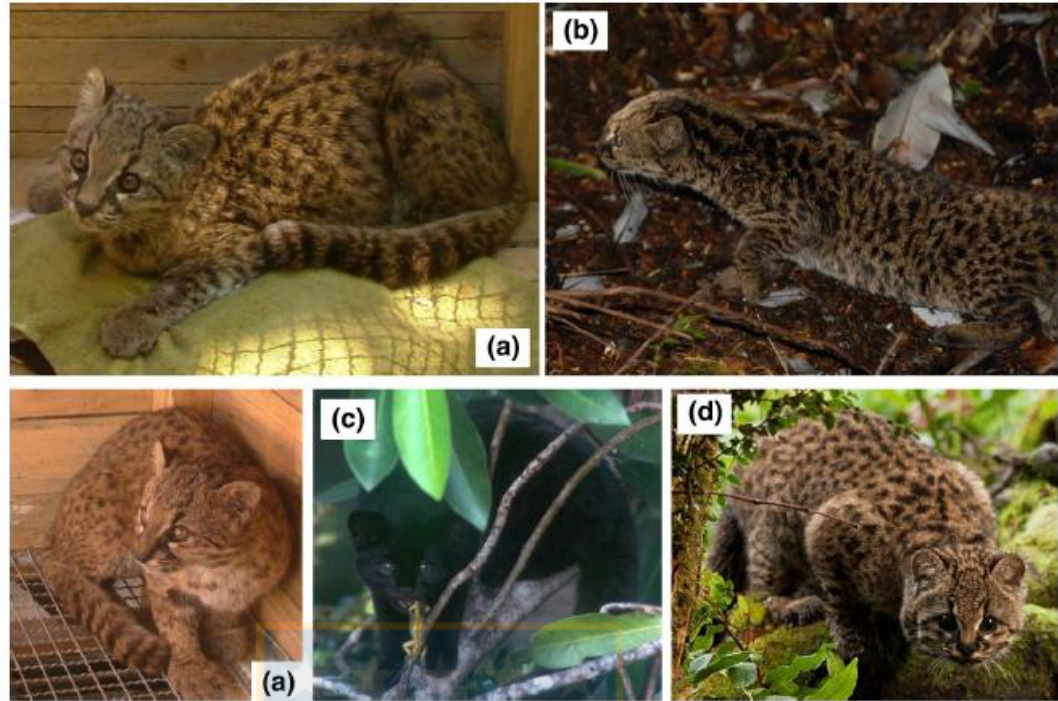


Figura 1. Imágenes de las subespecies de güiña. a: *Leopardus guigna tigrillo* (Molina, Región del Maule). b: *Leopardus guigna guigna* (Isla de Chiloé). c: *Leopardus guigna guigna* individuo melánico (Isla de Chiloé). d: *Leopardus guigna guigna* (Quetruleufu, Región de la Araucanía) (Napolitano *et al.*, 2014).

TNS heteroespecífica posible herramienta de conservación de la güiña.

A pesar de que no se ha reportado información respecto al ciclo reproductivo de la güiña, se presume que se trataría de una especie de ciclo estral estacional y de ovulación inducida como la mayoría de los felinos. Por otro lado, se ha descrito que la gestación de la güiña tiene una duración promedio de 72-78 días, con una camada promedio de 1-3 crías (Nowell y Jackson 1996), similar a lo que ocurre en el gato doméstico.

Un factor importante de destacar, es que las especies de felinos pertenecientes al género *Leopardus* incluida la güiña, se caracterizan por presentar 36 pares de cromosomas, mientras que el resto de las especies pertenecientes a la familia *Felidae* presentan 38 pares de cromosomas (Slattery *et al.*, 1994). A pesar de este factor, se ha descrito descendencia viable posterior a la cruce de gato de Geoffroyi con gato doméstico, generando crías híbridas con 37 pares de cromosomas, los denominado Safari cats, utilizados en estudios genéticos (Lyons *et al.*, 2009). Por lo que, la diferencia en el número

de cromosomas aparentemente no sería un factor limitante en la generación de embriones de güiña mediante TNSh.

Por los datos anteriormente mencionados, y por el hecho de que presenta características morfológicas similares a las de un gato doméstico, la güiña se presenta como un buen candidato para la generación de embriones mediante TNSh. Para lo cual sería posible utilizar a la gata doméstica tanto como donante de ovocitos usados como citoplasto receptor y como receptoras de los embriones producidos, lo cual permitiría el desarrollo *in vivo* de los embriones generados por medio de esta técnica. Ayudando de esta manera al rescate del material genético en esta especie, y por lo tanto a su conservación.

5. Factores que afectan la eficiencia de la TNS heteroespecífica

Influencia de calidad ovocitaria en la eficiencia de la TNSh

Independientemente de la técnica utilizada para la producción de embriones, un punto común es la disponibilidad de ovocitos maduros competentes. Un ovocito competente es aquel que posee los factores moleculares que le permiten una adecuada maduración nuclear y citoplasmática para poner en marcha el programa de desarrollo embrionario (Latham y Schultz, 2001; Hussein *et al.*, 2006; Leroy *et al.*, 2008). Durante la maduración, el ovocito acumula factores maternos (ARNs y proteínas) que serán necesarios para completar la meiosis, comenzar las primeras divisiones celulares, y generar la activación del genoma embrionario. Lo cual le permite soportar el desarrollo hasta estadios más avanzados, como el de blastocisto (Latham y Schultz, 2001). La adquisición de la competencia ovocitaria, requiere una permanente e íntima relación entre los ovocitos y el ambiente folicular. Se ha demostrado que *in vitro*, esta competencia va a depender de factores como el tamaño de los folículos de los cuales se extrajeron los ovocitos, la época del año (principalmente en especies estacionarias), las condiciones de cultivo y las características morfológicas del ovocito (Naoi *et al.*, 2008). Independientemente del origen de los ovocitos, la optimización de las condiciones de maduración puede modular la competencia ovocitaria y con ello el éxito del desarrollo embrionario.

En la gata doméstica la calidad morfológica de los complejos cúmulo-ovocitos (CCOs) refleja diferencias funcionales en la capacidad de estos para madurar, ser fertilizados, y posteriormente desarrollarse *in vitro* (Wood y Wildt, 1997). En la gata doméstica, los

CCOs grado I y II posterior a la maduración y fertilización *in vitro* son capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. Los embriones generados a partir de CCOs grado III y IV quedan generalmente detenidos en estadio de mórula (Wood y Wildt, 1997). En la TNS, el ovocito es el responsable de llevar a cabo la reprogramación del núcleo de la célula somática a un estado indiferenciado, permitiéndole desencadenar el desarrollo embrionario (Wilmut *et al.*, 1997). Se ha descrito que ovocitos clasificados morfológicamente como de mala calidad probablemente son deficientes en factores de reprogramación citoplasmáticos o presentan una aberrante acumulación de proteínas, lo cual llevaría a un desarrollo anormal de los embriones generados por TNS (Yu *et al.*, 2009). Por lo anterior, es de suma relevancia la selección de ovocitos competentes de buena calidad para la generación de embriones mediante TNS o TNSh.

Como se mencionó anteriormente, la MIV de ovocitos gata presenta una baja eficiencia en comparación a otras especies. Además, los embriones de gato generados a partir de ovocitos madurados *in vitro* presentan una menor capacidad de desarrollo en comparación a aquellos generados a partir de ovocitos madurados *in vivo* (Farstad *et al.*, 2000). Se ha descrito un patrón de expresión génica aberrante en ovocitos bovinos madurados *in vitro* en comparación a sus contrapartes madurados *in vivo* (Katz-Jaffe *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que cigotos generados a partir de ovocitos madurados *in vitro* presentan un patrón de metilación aberrante (Gioia *et al.*, 2005). Lo cual indica que los ovocitos madurados *in vitro* presentan una menor capacidad de reprogramación en comparación a los ovocitos madurados *in vivo*, repercutiendo negativamente en el desarrollo embrionario posterior.

La administración exógena de gonadotrofinas en la gata doméstica ha sido ampliamente usada para la maduración *in vivo* de ovocitos utilizados en la PIV de embriones (Gómez *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2005). En la gata doméstica, la administración exógena de FSH aumenta el número de folículos preovulatorios, la calidad de los CCOs, y el potencial de maduración de estos (Sánchez *et al.*, 2003). Además, los únicos clones de gato salvaje africano y gato de las arenas nacidos vivos, fueron producidos utilizando ovocitos madurados *in vivo* mediante la administración exógena de FSH y LH (Gómez *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2008). De la misma manera, la administración exógena de eCG y hCG en la gata doméstica inducen un mayor desarrollo folicular y la colección de un mayor número de CCOs maduros (Yu *et al.*, 2010). A la vez, también se ha descrito el nacimiento

de embriones clonados de gato doméstico a partir de ovocitos madurados *in vivo* utilizando eCG y hCG (Yin *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008).

Debido a que la MIV de ovocitos aún entrega resultados deficientes en la PIV de embriones de gato doméstico. La implementación de un protocolo de maduración *in vivo* de ovocitos de gata doméstica, aumentaría la calidad de los CCOs recuperados, la competencia ovocitaria y con ello la eficiencia de la TNSh.

Sincronía entre el citoplasto receptor y el núcleo donante

En la TNS es de suma importancia la interacción que se genera entre el núcleo de la célula donante y el citoplasto receptor, por lo cual, es necesario que exista una correcta coordinación entre la célula donante de núcleo y el ovocito maduro en MII. Se ha reportado que la fase del ciclo celular en la cual se encuentra la célula donante de núcleo puede repercutir en la ploidía, la integridad de los cromosomas y por tanto el desarrollo de los embriones generados por TNS (Campbell *et al.*, 1996). En relación a esto, se ha descrito que la transferencia de células diploides en la fase G0/G1 del ciclo celular, permite una correcta ploidía de los embriones generados por TNS. Además, la cromatina de las células quiescentes en G0/G1 presenta una mayor sensibilidad a la reprogramación por parte de los factores citoplasmáticos del ovocito posterior a la TNS (Campbell, 1999). La oveja Dolly, el primer mamífero clonado a partir de una célula adulta diferenciada, fue generada utilizando células de la glándula mamaria sincronizadas en el estado de G0/G1 (Wilmut *et al.*, 1997). A partir de entonces, la transferencia nuclear de células en G0/G1 se ha utilizado para la generación exitosa de clones en distintas especies como el ratón, vaca, cabra, perro y gato doméstico, entre otras (Wakayama *et al.*, 1998; Baguisi *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2009). Estos estudios han demostrado que sincronizar el ciclo celular en G0/G1 produce un incremento en el desarrollo de los embriones clonados, cuando se utiliza un ovocito en MII con un alto nivel de MPF como citoplasto receptor.

Se han descrito distintos protocolos para inducir la sincronización del ciclo celular en G0/G1 en las células somáticas de mamíferos. Los métodos más utilizados para la sincronización del ciclo celular en G0/G1 corresponden a la privación de suero, la inhibición por contacto causada por confluencia y la exposición a inhibidores reversibles

del ciclo celular. El primer clon generado a partir de células diferenciadas, fue producido utilizando células sincronizadas en G0/G1 mediante la exposición a un medio con 0,5% de suero fetal bovino (SFB) durante cinco días (Wilmut *et al.*, 1997). Actualmente, la privación de suero es el método más utilizado en la sincronización del ciclo celular en distintas especies, debido a que genera un alto porcentaje de células en G0/G1 (Boquest *et al.*, 1999; Mitalipov *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003). Sin embargo, la inducción de quiescencia mediante la privación de suero durante un período prolongado incrementa significativamente la proporción de células apoptóticas y la fragmentación del ADN (Kues *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2008). Esto podría repercutir negativamente en el potencial de desarrollo de los embriones generados por TNS, por lo cual es necesario implementar otros métodos de sincronización del ciclo celular que eviten este alto grado de apoptosis. La inhibición por contacto causada por confluencia genera una proporción de células en G0/G1 similar a la privación de suero, dejando de lado los problemas asociados al alto grado de apoptosis. Además, se ha reportado que no existe diferencia en la tasa de blastocistos generados por TNS al utilizar células en G0/G1 sincronizadas por inhibición por contacto o privación de suero (Hayes *et al.*, 2005).

En el año 2001 se describió por primera vez en el gato doméstico la sincronización del ciclo celular en células del cúmulo y fibroblastos mediante privación de suero (Bochenek *et al.*, 2001). La privación de suero no generó un aumento en la proporción de células del cúmulo arrestadas en G0/G1. Sin embargo, en los fibroblastos se observó un aumento en la proporción de células en G0/G1 posterior a un periodo prolongado de privación de éste (Bochenek *et al.*, 2001). De igual manera, se describió la sincronización del ciclo celular en fibroblastos fetales de gato doméstico, demostrando que tanto la privación de suero como la confluencia generan un aumento similar en la proporción de fibroblastos fetales en G0/G1. Además, al combinar ambos métodos se genera un efecto sinérgico que aumenta la proporción de células en G0/G1 en comparación a cada método por separado (de Barros *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha reportado que la privación de suero genera un mayor porcentaje de células fibroblásticas en G0/G1 en el gato doméstico y en el gato salvaje africano (96% y 83%, respectivamente) en comparación a la inhibición por contacto y al tratamiento con roscovitina (88% y 84% versus 61% y 56%, respectivamente) (Gómez *et al.*, 2003). Esto indica que la eficiencia de los distintos métodos de sincronización del ciclo celular en

G0/G1 puede variar dependiendo de la especie. Desde entonces, se han realizado una serie de investigaciones relacionadas a la sincronización del ciclo celular en felinos amenazados, con el objetivo de mejorar la eficiencia de la TNSh en estas especies.

La sincronización del ciclo celular en fibroblastos de tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*) ha sido descrita comparando los métodos de privación de suero, inhibición por contacto, la adición de antioxidantes o inhibidores de proteasas (Hashem *et al.*, 2007). Obteniendo una mayor proporción de células en G0/G1 al tratar las células con glutatión o cicloheximida (Hashem *et al.*, 2007). Más recientemente, se evaluó la sincronización del ciclo celular mediante privación de suero por 1-5 días, confluencia por cinco días y la acción de roscovitina (7,5 – 30 μ M), en el gato jaspeado (*Pardofelis marmorata*), el gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*) y el gato dorado asiático (*Pardofelis temminckii*) (Wittayara *et al.*, 2013a). Se observó que la privación de suero durante tres días generó la mayor proporción de células en G0/G1 independiente de la especie, sin un incremento significativo al aumentar los días de tratamiento (Wittayara *et al.*, 2013a). Sin embargo, a los cuatro días de privación de suero se observó un aumento significativo en la apoptosis en los fibroblastos de gato jaspeado y gato doméstico (Figura 3). De igual forma, la confluencia por cinco días logró aumentar significativamente la proporción de células en G0/G1 en todas las especies a excepción del gato jaspeado. No se observó un aumento significativo en la apoptosis a los cinco días de confluencia en ninguna de las especies. Mientras que el tratamiento con roscovitina logró aumentar la proporción de células en G0/G1 solo en el gato dorado asiático y en el gato doméstico.

En resumen, de acuerdo a estos estudios, se ha observado que a pesar de pertenecer a la misma familia (*Felidae*), existen diferencias en la respuesta de cada especie de felino a los distintos métodos de sincronización del ciclo celular. Por lo cual, es necesario estandarizar los protocolos de sincronización del ciclo celular para cada especie de felino en particular, con el fin de mejorar la eficiencia de la TNS en cada especie.

Influencia de la distancia filogenética en la TNS heteroespecífica

La viabilidad de los embriones generados mediante TNSh se correlaciona con la distancia genética o evolutiva entre las especies participantes (Loi *et al.*, 2011; Narbonne *et al.*,

2012). La capacidad de los embriones generados por TNSh de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto disminuye a medida que aumenta la distancia filogenética entre la especie donante de núcleo y la especie donante de ovocitos (Beyhan *et al.*, 2007). Embriones generados mediante TNSh a partir especies muy divergentes entre sí, son capaces de desarrollarse solamente hasta el estadio de blastocisto y presentan una serie de defectos como el retraso o bloqueo del desarrollo, un reducido número de células, daño del genoma nuclear, desorganización estructural, patrones de expresión génica y niveles de energía aberrantes, y defectos en la nucleogénesis (Narbonne *et al.*, 2012). Esto es debido a que la generación de embriones mediante TNSh debe enfrentar distintas complicaciones, como la incompatibilidad entre el ADN genómico y el ADN mitocondrial, y la activación del genoma embrionario (Loi *et al.*, 2011).

Incompatibilidad entre el ADN genómico y mitocondrial

El ADN mitocondrial codifica para alguna de las subunidades de la cadena de transferencia de electrones responsables de la producción de ATP. Por otro lado, el ADN nuclear es responsable de la codificación de factores de la replicación, transcripción y traducción del ADN mitocondrial. Por lo cual, para el correcto desarrollo embrionario es necesario que se produzca una correcta comunicación cruzada entre el ADN genómico y el ADN mitocondrial (Loi *et al.*, 2001). En embriones generados mediante TNSh, las mitocondrias derivan principalmente del ovocito receptor, mientras que las mitocondrias aportadas por la célula donante son eliminadas durante las primeras divisiones y son casi indetectable en el estadio de blastocisto (Evans *et al.*, 1999; Hiendleder *et al.*, 1999). Similarmente, en embriones generados mediante TNSh entre especies estrechamente relacionadas como los clones generados entre gaur-bovino, mouflon-oveja y coyote-perro las mitocondrias también derivan exclusivamente del ovocito receptor (Lanza *et al.*, 2000; Loi *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2013). Sin embargo, en embriones clonados generados mediante TNSh entre especies filogenéticamente muy distantes como en el caso de embriones panda-conejo, las mitocondrias de ambas especies coexisten hasta el estadio de blastocisto, y posterior a la implantación las mitocondrias de conejo son eliminadas (Chen *et al.*, 2002). A pesar de que aparentemente la heteroplasma de mitocondrias en los embriones generados mediante TNSh varía dependiendo de la distancia filogenética entre las especies. No se han reportado estudios que evidencien que la heteroplasma

de ADNmt afecte la capacidad de desarrollo de los embriones clonados, los cuales son capaces de desarrollarse en individuos adultos fértiles (Loi *et al.*, 2011).

Activación del genoma embrionario en embriones generados por TNSh

En el desarrollo embrionario temprano las primeras divisiones y la sobrevivencia del embrión son regulados por ARN y proteínas de origen ovocitarias. Posteriormente, esta reserva de ARN y proteínas comienzan a disminuir hasta el momento en que ocurre la activación del genoma embrionario (AGE). A partir de entonces, el embrión comienza a expresar genes específicos que le permiten desarrollarse hasta estadios más avanzados (Heikinheimo y Gibbons, 1998). Se ha descrito que el momento en que se produce la activación del genoma embrionario es especie específica, y en el gato doméstico ocurre entre los estadios de 5-8 células (Hoffert *et al.*, 1997). Sin embargo, se han reportado estudios en los cuales embriones generados mediante TNSh presentan alteraciones de la expresión génica al momento de la activación del genoma embrionario. Lo cual se hace más evidente al aumentar la distancia filogenética entre especies (Song *et al.*, 2009; Lagutina *et al.*, 2010).

Se ha descrito que embriones de mono rhesus generados mediante TNSh utilizando ovocitos bovinos, presentan una sub-expresión de genes imprintados y constitutivos, una morfología nucleolar anormal, y un patrón aberrante de proteínas nucleolares durante la AGE (Song *et al.*, 2009). Similarmente, embriones de cerdo generados por TNSh utilizando ovocitos bovinos presentan una expresión reducida de NANOG y un bloqueo del desarrollo entre los estadios de 16-25 células, sugiriendo que en estos embriones no se produce la AGE (Lagutina *et al.*, 2010). Con respecto al gato doméstico, se ha descrito que embriones de gato-bovino generados por TNSh quedan detenidos en los estadios de 8-16 células (Wittayarat *et al.*, 2013b). En bovinos, la AGE ocurre entre los estadios de 8-16 células, por lo cual este bloque en el desarrollo puede ser debido a una insuficiente reprogramación del núcleo y del estatus epigenético antes del AGE (Wittayarat *et al.*, 2013b).

6. Alteraciones epigenéticas en embriones generados por TNSh

Modificaciones epigenéticas durante el desarrollo temprano

La epigenesis corresponde a cambios que ocurren en la expresión de los genes sin que se produzca alguna alteración en la secuencia del ADN. La metilación del ADN, la acetilación de las histonas, la conformación de la cromatina, la arquitectura nuclear y los microRNAs corresponden a mecanismos epigenéticos involucrados en modular el funcionamiento genómico (Zuccotti *et al.*, 2000). Durante el proceso de diferenciación el núcleo de las células somáticas adquiere patrones únicos de modificaciones epigenéticas, entre estas, la metilación del ADN (Yamazaki *et al.*, 2006). En el proceso de metilación, las DNA metiltransferasas (DNMTs) transfieren un grupo metilo al carbono-5 del anillo de citosina de las islas CpG, ubicadas en el promotor de un gen determinado. Debido a esto, se considera que la metilación del ADN es una de las mayores modificaciones epigenéticas del genoma, ya que suprime la actividad transcripcional de genes específicos (Caiafa y Zampieri, 2005). Por esta razón, durante el desarrollo temprano, es necesario que ocurran una serie de modificaciones epigenéticas, que reviertan este patrón de diferenciación y que regulen la expresión de genes relevantes para el desarrollo embrionario (Blelloch *et al.*, 2006).

Durante el desarrollo de los mamíferos es necesario que se produzcan dos rondas de desmetilación y remetilación. La primera ronda ocurre antes de la gametogénesis donde el genoma de las células germinales primordiales es desmetilado. Posteriormente, durante la gametogénesis el genoma de estas células es nuevamente metilado, lo que resulta en el establecimiento de los imprintings genómicos de acuerdo al sexo (Reik *et al.*, 2001). La segunda ronda de desmetilación y remetilación se produce durante el desarrollo embrionario temprano, sin afectar el imprinting. Normalmente, posterior a la fertilización, cuando las protaminas de los cromosomas aportados por el espermatozoide son remplazadas por histonas ovocitarias, ocurre una desmetilación activa del genoma paterno (Oswald *et al.*, 2000). Varias secuencias del genoma aportado por el espermatozoide son rápidamente desmetiladas antes de que se produzca la primera ronda de replicación del ADN. Mientras que los alelos maternos aportados por el ovocito continúan metilados e incluso experimentando un proceso de metilación *de novo* posterior a la fertilización (Oswald *et al.*, 2000). Posteriormente, se produce una

desmetilación pasiva del genoma paterno y materno durante el desarrollo embrionario temprano, donde la metilación total del genoma disminuye. Se postula que la desmetilación general durante este período puede tener un rol en el retorno del genoma de los gametos a la totipotencia (Reik, 2007) (Figura 5). Este patrón de desmetilación asincrónica del ADN es especie específico y se ha reportado en el ratón, la rata, humano, mono, porcino y bovino (Dean *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005; Fulka *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Zaitseva *et al.*, 2007). Sin embargo, en el caso del ovino y el conejo no se produce una desmetilación activa del genoma paterno, solo ocurre una desmetilación pasiva del genoma total (Beaujean *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004).

Posteriormente ocurre la metilación *de novo* del ADN en los embriones pre-implantatorios, la cual igualmente se produce de manera especie específica. En el murino la metilación *de novo* del ADN se produce en el estadio de blastocisto, y en el bovino ocurre durante el estadio de 16 células (Dean *et al.*, 2001). Durante el estadio de blastocisto, cuando ocurre la primera diferenciación celular, se produce una diferenciación en el patrón de metilación entre las células del MCI y el TB. En el murino, el bovino, el ovino y el porcino la metilación del ADN es mayor en las células del MCI, mientras que en las células del TB se produce un proceso de desmetilación (Dean *et al.*, 2001; Beaujean *et al.*, 2004; Fulka *et al.*, 2006). Este patrón de metilación diferencial podría deberse a que durante el desarrollo las células del TB son las primeras en diferenciarse, y la correcta expresión de genes específicos del trofoblasto es esencial para la nutrición embrionaria y la implantación (Beaujean *et al.*, 2004).

Alteraciones en el patrón de metilación en los embriones generados por TNS

Se ha descrito que los sistemas de PIV de embriones generan modificaciones epigenéticas anormales (Wrenzycki *et al.*, 2006). Los embriones producidos *in vitro* presentan mayores niveles de metilación que los embriones producidos *in vivo*, lo cual puede ser la causa de los patrones de expresión génica aberrantes descritos en los embriones producidos *in vitro* (Zaitseva *et al.*, 2007). Estas alteraciones epigenéticas se producen de manera temprana en los sistemas de MIV de ovocitos, afectando la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario posterior. Gioia *et al.* (2005) reportaron que cigotos porcinos generados *in vitro* presentan un patrón de metilación aberrante en comparación

a sus contrapartes generados *in vivo*. Sumando a esto, se ha demostrado que las técnicas de PIV de embriones en sí, afectan el patrón de metilación embrionario. Los embriones generados por FIV presentan un patrón de metilación anormal al ser comparados con sus contrapartes generadas *in vivo* (Gioia *et al.*, 2005; Bonk *et al.*, 2008; Deshmukh *et al.*, 2011).

Se ha descrito que las alteraciones epigenéticas aumentan cuando los embriones son generados mediante TNS. Esto es debido a que la reprogramación del núcleo de una célula diferenciada a través de la TNS es un proceso aún ineficiente. Posterior a la TNS, frecuentemente el núcleo donante no logra reprogramarse y establecer modificaciones en la cromatina acorde a un patrón embrionario normal (Blelloch *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2014). Posterior a la TNS, el núcleo donado debe pasar por una intensa remodelación de la cromatina lo cual es llevado a cabo por los factores citoplasmáticos del ovocito. Es necesario que las histonas H3 presentes en el núcleo de las células somáticas sean reemplazadas por histonas de origen materno H3.3 para que sea posible la expresión de genes de pluripotencia (Wen *et al.*, 2014). Generalmente, el patrón de metilación de los embriones generados por TNS es más parecido al de una célula diferenciada que al de un embrión generado *in vivo* (Dean *et al.*, 2001; Matoba *et al.*, 2018). Describiéndose que los embriones generados por TNS presentan altos niveles de metilación en regiones promotoras del ADN en comparación a embriones generados por FIV (Matoba *et al.*, 2018). Por esta razón, se ha descrito que en la TNS el estado de diferenciación y metilación de la célula donante influye en la eficiencia de reprogramación, siendo esta eficiencia mayor al utilizar células poco diferenciadas como donante de núcleo (Blelloch *et al.*, 2006). Se ha reportado que utilizar células multipotentes como las células madre mesénquimales provenientes de médula ósea o tejido adiposo como donante de núcleo aumenta las tasas de blastocistos generados por TNS en el porcino y equino, así como la sobrevivencia de las crías generadas en el equino (Jin *et al.*, 2007; Olivera *et al.*, 2018). Relacionado con esto, se ha descrito que en embriones murinos generados por TNS se produce una expresión anormal de la isoforma somática de DNMT1, la cual debería ser normalmente inhibida por mecanismos post-transcripcionales en los embriones (Chung *et al.*, 2003). Mientras que la expresión de la isoforma ovocitaria DNMT1o, se encuentra escasamente expresada en embriones clonados. Como consecuencia de esto, se han

reportado patrones de metilación altamente aberrantes en varias regiones genómicas en los embriones generados por TNS. Incluso, se ha detectado un alto grado de variación individual en el patrón de metilación entre un blastocisto clonado y otro (Kang *et al.*, 2001) (Figura 6). Esto afecta negativamente la correcta expresión de los genes relacionados al desarrollo embrionario temprano, lo que se correlaciona con la baja capacidad de desarrollo de los embriones producidos mediante TNS (Blelloch *et al.*, 2006).

Los marcadores de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* son esenciales durante el desarrollo embrionario temprano y para la mantención de las características de pluripotencia en las células madre embrionarias (Nichols *et al.*, 1998; Mitsui *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2012). Por esta razón, posterior a la TNS, la desmetilación de promotores de genes de pluripotencia es un proceso indispensable para la reprogramación epigenética del núcleo donante (Simonsson y Gurdon, 2004). Un proceso de desmetilación incompleto podría repercutir negativamente en la expresión de los marcadores de pluripotencia en los embriones generados por TNS. Debido a esto, se han realizado estudios que analizan el patrón de metilación en los marcadores de pluripotencia, siendo el marcador más estudiado *OCT4*. El promotor de *OCT4* se encuentra esencialmente desmetilado en las células madre embrionarias y en las células de carcinoma embrionario, las cuales presentan una alta expresión de *OCT4*. Por otra parte, en las células somáticas, el promotor de *OCT4* se encuentra heterogéneamente metilado, lo cual inhibe su expresión (Marikawa *et al.*, 2005). De igual forma, los promotores de *SOX2* y *NANOG* se encuentran fuertemente metilados en las células somáticas, lo que inhibe la expresión de estos genes (Yamazaki *et al.*, 2006). Por esta razón, para que el núcleo donante adquiriera características totipotentes es necesario que los promotores de los genes de pluripotencia sean desmetilados, principalmente el promotor de *OCT4* (Simonsson y Gurdon, 2004; Yamazaki *et al.*, 2006). En embriones murinos generados por TNS, durante el desarrollo embrionario temprano el promotor de *OCT4* sufre un proceso de desmetilación progresivo. Sin embargo, durante todos los estadios de desarrollo, este promotor se encuentra significativamente más metilado en embriones clonados en comparación a embriones generados por FIV. Además, este proceso de desmetilación incompleto durante las primeras divisiones se asocia con un

retraso en el desarrollo de los embriones murinos generados por TNS (Yamazaki *et al.*, 2006).

A la fecha, se han publicado pocos estudios que en los cuales se analicen el patrón de modificaciones epigenéticas en embriones de gato generados por transferencia nuclear somática. En el año 2007 se realizó el primer análisis mediante secuenciación por bisulfito en el patrón de metilación de células somáticas y de placenta de gatos clonados (Cho *et al.*, 2007). Reportando un patrón de hipermetilación anormal en las células de placenta de gatos clonados al ser comparado con gatos nacidos de forma natural (Cho *et al.*, 2007). Lo cual podría ser una de las causas de la baja tasa de desarrollo a término de los embriones de gato generados mediante TNS. Posteriormente, se describió que embriones de gato patinegro generados por TNS_h presentaban un patrón aberrante de acetilación y metilación de histonas en comparación a embriones de gato generados por FIV (Gómez *et al.*, 2011). Esto puede ser debido a que el ovocito de gata doméstica no es capaz de reprogramar completamente el patrón epigenético del núcleo la célula somática de gato patinegro. A modo de solucionar esta problemática, se evaluó el tratamiento con inhibidores de las histona desacetilasas (Tricostatina A y ScriptAid) y DNA metiltransferasas (5-aza-2'deoxicitidina) en los embriones de gato patinegro generados por TNS_h. Observándose una regulación en la expresión de genes de pluripotencia y una mejoría en el desarrollo *in vitro*. Sin embargo, no se observó una mejoría en el desarrollo *in vivo* de estos embriones (Gómez *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2012). Esto demuestra que los eventos epigenéticos que afectan el desarrollo de embriones felinos generados por TNS son aún desconocidos. Según nuestro conocimiento no se han realizados estudios en los cuales se describa el patrón normal de modificaciones epigenéticas que se generan posterior a la fertilización en los embriones de gato doméstico. Además, tampoco se ha estudiado el patrón de metilación de genes relevantes durante el desarrollo temprano en embriones felinos normales y generados por TNS.

Genes relevantes durante el desarrollo embrionario temprano

Actualmente existen pocos estudios respecto a los genes involucrados en el desarrollo embrionario del gato doméstico (Gómez *et al.*, 2010; Imsoonthornruksa *et al.*, 2010; Waurich *et al.*, 2010; Hribal *et al.*, 2012a; Hribal *et al.*, 2012b). Sin embargo, se ha

reportado que en los embriones de gato doméstico los genes de pluripotencia *OCT4* y *SOX2* y de diferenciación *CDX2* y *GATA6* cumplen un rol similar a lo descrito en el murino durante la primera diferenciación celular (Filliers *et al.*, 2012). Lo que no ocurre en el caso del marcador de pluripotencia *NANOG* (Filliers *et al.*, 2012). En el gato doméstico la expresión de *NANOG* no aumenta posterior a la activación del genoma embrionario, la cual ocurre entre los estadios de 5-8 células en esta especie (Hoffert *et al.*, 1997), si no que comienza a disminuir posterior al estadio de 5-8 células (Filliers *et al.*, 2012) (Figura 7). En el modelo murino *OCT4* (Octamer-Binding Protein 4) se encarga de mantener el estado de pluripotencia de las células del MCI. En el murino, desde que el embrión comienza a dividirse este gen se expresa en todas las blastómeras, pero al formarse el blastocisto su expresión se restringe al MCI (Nichols *et al.*, 1998). Sin embargo, en el gato doméstico *OCT4* se expresa en las células del MCI y TB (Gómez *et al.*, 2010).

En ratones, embriones deficientes de *OCT4* no logran formar el MCI durante el estadio de blastocisto (Nichols *et al.*, 1998). Mientras que en el caso de las células madre embrionarias, una reducida expresión de *OCT4* induce la diferenciación de estas a trofoectodermo, y una sobreexpresión induce la diferenciación a hipoblasto y mesodermo (Niwa *et al.*, 2000). Se ha descrito que *OCT4* forma un complejo con *SOX2* (SRY [Sex Determining Region Y]-Box 2) y su acción conjunta regula la expresión de genes como *FGF4*, *NANOG*, y su propia expresión a través de feedback positivo (Kuroda *et al.*, 2005; Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005). La expresión de *NANOG* (Nanog Homeobox) también se restringe al MCI luego de la formación del blastocisto. En el estadio de blastocisto tardío durante la segunda diferenciación, *NANOG* es un factor importante para la mantención del epiblasto, reprimiendo la expresión *GATA6* e impidiendo que células del MCI se diferencien a hipoblasto. En embriones murinos en los que no expresan *NANOG* no se forma el tejido epiblastico (Mitsui *et al.*, 2003). Por otro lado, *CDX2* (Caudal Type Homeobox 2) es un factor que promueve la diferenciación de las células del trofoblasto reprimiendo la expresión de *OCT4* y *NANOG* en estas células (Strumpf *et al.*, 2005). *GATA6* (GATA binding protein 6) promueve la diferenciación de células del MCI a hipoblasto durante la segunda diferenciación, expresándose en una subpoblación de células en la cual la expresión de *NANOG* es inhibida. En embriones murinos en los que

no se expresa GATA6 no se forma tejido hipoblástico reconocible morfológicamente (Cai *et al.*, 2008).

Patrones de expresión génica aberrantes en embriones clonados

Recientemente, se ha descrito una expresión reducida de marcadores de pluripotencia y diferenciación en blastocistos de chita generados por TNSh en comparación a blastocistos de gato doméstico (Moro *et al.*, 2015a). Lo cual podría ser debido a una incompleta reprogramación del núcleo de chita por parte del ovocito de gata doméstica. Posteriormente, el mismo grupo describió una expresión aberrante de OCT4 en blastocistos de tigre generados por TNSh en comparación a clones de gato doméstico, lo que no se produjo en el caso de embriones de gato bengala (híbrido entre gato doméstico y gato leopardo) generados por TNSh (Moro *et al.*, 2015b). Postulando, que esta expresión aberrante podría deberse a alteraciones al momento de la AGE en los embriones de tigre–gato, que se hacen evidentes al tratarse de especies más distantes filogenéticamente.

En resumen, la güiña es una especie amenazada y la TNSh es una herramienta que podría ayudar a rescatar el pool genético en esta especie. Sin embargo, los embriones clonados presentan una reducida capacidad de desarrollo, así como anomalías epigenéticas asociadas a un proceso de reprogramación ineficiente. Además, la eficiencia de la TNSh disminuye a medida que aumenta la distancia filogenética entre las especies involucradas. Por lo cual es necesario evaluar si el ovocito maduro de gata doméstica es capaz de reprogramar células somáticas de güiña permitiendo el desarrollo embrionario temprano.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

La transferencia de células somáticas de guíña a ovocitos de gata doméstica genera embriones clonados con similar morfología y expresión génica a los embriones clonados utilizando células de gato doméstico.

Objetivo General:

Evaluar la capacidad de desarrollo *in vitro* y calidad de embriones generados mediante la transferencia de células somáticas de guíña a ovocitos en metafase II de gata doméstica.

Objetivos específicos

1. Producir ovocitos en metafase II competentes de gata doméstica.
2. Establecer un protocolo de inducción de quiescencia de células somáticas de gato doméstico y guíña.
3. Evaluar la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto de embriones de gato doméstico y guíña generados mediante transferencia nuclear somática, en comparación con embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro*.
4. Analizar el patrón de expresión de genes cruciales para el desarrollo embrionario durante puntos críticos del período pre-implantatorio en embriones clonados de guíña y embriones de gato doméstico generados por clonación y fecundación *in vitro*.

IV. MATERIALES Y MÉTODO

IV.1. Diseño Experimental

Etapa 1. Evaluación de la competencia ovocitaria y la sincronización del ciclo celular en fibroblastos de gato doméstico y güiña.

La primera etapa abarcó los objetivos 1 y 2, donde se establecieron las condiciones esenciales para la clonación somática utilizando tanto células de gato doméstico como de güiña. Para el éxito de este trabajo fue necesario la disponibilidad de ovocitos competentes en MII y de células somáticas de gato y güiña que estuvieran aptas para la transferencia nuclear. Adicionalmente y como resultados complementarios, se evaluó el sistema de cultivo *in vitro* de tal manera que permitiera el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

De esta forma fueron propuestos dos experimentos parciales:

Experimento 1.1. Implementación de un protocolo de estimulación ovárica para la generación de ovocitos competentes de gata doméstica.

En este experimento, se evaluaron dos protocolos de estimulación ovárica en la gata doméstica que permitieran la obtención de ovocitos competentes a lo largo del año, incluyendo en la época de anestro. Este experimento fue considerado teniendo en cuenta que una menor competencia ovocitaria es responsable de la baja eficiencia en los sistemas de producción *in vitro* de embriones durante la época de anestro de la gata doméstica

Por estos motivos, este experimento se centró en evaluar el efecto de la estimulación ovárica con FSH de origen porcino (FSHp) y con eCG (gonadotropina coriónica equina) sobre la competencia ovocitaria y la producción *in vitro* de embriones durante la época de anestro. Para lo cual, se colectaron CCOs inmaduros de las gatas tratadas con FSHp y eCG, los que fueron clasificados, madurados *in vitro* y activados partenogénicamente. Posteriormente, el protocolo de estimulación ovárica que entregó los mejores resultados fue seleccionado para evaluar el efecto de la maduración *in vivo* de ovocitos sobre la PIV de embriones de gato doméstico.

Para cumplir este objetivo, fueron generados cuatro grupos experimentales:

1. Gatas en anestro que no recibieron ningún tipo de tratamiento fueron utilizadas como control negativo (grupo control).
2. Gatas en anestro las cuales fueron tratadas con una dosis de 5 mg de FSHp, cada 24 horas, por cuatro días (grupo FSH).
3. Gatas en anestro que fueron tratadas con una dosis única de 200 UI de eCG (grupo eCG).
4. Gatas en anestro de los grupos 1 o 2, en las cuales la maduración *in vivo* fue inducida con una dosis de 100 UI hCG (grupo hCG).

Este estudio de la PIV de embriones de gato fue realizado durante los meses de Abril - Julio, dentro de las estaciones de otoño-invierno cuando se produce el anestro estacional en la gata doméstica en el hemisferio sur. En los cuatro grupos experimentales (control, FSH, eCG y hCG) se obtuvieron los ovarios de gata a través de ovariectomía. Una vez obtenidos los ovarios, estos fueron procesados para la obtención de los CCOs inmaduros en el caso de los grupos control, FSH y eCG, y para la obtención de los CCOs maduros en el caso del grupo hCG.

En los grupos control, FSH y eCG, los CCOs inmaduros fueron clasificados morfológicamente como grado I, grado II, grado III y IV. Una proporción de CCOs grado I y II fueron utilizados para el análisis de expresión génica de receptores de gonadotropinas (*FSHR* y *LHCGR*), de genes inducidos por FSH (*EGFR*, *PTGS2*, *EGR1* y *ESR2*) y de genes relacionados a la competencia ovocitaria (*GDF9*, *BMP15* y *GATM*) mediante RT-qPCR. Mientras que otra proporción de CCOs grado I y II fueron sometidos a un período de maduración *in vitro* (MIV).

Posteriormente, los ovocitos madurados *in vitro* (grupos control, FSH y eCG) y los ovocitos madurados *in vivo* (grupo hCG) fueron activados partenogenéticamente y cultivados *in vitro* durante 8 días. Una vez terminado el período de cultivo, se evaluó el porcentaje de embriones que lograron desarrollarse hasta el estadio de blastocisto en los cuatro grupos experimentales. Una proporción de estos blastocistos fueron utilizados en el análisis de expresión génica de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2* y *GATA6*. Mientras que

otro grupo de blastocistos fueron teñidos con Hoechst 33342 para determinar su número de células, y de esta manera evaluar la calidad morfológica (Figura 2).

El protocolo de estimulación ovárica con gonadotrofinas que entregó los mejores resultados, fue seleccionado para la producción de ovocitos maduros competentes, los cuales fueron utilizados para la generación de embriones mediante TNS.

Experimento 1.2. Determinación de un protocolo de inducción de arresto del ciclo celular en células somáticas de gato doméstico y güiña.

Se generaron líneas celulares de fibroblastos de gato doméstico y de güiña, para posteriormente utilizar estas células como donante de núcleo en la TNS. Estas líneas celulares de ambas especies fueron sometidas a distintos tratamientos de inducción de quiescencia para la sincronización del ciclo celular en la fase G0/G1. Se evaluaron los métodos de inhibición por contacto inducida por confluencia durante 1, 3 y 5 días y la privación de suero en el cultivo celular durante 1, 3 y 5 días. Además, se utilizaron células en crecimiento (60-80% de confluencia) como control negativo. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo, para estimar la proporción de células en las fases G0/G1, S y G2/M en cada tratamiento.

Por otra parte, se evaluó la viabilidad celular de los fibroblastos de gato y de güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia. Para el análisis de viabilidad las células fueron teñidas con una mezcla de naranja de acridina y yoduro de propidio y la viabilidad celular correspondió a la proporción de células teñidas con naranja de acridina en relación al total de células contadas.

Adicionalmente, se evaluó la apoptosis celular en las células de gato y de güiña sometidas a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia. El análisis de apoptosis celular se realizó evaluando la expresión relativa del marcador pro-apoptótico *BAX* y el marcador anti-apoptótico *BCL2*, mediante la técnica de RT-qPCR utilizando el método de curva estándar (Figura 2).

El o los tratamientos de inducción de quiescencia que generaron la mayor proporción de células en fase G0/G1 con la menor generación de apoptosis, fueron seleccionados para

la sincronización del ciclo celular en los fibroblastos de gato y güiña utilizados para la TNS.

Etapa 2. Evaluación de la calidad y capacidad de desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro* y transferencia nuclear y embriones de güiña generados por transferencia nuclear heteroespecífica.

Esta etapa abarcó los objetivos 3 y 4. Se produjeron embriones clonados mediante la transferencia de células somáticas de gato doméstico o güiña a ovocitos maduros de gata doméstica. El objetivo general de esta etapa fue determinar la capacidad de los ovocitos de gata doméstica para reprogramar células somáticas de güiña a través de clonación heteroespecífica. Para ello, todos los resultados fueron comparados utilizando embriones de gato doméstico generados por TNS y por FIV. Los primeros constituyeron los controles directos del proceso de clonación mientras que los segundos fueron los controles del desarrollo embrionario como tal.

Experimento 2.1. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* e *in vivo* de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro*.

*Evaluación del tratamiento con eCG en la generación de embriones de gato por fecundación *in vitro*.*

En este experimento, se evaluó la capacidad de desarrollo de los embriones de gato doméstico generados por FIV utilizando el tratamiento con eCG para la maduración ovocitaria. Todo esto con el propósito de generar los embriones que posteriormente se utilizarán como el modelo control para evaluar la capacidad de desarrollo de los embriones generados por clonación. Para este experimento, se crearon dos grupos experimentales, 1) Embriones de gato generados por FIV utilizando ovocitos de gatas tratadas con eCG (Grupo eCG). 2) Embriones de gato generados por FIV utilizando ovocitos de gatas sin tratar (Grupo control). Los embriones generados fueron cultivados *in vitro* por 8 días y posteriormente se evaluó la tasa de división, tasa de mórulas, blastocistos y blastocistos protruyendo. Los blastocistos generados fueron fijados y

teñidos para evaluar la calidad morfológica a través del conteo de células totales en ambos grupos experimentales.

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de desarrollo *in vivo* de los embriones generados utilizando el protocolo con eCG. Se utilizaron un total de tres gatas sincronizadas previamente con un protocolo de eCG y hCG como receptoras de embriones. Los embriones generados fueron transferidos al día 5 de cultivo (estadio de mórula y blastocisto temprano) o a los días 7-8 de cultivo (estadio de blastocisto y blastocisto protruyendo). La preñez fue confirmada por ecografía aproximadamente al día 20 posterior a la FIV. Se calcularon las tasas de preñez y de nacimientos vivos para cada grupo.

Evaluación del desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación in vitro posterior a la remoción de la zona pelúcida.

Se evaluó la capacidad de desarrollo *in vitro* de embriones de gato posterior a la remoción de la zona pelúcida. Este experimento fue realizado debido a que el método de clonación seleccionado para este proyecto consiste un método de clonación “Zona Libre” en el cual los ovocitos son enucleados y luego fusionados con la célula somática posterior a la remoción de la zona pelúcida. Por lo cual, fue necesario evaluar primeramente si la remoción de la zona pelúcida afecta o no la capacidad de desarrollo y calidad de los embriones de gato doméstico.

Para la realización de este experimento, se generaron dos grupos experimentales: 1) grupo de embriones de gato generados por FIV a los cuales se les removió la zona pelúcida (Grupo Zona Libre); 2) Grupo de embriones de gato generados por FIV cultivados con zona pelúcida (Grupo Zona Incluida). En el caso de los embriones Zona Libre, la zona pelúcida fue removida posterior a la FIV y los embriones fueron cultivados en el sistema “well of the well” (WOW). Ambos grupos experimentales fueron cultivados hasta el día 8 de desarrollo y posteriormente se evaluaron las tasas de división, mórula, blastocisto y blastocistos protruyendo (esta última solo en el caso del grupo zona incluida). Los blastocistos de ambos grupos fueron fijados y teñidos para el conteo de células totales. Adicionalmente, se midió el diámetro de los blastocistos generados utilizando el programa Micrometrics.

Experimento 2.2. Evaluación del desarrollo *in vitro* de embriones clonados de gato doméstico y güiña.

Evaluación de la agregación embrionaria en la generación de embriones de gato doméstico y güiña mediante transferencia nuclear somática

Se generaron embriones de gato doméstico y de güiña mediante TNS sin la presencia de zona pelúcida. En ambas especies, los embriones fueron cultivados en el sistema WOW colocando uno (1x) o agregando dos embriones (2x) por pocillo. El motivo de este experimento, es porque ha sido descrito anteriormente que la agregación embrionaria mejora el desarrollo *in vitro* en embriones felinos generados por TNS y TNSh (Moro *et al.*, 2015). En este experimento, los embriones fueron cultivados hasta los días 8-9, y posteriormente se evaluaron las tasas de división, mórula y blastocistos generados. Los blastocistos fueron fijados y teñidos para el conteo de células totales. Otra proporción de blastocistos fue utilizada para los análisis de expresión génica.

Análisis del patrón de expresión génica en embriones clonados de güiña y gato doméstico.

Se evaluó el patrón de expresión génica de los blastocistos de gato doméstico y de güiña generados por TNS y cultivados en el sistema WOW de forma individual o en agregado (2x). Se utilizaron blastocistos de gato generados por FIV como controles del patrón normal de expresión génica.

Se evaluó por medio de RT-qPCR utilizando el método de curva estándar el patrón de expresión de los genes de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2* y *NANOG*) y los genes de diferenciación (*CDX2* y *GATA6*). Todo esto con el propósito de evaluar la capacidad del ovocito de gata doméstica para reprogramar las células somáticas de güiña (Figura 3)

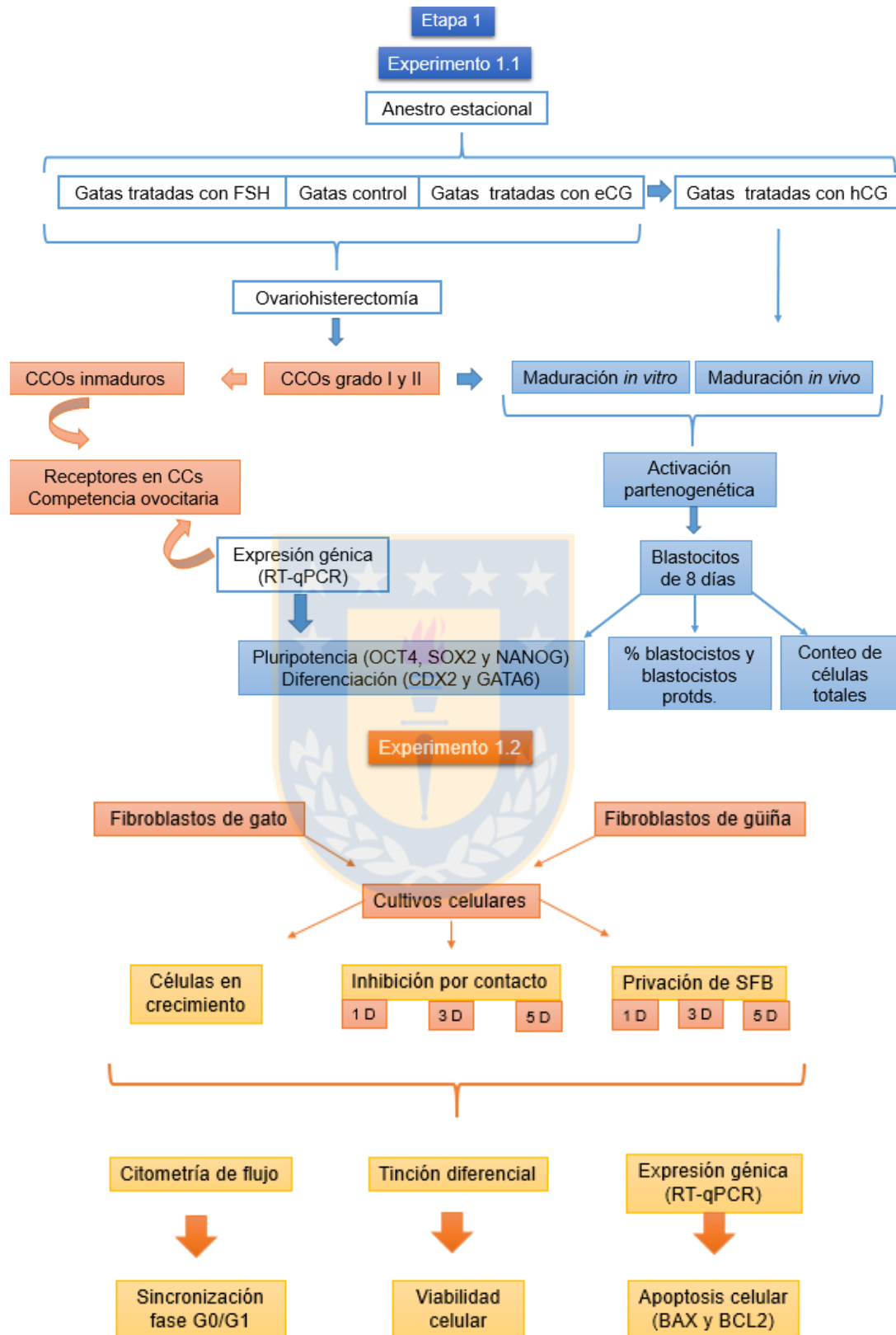


Figura 2. Diagrama de flujo de la etapa 1 del diseño experimental.
Fuente: Elaboración propia.

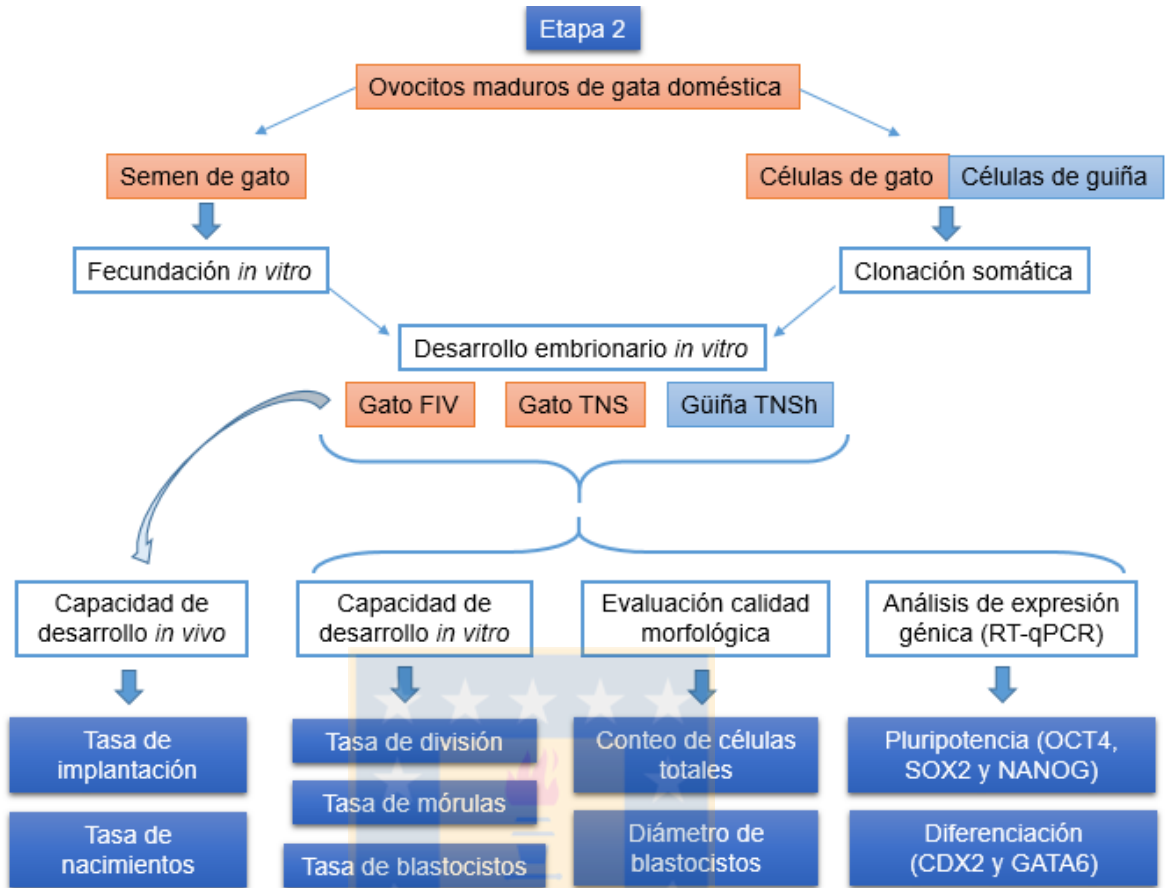


Figura 3. Diagrama de flujo de la etapa 2 del diseño experimental.
Fuente: Elaboración propia.

IV.2. Descripción de los materiales y métodos

Etapa 1. Experimento 1. Implementación de un protocolo de estimulación ovárica para la generación de ovocitos competentes de gata doméstica.

Esta tesis fue aprobada por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción el día 7 de julio de 2016.

Animales utilizados y evaluación del estatus reproductivo.

Animales utilizados para el grupo control negativo. Se utilizaron como control a gatas sanas no ciclantes durante la estación de anestro estacional (Grupo Anestro) y a gatas

ciclistas durante la estación reproductiva (Grupo Estro) que no hayan recibido ningún tipo de tratamiento hormonal. Los ovarios fueron colectados en operativos masivos de esterilización y los datos de edad, peso, y estatus reproductivo fueron obtenidos de las fichas clínicas.

Animales sometidos al tratamiento con gonadotrofinas. Se utilizaron gatas sanas en anestro, procedentes de distintos propietarios. Los tratamientos con gonadotrofinas (FSH, eCG, y hCG) y la cirugía posterior fueron realizados con previa autorización de los dueños, a través de un consentimiento firmado de acuerdo a lo estipulado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción.

Evaluación del estatus reproductivo en las gatas. En el Grupo Anestro, se seleccionaron gatas durante los meses de abril a julio, que no presentaron signos de conducta de celo, según la información proporcionada por la ficha clínica de cada animal. Además, se examinaron las características morfológicas de los ovarios extraídos, ovarios en estado inactivo fueron considerados indicativo de que la gata se encontraba en anestro. Se clasificaron como ovarios inactivos, aquellos con folículos <2 mm de diámetro y sin presencia de cuerpos lúteos (Freistedt *et al.*, 2001; Karja *et al.*, 2002a). Por otro lado, en el Grupo Estro se colectaron ovarios de gatas durante los meses de agosto a marzo y solo los ovarios que presentaban folículos con un diámetro >2 mm y sin presencia de cuerpos lúteos fueron considerados como indicativo de que la gata se encontraba ciclando (Freistedt *et al.*, 2001; Karja *et al.*, 2002a).

En los grupos tratados con FSH, eCG, y hCG se seleccionaron animales sin signos de conducta de celo i.e. conducta afectiva, vocalizaciones constantes, frotación contra objetos, postura de lordosis y exposición de la región perianal, etc.; (Shille *et al.*, 1979; Verstegen, 1998). Además, para verificar que las gatas seleccionadas efectivamente se encontraban en anestro, previo al tratamiento con gonadotrofinas se realizó un examen de citología vaginal. La predominancia de células parabasales y presencia algunas células intermedias se consideró indicativo de que las gatas se encontraban en anestro (Verstegen, 1998).

Tratamiento con gonadotrofinas

Tratamiento con FSH. El tratamiento consistió en la administración exógena de una dosis de 5 mg de FSHp (Folltropin-V, Bioniche, Canadá), vía subcutánea, cada 24 horas, por cuatro días, y la ovariectomía fue realizada un día después de la última dosis (Sánchez *et al.*, 2006). Las cirugías fueron realizadas en una sala adaptada para este propósito en el Departamento de Ciencia Animal y fueron hechas por un médico veterinario con experiencia en cirugía animal. Las cirugías consistieron en ovariectomías por la línea media, y la inducción y mantención del plano anestésico en los animales fue realizada con Acepromacina al 2% y ketamina al 10% en relación 1:2.

Tratamiento con eCG. El tratamiento consistió en la administración de una dosis única de 200 UI de eCG (Novormon, Syntex) vía subcutánea, mientras que la cirugía se realizó cuatro días posterior a la administración de eCG (Yu *et al.*, 2010). Las cirugías fueron realizadas de la misma manera que en el grupo tratado con FSH.

Tratamiento con hCG (Maduración *in vivo* de ovocitos). De acuerdo a los resultados obtenidos, se utilizaron animales procedentes del grupo tratado con FSH o con eCG. Los animales seleccionados fueron tratados con una dosis única de 100 UI de hCG (Chorulon, MSD) 24 horas posterior a la última dosis de FSH o cuatro días posterior a la dosis de eCG, según corresponda (Yu *et al.*, 2010). Los ovarios se obtuvieron a través de ovariectomía 24 horas posterior a la dosis de hCG.

Procesamiento de los ovarios y obtención de los complejos cúmulo-ovocito.

Los ovarios extraídos por ovariectomía fueron puestos en solución salina (0,9% NaCl) estéril a 39°C, con 0,1% de gentamicina (Gentamicina 10%, laboratorio FAV). Al colectarse ovarios de distintas gatas, cada par de ovarios fueron clasificados y colocados en tubos estériles de 15 mL con solución salina y fueron transportados en un termo hasta el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad de Concepción, para su procesamiento.

Los ovarios fueron procesados dentro de un período máximo de 6 horas a partir del momento de su extracción. Una vez en el laboratorio, cada par de ovarios fue lavado en solución salina y se depositaron en una placa de 100 mm con 7-8 mL de medio de manipulación (TCM-199 con 4mM de bicarbonato, 18 mM de hepes, 10% de suero fetal bovino (SFB) y 50 µg/mL de gentamicina) a 38,5°C. Para la obtención de los CCOs, los ovarios fueron cortados en pequeños fragmentos con una hoja de bisturí lo cual permitió abrir los folículos y liberar los CCOs. Este procedimiento fue realizado sobre una platina térmica para mantener la temperatura y evitar un estrés térmico en los ovocitos. Los CCOs fueron clasificados morfológicamente y posteriormente seleccionados para la MIV.

Clasificación morfológica de los CCOs. De acuerdo a la clasificación morfológica hecha por Wood y Wildt (1997) los CCOs fueron clasificados como grado I (excelente), grado II (buena), grado III (mala), y grado IV (pobre). Se clasificaron como grado I a aquellos CCOs con un citoplasma oscuro y homogéneo rodeado por 5 o más capas compactas de células del cúmulo. Mientras que los CCOs grado II fueron aquellos con un citoplasma oscuro y homogéneo, con una corona radiada completa y rodeado por menos de 5 capas compactas de células del cúmulo. Por otra parte, se consideraron como grado III y IV a aquellos CCOs que presentaron una escasa cantidad de células del cúmulo y distintos grado de degeneración del citoplasma ovocitario.

Los CCOs fueron separados y clasificados en los grupos grado I y II (aptos para la MIV) y grado III y IV (no aptos para la MIV). Una proporción de los CCOs grado I y II fueron colectados y utilizados para el análisis de expresión génica, mientras que otra proporción de CCOs fueron madurados *in vitro* y utilizados para la PIV de embriones.

Maduración *in vitro* de ovocitos (MIV)

Los CCOs seleccionados fueron lavados 2-3 veces en medio de manipulación, y una vez en medio de maduración (Tabla 2). Los CCOs fueron colocados en una placa de cuatro-pocillos con 500 µL de medio de maduración en cada uno (colocando un máximo 30 CCOs por pocillo), y fueron incubados por un período 28-30 horas (Kańska-Książkiewicz *et al.*, 2003; Nagano *et al.*, 2008), a una temperatura de 38,5°C, y en una atmósfera

gaseosa de 5%O₂, 5%CO₂ y 90% N₂, humidificada, para reducir el estrés oxidativo (Pope *et al.*, 1999).

Maduración *in vivo* de ovocitos

Solo en el grupo tratado con hCG. Posterior a la colección de los ovarios, se colectaron los CCOs, y solo los que presentaban un cúmulo expandido y un citoplasma oscuro y homogéneo fueron seleccionados. Se removieron las células del cúmulo y solo los ovocitos que presentaron la presencia del primer cuerpo polar fueron clasificados como maduros y utilizados para la activación partenogenética. Los ovocitos sin presencia del primer cuerpo polar fueron madurados *in vitro* por un período adicional de 20 horas y posteriormente utilizados para la activación partenogenética.

Remoción de las células del cúmulo

Los CCOs madurados *in vitro* o *in vivo* fueron colocados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL con 500 µL de medio TCM- HEPES y 0,5 mg/mL de hialuronidasa, y se les dio vórtex por 6 minutos a temperatura ambiente, con el objeto de desprender las células del cúmulo del ovocito. Posteriormente, los ovocitos se lavaron en medio de manipulación para eliminar la hialuronidasa y desprender las células del cúmulo restantes.

Activación partenogenética

Posterior a la eliminación de las células del cúmulo, para la activación partenogenética se seleccionaron ovocitos maduros en MII con presencia del primer cuerpo polar, y con un citoplasma oscuro y homogéneo. Los ovocitos seleccionados fueron colocados en medio de manipulación con 7% de etanol por 5 minutos, y luego fueron lavados en medio TCM-199 suplementado con 0,3% BSA, 0,36 mM de piruvato de sodio, 2,2 mM lactato de calcio, 1.0 mM de glutamina y 50 µg/mL gentamicina (Medio activación) a modo de eliminar el etanol. Posteriormente, los ovocitos se incubarán durante 5 horas en medio de activación con 10 µg/mL de cicloheximida (CHX) y 5 µg/mL de citocalacina B (CIT-B)

para inhibir la síntesis proteica e impedir la extrusión del segundo cuerpo polar respectivamente, a una temperatura de 38,5°C, y en una atmosfera de 5%O₂, 5%CO₂ y 90% N₂, humidificada.

Cultivo *in vitro* de embriones

Posteriormente, los ovocitos activados se lavaron una vez en medio de activación, y luego en medio de cultivo SOF (fluido sintético oviductal) con el objeto de eliminar la CHX y CIT-B. El cultivo de los ovocitos activados fue realizado en una placa de cuatro pocillos con 500 µL de medio SOF suplementado (Tabla 1) y fueron incubados a 38,5°C, en una atmosfera de 5%O₂, 5%CO₂, y 90%N₂, humidificada, por 8 días. El medio fue suplementado con 10% de SFB al día 5 de cultivo, según lo descrito previamente por (Karja *et al.*, 2002b). Transcurridos los 8 días de cultivo, se evaluó el potencial de desarrollo embrionario calculando las tasas de división, mórula, blastocisto y blastocistos protruyendo.

Tabla 1. Medios para la maduración *in vitro* de ovocitos, y el cultivo *in vitro* de embriones.

Medio maduración <i>in vitro</i> de ovocitos	Medio de cultivo <i>in vitro</i> de embriones
Medio base: TCM-199	Medio base: SOF
0,3 % BSA – Fracción V	0,3% de BSA
0,36mM Piruvato	0,4 mM piruvato de sodio
2,0 mM Glutamina	0,2 mM de L-glutamina
10 ng/mL EGF	10 ng/mL de EGF
50 µg/mL gentamicina	50 µg/mL gentamicina
1µg/mL 17-B estradiol	0,1mg/mL de ácido cítrico ¹⁰
2,2 mM Lactato de calcio	2% de SFB
0,1 UI FSH-LH (Pluset, Serono, Italia)	1X de aminoácidos esenciales y no esenciales
	0,5 mg/mL de myo-Inositol

Fuente: Elaboración propia.

Tinción de los blastocistos

Para evaluar la calidad morfológica de los blastocistos producidos, una proporción de estos fue fijada en una solución de glutaraldehído al 3% durante 3 días a 4°C. Luego, fueron pasados a PBS 1x con 1% de polivinyl alcohol a 4°C. Posteriormente, los blastocistos fijados fueron teñidos con 5 µg/mL de Hoechst 33342 por 20 min, se visualizaron en un microscopio de fluorescencia bajo luz UV para realizar el conteo celular.

Evaluación de la expresión génica

Se evaluó la expresión génica de *FSHR*, *LHCGR*, *EGFR*, *PTGS2*, *EGR1*, *ESR2*, *GDF9*, *BMP15* y *GATM* en los CCOs inmaduros grado I y II colectados en los grupos FSH, eCG, y los grupos control (Anestro y Estro). Para lo cual, se generaron un mínimo de 7 grupos de 5-10 CCOs para cada grupo experimental. Los CCOs seleccionados se colocaron en tubos de 1,5 mL y fueron almacenados a -80°C, hasta el momento de la extracción de ARN.

Adicionalmente, se evaluó la expresión génica de los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, y los genes de diferenciación *CDX2* y *GATA6* en los blastocistos producidos en los grupos FSH, eCG, hCG y control. Para lo cual, blastocistos y blastocistos protruyendo al día 8 de cultivo fueron pooleados, generando 7 grupos de 2-5 embriones para cada grupo experimental. Los grupos de embriones fueron colocados en tubos de 1,5 mL y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN.

La extracción de ARN y la generación de ADNc se realizaron utilizando el Ambion Cell to cDNA II kit (AM1723; Life Technologies) siguiendo las instrucciones descritas en el kit. Para la extracción de ARN, las muestras fueron lavadas una vez con PBS 1x frío. Después de esto, se les agregó a las muestras 50 µl de Lysis buffer y fueron incubadas a 75°C por 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con DNasa I (0,04 U/ µl) incubándolas primero a 37°C por 15 minutos y luego a 75°C por 5 minutos, para la degradación del ADN genómico. La reacción de RT realizada para la generación del

ADNc, se llevó a cabo con 10 μ l del ARN total para una reacción de un volumen final de 20 μ l que consistió en 5 μ M random primers, 10mM de cada dNTP, 2 μ l first strand buffer (10 \times), 10 U de RNase inhibitor, y 200 U/mL M-MuLV (Ambion Co., Austin, TX, USA). Los parámetros de incubación fueron: 70°C por 3 min, 42°C por 60 min, y 92°C por 10 min. El ADNc fue almacenado a -20°C hasta el momento de la realización de los PCRs.

Para el análisis de expresión génica se realizó un estudio cuantitativo mediante la técnica de PCR tiempo real (RT-qPCR) utilizando el método de curva estándar. La curva estándar fue realizada con 2 μ l de un producto de PCR de concentración conocida para cada gen de interés, el cual fue previamente purificado en un gel de agarosa al 2% y utilizando el EZNA gel extraction kit (Omega, Biotek, Santiago, Chile). El producto fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro (Epoch, BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT USA). Cada curva estándar fue realizada con ocho puntos que correspondieron a diluciones seriadas (1:10) de los productos de PCR purificados, utilizando 2 μ l por duplicado para cada punto de la curva. Para el análisis de qPCR cada muestra fue cargada por duplicado (replicas técnicas). La reacción de qPCR fue realizada con 2 μ l de ADNc, 1 μ l de primers (10 pm de cada uno, forward y reverse) 5 μ l de 2 \times Sensimix SYBR Hi-ROX (Bioline) y completado con 2 μ l de H₂O para un volumen final de 10 μ l. Se utilizó el equipo MX3000P Real-Time PCR (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Solo aquellos experimentos (incluyendo curva estándar y muestras) con una eficiencia dentro del rango de 90-110% y con un coeficiente de correlación de 0,9 fueron utilizados para el análisis de expresión génica. Todas las muestras dentro del rango de cuantificación de la curva estándar fueron consideradas para el análisis. Los resultados obtenidos mediante el método de curva estándar para cada gen de interés fueron normalizados utilizando los genes housekeepings *GAPDH* y *SDHA*. Los cuales fueron previamente seleccionados a través de un análisis de estabilidad. Los primers utilizados y las condiciones de PCR para cada gen se presentan en la Tabla 3.

Análisis estadístico

Cálculo del tamaño mínimo muestral.

El tamaño mínimo muestral fue calculado utilizando el programa estadístico Infostat (Infostat, Buenos Aires, Argentina) para detectar una diferencia mínima significativa (DMS) entre las medias de distintos tratamientos. Detectar una DMS permite calcular la Potencia alcanzada para un modelo de análisis de la varianza de efectos fijos, modificando el número de tratamientos (a), la varianza común dentro de tratamientos (σ^2), nivel de significancia (α), la diferencia mínima que se quiere detectar (D), y el tamaño muestral por tratamiento (n). Los tamaños muestrales por tratamiento son derivados a partir de la relación entre ϕ^2 (efecto del tratamiento) y la Potencia (1- β).

$$\phi^2 = \frac{nD^2}{2a\sigma^2}$$

La varianza común dentro de cada tratamiento se obtuvo realizando un análisis de t-student de los resultados obtenidos (% blastocistos producidos) en un grupo de experimentos preliminares, con 4 repeticiones para cada tratamiento. Se obtuvo una varianza común dentro del grupo tratado con gonadotrofina de 30%, y una varianza común dentro del grupo control del 31%.

Por consiguiente, para este estudio se deseó obtener una potencia del 90% y por tanto con una DMS que se quiere detectar de un 10%, con una varianza común dentro los tratamientos de 30%, un error estándar de 5% (0,05). Se necesitó un n mínimo muestral de 7 para cada tratamiento.

Este tamaño mínimo muestral calculado fue utilizado para los experimentos de producción *in vitro* de embriones en las etapas 1 y 2.

Análisis de resultados.

Para estimar diferencias significativas en la calidad ovocitaria (grupos control, FSH y eCG), y en el porcentaje de blastocistos PIV y el análisis de expresión génica (grupos control, FSH, eCG y hCG), se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis. Además, para estimar diferencias significativas en el número de células totales de los blastocistos producidos se utilizó la prueba de t-student. Todos los análisis se realizaron

utilizando el programa estadístico Infostat (Infostat, Buenos Aires, Argentina), considerándose diferencias significativas con un $P < 0,05$.

Etapa 1. Experimento 2. Determinación de un protocolo de inducción de arresto del ciclo celular en células somáticas de gato doméstico y güiña.

Cultivos primarios y aislamiento de líneas celulares de gato doméstico y güiña

Aislamiento de líneas celulares de gato doméstico. Con el propósito de aislar líneas celulares de fibroblastos de gato doméstico, se tomaron muestras de piel de la región abdominal de gatas del Experimento 1.1 que fueron sometidas a ovariectomía. Las muestras tomadas fueron lavadas por cuatro minutos en etanol al 70%. Posteriormente, las muestras de piel se colocaron en una solución PBS 1x con 1% de antibiótico-antimicótico y fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento.

Una vez en el laboratorio, todas las muestras se procesaron de la misma manera. Se eliminaron los restos de pelos de la muestra, y luego estas se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 1mm^2 . Las muestras se lavaron al menos cinco veces en una solución de PBS 1x con 1% de antibiótico-antimicótico, y luego fueron sometidas a un proceso de digestión enzimática con colagenasa. El tejido fue digerido por 18 horas en $500\ \mu\text{L}$ de medio DMEM-F12 suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico, 10% de SFB, y $1\ \text{mg/mL}$ de colagenasa, a $38,5^\circ\text{C}$, con agitación orbital. Una vez finalizada la digestión, se resuspendió vigorosamente el tejido para desprender células que pudiesen permanecer pegadas al mismo y se centrifugó por 10 minutos a 1200 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue sembrado en frascos de cultivo T25 con 4 mL de medio de cultivo. En el caso del cultivo primario, se utilizó como medio de cultivo DMEM-F12 suplementado (1mM de glutamina, $0,2\ \text{mM}$ de piruvato, $10\ \text{ng/mL}$ de EGF, 1% AAM) más 30% SFB. Las células se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar un 80% de confluencia y se les realizó cambio de medio cada dos días. Transcurrido este período, se desprendieron las células del cultivo utilizando tripsina-EDTA durante cuatro minutos, la acción de la tripsina se detuvo agregando DMEM-F12 con 10% SFB. Una proporción de células fueron congeladas en viales Nalgene de 2 mL (Nalgene, Inc, Dinamarca) (pase 1), en medio DMEM-F12 suplementado con 30% de SFB y 10% de DMSO (dimetilsulfóxido). La

congelación se realizó mediante un gradiente de -1°C por minuto, empleando el sistema Mr. Frosty (Nalgene, Inc, Dinamarca) al interior de un congelador comercial de -80°C . Los viales de congelación permanecieron en este sistema por tres días después de lo cual fueron introducidos a un tanque con nitrógeno líquido. Otra proporción de células se continuó expandiendo, en placas de 100 mm con medio DMEM-F12 suplementado más 10% SFB, para posteriormente ser congeladas en los pases 2, 3, 4, 5 y 6. Se generaron un total de tres líneas celulares de gato doméstico.

Líneas celulares de güiña. Para este estudio, se utilizaron dos líneas celulares de fibroblasto de güiña que se encontraban almacenada en el banco de recursos genéticos del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción. Estas líneas celulares se obtuvieron a través de muestras de piel de oreja de una güiña hembra y una güiña macho. El procesamiento de muestras, la generación del cultivo primario, y la expansión y congelación de las líneas celulares, se realizaron siguiendo un protocolo similar al utilizado para las líneas celulares de gato doméstico (Tovar *et al.*, 2008)

De las tres líneas celulares establecidas de gato doméstico y de las dos líneas celulares de güiña, se seleccionó una línea celular por cada especie, siendo estas las que presentaron el mayor crecimiento en cultivo hasta los pases 5-6.

Debido a que para la realización de los experimentos de citometría de flujo, análisis de viabilidad celular y apoptosis, se utilizaron células de gato doméstico y de güiña entre los pases 5-6.

Métodos de sincronización del ciclo celular en fase G0/G1

En este estudio se evaluaron dos métodos de inducción de quiescencia celular: 1) privación de SFB, 2) inhibición por contacto; en fibroblastos de gato doméstico y güiña. Con el objetivo de seleccionar para cada especie el método que induzca la mayor proporción de células sincronizadas en la fase G0/G1 y la menor proporción de células en apoptosis. Para cumplir este objetivo, las células de gato doméstico y de güiña fueron sometidas a 7 tratamientos (grupos experimentales):

- 1) células en crecimiento (control)
- 2) privación de SFB por 1 día.
- 3) privación de SFB por 3 días.
- 4) privación de SFB por 5 días.
- 5) confluencia por 1 día.
- 6) confluencia por 3 días.
- 7) confluencia por 5 días.

Las células en crecimiento (60-80% de confluencia) se utilizaron como control negativo, para evidenciar el efecto de los métodos de sincronización del ciclo celular. Los tratamientos de privación de SFB se realizaron utilizando células en un 60-80% de confluencia, a las cuales se les cambió el medio de cultivo por medio DMEM-F12 suplementado (sin EGF) más 0,5% de SFB. Los tratamientos de inhibición por contacto, se llevaron a cabo dejando que los cultivos celulares alcanzaran el 100% de confluencia, y se esperó 1, 3 o 5 días posterior a la confluencia, realizando cambio de medio diario una vez alcanzada la confluencia. Para cada tratamiento se realizó un mínimo de tres repeticiones por experimento.

Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Los cultivos celulares utilizados para los análisis por citometría de flujo se realizaron en frascos T25. Finalizado cada tratamiento, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. El pellet formado fue lavado dos veces con PBS 1x para eliminar el medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron fijadas en 90% de metanol durante 10 minutos a -20°C. Luego, las células se lavaron dos veces en PBS 1x para eliminar el metanol, y fueron incubadas en una solución con 50 µg/mL de yoduro de propidio y 100 µg/mL de RNasa A durante 30 minutos a 37°C, en oscuridad. Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas y posteriormente el pellet fue resuspendido en 1-1,5 mL de Focussing fluid 1x (Thermo Fisher Scientific), para luego realizar el análisis mediante citometría de flujo. Las citometrías fueron realizadas utilizando el equipo Attune® NxT Acoustic Focussing Cytometer (Thermo Fisher Scientific) colectando

un mínimo de 10.000 eventos a una velocidad de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, y la fluorescencia fue visualizada utilizando el canal BL2-A (filtro 574/26 nm). Los histogramas, dot plots, y density plots, fueron realizados utilizando el software Attune[®] NxT SW v1.1 incluido en el equipo. Cada citometría fue repetida al menos dos veces.

Análisis de viabilidad celular y apoptosis

Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento, las células fueron cultivadas en placas de 35 mm bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Una proporción de estas células fue utilizada para el análisis de viabilidad celular a través de un contador de células con fluorescencia dual, mientras que la otra proporción se utilizó para evaluar la apoptosis celular mediante RT-qPCR.

Análisis de viabilidad celular. Al finalizar cada tratamiento las células fueron tripsinizadas y centrifugadas, y luego fueron resuspendidas en 100 μl de medio de cultivo. Posteriormente, se tomaron 18 μl de las células en suspensión, se tiñeron con 2 μl de naranja de acridina más ioduro de propidio (AO/PI cell viability kit, Logos biosystems) y se incubaron dos minutos a 37°C. Posteriormente, se cargaron 10-12 μl de las células teñidas en Photon slides[™] (Ultra-low fluorescence counting slides, Logos biosystems), los cuales fueron colocados en un contador de células automatizado con fluorescencia dual Luna[™]-fl (Logos biosystems) para el análisis de viabilidad celular. Las células vivas se observaron de color verde debido a la tinción naranja de acridina, mientras que las células apoptóticas y necróticas se observaron de color rojo por el ioduro de propidio. Adicionalmente, el contador celular automatizado permitió medir el tamaño celular de los fibroblastos sometidos a cada tratamiento.

Análisis de apoptosis celular mediante RT-qPCR. La proporción de células restantes de los análisis de viabilidad celular fueron lavadas en PBS 1 \times , colocadas en un tubo de 1,5 mL, para luego ser centrifugadas y posteriormente almacenadas a -80°C hasta el momento de la extracción del ARN.

La extracción del ARN se realizó utilizando el E.Z.N.A. RNA extraction kit (Omega Biotek) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Una vez extraído el ARN, se cuantificó la concentración de cada muestra utilizando un espectrofotómetro (Epoch, BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT USA) y fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de la reacción de reverso transcripción (RT). Antes de comenzar la reacción de RT, primero se realizó un tratamiento con DNAsa I ($0,04\text{ U}/\mu\text{l}$) incubando las muestras a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, para eliminar el ADN genómico. Posteriormente, la reacción se detuvo con 25 mM de EDTA ($1\ \mu\text{l}$) incubando las muestras a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Para la reacción de RT, la cual tuvo un volumen final de $20\ \mu\text{l}$, se utilizaron 100 ng del ARN extraído, $5\ \mu\text{M}$ de random primers y 10 mM de cada dNTP, seguido por una incubación a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo, y se les agregó $4\ \mu\text{L}$ de 5x First strand buffer, $2\ \mu\text{l}$ de DTT, y 10 U de RNase out, y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos minutos. Finalmente, las muestras se incubaron con 200 U de M-MLV-Reverse transcriptase (Invitrogen, thermofisher) a 25°C por 10 min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 min, y finalmente a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de la reacción de PCR.

Para el análisis de RT-qPCR, se evaluó la expresión relativa de los genes *BAX* y *BCL2* en las células de gato doméstico y de güiña sometidas a los distintos tratamientos. Para lo cual, se utilizó el método de curva estándar anteriormente descrito en el experimento 1.1, y los resultados obtenidos fueron normalizados utilizando el gen housekeeping *SDHA*. Debido a que no se han reportado las secuencias los genes analizados en la güiña, se utilizaron primers de gato doméstico para el análisis de expresión génica en las células de güiña. Los primers utilizados y las condiciones de PCR para cada gen de interés se describen en la Tabla 3.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados de las citometrías de flujo y el análisis de viabilidad celular, los datos que se encontraban en porcentaje fueron sometidos a la transformación de arcoseno. Los datos transformados y los datos correspondientes al diámetro celular fueron analizados por medio de un Modelo Lineal Generalizado (GLM) y

utilizando la prueba de Tukey para la comparación de medias, utilizando el programa estadístico SAS (Cary, NC, USA). Para estimar diferencias significativas en el análisis de expresión génica se utilizó el test no paramétrico de Kruskal–Wallis en el programa estadístico Infostat (Infostat, Buenos Aires, Argentina), considerando diferencias significativas $P < 0,05$.

Etapa 2. Experimento 2.1. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* e *in vivo* de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro*.

Evaluación del tratamiento con eCG en la generación de embriones de gato por fecundación *in vitro*.

Colección de complejos cúmulo-ovocito y maduración *in vitro*

Para este experimento se seleccionaron gatas clínicamente sanas, no gestantes, de al menos 6 meses de edad. Las gatas fueron seleccionadas para conformar dos grupos experimentales, un grupo de gatas tratadas con una dosis de 200 UI de eCG subcutánea (Grupo eCG) y un grupo de gatas que no recibió este tratamiento (Grupo Control). Los ovarios fueron colectados por medio de ovariectomía, cirugía la cual se realizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, cuatro días posterior a la dosis de eCG. Se seleccionaron los CCOs grado I y II, los cuales fueron madurados *in vitro*, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas en la Etapa 1, por 28-30 horas, en una atmósfera gaseosa de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ a 38,5°C.

Colección de espermatozoides

Se seleccionaron gatos mayores a los 10 meses de edad los cuales fueron sometidos a castración quirúrgica. La inducción y mantención del plano anestésico en los animales fue realizada con Acepromacina al 2% y ketamina al 10% en relación 1:2.

Los testículos fueron colectados en tubos de 50 mL con solución salina NaCl 0.9% más 0,1% de gentamicina, a 38,5°C. Se separó el epidídimo de cada uno de los testículos y ambos epidídimos fueron posteriormente cortados en pequeños trozos en una placa de

100 mm con medio de manipulación más BSA (TCM-199 con 4 mM de bicarbonato, 18 mM de hepes, 0,3% de BSA-Fracción V y 50 µg/mL de gentamicina). Posteriormente, el medio junto con los espermatozoides fue pasado a través de un filtro de 40 µm para eliminar los restos de tejido. Luego se centrifugó la suspensión en un tubo cónico de 50 mL a 1800 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 3-5 mL de medio de manipulación más BSA y pasado a un tubo cónico de 15 mL, los espermatozoides fueron sometidos a swim-up (Parrish *et al.*, 1978) a 38,5°C por 2-3 horas. Una vez finalizado, se colectó el sobrenadante y este fue centrifugado a 1800 rpm por 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en el medio comercial Andromed (Minitub, Tiefenbach, Alemania) al 2% y refrigerado a 4 °C.

Fecundación *in vitro*

Finalizado el tiempo de MIV, se disgregaron las células del cúmulo de los CCOs mediante pipeteo y posteriormente estos fueron pasados a una placa de cuatro pocillos con 500 µL de medio TALP suplementado con: 6 mg/mL BSA-Fracción V, 0,36 mM de piruvato de sodio, 1 mM de glutamina, 2,2 mM de lactato de calcio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales (NEAA), 0,01 mg/mL de sales de heparina de sodio y 50 µg/mL. Para la FIV se utilizaron espermatozoides epididimales refrigerados por 24 horas, previo a la FIV, los espermatozoides fueron sometidos a swim-up en medio de manipulación con BSA por 30 min a 1 hora. Posteriormente, el sobrenadante fue centrifugado a 1800 rpm por 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 1 mL de medio TALP. Se agregaron $1,5 - 2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL a las gotas de 500 µL de medio TALP con 20-30 CCOs por gota. Los CCOs y los espermatozoides fueron co-incubados durante 18-20 horas, a 38,5 °C, en una atmosfera humidificada con 5% CO₂.

Cultivo *in vitro* de embriones

El cultivo *in vitro* de embriones se realizó de manera similar a lo descrito en la Etapa 1. Se removieron las células del cúmulo con hialuronidasa y vórtex. Luego los posibles cigotos fueron cultivados en una placa de cuatro pocillos con 500 µL de medio SOF por pocillo. El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino al día 5 de cultivo y en

este momento se evaluaron las tasas de división y de formación de mórula. El cultivo fue incubado a 38,5°C, en una atmosfera gaseosa con 5%O₂, 5% CO₂ y 90% N₂, durante 8 días. Finalizado el cultivo se evaluaron las tasas de blastocistos y blastocistos protruyendo.

Tinción de blastocitos

Los blastocistos y blastocistos protruidos de ambos grupos fueron fijados con glutaraldehído al 3% durante 72 horas y posteriormente teñidos con Hoechst 33342 para el conteo de células totales, de la misma manera que se describió en la Etapa 1.

Sincronización de gatas receptoras

Se seleccionaron tres gatas clínicamente sanas, mayores a los 6 meses de edad, las cuales fueron mantenidas en una sala temperada (20-22 °C) y especialmente acondicionada con elementos para la distracción y entretenimiento, con agua y comida ad-libitum, bajo luz natural. Para la sincronización hormonal, las gatas receptoras fueron tratadas primero con una dosis de 200 UI de eCG vía subcutánea, lo cual se realizó un día después de haber inyectado a las gatas donantes de ovocitos. Posteriormente, las gatas fueron tratadas con 100 UI de hCG intramuscular cuatro días posterior a la dosis de eCG, para inducir la ovulación y formación de los cuerpos lúteos.

Transferencia de embriones generados *in vitro*

Para la transferencia, se seleccionaron grupos de embriones en dos estadios de desarrollo: 1) embriones en estadio de mórula y blastocisto temprano al día 5 de cultivo y 2) embriones en estadio de blastocisto y blastocisto protruyendo entre los días 7-8 de cultivo. Esto con el motivo de evaluar en que estadio de desarrollo la transferencia de embriones presenta mayor eficiencia, realizando un total de tres transferencias para cada estadio (día 5 o día 7-8 de cultivo).

Durante la transferencia, la anestesia de las gatas fue inducida con una dosis intramuscular de Acepromacina (Acepromacina al 2%) y Ketamina (Ketamil®, ketamina al

10%) en relación 1:2. La mantención de la anestesia se realizó con bolos endovenosos de la mezcla de Acepromacina y Ketamina en relación 1:2. Una vez bajo anestesia, se realizó una incisión por la línea media abdominal y se expusieron ambos cuernos uterinos. Posteriormente, se utilizó una branula de 20G para realizar un orificio en uno de los cuernos uterinos, seleccionándose el cuerno que presentó el mayor número de cuerpos lúteos. Los embriones seleccionados fueron colocados en medio de manipulación con BSA y luego fueron cargados en un catéter Tomcat, el catéter fue colocado dentro del orificio en dirección craneal y los embriones fueron depositados dentro del cuerno uterino. Una vez finalizada la cirugía la gata receptora recibió una dosis única de 0,2-0,3 mL del antibiótico de amplio espectro Convenia® (Cefovecin sódico, 80mg/mL, Zoetis).

Posteriormente, la preñez de cada gata receptora fue confirmada por ecografía abdominal aproximadamente al día 20 de gestación. La presencia de una o más vesículas germinales y la identificación del latido cardiaco fueron confirmatorios de preñez. Una vez confirmada la preñez, se esperó a que la gestación llegará a término y que las crías nacieran por parto natural. Finalmente, se estimaron las tasas de preñez, de nacidos vivos, y se registró el peso y largo de las crías.

Evaluación del desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro* posterior a la remoción de la zona pelúcida.

Remoción de la zona pelúcida

En este experimento, una vez finalizada la FIV, se eliminaron las células del cúmulo con hialuronidasa (0,5 mg/mL) y 7 minutos de vórtex. Posteriormente, los posibles cigotos fueron lavados en medio de manipulación para eliminar la hialuronidasa.

En este momento se generaron dos grupos experimentales: 1) un grupo de cigotos a los cuales se les removió la zona pelúcida posterior a la fecundación (Grupo Zona Libre) y 2) un grupo de embriones que fueron cultivados normalmente con presencia de la zona pelúcida (Grupo Zona Incluida). En el caso del Grupo Zona Libre, previo a la remoción de la zona pelúcida, los posibles cigotos fueron lavados en medio de manipulación sin suero

fetal bovino (T0). Luego, la zona pelúcida fue removida colocando los cigotos en una gota de pronasa (2m/mL) por 3 – 4 minutos. Lo cual fue realizado sobre una platina térmica a 38,5 °C y moviendo levemente la placa para promover la degradación de la zona. Los posibles cigotos sin zona, fueron lavados primero en medio de manipulación y posteriormente en medio de manipulación con 30% de SFB (T30) para inactivar la pronasa.

Cultivo *in vitro* de embriones zona-libre

En el Grupo Zona Libre, los posibles cigotos fueron cultivados en placas de cuatro pocillos utilizando el sistema Well of the Well (WOW). Mientras que los cigotos del Grupo Zona Incluida fueron cultivados bajo las condiciones anteriormente descritas. Los micropocillos fueron realizados por calor, para lo cual se utilizó una sonda de endodoncia de acero inoxidable, la punta de la sonda se calentó por 3-4 segundos en un mechero, luego esta se colocó levemente sobre la placa y se dejó en esa posición por 10 segundos antes de ser retirada. Posteriormente, se utilizó una aguja de agregación (Aggregation needles, DN-09, BLS Ltd) para darle forma a los pocillos por presión mecánica. La placa fue lavada 2 a 3 veces con medio de cultivo, luego esta se dejó reposando 12-24 horas con medio de cultivo, y fue lavada nuevamente antes de colocar los embriones. Esto con el propósito de eliminar cualquier residuo potencialmente tóxico producido por el plástico calentado.

Los embriones fueron cultivados en 500 µL de medio SOF suplementado, colocando un embrión por cada micropocillo. El cultivo se realizó bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, suplementando el medio con 10% de SFB al día 5 de cultivo y finalizando el cultivo al día 8. Se determinaron, las tasas de división, formación de mórulas y tasa de blastocistos en ambos grupos experimentales.

Medición del diámetro de los blastocistos y conteo de células totales

El diámetro de los blastocistos generados en ambos grupos experimentales fue medido utilizando el software Micrometrics, el cual permite generar mediciones de las fotos tomadas por una cámara acoplada al esteromicroscopio. Para el conteo de células

totales, los blastocistos de ambos grupos fueron fijados con glutaraldehído al 3% durante 72 horas y posteriormente teñidos con Hoechst 33342, de la misma manera a lo anteriormente descrito.

Experimento 2.2. Evaluación del desarrollo *in vitro* de embriones clonados de gato doméstico y güiña.

Preparación de citoplastos receptores

Se utilizaron ovocitos de gatas tratadas con 200 UI eCG y madurados bajo las mismas condiciones anteriormente descrita, solo que esta vez el período se redujo a 24 horas. Una vez finalizada la MIV, se removieron las células del cúmulo y se seleccionaron solo los ovocitos con presencia del primer cuerpo polar para ser utilizados como citoplasto receptor. Los ovocitos seleccionados fueron incubados en 500 μ L de medio de maduración con 4 μ M de demecolcina durante 2 horas, esto provocó la protrusión del plato metafásico para facilitar la enucleación de los ovocitos.

Células donantes de núcleo

Se utilizaron fibroblastos de gata doméstica, entre los pases 4-5. Para la sincronización en fase G₀/G₁, los fibroblastos fueron cultivados en placas de 60 mm hasta alcanzar un 60-80% de confluencia, posteriormente se expusieron al método de privación de suero (DMEM F12 + 0,5% SFB) durante 2 días, el medio fue suplementado con 10 μ L/mL de ITS (Insulin-Transferrin-Selenium Supplement 100x, Gibco, Thermofisher) para disminuir la apoptosis. Los fibroblastos de güiña presentaron un crecimiento más lento que los de gato, estos fueron cultivados en una placa de 35 mm. Se utilizaron fibroblastos de güiña en pase 4, los cuales fueron cultivados por tres días hasta alcanzar un 60-80% de confluencia, luego estos fueron sometidos al método de privación de suero por 1-2 días para inducir la quiescencia celular.

Durante el proceso de clonación, los fibroblastos fueron desprendidos de la placa incubándolos con 0,025% de tripsina-EDTA por cuatro minutos, se centrifugaron a 1500

rpm por 5 minutos y fueron finalmente resuspendidos en 1 mL de medio de cultivo. Todo esto en no más de 30 minutos antes de comenzar la fusión.

Transferencia nuclear somática sin la presencia de zona pelúcida

Una vez finalizada la incubación con demecolcina, se seleccionaron los ovocitos con protrusión del plato metafásico. Se removió la zona pelúcida incubando los ovocitos 2-4 minutos en una solución con 2 mg/mL de pronasa en TCM-Hepes sin SFB, sobre una platina térmica a 39 °C y agitando la placa constantemente para asegurar la remoción de la zona. Los ovocitos fueron lavados 3-5 veces en medio de manipulación y luego en medio de manipulación con 30% de SFB. Finalizada la remoción de la zona pelúcida, los ovocitos fueron teñidos con 20 µg/mL de Hoechst 33342 por 20 minutos.

Para la enucleación los ovocitos fueron colocados en una gota de 100 µL de medio de manipulación con 10 µg/mL de citocalacina B, cubierta de aceite mineral. La enucleación se realizó por medio de micromanipulación, utilizando una pipeta de holding cerrada de unos 120 µm de diámetro para ayudar a sostener al ovocito y una pipeta de enucleación de 20 µm de diámetro sin bisel para extraer el plato metafásico. Tanto el ovocito como la pipeta de enucleación fueron expuestos brevemente a luz UV para confirmar la correcta remoción del plato metafásico.

Posteriormente, previo a la fusión, los ovocitos enucleados fueron pasados brevemente por 1 mg/mL fitohemoaglutinina (PHA) en TCM Hepes sin SFB. Luego de a un ovocito por vez, fueron puestos en una gota con TCM-Hepes con 2% de SFB (T2) en la cual se depositaron las células somáticas (Gato o Güiña), cada ovocito se adhirió a una célula somática generando los complejos ovocito-célula.

Para la fusión, se utilizó un electrofusor marca BLS (Budapest, Hungría, <http://www.bls-ltd.com>), junto con una cámara de fusión con 0,5 mm de separación entre los electrodos (BTX). Los ovocitos enucleados fueron colocados en la cámara de fusión, la cual contenía 300-500 µL de medio de fusión (0.3 M de Manitol, 0.05 mM de CaCl₂, 0.1 mM de MgCl₂ y 1 mg/mL de alcohol polivinílico). Estos fueron colocados cercanos al electrodo superior con ayuda de un pulso de corriente alterna y de tal manera que la célula somática quedara

en posición vertical respecto al ovocito. El pulso de fusión consistió en 140 kV/cm, por 40 μ sec y con 2 repeticiones. Posteriormente, se esperó un total de 30 minutos para verificar la fusión. Los ovocitos reconstruidos, se dejaron 1,5-2 horas en medio SOF suplementado, para asegurar la reprogramación.

Activación ovocitaria

Finalizado el tiempo de reprogramación, los ovocitos reconstruidos fueron activados por electroporación a través de pulso eléctrico. Para lo cual, fueron colocados en la cámara de fusión con 300-500 μ L de medio de fusión, la activación fue inducida por un pulso de 140 kV/cm por 40 μ sec (solo 1 repetición). Posteriormente, los ovocitos activados fueron incubados por 4-5 horas en medio SOF suplementado, con 10 μ g/mL de cicloheximida y 5 μ g/mL de citocalacina B en una atmósfera de 5%CO₂, 5%O₂ y 90%N₂.

Cultivo de embriones zona-libre

El cultivo de los ovocitos reconstruidos fue realizado similarmente a lo anteriormente descrito. Los clones zona-libre fueron cultivados utilizando el sistema WOW. En cada especie se generaron dos grupos experimentales, un grupo de embriones que fueron cultivados de manera individual por pocillo (Grupo Individual) y un grupo de embriones que fueron cultivados en agregado colocando dos por pocillo (Grupo Agregado). Los embriones fueron cultivados a 38,5°C, en una atmósfera de 5%CO₂, 5%O₂ y 90%N₂, por 8 días, el medio fue suplementado con 10% de SFB al día cinco de cultivo. Se estimaron las tasas de división, mórula y blastocisto.

Una proporción de los blastocistos generados fue congelada a -80°C para realizar los análisis de expresión génica, mientras que otra proporción de blastocistos fueron fijados para el conteo de células totales.

Análisis del patrón de expresión génica en embriones clonados de güiña y gato doméstico.

Para el análisis de expresión génica, se crearon 7 grupos de blastocistos generados por FIV (3-5 blastocistos por grupo), 7 grupos de blastocistos de gato generados por clonación y cultivo individual (1-3 blastocistos por grupo) y 5 grupos de blastocistos de gato generados por clonación y cultivo en agregado (1-3 blastocistos por grupo). Por otro lado, el reducido número de blastocistos de güiña generados por clonación limitó el número de muestras utilizadas, por lo cual se generaron 4 grupos de mórulas de güiña generadas por clonación y cultivo individual (3-5 mórulas por grupo), 4 grupos de mórulas de güiña generadas por clonación y cultivo en agregado (3-5 mórulas por grupo) y 4 grupos de blastocistos de güiña generados por clonación y cultivo en agregado (1-2 blastocistos por grupo). Los grupos fueron congelados a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN.

La extracción de ARN y la generación de ADNc se realizaron utilizando el Ambion Cell to cDNA II kit (AM1723; Life Technologies) siguiendo las instrucciones del kit, similar a lo descrito en la etapa I. Para el análisis de expresión génica se realizó un estudio cuantitativo mediante RT-qPCR utilizando el método de curva estándar. La curva estándar fue realizada con ocho puntos que correspondieron a diluciones seriadas (1:10), utilizando 2 μl por duplicado para cada punto de la curva. Para el análisis de qPCR cada muestra fue cargada por duplicado (replicas técnicas). La reacción de PCR fue realizada con 2 μl de ADNc, 1 μl de primers (10 pm de cada uno, forward y reverse) 5 μl de 2x Sensimix SYBR Hi-ROX (Bioline) y completado con 2 μl de H_2O para un volumen final de 10 μl . Se utilizó el equipo MX3000P Real-Time PCR (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Solo los experimentos con una eficiencia de 90-110% y con un coeficiente de correlación de 0,9 fueron utilizados para el análisis de expresión génica. Los resultados obtenidos mediante el método de curva estándar para cada gen de interés fueron normalizados utilizando el gen housekeeping *SDHA*.

Análisis estadístico

Durante la etapa II del proyecto, para estimar diferencias en el potencial de desarrollo *in vitro* las tasas de división, mórulas y blastocistos generados fueron analizadas utilizando los test no paramétricos de Wilcoxon o Kruskal wallis, dependiendo del número de grupos experimentales analizados. Mientras que el diámetro y el número de células totales de los blastocistos fue analizado con el test de t student. El análisis de expresión génica fue realizado utilizando el test no paramétrico de Kruskal wallis. Todo esto fue realizado utilizando el software estadístico Infostat, considerando significancia con un valor de $P < 0,05$.

Tabla 2. Lista de partidores utilizados para RT-qPCR en las etapas 1 y 2. Secuencia de partidores forward (F) y reverse (R), temperatura de aneling (Ta), tamaño del producto (Prod.) (pares de bases, pb), identificador de secuencia en NCBI.

Genes	Secuencia de partidores (5'-3')	Ta (°C)	Prod (pb)	NCBI N° de acceso
OCT4	F: CCGAAAGAGAAAGCGAACAAG R: GACCACATCCTTCTCCAGC	58	136	NM_001173441.1
SOX2	F: ATGCACAACCTCGGAGATCAG R: TTTATAATCCGGGTGCTCCT	58	132	NM_001173447.1
NANOG	F: CAGCCCCAGATACAGTTACAG R: GCTGGGCACTAAAATACTTGG	58	115	NM_001173442.1
GATA6	F: TGGATGGCCTTGACTGAC R: GAGCAGCAGGAGGAGCAAG	58	147	XM_006938823.1
CDX2	F: CAGTGAAAACCAGGACGAA R: CCGGATGGTGATGTAACGA	55	104	XM_003980306.1
FSHR	F: CTGCCTGCCCATGGATATT R: CTGTGAGGTAGATGTGAGCATAG	58	119	NM_001048014.1
LHCGR	F: GCACAGCAAGGAGACCAAATA R: CTTGGGTGAGCAGAAACCATAG	58	101	XM_011281083.1
EGFR	F: GTGCCGAGGAGAAAGAATACC R: CGTCACTTTGGTGGGTGTAA	58	102	HQ185236.1
ESR2	F: GTCAGACACGCCAGTAACAA R: TGTGGGCATTCAGCATCTC	58	103	XM_006932907.2

PTGS2	F: C T A C T G G A A G C C T A G C A C T T T R: G G A C A G C C C T T C A C G T T A T T	58	99	NM_001110449.1
EGR1	F: A G G A G T G A T G A A C G C A A G A G R: T A G G A A G A G A G A G A G G T G G T G	58	107	XM_003980809.3
GATM	F: G T G G A C A A C G G C T C C T A A A R: C T C G A A C T C A G T C G T C A C A A A	58	124	XM_003987192.3
GDF9	F: C A T C C G T G G A C C T G C T A T T T R: C C A G G T T G C A C A C A C A T T T C	58	129	NM_001165900.1
BMP15	F: C C G G C A A A C A G A C A G T A T C A R: T G G A A G C T G A C T T G G A A A G G	58	105	NM_001165898.1
BAX	F: G T C G T T G C C C T C T T C T A C T T T R: T C T C G A A G G A A G T C C A G T G T	55	110	NM_001009282.1
BCL2	F: G T G G A T G A C T G A G T A C C T G A A C R: G G A C A G C C A G G A G A A A T C A A	55	124	NM_001009340.1
GAPDH	F: A A G G C T G A G A A C G G G A A A C R: C A T T T G A T G T T G G C G G G A T C	58	80	NM_001009307.1
SDHA	F: G C A G C A G A A G A A G C C A T T T G R: G T C A T T G A C G G G T C T G T A C T C	58	103	XM_003981595.1

Fuente: Elaboración propia.

V. RESULTADOS

Etapa 1. Experimento 1.1. Implementación de un protocolo de estimulación ovárica para la generación de ovocitos competentes de gata doméstica

Evaluación del tratamiento con FSH a gatas en anestro sobre la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario in vitro

Evaluación de la calidad morfológica de los CCOs posterior al tratamiento con FSH

Un total de 11 gatas fueron sometidas al tratamiento con FSH (5mg/animal/día) durante cuatro días, y 13 gatas a las cuales no se les realizó este tratamiento se utilizaron como control negativo. El grupo tratado con FSH presentó un mayor porcentaje de CCOs grado I respecto al grupo control (25,4 y 11,6%, respectivamente) ($P < 0,05$), mientras que el porcentaje de CCOs grado III y IV fue menor en el grupo tratado con FSH en comparación al grupo control ($P < 0,05$) (Tabla 3). Posterior a la maduración se observó una mayor expansión de las células del cúmulo en los CCOs del grupo tratado con FSH en comparación al grupo control, lo cual podría estar asociado a una mayor maduración ovocitaria (Figura 4). Sin embargo, no se observó diferencia significativa en el porcentaje de ovocitos que presentaban el primer cuerpo polar posterior a la MIV entre ambos grupos ($P > 0,05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del tratamiento con FSH a gatas en anestro sobre la calidad de los complejos cúmulo-ovocito.

Grupo	N° Replicas	Total CCOs	Media CCOs (D.E.)	CCOs Grado I (%)	CCOs Grado II (%)	CCOs Grado I y II (%)	CCOs Grado III y IV (%)	%Cuerpo polar (Media ± DE)
FSH	11	979	89 ± 38,1 ^a	25,4 ^a	24,8 ^a	50,8 ^a	49,2 ^a	60,4 ± 26,5 ^a
Anestro	13	1000	76,9 ± 28,9 ^a	11,6 ^b	25,1 ^a	36,5 ^b	63,5 ^b	51,8 ± 10,0 ^a

^{a,b} Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

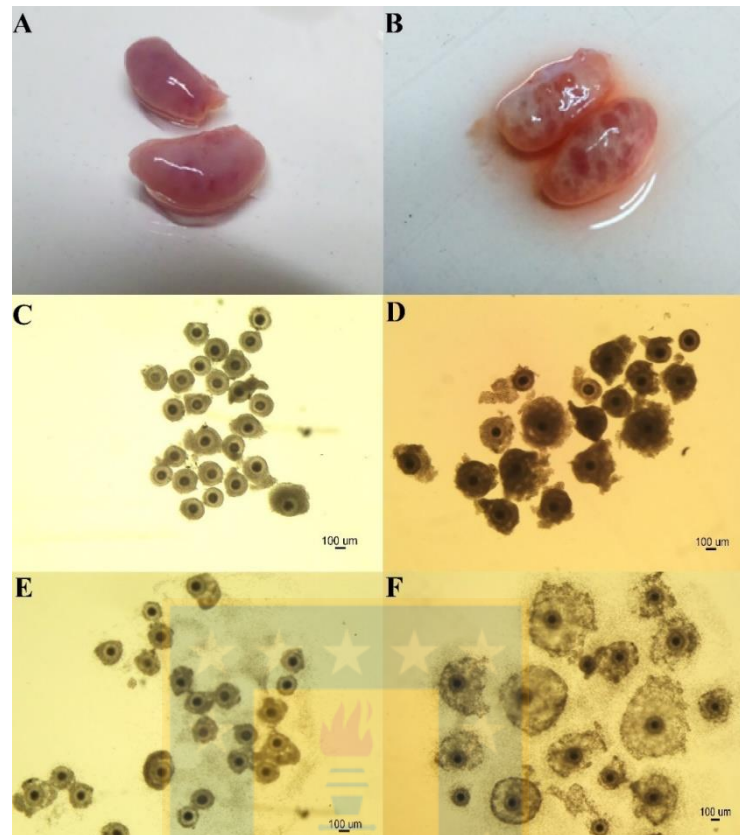


Figura 4. Características morfológicas de los ovarios y CCOs de los grupos control y FSH. A: par de ovarios inactivos colectados de una gata en anestro del grupo control. B: par de ovarios colectados de una gata en anestro del grupo FSH un día posterior al tratamiento. C: CCOs inmaduros del grupo control, 4x. D: CCOs inmaduros del grupo FSH, 4x. E: CCOs del grupo control posterior a la MIV, 4x. F: CCOs del grupo FSH posterior a la MIV, 3,2x. Fuente: Elaboración propia.

Efecto del tratamiento con FSH a gatas en anestro sobre el patrón de expresión génica de los CCOs inmaduros.

Para este experimento, se colectaron CCOs inmaduros grado I y II de cuatro gatas del grupo FSH y cuatro gatas del grupo control. Se seleccionaron siete genes específicos para evaluar el efecto del tratamiento con FSH sobre el patrón de expresión génica de los CCOs inmaduros. Entre estos genes, dos corresponden a receptores de gonadotropinas (*FSHR* y *LHCGR*), tres genes inducidos por gonadotropinas cuya

expresión es relevante para la adquisición de la competencia ovocitaria y maduración (*EGFR*, *PTGS2* y *EGR1*), y dos genes relacionados a la competencia ovocitaria (*GDF9* and *GATM*) cuyo aumento en la expresión es predictivo de un mejor desarrollo embrionario.

Los CCOs inmaduros grado I y II del grupo tratado con FSH presentaron una mayor expresión relativa de *FSHR* en comparación a los CCOs del grupo control ($P < 0,05$). Además, los CCOs inmaduros grado I y II del grupo FSH presentaron una menor expresión de *GATM* en comparación al grupo control ($P < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de *FSHR*, *EGFR*, *PTGS2*, *EGR1* y *GDF9* entre ambos grupos ($P > 0,05$) (Figura 5).

Efecto de la aplicación exógena de FSH a gatas en anestro sobre la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*.

En este experimento se generaron embriones mediante activación partenogenética con el objetivo de evaluar la competencia ovocitaria y evadir los posibles efectos negativos que genera la estación no reproductiva sobre la calidad y motilidad espermática.

Para este experimento, se utilizaron CCOs grado I y II procedentes de siete gatas tratadas con FSH y nueve gatas del grupo control. Posterior a la activación partenogenética, no se observó diferencia significativa en la tasa de división entre los embriones del grupo FSH y el grupo control ($> 0,05$). Sin embargo, los ovocitos activados del grupo FSH generaron una mayor tasa de blastocistos y blastocisto protruyendo al día 8 de cultivo en comparación al grupo control ($P < 0,05$) (Tabla 4).

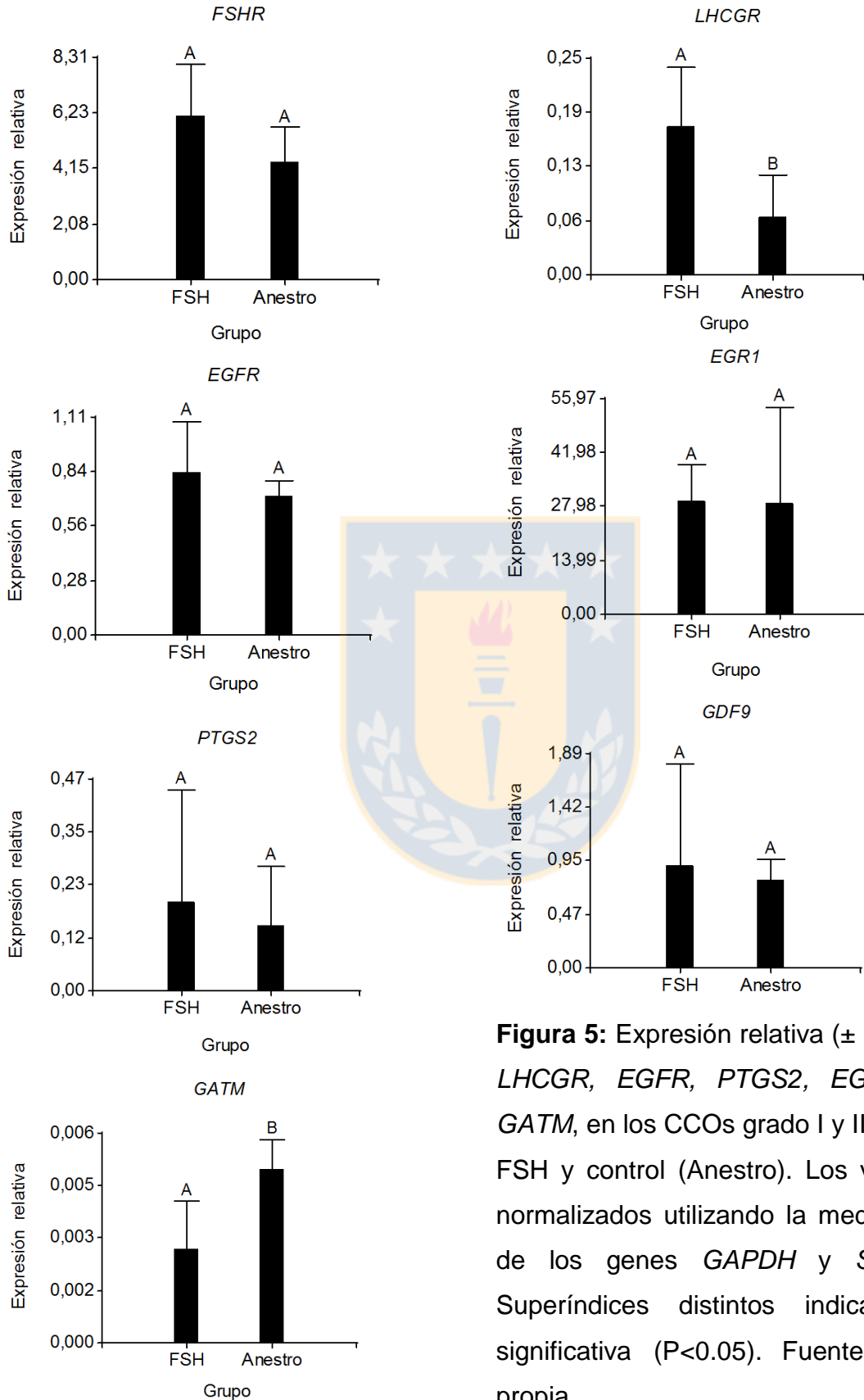


Figura 5: Expresión relativa (\pm DE) de *FSHR*, *LHCGR*, *EGFR*, *PTGS2*, *EGR1*, *GDF9* y *GATM*, en los CCOs grado I y II de los grupos FSH y control (Anastro). Los valores fueron normalizados utilizando la media geométrica de los genes *GAPDH* y *SDHA*. (A, B): Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0.05$). Fuente: Elaboración propia.

Además, el tratamiento con FSH mejoró la calidad morfológica de los embriones generados por activación partenogenética, lo cual se evidenció por un incremento en el número de células totales en los blastocistos y blastocistos protruyendo del grupo FSH en comparación al grupo control ($P < 0,05$) (Figura 6).

Evaluación de la expresión génica de los blastocistos producidos en el grupo tratado con FSH y el grupo control.

En este experimento se evaluó la expresión relativa de los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, y los genes de diferenciación *CDX2* y *GATA6* en los blastocistos y blastocistos protruyendo generados en los grupos FSH y control. Los resultados obtenidos demostraron que los blastocistos y blastocistos protruyendo del grupo FSH presentan una mayor expresión relativa de *OCT4* y *GATA6* en comparación a sus contrapartes del grupo control ($P < 0,05$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de *SOX2*, *NANOG* y *CDX2* entre los blastocistos y blastocistos protruyendo de ambos grupos ($P > 0,05$) (Figura 7).

Tabla 4. Desarrollo embrionario post activación partenogenética de ovocitos grado I y II, en el grupo tratado con FSH y el grupo control.

Grupo	n	Ovocitos activados	Embriones divididos N° (%)	*Blastocistos totales N° (%)	Blastocistos protruyendo N° (%)	**Número de células totales (± DE)
FSH	7	190	125 (65,8) ^a	58 (30,5) ^a	25 (13,2) ^a	199,9 ± 53,6 ^a
Anestro	9	198	104 (52,5) ^a	26 (13,1) ^b	2 (1,0) ^b	121 ± 34,9 ^b

^{a,b}: Superíndices distintos en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$). (DE): desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

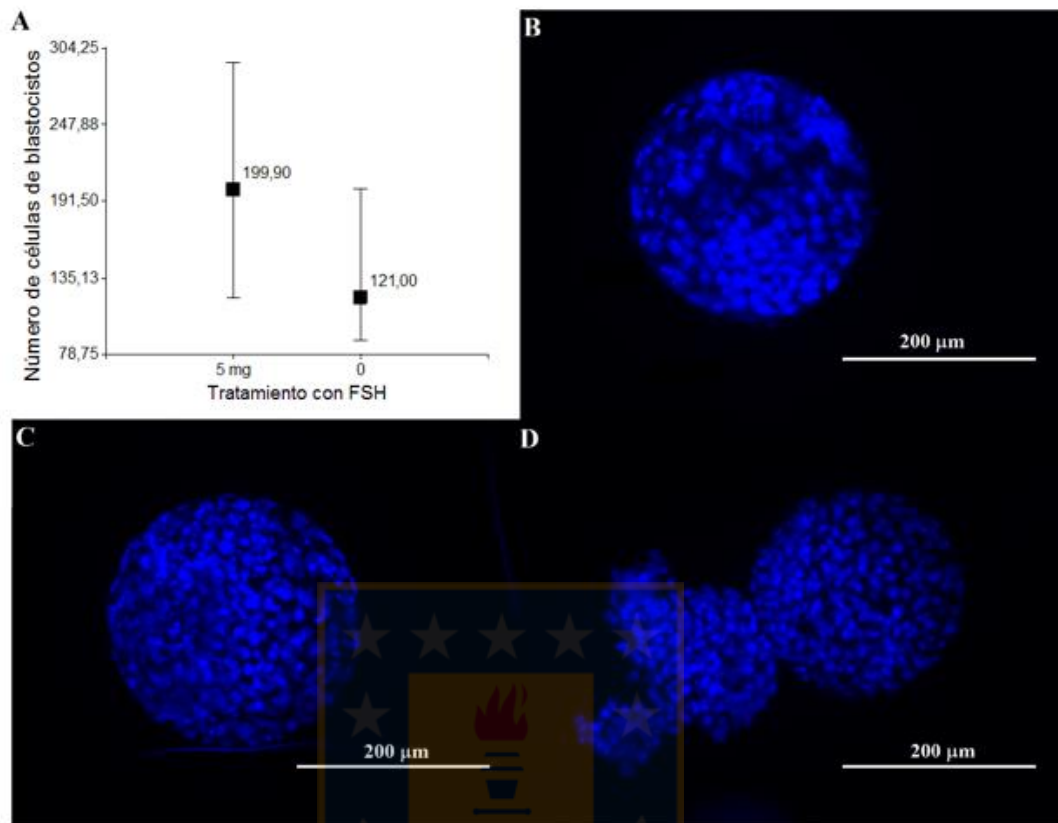


Figura 6. Conteo de células totales de los blastocistos y blastocistos protruyendo de los grupos control y FSH. **A:** Número de células totales de los blastocistos y blastocistos protruyendo de los grupos control y FSH, $P < 0,05$. **B:** Blastocisto del grupo control teñido con Hoechst 33342, 20x. **C:** Blastocisto del grupo FSH teñido con Hoechst 33342, 20x. **D:** Blastocisto protruyendo del grupo FSH teñido con Hoechst 33342, 20x. Fuente: Elaboración propia.

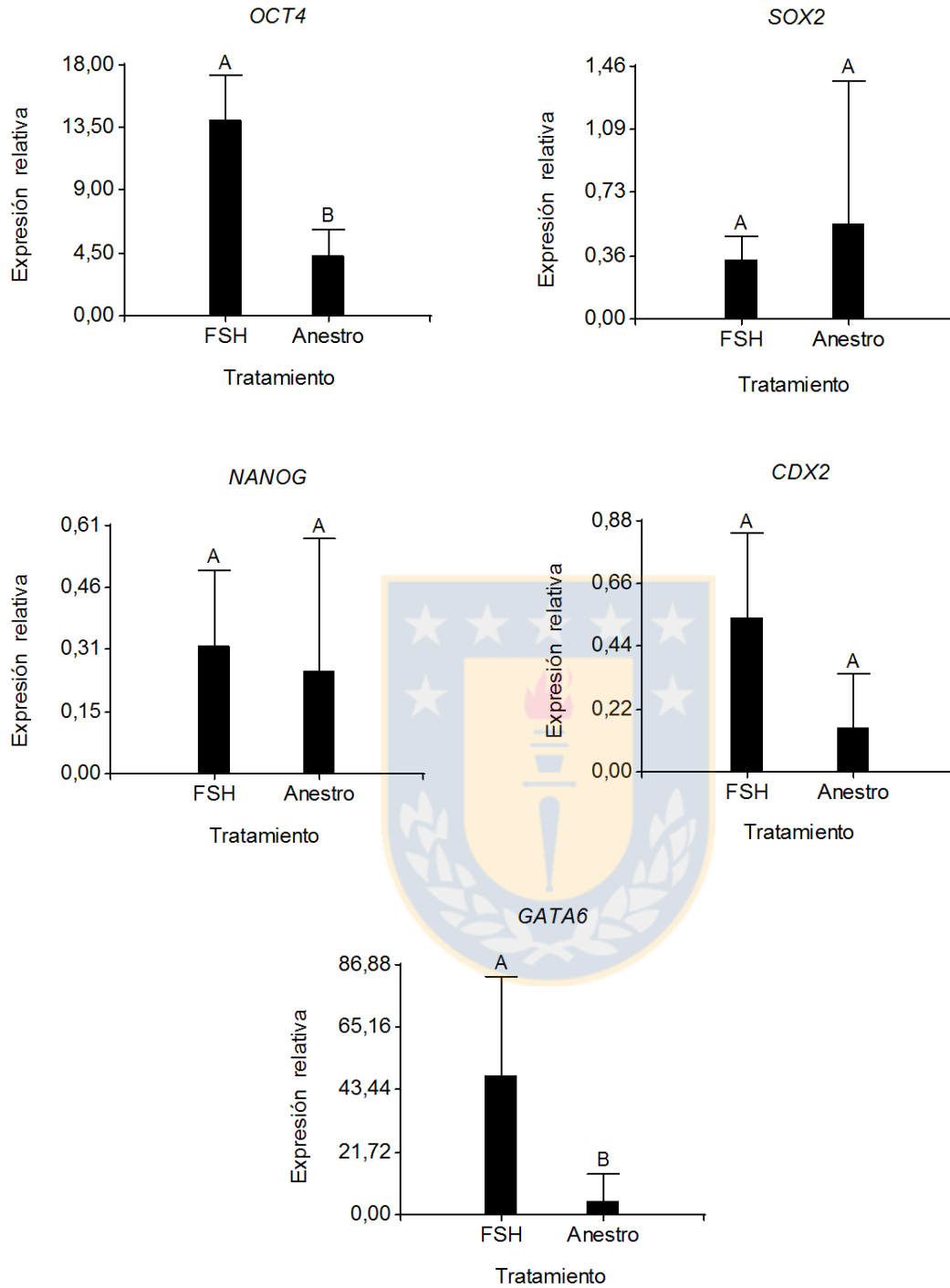


Figura 7. Expresión relativa de los genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CDX2*, y *GATA6*. Expresión relativa (\pm DE) en relación al promedio geométrico de *GAPDH* y *SDHA*, en blastocistos de gato de 8 días de cultivo, generados en el grupo FSH y el grupo control (Anastro). (A, B): Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Evaluación del efecto del tratamiento con eCG a gatas en anestro sobre la competencia ovocitaria y el desarrollo embrionario in vitro.

Evaluación de la calidad morfológica de los CCOs posterior al tratamiento con eCG.

Se colectaron CCOs de tres grupos experimentales, un grupo de 11 gatas ciclando durante la estación reproductiva (Estro), un grupo de 16 gatas en anestro durante la estación no reproductiva (Anestro), y un grupo de 12 de gatas en anestro tratadas con 200 UI de eCG (eCG). No se observó diferencia significativa en el total de CCOs colectados por gata entre cada grupo ($P > 0,05$). Sin embargo, el grupo eCG presentó una mayor proporción de CCOs de grado I y una menor proporción de CCOs grado III y IV en comparación a los grupos Estro y Anestro ($P < 0,05$) (Tabla 5). Además, posterior a la MIV, se observó una mayor expansión en las células del cúmulo en los CCOs recuperados de las gatas del grupo eCG (Figura 8). Similarmente, al remover las células del cúmulo, fue posible observar una mayor proporción de ovocitos con presencia del primer cuerpo polar en el grupo eCG en comparación a los grupos Estro y Anestro ($P < 0,05$) (Figura 11).

Tabla 5. Efecto del tratamiento con eCG a gatas en anestro sobre la calidad de los complejos cúmulo-ovocito (CCOs).

Grupo	N° replicas	Total CCOs	Media CCOs (\pm DE)	CCOs grado I (%)	CCOs grado II (%)	CCOs grado I y II (%)	CCOs grado III y IV (%)
Estro	11	625	56,8 \pm 20,5 ^a	16,5 ^a	26,4 ^a	42,9 ^a	57,1 ^a
Anestro	16	1356	84,8 \pm 36,1 ^a	9,5 ^a	25,7 ^a	35,2 ^a	64,8 ^a
eCG	12	1182	98,5 \pm 63,2 ^a	33,2 ^b	22,3 ^a	55,5 ^b	44,5 ^b

^{a,b}: Superíndices distintos en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia.

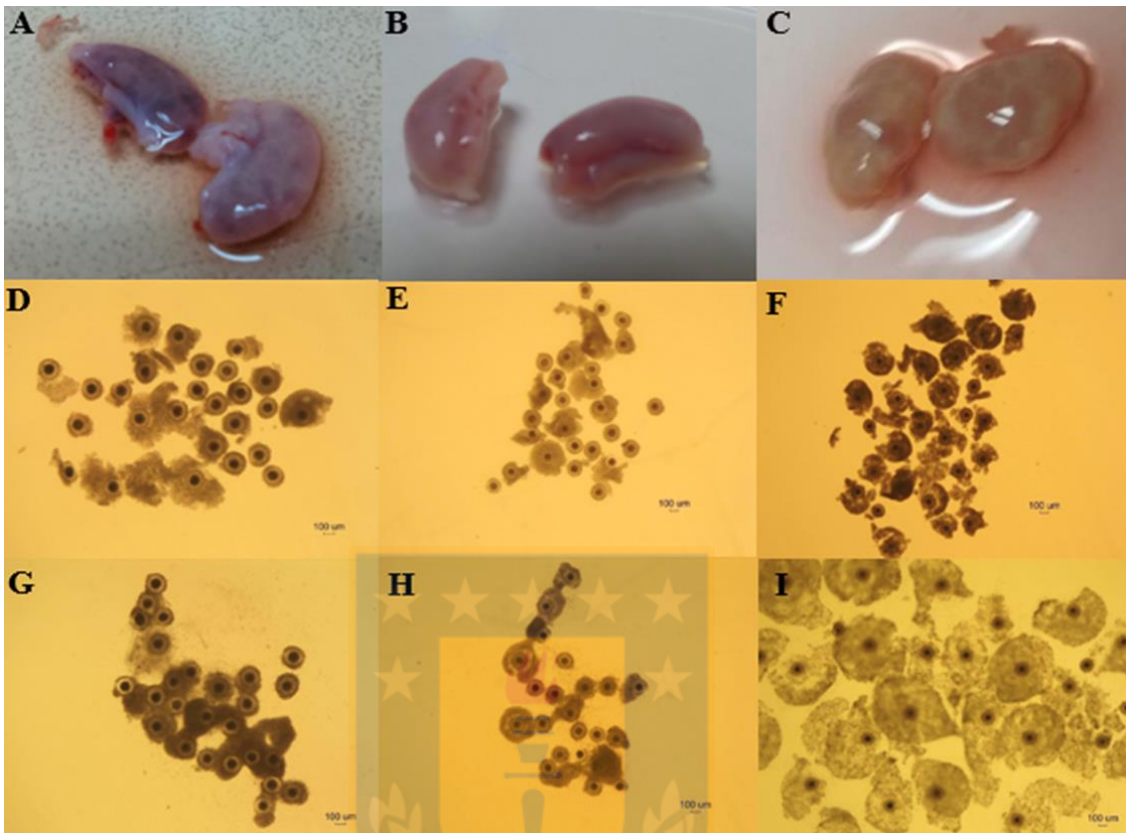


Figura 8. Características morfológicas de los ovarios y CCOs de los grupos Estro, Anestro y eCG. **A:** par de ovarios activos colectados de una gata del grupo Estro. **B:** par de ovarios inactivos colectados de una gata del grupo Anestro. **C:** par de ovarios colectados de una gata en anestro del grupo eCG posterior al tratamiento. **D:** CCOs inmaduros del grupo Estro, 4x. **E:** CCOs inmaduros del grupo Anestro, 3,2x. **F:** CCOs inmaduros del grupo eCG 2,5x. **G:** CCOs del grupo Estro posterior a la MIV, 4x. **H:** CCOs del grupo Anestro posterior a la MIV, 3,2x. **I:** CCOs del grupo eCG posterior a la MIV, 3,2x. Fuente: Elaboración propia.

Efecto del tratamiento con eCG a gatas en anestro sobre el patrón de expresión génica de los CCOs inmaduros.

En este experimento, se evaluó la expresión relativa de receptores de gonadotrofinas (*FSHR* y *LHCGR*), genes inducidos por gonadotrofinas (*EGFR*, *EGR1*, *PTGS2* y *ESR2*) y genes relacionados a la competencia ovocitaria (*GDF9*, *BMP15* y *GATM*) en CCOs inmaduros grado I y II colectados de los grupos Estro, Anestro y eCG. En cuanto a los receptores de gonadotrofina, la expresión de ambos genes, *FSHR* y *LHCGR*, fue significativamente mayor en los CCOs del grupo eCG comparado a los grupos Anestro y Estro ($P < 0,05$).

En relación a los genes inducidos por gonadotrofinas, la expresión de *EGFR* presentó un patrón similar al de los receptores de gonadotrofina, siendo mayor en los CCOs del grupo eCG comparado a los grupos Anestro y Estro ($P < 0,05$). La expresión de *ESR2* en los CCOs del grupo eCG fue significativamente mayor comparada con el grupo Estro ($P < 0,05$). Mientras que la expresión relativa de *EGR1* de los CCOs del grupo eCG fue mayor a la del grupo Anestro ($P < 0,05$), sin presentar diferencia con el grupo Estro ($P > 0,05$). Sin embargo, en comparación a ambos grupos sin tratamiento, en los CCOs del grupo eCG se observó una menor expresión relativa de *PTGS2*, la cual fue significativamente menor comparada al grupo Estro ($P < 0,05$).

En cuanto a los genes relacionados a la competencia ovocitaria, *BMP15* y *GDF9* presentaron un patrón de expresión similar, en ambos casos los CCOs del grupo eCG presentaron una menor expresión en comparación al grupo Anestro ($P < 0,05$). Mientras, que la expresión relativa de *GATM* fue significativamente menor en los CCOs del grupo eCG comparada con el grupo Estro ($P < 0,05$) (Figura 9).

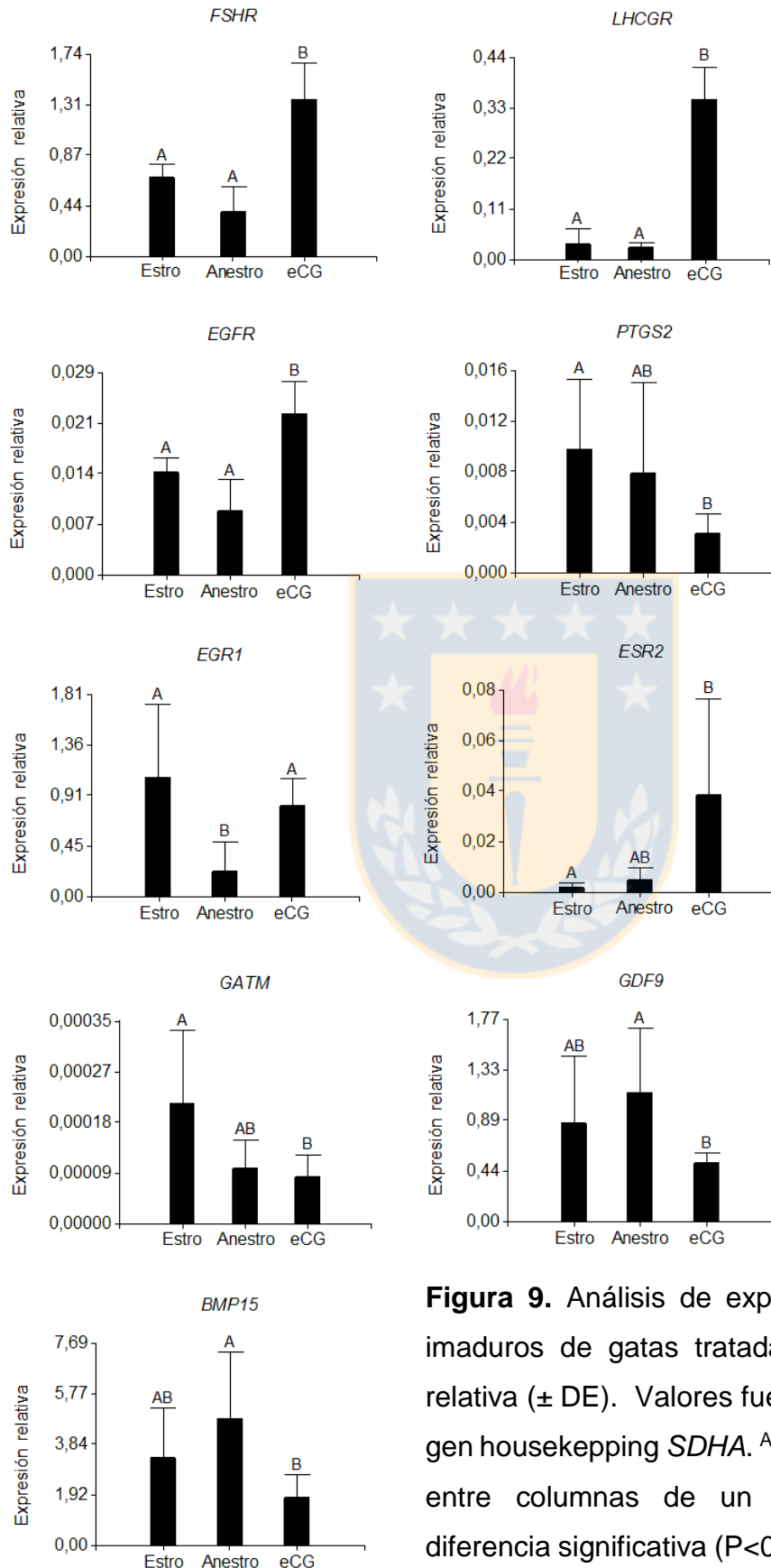


Figura 9. Análisis de expresión génica en CCOs imaduros de gatas tratadas con eCG. Expresión relativa (\pm DE). Valores fueron normalizados con el gen housekeeping *SDHA*. ^{A, B}: Superíndices distintos entre columnas de un mismo gráfico indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Elaboración propia.

Evaluación de la maduración in vivo de ovocitos de gata mediante la estimulación ovárica con eCG y hCG

De acuerdo a los resultados anteriores, que indican que el tratamiento con eCG induce una mayor expresión de los genes relacionados a gonadotropinas en los CCOs en comparación con el tratamiento con FSHp, se decidió utilizar la eCG en combinación con hCG para evaluar la maduración *in vivo* de ovocitos de gata (Grupo hCG).

Posterior a la administración de 200 UI de eCG a las gatas, se administraron 100 UI de hCG vía intramuscular 96 horas después, la ovariectomía se realizó 24 horas posterior a la administración de hCG. Los resultados obtenidos demostraron que no todos los CCOs recuperados presentaron expansión de las células del cúmulo. De 7 gatas sometidas al tratamiento con hCG se colectaron un total de 233 CCOs con el cúmulo expandido, colectando un promedio de 33 CCOs con cúmulo expandido por gata, con un mínimo de 7 y un máximo de 72 CCOs por gata (Figura 10).

Posteriormente, al remover las células del cúmulo se observó que no en todos CCOs que presentaban un cúmulo expandido se evidenciaba la presencia del primer cuerpo polar. Solo un 56,6% de los ovocitos recuperados se encontraban en el estadio de MII (Grupo hCG). Sin embargo, al someter a los ovocitos inmaduros a un período de MIV de 20 h, el porcentaje de ovocitos maduros aumentó a un 76,3% (hCG-IVM). El resultado de las tasas de maduración ovocitarias de los grupos hCG y hCG-IVM, se compararon con las tasas de maduración de los grupos anestro, estro y eCG. Se observó que las tasas de maduración de los grupos eCG ($61,5 \pm 13,7\%$) y hCG-IVM ($76,3 \pm 10,7\%$) fueron significativamente mayor a las tasas de maduración de los grupos anestro ($47,9 \pm 13,6\%$) y estro ($43,7 \pm 11,1$) ($P < 0,05$). Sin observarse diferencia significativa en las tasa de maduración ovocitaria entre los grupos hCG ($56,6 \pm 29,5$), estro y anestro ($P > 0,05$) (Figura 11).

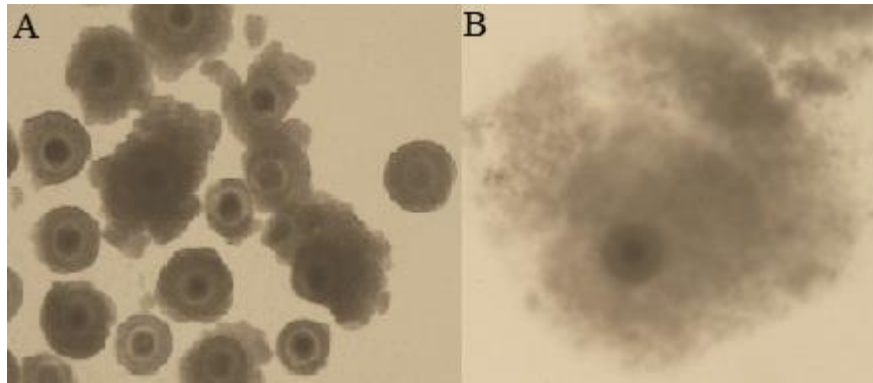


Figura 10. Complejos cúmulo-ovocito recuperados posterior al tratamiento con hCG. A) CCOs inmaduros colectados posterior al tratamiento con hCG. B) CCO madurado *in vivo* colectado posterior al tratamiento con hCG (3,2×). Fuente: Elaboración propia.

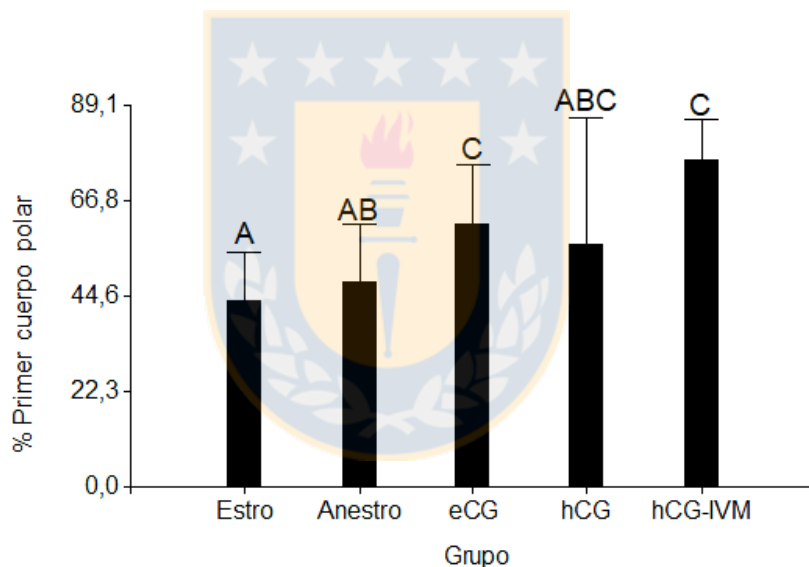


Figura 11. Tasa de maduración ovocitaria (Media \pm DS) en los grupos estro, anestro, eCG y hCG (hCG y hCG-IVM). ^{A-C}: Superíndices distintos indican diferencia significativa entre barras ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Evaluación del efecto de los tratamientos con eCG y eCG-hCG en gatas en anestro sobre la capacidad de desarrollo embrionario in vitro.

Posterior a la MIV de ovocitos en los grupos anestro, estro y eCG y la maduración *in vivo* de ovocitos en el grupo hCG, los ovocitos maduros fueron utilizados para generar embriones mediante activación partenogénica y de esta manera evaluar la competencia

ovocitaria en los cuatro grupos experimentales. Posterior a la activación partenogenética, los ovocitos del grupo Anestro presentaron una reducida tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto. Sin embargo, posterior al tratamiento con eCG en las gatas en anestro se observó que los ovocitos recuperados presentaron una capacidad desarrollo similar a lo observado durante la estación reproductiva. Los ovocitos activados del grupo eCG presentaron una tasa de desarrollo hasta el estadio de blastocisto, mayor a la del grupo Anestro ($P < 0,05$) y similar a la del grupo Estro ($P > 0,05$) (Tabla 8). Sin embargo, se obtuvo una gran variación en el número de células entre un blastocisto y otro, por lo cual no fue posible establecer una diferencia significativa en el número de células totales entre los blastocistos generados en grupos anestro, estro, eCG y hCG ($P > 0,05$) (Figuras 12 y 13).

Al evaluar el tratamiento con hCG primero se determinó el potencial de desarrollo de los ovocitos de gata madurados *in vivo* (hCG *in vivo*), los cuales fueron activados inmediatamente después a su colección, en comparación al potencial de desarrollo de los ovocitos de gata recuperados posterior al tratamiento con hCG y a los cuales se les dio un período de 20 horas de MIV (hCG + IVM). No se observaron diferencias significativas en la tasa de división, formación de mórulas y blastocistos totales entre ambos grupos ($P > 0,05$) (Tabla 6). Adicionalmente, se observó que los embriones generados en el grupo hCG presentaron las mayores tasas de división y formación de mórulas, siendo significativamente mayor comparadas al grupo Estro ($P < 0,05$). Sin embargo, al día 8 de cultivo, no se observaron diferencias significativas en las tasas de blastocistos y blastocistos protruyendo entre los grupos Estro, eCG y hCG ($P > 0,05$). Además, las tasas de blastocistos totales de los grupos eCG y hCG fueron significativamente mayor a la del grupo Anestro ($P < 0,05$) (Tabla 7).

Tabla 6. Desarrollo embrionario post activación partenogenética de ovocitos maduros recuperados de gatas tratadas con hCG.

Grupo	n	Ovocitos activados	Embriones divididos N° (%)	Mórulas día 5 N° (%)	Blastocistos N° (%)	Blastocistos protruyendo N° (%)	Total Blastocistos N° (%)
hCG <i>in vivo</i>	3	38	35 (92,1) ^a	25 (65,8) ^a	11 (28,9) ^a	2 (5,3) ^a	13 (34,2) ^a
hCG + IVM	5	107	88 (91,6) ^a	75 (78,1) ^a	18 (18,8) ^a	11 (11,5) ^a	29 (30,2) ^a
hCG (Total)	8	145	123 (91,8)	100 (74,6)	26 (19,4)	13 (9,7)	42 (31,4)

^{a,b}: Superíndices distintos en la misma columna indican diferencia significativa (P<0,05). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Desarrollo embrionario post activación partenogenética de ovocitos grado I y II, en los grupos estro, anestro, eCG y hCG.

Grupo	n	Ovocitos activados	Embriones divididos N° (%)	Mórulas día 5 N° (%)	Blastocistos N° (%)	Blastocistos protruyendo N° (%)	Total blastocistos N° (%)
Estro	6	70	54 (77,1) ^a	39 (55,7) ^a	17 (24,3) ^{ab}	7 (10) ^a	24 (34,3) ^{ab}
Anestro	12	154	141 (91,6) ^{ab}	105 (68,2) ^{ab}	17 (11) ^a	9 (5,8) ^a	26 (16,9) ^a
eCG	9	189	153 (81) ^{ab}	119 (63) ^{ab}	50 (26,5) ^b	12 (6,3) ^a	62 (32,8) ^b
hCG	9	156	145 (92,9) ^b	116 (74,4) ^b	33 (21,2) ^{ab}	16 (10,3) ^a	49 (31,4) ^{ab}

^{a,b}: Superíndices distintos en la misma columna indican diferencia significativa (P<0,05).

Fuente: Elaboración propia.

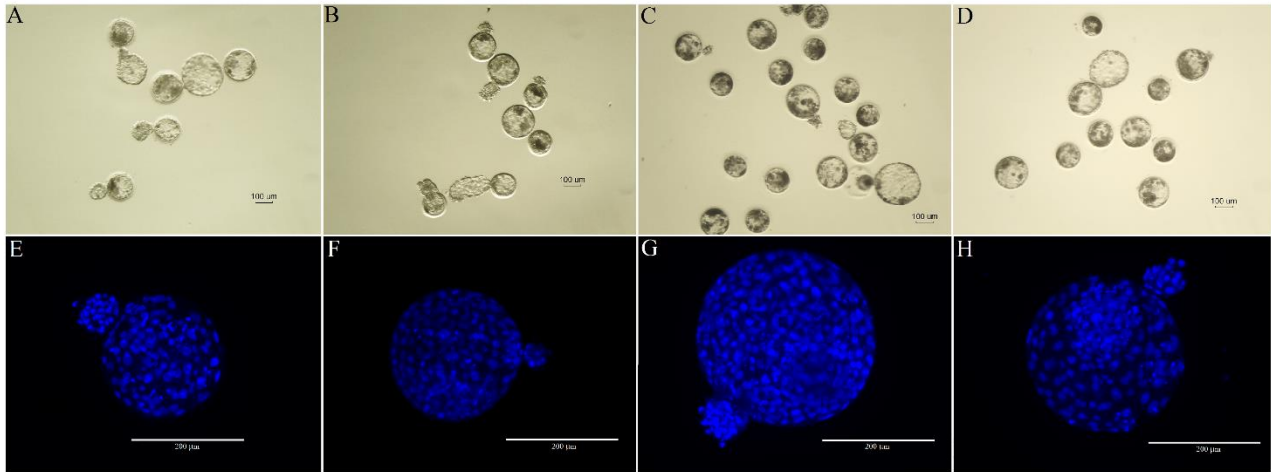


Figura 12. Blastocistos y blastocistos protruyendo a los 8 días de cultivo en los grupos estro (A), anestro (B), eCG (C) y hCG (D). Blastocistos teñidos con Hoechst 33342 en los grupos estro (E), anestro (F), eCG (G) y hCG (H) (20x). Fuente: Elaboración propia.

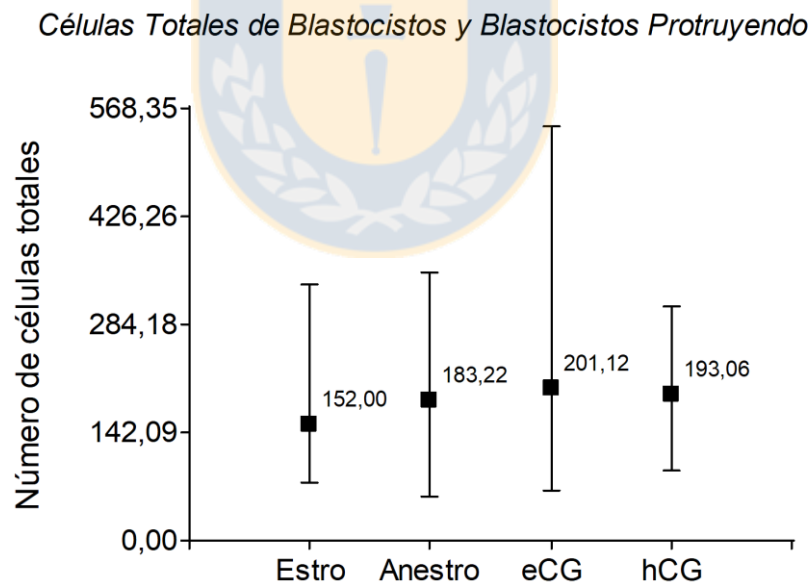


Figura 13. Conteo de células totales de los blastocistos y blastocistos protruyendo de los grupos estro, anestro, eCG y hCG (Media, Min/Max). Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Evaluación del efecto del tratamiento con eCG y hCG sobre el patrón de expresión génica en los blastocistos generados por activación partenogenética.

Se analizaron los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* y de diferenciación *CDX2* y *GATA6*. No se encontró diferencia significativa en la expresión relativa de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *CDX2* entre los blastocistos generados en los grupos Estro, Anestro, eCG y hCG ($P > 0,05$). Sin embargo, en los blastocistos del grupo eCG se presentó una tendencia a una mayor expresión relativa de *GATA6* en comparación al grupo anestro ($P = 0,1$). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de *GATA6* entre los blastocistos del grupo Estro, Anestro y hCG ($P > 0,05$) (Figura 14).



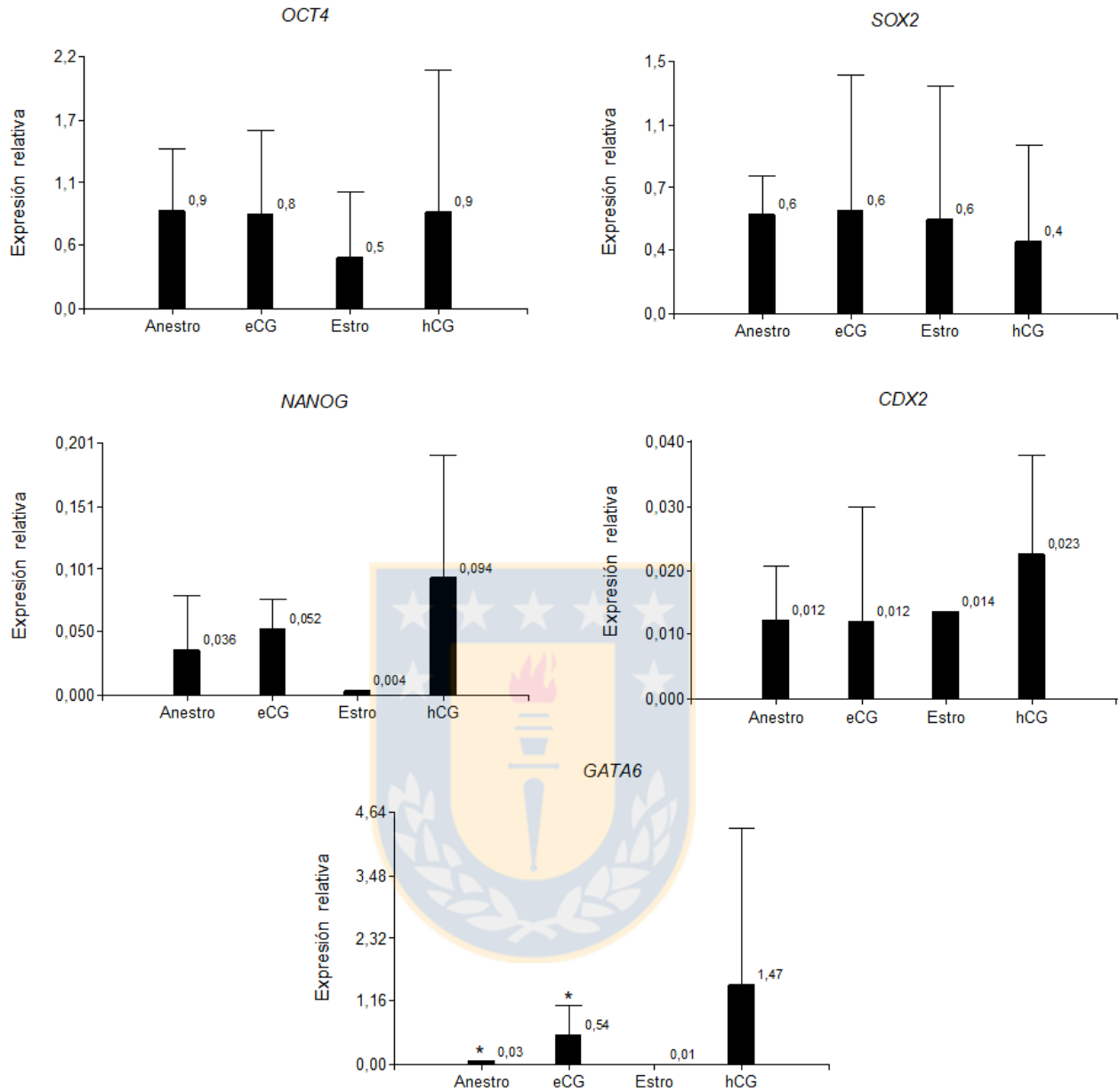


Figura 14. Análisis de expresión génica de los blastocistos y blastocistos protruyendo generados en los grupos Estro, Anestro, eCG y hCG. Los resultados fueron normalizados utilizando el gen housekeeping SDHA ($P < 0,05$). Sobre cada barra se indica el valor de la media de cada grupo. ^{A, B}: Superíndices distintos indican diferencia significativa dentro del mismo gráfico. *: indica tendencia entre dos grupos ($P \leq 0,1$). Fuente: Elaboración propia.

En resumen, el tratamiento con eCG y hCG en la gata doméstica permite la colección de ovocitos maduros competentes. Sin embargo, una proporción de estos ovocitos necesitan un período de MIV adicional para reanudar la meiosis. Además, el tratamiento con eCG y hCG mejora el desarrollo embrionario *in vitro* posterior a la activación partenogénica. Sin embargo, estos resultados no son significativamente distintos a los obtenidos solo con eCG y madurando los ovocitos *in vitro*.

De acuerdo, estos resultados se decidió utilizar el protocolo con eCG y MIV para la posterior generación de embriones de gato doméstico mediante FIV y embriones de gato y de güiña mediante clonación. Esto debido a que los ovocitos maduros obtenidos por este protocolo presentaron una competencia similar a la de los ovocitos madurados *in vivo*, sin la necesidad de una dosis adicional de hCG. Lo cual facilita el manejo de los animales y disminuye los costos, sin afectar la eficiencia del proceso.

Experimento 1.2. Determinación de un protocolo de inducción de arresto del ciclo celular en células somáticas de gato doméstico y güiña.

Análisis del ciclo celular en fibroblastos de gato doméstico y güiña sometidos a distintos tratamientos de inducción de quiescencia.

En este experimento, se evaluaron distintos protocolos de sincronización del ciclo celular en la fase G₀/G₁ (inhibición por contacto por 1, 3 y 5 días, y privación de suero por 1, 3 y 5 días) tanto en los fibroblastos de gato doméstico como de güiña. Mediante citometría de flujo fue posible identificar las fases G₀/G₁, S y G₂/M, así como también el grado de apoptosis en cada tratamiento, tanto en los fibroblastos de gato doméstico como de güiña (Figura 15).

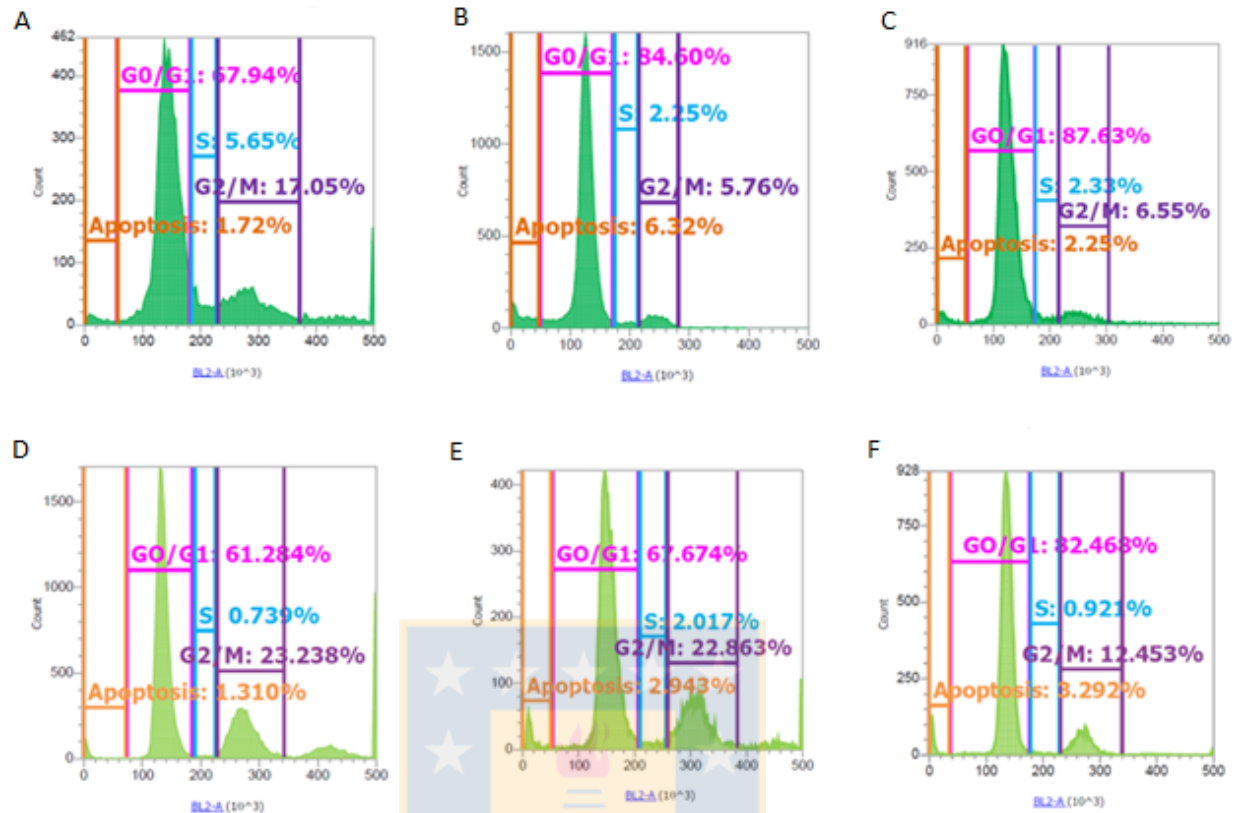


Figura 15: Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo en los fibroblastos de gato doméstico (A: células en crecimiento, B: inhibición por contacto, C: privación de suero) y en los fibroblastos de güiña (D: células en crecimiento, E: inhibición por contacto, F: privación de suero). Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de este experimento demostraron que los fibroblastos de gato doméstico y güiña responden de manera distinta a cada tratamiento de inducción de quiescencia. Ambos métodos, tanto la privación de suero como la inhibición por contacto aumentan la proporción de fibroblastos de gato doméstico y de güiña arrestados en la fase G0/G1 del ciclo celular, observándose diferencias entre ambas especies.

En el gato doméstico, tanto la privación de suero como la inhibición por contacto, ambas por 3 y 5 días, aumentan significativamente la proporción de fibroblastos arrestados en la fase G0/G1 del ciclo celular y reducen la proporción de fibroblastos en las fases S y G2/M en comparación a los fibroblastos que se encontraban en crecimiento (60-80% confluencia) que fueron utilizados como control ($P < 0,05$). Por otro lado, no se encontraron

diferencias en la proporción de fibroblastos en las fases G0/G1, S y G2/M entre los tratamientos de privación de suero por 3 y 5 días y los tratamientos de inhibición por contacto por 3 y 5 días ($P>0,05$). Además, de acuerdo a los resultados de las citometrías, no se encontró diferencia significativa en la proporción de células en apoptosis entre todos los tratamientos ($P>0,05$) (Tabla 8).

En relación a los fibroblastos de güiña, los tratamientos de privación de suero por 3 y 5 días y la inhibición por contacto por 1 y 3 días aumentan significativamente la proporción de fibroblastos detenidos en la fase G0/G1 del ciclo celular ($P<0,05$). La privación de suero por 3 y 5 días generaron los porcentajes más altos de fibroblastos de güiña arrestados en la fase G0/G1. Sin embargo, a diferencia de lo observado en los fibroblastos de gato doméstico, la inhibición por contacto por 5 días no aumentó la proporción de fibroblastos de güiña arrestados en la fase G0/G1 comparado con los fibroblastos en crecimiento utilizados como control ($P>0,05$). Además, la inhibición por contacto por 5 días presentó la proporción más alta de fibroblastos de güiña en apoptosis en comparación a los demás tratamientos, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo ($P>0,05$). Adicionalmente, se observó que solo la privación de suero por 5 días redujó significativamente la proporción de fibroblastos de güiña que se encontraban en la fase G2/M del ciclo celular ($P<0,05$) (Tabla 9).

Tabla 8. Resultados del análisis de citometría de flujo (Media \pm DE) en fibroblastos de gato doméstico sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.

Tratamiento	Apoptosis (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Crecimiento	1,2 \pm 1 ^a	63 \pm 8,7 ^a	5,7 \pm 0,3 ^a	21 \pm 6,9 ^a
Privación de SFB 1 día	2,7 \pm 1,4 ^a	79,1 \pm 6,4 ^{ab}	2,7 \pm 0,8 ^b	12,1 \pm 3,9 ^{ab}
Privación de SFB 3 días	2,5 \pm 0,6 ^a	85,2 \pm 2,4 ^b	2,2 \pm 0,2 ^b	8,5 \pm 2,2 ^b
Privación de SFB 5 días	1,5 \pm 0,9 ^a	87,2 \pm 3,6 ^b	2,7 \pm 1 ^b	7,1 \pm 1,7 ^b
Confluencia 1 día	4 \pm 1,7 ^a	79,6 \pm 6,1 ^{ab}	3,3 \pm 1 ^{ab}	10,5 \pm 3,2 ^{ab}
Confluencia 3 días	3,1 \pm 1,9 ^a	85,5 \pm 7 ^b	2,5 \pm 1,2 ^b	7,3 \pm 4,9 ^b
Confluencia 5 días	4,7 \pm 1,6 ^a	85,4 \pm 2 ^b	2,6 \pm 0,3 ^b	6 \pm 0,8 ^b

^a, ^b: Superíndices distintos dentro de la misma columna indican diferencia significativa (P<0,05). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Resultados del análisis de citometría de flujo (Media \pm DE) en fibroblastos de güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.

Tratamiento	Apoptosis (%)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
Crecimiento	1 \pm 0,5 ^a	53,6 \pm 8,8 ^a	3,1 \pm 1,8 ^a	29,1 \pm 5,5 ^a
Privación SFB 1 día	1,9 \pm 1,7 ^a	66 \pm 4,4 ^{ab}	2,4 \pm 0,2 ^a	24,3 \pm 6,2 ^{ab}
Privación SFB 3 días	2 \pm 2,3 ^a	75,2 \pm 7,2 ^{bc}	3,4 \pm 2,5 ^a	16 \pm 9,2 ^{ab}
Privación SFB 5 días	2,1 \pm 1,7 ^a	82,5 \pm 4,8 ^c	2,9 \pm 1,6 ^a	10,5 \pm 5,7 ^b
Confluencia 1 día	1,7 \pm 1,4 ^a	71,1 \pm 3,5 ^{bc}	3 \pm 1,8 ^a	19,5 \pm 3 ^{ab}
Confluencia 3 días	1,8 \pm 1,6 ^a	71,1 \pm 4,8 ^{bc}	3,7 \pm 1,5 ^a	18,5 \pm 4,3 ^{ab}
Confluencia 5 días	4,1 \pm 3,6 ^a	66,4 \pm 5,1 ^{ab}	3,6 \pm 2 ^a	19,8 \pm 5,2 ^{ab}

a, b: Superíndices distintos dentro de la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Análisis de viabilidad celular de los fibroblastos de gato doméstico y güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia

Respecto al análisis de viabilidad celular por tinción diferencial, tanto en los fibroblastos de gato doméstico como de güiña, el tratamiento de privación de suero por 5 días disminuyó significativamente la proporción de células vivas en comparación a los fibroblastos en crecimiento ($P < 0,05$). Adicionalmente, el equipo LunaTM-fl (Logos biosystems) también permitió estimar el diámetro celular en cada tratamiento. La medición de los fibroblastos de gato doméstico reveló que los tratamientos de privación de suero por 3 y 5 días e inhibición por contacto por 1, 3 y 5 días, disminuyeron significativamente el tamaño celular en comparación a los fibroblastos en crecimiento

($P < 0,05$) (Tabla 10). Por otro lado, en los fibroblastos de güiña, solamente los tratamientos de privación de suero por 5 días e inhibición por contacto por 3 y 5 días disminuyeron significativamente el tamaño celular en comparación a los fibroblastos en crecimiento ($P < 0,05$) (Tabla 11).

Tabla 10. Resultados del análisis de viabilidad y tamaño celular en fibroblastos de gato doméstico sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.

Tratamiento	Viabilidad (%)	Tamaño celular (μm)
Crecimiento	$94,5 \pm 0,5^a$	$14,2 \pm 0,4^a$
Privación SFB 1 día	$90,2 \pm 5,2^a$	$13,2 \pm 0,8^{ab}$
Privación SFB 3 días	$86,8 \pm 5,5^{ab}$	$10,9 \pm 1,6^{bc}$
Privación SFB 5 días	$74,7 \pm 3,6^b$	$10,2 \pm 0,6^c$
Confluencia 1 día	$95,9 \pm 2,6^a$	$10,8 \pm 0,8^{bc}$
Confluencia 3 días	$94,1 \pm 1,5^a$	$11,4 \pm 1,2^{bc}$
Confluencia 5 días	$89,6 \pm 3,2^a$	$9,8 \pm 1^c$

^{a, b, c}: Superíndices distintos indican diferencias significativas dentro de la misma columna ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11. Resultados del análisis de viabilidad y tamaño celular en fibroblastos de güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia.

Tratamiento	Viabilidad (%)	Tamaño celular (μm)
Crecimiento	97,3 \pm 1,8 ^a	16,8 \pm 0,2 ^a
Privación SFB 1 día	96,3 \pm 1,2 ^a	15,7 \pm 0,5 ^{ab}
Privación SFB 3 días	94,3 \pm 1,7 ^a	14,8 \pm 1,9 ^{ab}
Privación SFB 5 días	83,5 \pm 7,3 ^b	13,5 \pm 1,2 ^b
Confluencia 1 día	94,8 \pm 3 ^a	14,1 \pm 0,9 ^{ab}
Confluencia 3 días	95,4 \pm 2,7 ^a	13,4 \pm 0,2 ^b
Confluencia 5 días	97,2 \pm 0,2 ^a	13 \pm 0,6 ^b

a, b, c: Superíndices distintos indican diferencias significativas dentro de la misma columna ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de la apoptosis celular en los fibroblastos de gato doméstico y güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia

En este experimento, se evaluó el grado de apoptosis de cada tratamiento de inducción de quiescencia a través del análisis de la expresión relativa del gen apoptótico *BAX* y el gen antiapoptótico *BCL2*.

En cuanto a los fibroblastos de gato doméstico, solo los tratamientos de inhibición por contacto por 3 y 5 días aumentaron significativamente la expresión relativa de *BAX* en comparación a los fibroblastos en crecimiento utilizados como control ($P < 0,05$). Además, la expresión relativa de *BAX* fue mayor en los fibroblastos sometidos a inhibición por contacto por 5 días en comparación a los fibroblastos sometidos a privación de suero por

3 y 5 días ($P < 0,05$). Por otro lado, la privación de suero y la inhibición por contacto, ambas por 3 y 5 días, aumentaron significativamente la expresión relativa del gen antiapoptótico *BCL2* en comparación a las células control en crecimiento ($P < 0,05$). Finalmente, al evaluar la razón *BAX/BCL2*, no se encontraron diferencias significativas al comparar todos los tratamientos con los fibroblastos control en crecimiento ($P > 0,05$). Esto se podría explicar porque en los fibroblastos sometidos a inhibición por contacto por 3 y 5 días, el aumento en la expresión relativa de *BCL2* puede haber contrarrestado los altos niveles de *BAX*, lo cual se vio reflejado en una razón *BAX/BCL2* similar a la de los fibroblastos control ($P > 0,05$) (Figura 16).

En relación a los fibroblastos de güiña, estos respondieron de manera distintas a los tratamientos de inducción de quiescencia en comparación a los fibroblastos de gato doméstico. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión relativa de *BAX* en todos los tratamientos en comparación a los fibroblastos control en crecimiento ($P > 0,05$). Sin embargo, la expresión relativa de *BAX* fue significativamente más alta en los tratamientos de inhibición por contacto por 1 y 3 días en comparación a la privación de suero por 5 días ($P < 0,05$). En contraste, la privación de suero por 3 días aumentó significativamente la expresión relativa de *BCL2* en comparación a los fibroblastos control en crecimiento ($P < 0,05$). Además, la expresión relativa de *BCL2* fue significativamente mayor en los tratamientos de privación de suero por 3 y 5 días en comparación a al tratamiento de inhibición por contacto por 5 días ($P < 0,05$). Finalmente, no se encontraron diferencias significativas al comparar la razón *BAX/BCL2* de todos los tratamientos contra el grupo control en crecimiento ($P > 0,05$). Sin embargo, los tratamientos de inhibición por contacto por 3 y 5 días presentaron una razón *BAX/BCL2* significativamente mayor en comparación a los tratamientos de privación de suero por 3 y 5 días ($P < 0,05$). Esto puede haber sido causado, porque en los tratamientos de privación de suero, la expresión relativa de *BCL2* aumentaba de manera conjunta con el tiempo transcurrido en el tratamiento, disminuyendo los niveles de *BAX*. Por el contrario, en los tratamientos de inhibición por contacto, la expresión relativa de *BCL2* permaneció de manera constante a lo largo del tiempo, lo que se evidenció en una elevada razón *BAX/BCL2* a los días 3 y 5 de tratamiento (Figura 17).

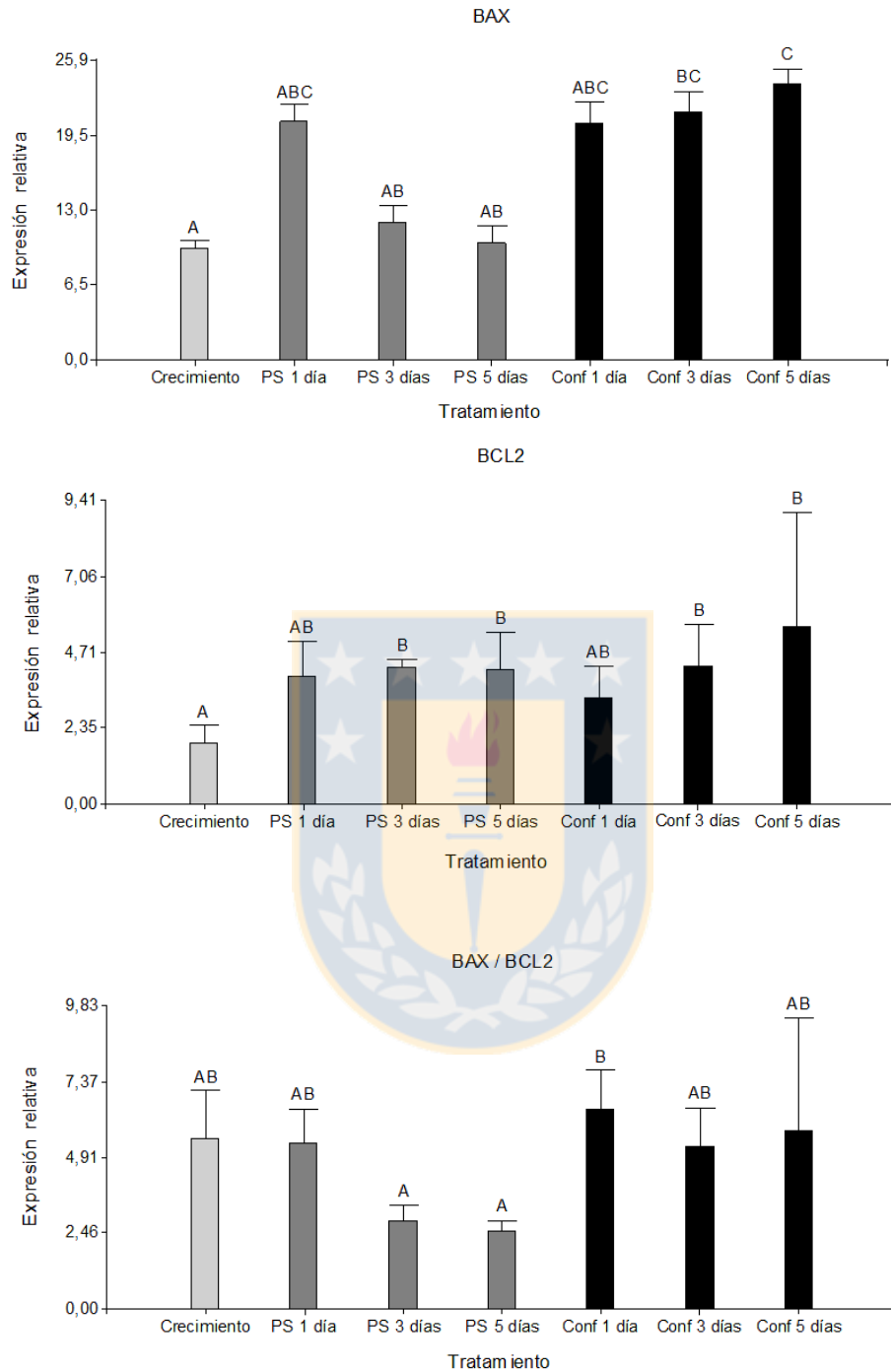


Figura 16. Expresión relativa (Media \pm D.E.) de *BAX*, *BCL2* y de la razón *BAX/BCL2* en fibroblastos de gato doméstico sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia. A,B,C: Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

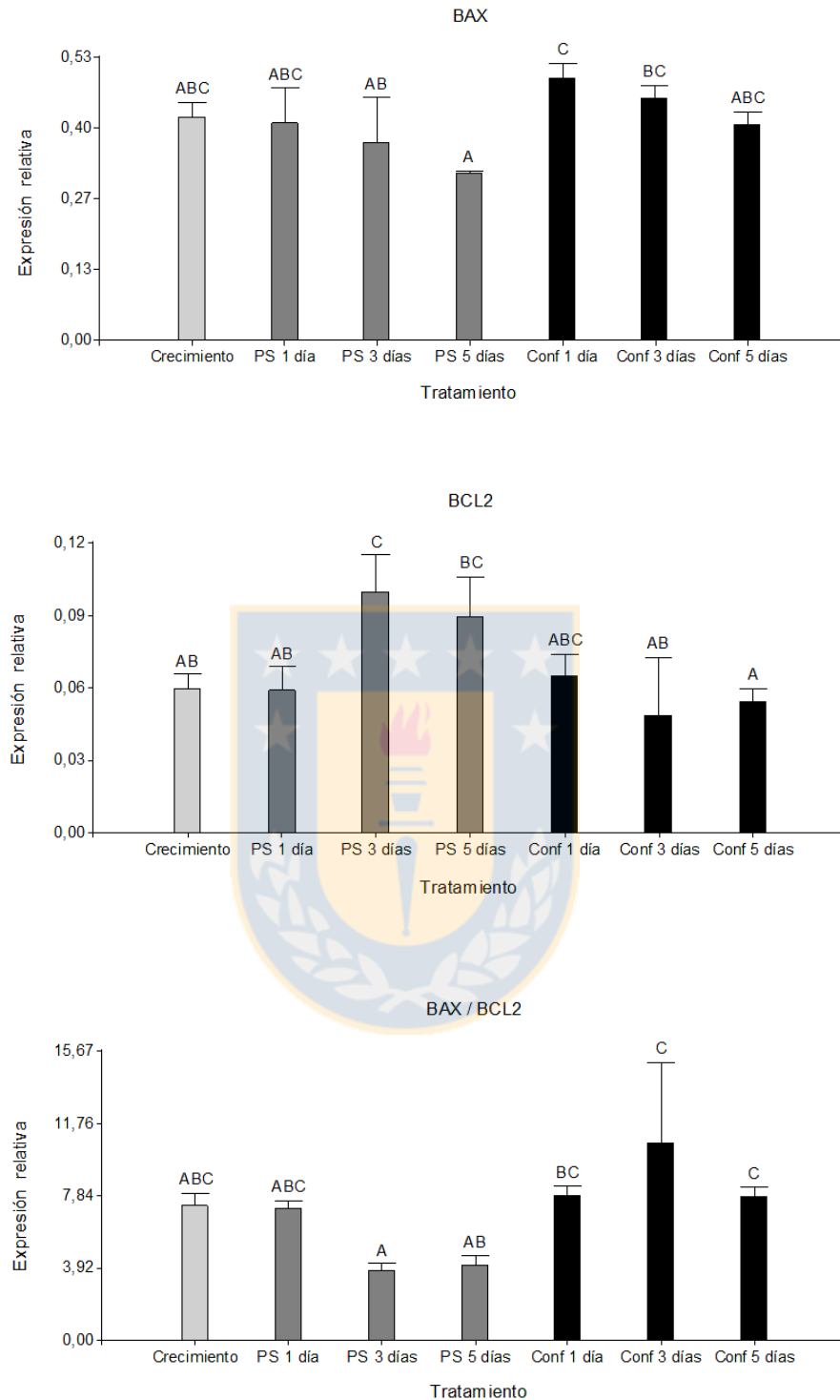
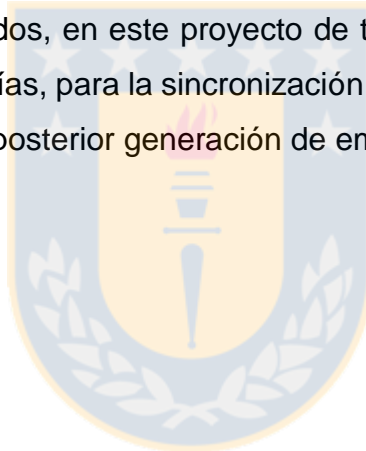


Figura 17. Expresión relativa (Media ± D.E.) de *BAX*, *BCL2* y de la razón *BAX/BCL2* en fibroblastos de güiña sometidos a los distintos tratamientos de inducción de quiescencia A,B,C: Superíndices distintos indican diferencia significativa ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

En resumen, los fibroblastos de gato doméstico y de güiña responden de manera distinta a los diferentes tratamientos de inducción de quiescencia.

En los fibroblastos de gato doméstico, la inhibición por contacto y la privación de suero, ambas por 3 y 5 días, generan una proporción similar de células arrestadas en la fase G0/G1. En el caso de los fibroblastos de güiña, la privación de suero por 3 y 5 días generan la mayor proporción de células arrestadas en la fase G0/G1. Sin embargo, la inhibición por contacto por 5 días no genera un aumento significativo en la proporción de fibroblastos en G0/G1, presentando de igual manera un aumento en la razón *BAX/BCL2*, lo cual podría estar relacionado a una mayor incidencia de apoptosis. De igual manera, en ambas especies la privación de suero por 5 días genera una disminución significativa en la viabilidad de los fibroblastos.

De acuerdo a estos resultados, en este proyecto de tesis se decide utilizar la privación de suero, por no más de 3 días, para la sincronización de fibroblastos de güiña en la fase G0/G1 del ciclo celular y la posterior generación de embriones mediante TNS.



Etapa 2. Evaluación de la calidad y capacidad de desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro* y transferencia nuclear y embriones de güiña generados por transferencia nuclear heteroespecífica.

Experimento 2.1. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* e *in vivo* de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro*.

Evaluación del tratamiento con eCG en la generación de embriones de gato por fecundación *in vitro*.

Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro*

Se generaron embriones de gato mediante FIV y se evaluó el desarrollo de estos embriones hasta el estadio de blastocisto al día 8 de cultivo. En este experimento, se comparó la generación de embriones a partir de ovocitos de gatas tratadas con eCG en comparación a ovocitos colectados de gatas sin tratar. De acuerdo a los resultados obtenidos, los ovocitos de gatas tratadas con eCG permiten la generación de embriones de gato doméstico por FIV, logrando desarrollarse hasta los estadios de blastocisto y blastocisto protruyendo. La tasa de blastocistos al día 8 fue significativamente mayor en el grupo eCG en comparación al grupo control ($P < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la tasa de blastocistos protruyendo ni en el número de células totales de los blastocistos entre los grupos control y eCG ($P > 0,05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Desarrollo *in vitro* de embriones de gato doméstico generados por FIV posterior al tratamiento con eCG.

Grupo	n	Ovocitos Fertilizados	División (%)	Mórulas (%)	Total Blastocistos (%)	Blastocistos protruyendo (%)	Células totales de blastocistos (± DS)
eCG	10	354	153/354 (43,2)	97/153 (63,4)	58/153 ^a (37,9)	35/153 (22,9)	420,6 ± 193,6
Control	8	222	82/222 (36,9)	46/82 (56,1)	21/82 ^b (25,6)	9/82 (10,9)	347 ± 237,1

^{a, b}: Superíndices distintos indican diferencias significativas dentro de la misma columna (P<0,05). Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vivo*

Para la evaluación del desarrollo *in vivo* de los embriones de gato doméstico generados por FIV a partir de los ovocitos tratados con eCG, se realizaron dos grupos experimentales. Embriones que fueron transferidos en los estadios de mórula y blastocisto temprano al día 5 de cultivo y embriones que fueron transferidos en los estadios de blastocisto y blastocisto protruyendo entre los días 7 a 8 de cultivo.

Las gatas utilizadas como receptoras fueron sincronizadas con un día de desfase en comparación a las gatas utilizadas como donante de ovocitos, esto se realizó para prevenir la prematura formación del cuerpo lúteo. Las gatas utilizadas como donante de ovocitos fueron tratadas con una dosis única de 200 UI de eCG vía subcutánea y la colecta de ovocitos se realizó cuatro días posterior mediante ovariectomía. Las gatas utilizadas como receptoras fueron sincronizadas con una dosis de 200 UI de eCG vía subcutánea, cuatro días posterior se administró una dosis de 100 UI de hCG vía intramuscular. La transferencia de embriones se realizó por laparotomía 5 o 7-8 días después de la administración de hCG, dependiendo del grupo experimental a manera de sincronizar con el estadio del embrión.

Las primeras transferencias de embriones se realizaron en el estadio de blastocisto, se realizaron un total de tres transferencias con distintas gatas utilizadas como receptoras. Dos transferencias se realizaron con embriones de día 7 de cultivo y una transferencia con embriones de 8 días de cultivo. En la transferencia realizada con embriones de 8 días de cultivo, se transfirieron 8 blastocistos, de los cuales ninguno logró implantarse. En las transferencias realizadas con blastocistos de 7 días, 14 y 15 embriones fueron transferidos a cada gata respectivamente. En ambos casos solo un embrión logró implantarse al día 20 de gestación. En la gata a la cual se transfirieron 14 embriones, el embrión implantado se reabsorbió posterior al día 35 de gestación. Por otro lado, en la gata en que se transfirieron 15 embriones, el embrión implantado logró desarrollarse a término, y una cría viva hembra nació a los 64 días de gestación por parto natural (Tabla 13). La cría nació con un peso de 84 gramos y completamente sana, convirtiéndose en el primer gato doméstico nacido por FIV en el país (Figura 18).

Posteriormente, se realizaron un total de tres transferencias con embriones de gato en estadio de mórula utilizando las mismas gatas receptoras de las transferencias anteriores. En la primera, fueron transferidos 9 mórulas y 1 blastocisto temprano al día 5 de cultivo, de los cuales ninguno logró implantarse posteriormente. En la segunda transferencia, se transfirieron 16 mórulas con 5 días de cultivo, transfiriendo 8 en cada cuerno uterino. Aproximadamente, al día 20 de gestación se observó la presencia de dos vesículas gestacionales en el cuerno izquierdo, de las cuales sola una presentaba un embrión, y la otra se encontraba sin contenido posiblemente a una reabsorción embrionaria. Una cría macho nació a los 66 días de gestación, pesando 126 gramos y encontrándose completamente sano. En la tercera transferencia, se transfirieron 11 mórulas y 5 blastocistos tempranos al día 5 de cultivo, dos vesículas se observaron al día 20 de gestación, una se reabsorbió una semana después, mientras que el embrión restante se desarrollo hasta la última semana de gestación, encontrándose sin latido cardiaco aproximadamente al día 64 de gestación. El feto fue extraído por cesarí a al día 67 de gestación, encontrándose sin malformaciones evidentes y con abundante presencia de meconio (Figura 18) (Tabla 13).



Figura 18. Nacimientos vivos de gatos domésticos generados por FIV. **A-B:** Primera cría de gato doméstico nacida por FIV (Fivy) con madre receptora y al primer mes de edad. **C-D:** Segunda cría de gato doméstico nacida por FIV (Chimuelo) con madre receptora y al mes de edad. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 13. Desarrollo *in vivo* de embriones generados por fecundación *in vitro* posterior al tratamiento con eCG.

Gata Transferida	Estadio embrionario	Tiempo de cultivo	Número total de embriones transferidos	Embriones Implantados	Crías nacidas	Duración Gestación
A	Blastocistos	Día 7	15	1	1	64 días
B	Blastocistos	Día 8	8	0	-	
C	Blastocistos	Día 7	14	1	0	
A	Mórulas y blastocisto temprano	Día 5	10	0	-	
C	Mórulas	Día 5	16	2	1	66 días
B	Mórulas y blastocistos tempranos	Día 5	16	2	0	Nacido muerto (67 d)

Fuente: Elaboración propia.

En resumen, los embriones de gato doméstico generados por FIV a partir de ovocitos colectados de gatas tratadas con eCG son capaces de desarrollarse *in vitro* hasta los estadios de blastocisto y blastocisto protruyendo. El tratamiento con eCG aumenta significativamente la tasa de blastocistos generados por FIV al día 8 de cultivo. Además, posterior a la transferencia de estos embriones a gatas receptoras previamente sincronizadas, estos son capaces de implantarse ya sea tanto en los estadios de mórula como de blastocisto, y generar crías vivas sanas. Estos resultados demuestran que el sistema de producción de embriones mediante FIV permite generar embriones viables de gato doméstico, capaces de generar gestaciones y desarrollarse a término. Todo lo anterior, permitiría establecer un sistema óptimo para la posterior generación de embriones felinos mediante TNS.

Evaluación del desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro* posterior a la remoción de la zona pelúcida.

Este experimento fue destinado a evaluar el cultivo de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro* posterior a la remoción de la zona pelúcida. La FIV se realizó de manera convencional, y una vez finalizada la zona pelúcida de los posibles cigotos se removi6 con pronasa (Zona libre) y estos fueron posteriormente cultivados en el sistema well of the well (WOW). Embriones generados por FIV cultivados con zona pelúcida fueron utilizados como control (Zona incluida). De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas en las tasas de divisi6n, formaci6n de m6rulas y tasa de blastocistos entre los embriones de los grupos Zona libre y Zona incluida ($P > 0,05$) (Tabla 14). Posteriormente, se realiz6 el conteo de c6lulas totales de los blastocistos de ambos grupos, al d6a 8 de cultivo. Se observ6 que los blastocistos del grupo Zona libre presentaban un mayor n6mero de c6lulas, pero esta diferencia no fue estad6sticamente significativa en comparaci6n al grupo Zona incluida, posiblemente debido a la gran variaci6n del n6mero de c6lulas entre un blastocisto y otro ($P > 0,05$) (Tabla 14) (Figura 19).

Tabla 14. Desarrollo *in vitro* de embriones de gato dom6stico generados por FIV con zona incluida o posterior a la remoci6n de la zona pelúcida (Zona libre).

Grupo	n	Ovocitos Fertilizados	Divisi6n (%)	M6rulas (%)	Total Blastocistos (%)	Blastocistos protruyendo (%)	C6lulas totales blastocisto (Media \pm DE)
Zona Incluida	9	239	155/239 (64,9)	115/155 (74,2)	51/155 (32,9)	15/155 (9,7)	279,9 \pm 148,1
Zona Libre	6	177	116/177 (65,5)	68/116 (58,6)	36/116 (31,0)	-	313,1 \pm 164,9

Fuente: Elaboraci6n propia.

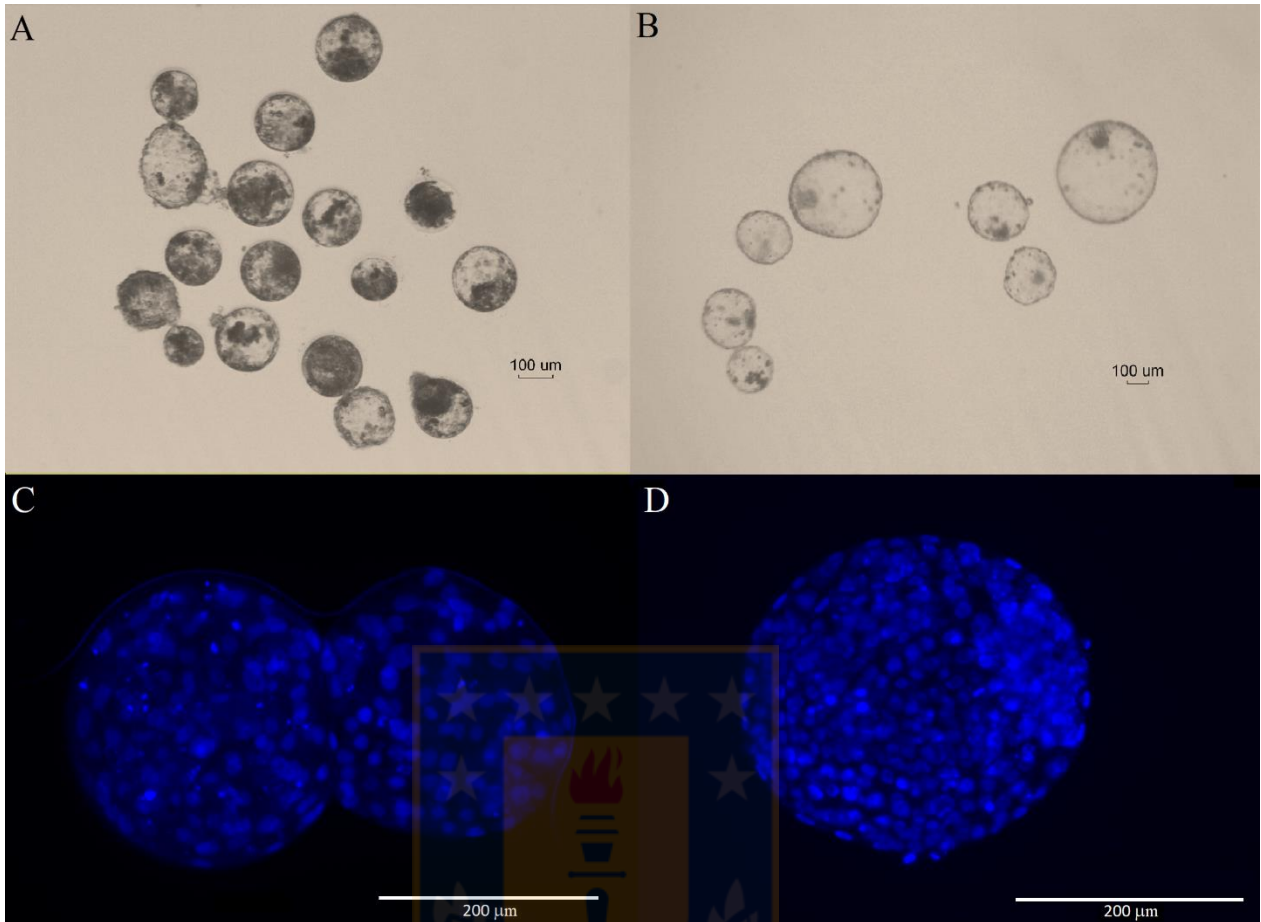


Figura 19. Blastocistos de gato doméstico generados por fecundación *in vitro* (FIV) con y sin la presencia de zona pelúcida. **A:** Blastocistos de gato doméstico generados por FIV con presencia de zona pelúcida a los 8 días de cultivo (8x). **B:** Blastocistos de gato doméstico generados por FIV y cultivados sin la presencia de zona pelúcida, 8 días de cultivo (6,3x). **C:** blastocisto generado por FIV teñido con Hoechst 33342 (20x). **D:** blastocisto de gato doméstico generado por FIV y sin presencia de la zona pelúcida, teñido con Hoechst 33342 (20x). Fuente: Elaboración propia.

Adicionalmente, se evaluó el diámetro de los blastocistos generados con y sin presencia de zona pelúcida. Se observó que el tamaño de los blastocistos cultivados zona-libre (253,4 μm) fue significativamente mayor en comparación a los blastocistos cultivados con zona-incluida (210,5 μm) ($P < 0,05$) (Figura 20). Este aumento de tamaño no está relacionado a un aumento en el número de células totales en los blastocistos cultivados

zona-libre. Por lo cual podría deberse a un aumento en el tamaño del blastocelo causado por la ausencia de zona pelúcida y el cultivo en el sistema WOW.

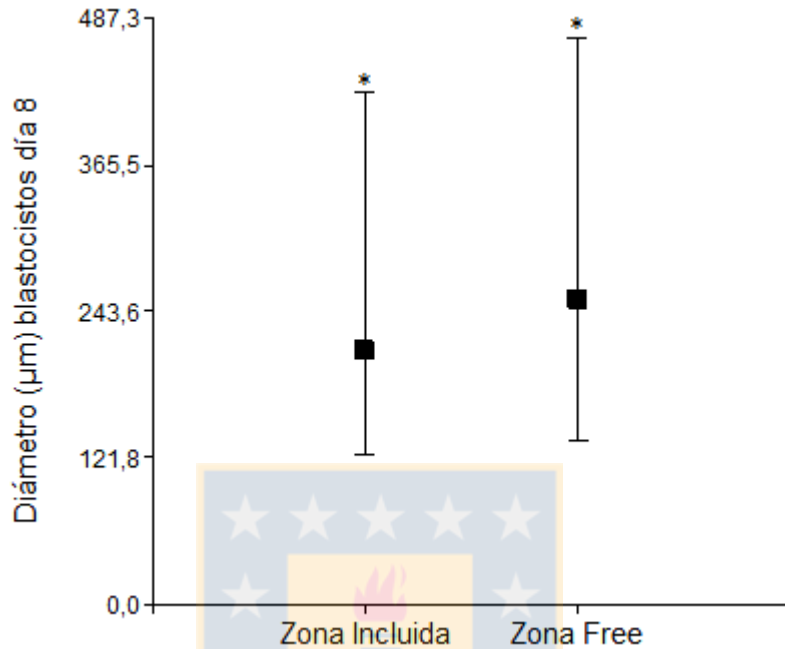


Figura 20. Diámetro (Media, Min/Max) de los blastocistos de gato generados por FIV sin presencia (Zona Libre) y con presencia de zona pelúcida (Zona Incluida). *: Indica diferencia significativa entre grupos ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

En resumen, los resultados de este experimento demuestran que es posible generar embriones de gato mediante FIV y posterior a la remoción de la zona pelúcida utilizando un sistema de cultivo adecuado. Los embriones de gato doméstico cultivados sin zona pelúcida presentan una capacidad de desarrollo similar a la de los embriones cultivados con zona pelúcida. Además, la remoción de la zona pelúcida no afectó la calidad morfológica de los blastocistos generados, lo que se evidenció en un similar número de células totales en comparación a los blastocistos cultivados con zona pelúcida.

Estos resultados, fueron de utilidad para posteriormente implementar un sistema de generación de embriones de gato doméstico mediante transferencia nuclear somática con remoción de la zona pelúcida.

Experimento 2.2. Evaluación del desarrollo *in vitro* de embriones clonados de gato doméstico y güiña.

Evaluación de la agregación embrionaria en la generación de embriones de gato doméstico y güiña mediante transferencia nuclear somática.

En este experimento, se evaluó la capacidad de desarrollo de embriones de gato doméstico generados por transferencia nuclear somática y embriones de güiña generados por transferencia nuclear heteroespecífica.

Los embriones clonados fueron generados utilizando un método de clonación en el cual la zona pelúcida fue removida y el plato metafásico fue extraído mediante micromanipulación. Posteriormente, los embriones fueron cultivados de manera individual (x1) o en agregados (x2) en el sistema WOW (Figura 21). De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó una mayor tasa de división en los embriones de gato clonados cultivados en agregado en comparación a los cultivados individualmente ($P < 0,05$). Al evaluar los clones de gato al día cinco de cultivo, los clones cultivados en agregado presentaron una mayor tasa de mórulas en comparación al grupo cultivado individual ($P < 0,05$). Además, al evaluar el cultivo al día 8, la tasa de blastocistos fue significativamente mayor en el grupo agregado en comparación al grupo individual ($P < 0,05$, $P = 0,03$) (Tabla 15)

Por otro lado, en relación con la generación de embriones de güiña mediante TNSh, la tasa de división fue mayor en el grupo güiña agregado en comparación al grupo güiña individual ($P < 0,05$). Además, la tasa de mórulas en el grupo güiña agregado fue significativamente mayor comparada al grupo güiña individual ($P < 0,05$). Por otra parte, no se generaron blastocistos en el grupo güiña individual. Solo en el grupo güiña agregado los embriones fueron capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto

en un bajo porcentaje, a pesar de esto no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($P=0,1$) (Tabla 15). A diferencia de los clones de gato doméstico, los clones agregados de güiña lograron desarrollarse hasta el estadio de blastocisto al día 9 de cultivo, lo cual puede ser debido a una reprogramación nuclear ineficiente. En total se generaron 6 blastocistos de güiña mediante TNSh, de acuerdo a la clasificación hecha previamente (Moro *et al.*, 2015a), un blastocisto güiña fue clasificado como Calidad I, caracterizándose por ser un blastocisto expandido con un definido MCI, un blastocisto de güiña fue clasificado como Calidad II, siendo un blastocisto expandido con un poco definido MCI, cuatro blastocistos de güiña fueron clasificados como Calidad III, correspondiente a blastocistos no expandidos y sin un MCI definido (Figura 22).

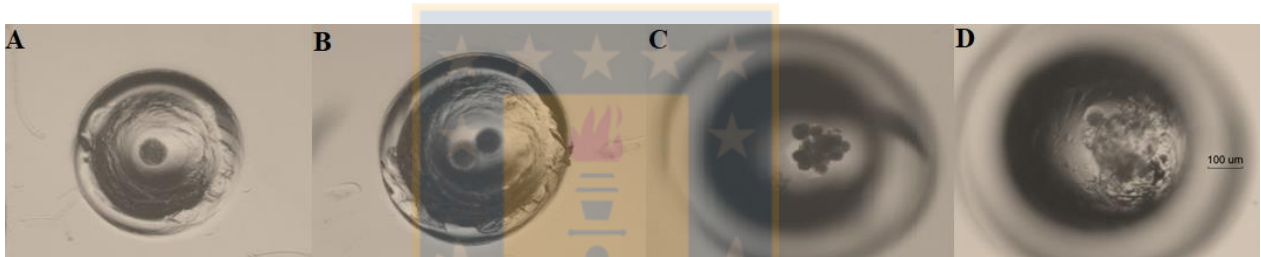


Figura 21. Cultivo *in vitro* de embriones clonados de gato doméstico en el sistema WOW. **A)** clon de gato cultivado individual (1x). **B)** clon de gato cultivado en agregado (2x). **C)** mórula de clones de gato cultivados en agregado (2x). **D)** blastocisto temprano generado a partir de clones de gato cultivados en agregado (2x). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15. Desarrollo *in vitro* de embriones de gato doméstico y güiña generados por transferencia nuclear somática sin zona pelúcida en cultivo individual o agregado.

Grupo	n	Total embriones	Total cultivo	Embriones divididos N° (%)	Mórulas día 5 N° (%)	Blastocistos N° (%)	% Blastocistos (Media ± DE)
FIV*	10	354	354	153/354 ^a (43,2)	97/153 ^a (63,4)	58/153 ^c (37,9)	41,2 ± 15
Gato Individual	8	126	126	99/126 ^{ab} (78,6)	48/126 ^b (38,1)	21/126 ^b (16,7)	16,6 ± 10,5
Gato Agregado	6	102	51	49/51 ^c (96,1)	28/51 ^a (54,9)	15/51 ^c (29,4)	26,4 ± 10,5
Güiña Individual	7	171	171	135/171 ^{ab} (78,9)	50/171 ^b (29,2)	0/171 ^{a**} (0)	0 ± 0
Güiña Agregado	8	220	110	101/110 ^c (91,8)	63/110 ^a (57,3)	6/110 ^{a**} (5,5)	5,8 ± 6,9

a, b: Superíndices distintos indican diferencias significativas dentro de la misma columna ($P < 0,05$). *: las tasas de mórulas y blastocistos en el grupo FIV fueron calculadas respecto a la tasa de división. **: indica tendencia entre los grupos ($P \leq 0,1$). Fuente: Elaboración propia.

Adicionalmente, se midió el diámetro de los blastocistos generados por TNS y TNSh. No se encontró diferencia significativa en el diámetro de los blastocistos generados en los grupos gato individual y gato agregado (220,4 y 251,2 μm , respectivamente. $P > 0,05$). Sin embargo, el diámetro de los blastocistos generados en el grupo güiña agregado (172,8 μm) tendió a ser significativamente menor comparado al de los blastocistos del grupo gato agregado ($P = 0,056$) (Figura 23).

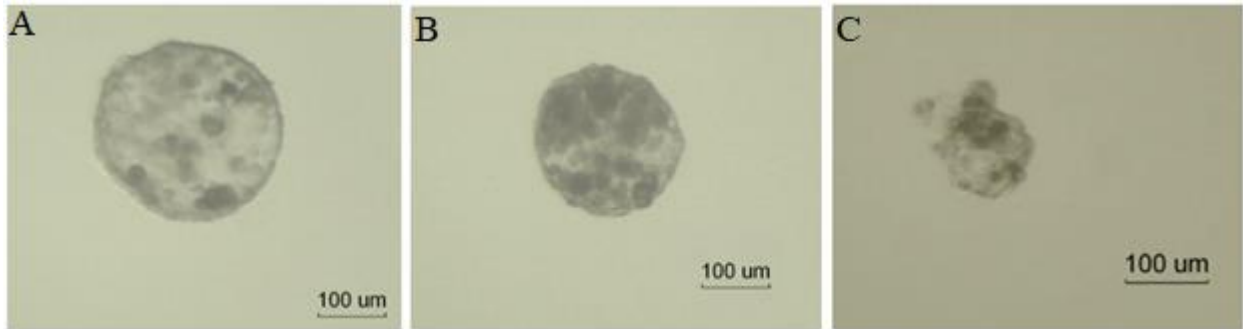


Figura 22. Blastocistos generados en el grupo güiña agregado 2x por transferencia nuclear somática heteroespecífica. **A:** blastocisto güiña calidad I generado por TNSh. **B:** blastocisto de güiña calidad II generado por TNSh. **C:** blastocisto de güiña calidad III generado por TNSh. Fuente: Elaboración propia.

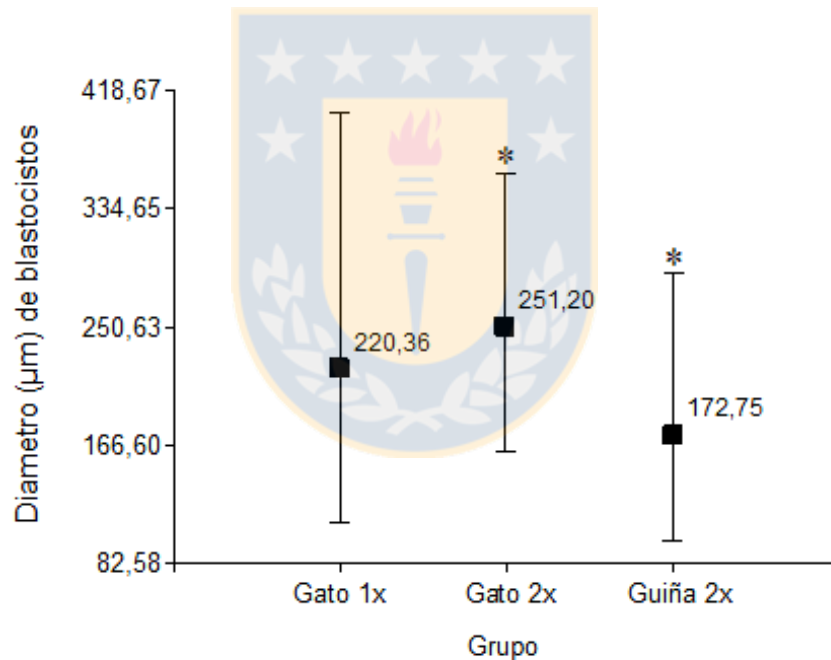


Figura 23. Diámetro (Min/Max) de los blastocistos generados en los grupos gato individual (Gato 1x) gato agregado (Gato 2x) y güiña agregado (Güiña 2x). *: Indica tendencia entre los grupos. $P \leq 0,1$. No se lograron blastocistos de güiña cultivados de modo individual. Fuente: Elaboración propia.

Análisis del patrón de expresión de genes de pluripotencia y diferenciación en embriones clonados.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica, solo una de los blastocistos de güiña generados en el grupo agregado expresó *OCT4* en los ensayos de RT-qPCR. Ninguno de los blastocistos de güiña analizados expresó *SOX2*, *NANOG*, *CDX2* y *GATA6* al RT-qPCR.

En relación a los embriones de gato, los blastocistos generados por FIV presentaron una mayor expresión relativa de *OCT4* en comparación a los blastocistos clonados del grupo gato individual (Clon gato 1x). Esta diferencia no fue significativa, pero si se observó una tendencia ($P=0,053$, prueba global $P=0,09$). No se observó diferencia significativa en la expresión relativa de los genes de pluripotencia *SOX2* y *NANOG*. Por otro lado, la expresión relativa del gen de diferenciación *CDX2* fue significativamente mayor en los blastocistos del grupo clon gato individual (Clon gato 1x) en comparación a los del grupo clon gato agregado (Clon gato 2x) ($P<0,05$). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la expresión relativa del gen de diferenciación *GATA6* entre los blastocistos de los grupos FIV, clon gato individual y clon gato agregado ($P>0,05$) (Figura 24).

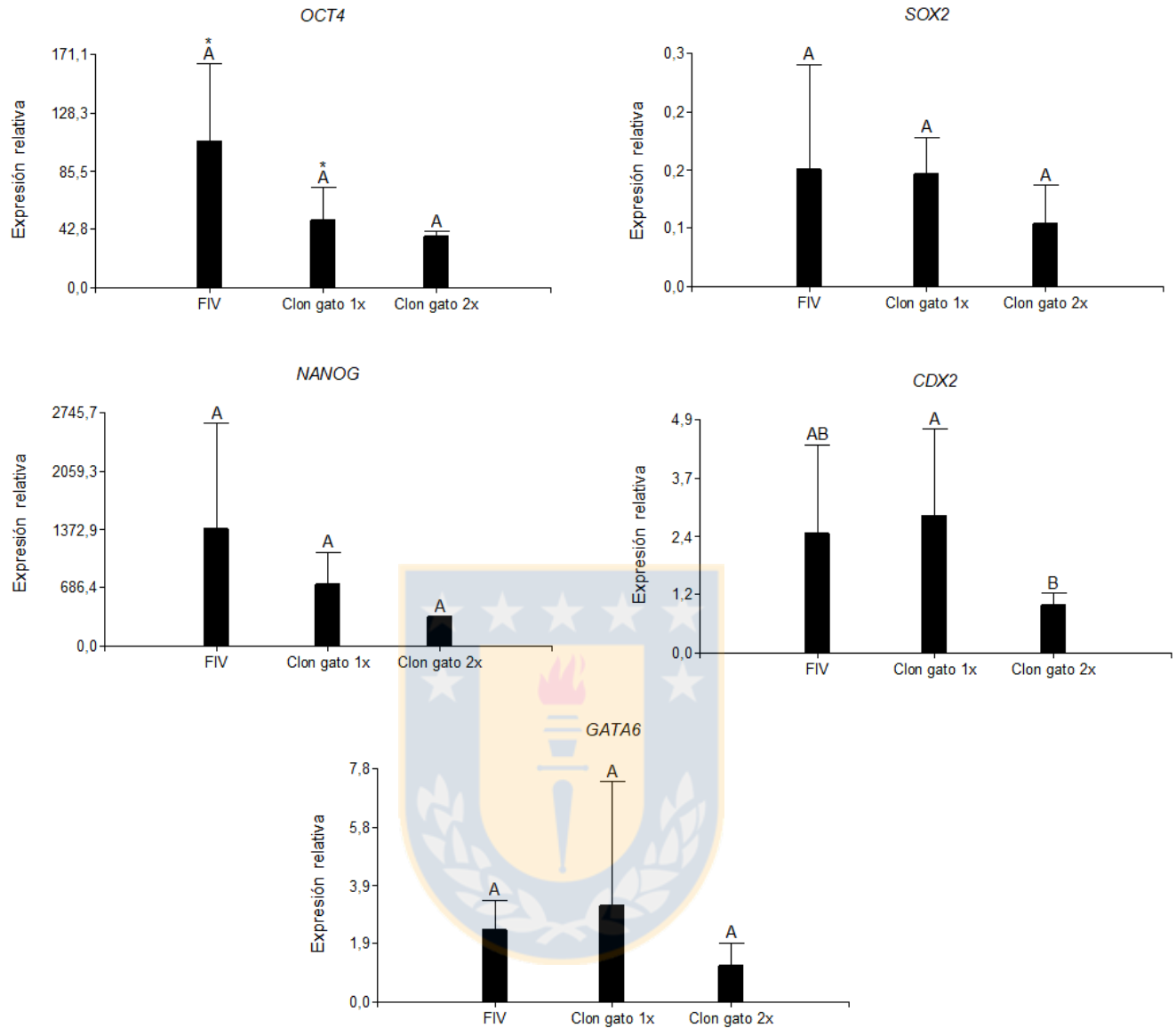


Figura 24. Expresión relativa de los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* y de diferenciación *CDX2* y *GATA6* en los blastocistos de gato doméstico generados por fecundación *in vitro* y transferencia nuclear somática. Los valores fueron normalizados utilizando el gen housekeeping *SDHA*. ^{A,B}: Superíndices distintos dentro de un gráfico indican diferencia significativa ($P < 0,05$). *: indica tendencia entre dos grupos ($P \leq 0,1$). Fuente: Elaboración propia.

VI. DISCUSIÓN

Generación de un protocolo para la obtención de ovocitos competentes de gata doméstica.

Uno de los principales problemas en los sistemas de PIV de embriones en el gato doméstico es la discontinua disponibilidad de ovocitos competentes a lo largo del año debido a las variaciones estacionales (Spindler y Wildt, 1999; Freistedt *et al.*, 2001; Comizzoli *et al.*, 2003). Se ha descrito que la tasa de MIV de ovocitos y la tasa de generación *in vitro* de blastocistos disminuyen significativamente durante la época de anestro estacional en la gata doméstica (Spindler y Wildt, 1999; Freistedt *et al.*, 2001; Comizzoli *et al.*, 2003). Se ha postulado que una disminución en los niveles circulantes de FSH o una menor presencia de los receptores de FSH (*FSHR*) en las células de la granulosa podrían ser los factores que afectan negativamente la PIV de embriones durante la estación de anestro en la gata doméstica (Spindler y Wildt, 1999; Comizzoli *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos demostraron que tanto el tratamiento con FSHp como con eCG generaron un aumento en la proporción de CCOs grado I. Además, en ambos tratamientos se observó una mayor expansión de las células del cúmulo posterior a la MIV en comparación a los grupos control. Sin embargo, solo el tratamiento con eCG logró aumentar significativamente la tasa de MIV de los ovocitos. Se ha descrito que la administración de FSHp es capaz de inducir el estro, la ovulación e incluso preñez durante la estación de anestro en la gata doméstica (Tsutsui *et al.*, 1989). Sin embargo, la FSHp posee una corta vida media siendo necesario 1 o 2 dosis diarias por 3 a 6 días para inducir desarrollo folicular en los felinos (Pelican *et al.*, 2006). Por otro lado, la eCG posee una vida media más larga, permaneciendo en circulación por hasta 120 horas posterior a su administración (Swanson *et al.*, 1997). Además, la eCG es capaz de unirse tanto los receptores de FSH como a los de LH (Stewart *et al.*, 1976). Teniendo en cuenta esto, se pone en evidencia que el tratamiento con eCG permitió en un mayor grado reanudar la meiosis y aumentar la tasa de maduración *in vitro* de los ovocitos de gata. En cuanto al efecto en el patrón de expresión génica inducido por ambos tratamientos, durante la estación no reproductiva el tratamiento con FSHp a las gatas en anestro mejoró

la calidad morfológica de los complejos cúmulo-ovocito, lo cual se relacionó con un aumento en la expresión relativa de *LHCGR* en estos mismos. Mientras que el tratamiento con eCG aumentó significativamente la expresión *FSHR*, *LHCGR*, *EGFR*, *EGR1* y *ESR2* en los CCOs grado I y II. La afinidad de la eCG por los receptores de FSH y LH podría ser el factor determinante para este aumento en la expresión relativa. El tratamiento con FSHp aumentó la expresión relativa de *LHCGR*, pero no la de *FSHR* en los CCOs inmaduros. Este resultado es similar a lo descrito en humanos, en donde el tratamiento con FSH aumenta la expresión de *LHCGR* en las células de la granulosa sin aumentar la expresión de *FSHR* (Lindeberg *et al.*, 2006). Se ha descrito que la adición de FSH durante la MIV aumenta la expresión de *LHCGR* en los CCOs inmaduros, lo cual es necesario para lograr la maduración ovocitaria (Shimada *et al.*, 2003).

Por otro lado, el tratamiento con eCG aumentó la expresión relativa tanto de *FSHR* como de *LHCGR* en los CCOs inmaduros. En humanos, los niveles de la proteína *FSHR* fueron correlacionados positivamente con el pico de estradiol y el número de ovocitos maduros (Cai *et al.*, 2007). En porcinos, el tratamiento con eCG aumenta la sensibilidad a LH y la presencia de *LHCGR* en las células del cúmulo (Mattioli *et al.*, 1994; Kawashima *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que ratones knockout para *LHCGR* no logran la maduración folicular y los folículos no progresan a un estadio preovulatorio (Pakarainen *et al.*, 2005). Por esta razón, el aumento en la expresión relativa de *FSHR* y *LHCGR* en los CCOs del grupo eCG puede ser responsable del aumento en la tasa de MIV.

Adicionalmente, los CCOs inmaduros del grupo eCG presentaron un aumento en la expresión relativa de *ESR2*, *EGFR* y *EGR1*. *ESR2* es crucial durante la diferenciación de las células de la granulosa inducida por FSH. En ratones knockout para *ESR2*, los folículos preovulatorios presentan una respuesta reducida a FSH, una disminución en la actividad aromatasa y síntesis de estradiol, y una reducida expresión de *LHCGR* (Couse *et al.*, 2005). En cuanto a la expresión de *EGFR*, el factor de crecimiento epidermal (EGF) potencia la acción de la FSH para inducir la maduración ovocitaria y mejorar la competencia ovocitaria (Merlo *et al.*, 2005; Farin *et al.*, 2007). Finalmente, *EGR1* induce la expresión de *LHCGR* en las células de la granulosa en el ratón, la rata y el bovino (Topilko *et al.*, 1998; Yoshino *et al.*, 2002; Sayasith *et al.*, 2006). La expresión de *EGR1* está involucrada en la biosíntesis de prostaglandina y es considerado un marcador de

competencia ovocitaria (Robert *et al.*, 2001; Sayasith *et al.*, 2006). Ratones deficientes para *EGR1* no sintetizan la subunidad- β de la LH en la hipófisis y *LHCGR* en los ovarios, lo cual está asociado a infertilidad (Topilko *et al.*, 1998). De acuerdo a estos reportes, una expresión aumentada de estos genes en los CCOs inmaduros del grupo eCG podría estar relacionado una mayor competencia ovocitaria.

Evaluación del desarrollo embrionario posterior al tratamiento con gonadotrofinas

El tratamiento con FSH durante la época de anestro demostró mejorar el desarrollo embrionario posterior a la activación partenogenética. Los ovocitos activados en el grupo FSH lograron desarrollarse en una mayor proporción hasta los estadios de blastocisto y blastocisto protruyendo. Además, los blastocistos generados presentaron un mayor número de células totales y una mayor expresión relativa de *OCT4* y *GATA6*. En los embriones de gato doméstico una mayor expresión de *OCT4* ha sido relacionada con una mayor capacidad de desarrollo (Filliers *et al.*, 2012). Por otro lado, la reducida expresión de *OCT4* en embriones felinos generados por TNSh se ha correlacionado con una reducida capacidad de desarrollo (Imsoonthornruksa *et al.*, 2010). Finalmente, se ha descrito que la expresión de *GATA6* es esencial para la formación del hipoblasto durante la segunda diferenciación celular. En embriones en los que no se expresa *GATA6* no logra formarse un hipoblasto reconocible morfológicamente (Cai *et al.*, 2008). En resumen, el tratamiento con FSHp aumenta la capacidad de desarrollo posterior a la activación partenogenética, lo cual se correlaciona con una mayor expresión relativa de *OCT4* y *GATA6* en el estadio de blastocisto.

El tratamiento con eCG mejoró el desarrollo embrionario *in vitro* posterior a la activación partenogenética aumentando la tasa de blastocistos generados. En este caso, el tratamiento con eCG a las gatas en anestro, logró aumentar la tasa de blastocistos a un nivel similar a lo observado durante la estación reproductiva (Grupo Estro). Además, la tasa de blastocistos generados por activación partenogenética en el grupo eCG (32,8%) fue mayor a la reportada en estudios previos en los cuales se utilizó un tratamiento conjunto de eCG y hCG (23,7%) (Yu *et al.*, 2010). De igual manera, el número de células totales (Media \pm DE) en los blastocisto del grupo eCG (201,1 \pm 123,5) fue similar a lo observado en el Grupo FSH (199,9 \pm 53,6). Por otra parte, a diferencia de lo observado

en el grupo FSH, solo fue posible observar la tendencia de una mayor expresión relativa de *GATA6* en los blastocistos generados en el grupo eCG en comparación a los blastocistos del grupo control (Grupo Anestro). A pesar de este resultado, la capacidad de desarrollo y calidad morfológica de los embriones generados en el grupo eCG fue similar a lo observado en el grupo FSH.

En resumen, debido a que el tratamiento con eCG mejoró el patrón de expresión génica de los CCOs aumentando la tasa de MIV, lo cual además coincide con una mayor tasa de blastocistos, se seleccionó este tratamiento para evaluar la maduración *in vivo* de ovocitos de gata.

Comparación del tratamiento con eCG y la maduración in vivo de ovocitos

Solo un 56,6% de los ovocitos colectados posterior al tratamiento con eCG y hCG se encontraban en metafase II. Por este motivo fue necesario un período adicional de MIV de 20 h posterior al cual la tasa de maduración aumentó a un 76,5%. Similarmente, se ha demostrado que posterior al tratamiento con eCG y hCG solo un 53,6% de los ovocitos de gata logran alcanzar la metafase II y luego de 24 horas de MIV esta tasa aumenta a un 82% (Yu *et al.*, 2010). A pesar de esto, posterior a la activación partenogenética no se observó un aumento significativo en la tasa de blastocistos posterior al tratamiento con eCG y hCG (Grupo hCG) en comparación al tratamiento solo con eCG. Similarmente, no se observó diferencia significativa en el número de células totales y en el patrón de expresión génica de los blastocistos entre el grupo eCG y el grupo hCG. Finalmente, se concluyó que el tratamiento con eCG es suficiente para modificar positivamente el patrón de expresión génica en los CCOs, lo cual se refleja en una mayor competencia ovocitaria y capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*.

Sincronización del ciclo celular en fibroblastos de gato doméstico y güiña

De acuerdo a nuestros resultados, en fibroblastos de gato doméstico, la privación de suero y la inhibición por contacto, ambos por 3 y 5 días aumentan significativamente la proporción de células en G0/G1. Sin embargo, la privación de suero por 5 días disminuyó significativamente la viabilidad celular. En estudios previos, se describió que los

fibroblastos de gato doméstico y de gato salvaje africano la privación de suero por 5 días genera un porcentaje más alto de células arrestadas en la fase G0/G1 en comparación al método de inhibición por contacto (Gómez *et al.*, 2003). Sin embargo, genera una mayor fragmentación del ADN en comparación a la inhibición por contacto (Gómez *et al.*, 2003). Se ha descrito que posterior a un período prolongado de privación de suero, las células de gato doméstico comienzan a despegarse de la placa e inician la apoptosis (Bochenek *et al.*, 2001).

Además, en los resultados de este estudio se observó que los fibroblastos de gato doméstico y de güiña respondieron de manera distinta a los métodos de sincronización del ciclo celular. Esto es similar a lo descrito previamente donde demostraron que células de diferentes especies de felinos respondieron de manera distinta a los métodos de sincronización del ciclo celular (Wittayarat *et al.*, 2013). En nuestro estudio, la privación de suero por 3 y 5 días generó la proporción más alta de fibroblastos de güiña arrestados en la fase G0/G1 del ciclo celular. Sin embargo, similar a lo observado en los fibroblastos de gato doméstico, en los fibroblastos de güiña la privación de suero por 5 días disminuyó significativamente la viabilidad celular. Por otro lado, solo la inhibición por contacto por 1 y 3 días aumentaron significativamente la proporción de fibroblastos de güiña en la fase G0/G1, lo cual no se produjo en el método de inhibición por contacto por 5 días. Esto podría estar relacionado con el aumento en la proporción de células apoptóticas que se observó por citometría de flujo en los fibroblastos de güiña sincronizados por inhibición por contacto por 5 días. Este resultado es similar a lo reportado previamente en fibroblastos de gato jaspeado (*Pardofelis marmorata*) en el cual el método de inhibición por contacto por 5 días no genera un aumento en la proporción de células en la fase G0/G1 (Wittayarat *et al.* 2013). Todo esto podría indicar que en los fibroblastos de güiña la de inhibición por contacto y la privación de suero, ambos por 5 días, generarían un efecto negativo sobre la viabilidad celular.

En relación al análisis de expresión génica, *BCL2* es un gen anti-apoptótico y anti-proliferativo y su sobreexpresión prolonga la sobrevivencia celular (Chao y Korsmeyer, 1998). *BAX* es un gen pro-apoptótico homólogo a *BCL2* y su sobreexpresión acelera la tasa de apoptosis en respuesta a una señal de muerte celular (Oltvai *et al.*, 1993). Por este motivo, la razón *BAX/BCL2* ha sido establecido como un importante indicador de

susceptibilidad a apoptosis (Chao y Korsmeyer, 1998; Oltvai *et al.*, 1993). En este estudio, en los fibroblastos de gato doméstico no se observó una diferencia significativa en la razón *BAX/BCL2* en los tratamientos de privación de suero e inhibición por contacto en comparación a las células control en crecimiento. Sin embargo, en los fibroblastos de güiña, la inhibición por contacto por 3 y 5 días presentaron los índices más altos de la razón *BAX/BCL2* los cuales fueron significativamente más alto comparados a los tratamientos de privación de suero por 3 y 5 días. Se ha descrito que cuando *BCL2* esta sobreexpresado heterodimeriza con *BAX* reduciendo la tasa de apoptosis celular (Oltvai *et al.*, 1993). Por este motivo, una elevada expresión *BAX* y una baja razón *BAX/BCL2* podría estar correlacionada a una alta incidencia de apoptosis en los fibroblastos de güiña posterior 3 días de confluencia. Lo cual podría indicar que se produce un efecto negativo en los fibroblastos de güiña posterior a un período prolongado de confluencia.

Por otro lado las proteínas de la familia *BCL2* también participan en la sincronización del ciclo celular. Los genes anti-apoptóticos *BCL2* y *BCL-XL* tienen un rol anti-proliferativo y mantienen las células arrestadas en la fase G0 del ciclo celular (Zinkel *et al.*, 2006). Mientras *BAX* es un gen proliferativo y acelera el avance de las células hacia la fase S del ciclo celular (Zinkel *et al.*, 2006). Esto podría indicar que la alta expresión relativa de *BCL2* observada en los fibroblastos de güiña posterior a la privación de suero por 3 y 5 días estaría relacionada a la alta proporción de células en la fase G0/G1.

Finalmente, en los sistemas de PIV de embriones las bajas tasas de las proteínas *BAX/BCL2* y *BAX/BCL-XL* se han relacionado a una reducción de la apoptosis y un mayor desarrollo embrionario (Kölle *et al.*, 2002; Yang y Rajamahendran, 2002; Gupta *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2011). Por lo tanto, el uso de fibroblastos de güiña con una reducida razón *BAX/BCL2* en la TNS podría tener un efecto positivo sobre el potencial de desarrollo de los embriones reconstruidos.

En resumen, en los fibroblastos de güiña la inhibición por contacto por 5 días no aumenta la proporción de células en G0/G1. Lo cual además, está relacionado a un aumento en la razón *BAX/BCL2* pudiendo indicar un aumento en la incidencia de apoptosis. De igual manera, la privación de suero por 5 días reduce significativamente la viabilidad de los

fibroblastos de güiña. Por lo tanto, se decidió utilizar la privación de suero por no más de 3 días para la sincronización en la fase G0/G1 en los fibroblastos de güiña.

Evaluación de la calidad y capacidad de desarrollo de embriones de gato doméstico generados por fecundación *in vitro*.

En el presente estudio los ovocitos fueron pre-madurados con una dosis de eCG y posteriormente la maduración ovocitaria se completó *in vitro*, lo cual logró aumentar la tasa de blastocistos de un 25% a un 38%. Sin embargo, no se observó diferencia significativa en las tasas de blastocistos protruyendo y el número de células totales. Se ha descrito que uno de los principales problemas que experimentan los embriones de gato generados por fecundación *in vitro* es el bloqueo del desarrollo durante el estadio de mórula (Roth *et al.*, 1994). Aproximadamente un 70% de los embriones de gato generados *in vivo* alcanza el estadio de blastocisto. Mientras que en los embriones de gato generados por FIV la tasa de blastocistos generados alcanza solo 20 – 50% dependiendo del origen de los ovocitos (madurados *in vitro* o *in vivo*) y el sistema de cultivo utilizado (Roth *et al.*, 1994; Pope *et al.*, 2006). Este menor potencial de desarrollo en los embriones de gato se ha atribuido a una incompleta maduración citoplasmática de los ovocitos madurados *in vitro* (Gómez *et al.*, 2000; Bogliolo *et al.*, 2004). Se ha reportado que ovocitos de gata madurados *in vitro* presentan niveles reducidos del factor promotor de mitosis, meiosis (MPF) y del factor mitógeno activado por proteína quinasa (MAPK) en comparación a los ovocitos madurados *in vivo* (Bogliolo *et al.*, 2004). Es posible que en este estudio los ovocitos pre-madurados con eCG presentaran un mayor grado de maduración citoplasmática en comparación a los ovocitos del grupo control. Lo cual podría ser el motivo del mayor potencial de desarrollo hasta el estadio de blastocistos de los ovocitos colectados en el grupo eCG.

Por otro lado, se ha postulado que este bloqueo en el desarrollo es debido a un escaso conocimiento de los requerimientos de cultivo de los embriones de gato y de cómo estos responden a condiciones específicas (Sananmuang *et al.*, 2011). En otras especies, se ha demostrado que el sistema de cultivo *in vitro* afecta la morfología, el metabolismo y la expresión génica de los embriones generados (Lane y Gardner, 1998; Crosier *et al.*, 2001; Rinaudo y Schultz, 2004). Además, estas alteraciones pueden afectar negativamente la

tasa de implantación, el desarrollo fetal, la tasa de nacimientos, la duración de la gestación y el estado de salud de las crías (Thompson *et al.*, 1995; Bower y Hansen, 2005).

Por los motivos anteriormente mencionados se decidió evaluar el potencial de desarrollo *in vivo* de los embriones generados por FIV. Actualmente, existe información limitada relacionada al estudio del desarrollo *in vivo* de los embriones de gato generados por FIV. Sin embargo, los principales factores que varían y que podrían afectar el desarrollo *in vivo* posterior son el origen de los ovocitos utilizados (madurados *in vivo* o *in vitro*) y el estadio de desarrollo, al momento de la transferencia (estadios tempranos – transferencia oviductal y estadios tardíos – transferencia intrauterina). Actualmente, se ha reportado la transferencia de embriones de gato en los estadios de 2-4 células a nivel oviductal y en los estadios de mórula o blastocito a nivel de los cuernos uterinos, resultando con el nacimiento de crías vivas en ambos casos (Goodrowe *et al.*, 1988; Pope *et al.*, 1993; Pope *et al.* 1997). Más recientemente, junto con la optimización de los sistemas de cultivo de embriones en el gato doméstico, un mayor número de estudios han reportado la transferencia de embriones en los estadios de mórula o blastocisto dentro del cuerno uterino, describiendo el nacimiento de crías vivas tanto en el gato doméstico como en felinos silvestres (Pope, 2000; Pope *et al.*, 2006). Actualmente, la transferencia de embriones de gato en estadios tempranos es utilizada principalmente en aquellos casos en los cuales las tasas de embriones que logran desarrollarse hasta los estadios de mórula y blastocisto son reducidas. En estudios en los cuales se han generado embriones de gato a partir de ovocitos vitrificados o en donde los embriones fueron generados por ICSI o por TNS, se reportaron bajas tasas de blastocistos y el nacimiento de crías vivas fue posible posterior a la transferencia oviductal (Gómez *et al.*, 2000).

En este estudio, los embriones producidos por FIV fueron generados a partir de ovocitos pre-madurados con una dosis de eCG y posteriormente madurados *in vitro*. No existen reportes previos que mencionen la generación de embriones de gato a partir de ovocitos pre-madurados *in vivo*. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que con este protocolo es posible generar crías vivas de gato doméstico, posterior a la transferencia de embriones en el estadio de mórula al día 5 o blastocisto al día 7. Tomando en conjunto

estos resultados, se obtuvo una tasa de preñez = 66,6% (4/6) y una tasa de nacimientos = 33,3% (2/6). Siendo este resultado superior a lo reportado previamente en donde se utilizaron ovocitos madurados *in vitro* y los embriones fueron transferidos al día 5 de cultivo, siendo la tasa de preñez = 44 % (4/9) y la de nacimientos = 22 % (2/9). (Gómez *et al.*, 2003). Por lo cual, los resultados de este estudio se asemejan más a los reportados previamente al utilizar ovocitos madurados *in vivo*, en los cuales las tasas de preñez varían entre 25-80% similar a las tasas de nacidos vivos 25-80% (Goodrowe *et al.*, 1988, Pope *et al.*, 1993).

Esto demuestra, que el sistema de producción *in vitro* de embriones establecido en este estudio, es capaz de generar embriones viables de gato doméstico, capaces de desarrollarse a término posterior a la transferencia. Estos experimentos permitieron implementar la técnica de transferencia de embriones de gato doméstico, siendo de utilidad para la posible transferencia de embriones generados por TNS en estudios posteriores.

Cultivo *in vitro* de embriones de gato doméstico posterior a la remoción de la zona pelúcida

Los resultados de este estudio demostraron que con un sistema de cultivo apropiado la remoción de la zona pelúcida no afecta el desarrollo *in vitro* de los embriones de gato doméstico generados por FIV. Solamente un estudio previo había evaluado el efecto de la remoción de la zona pelúcida en embriones de gato generados por FIV. Se ha reportado que la remoción de la zona pelúcida en blastocistos de gato al día 6 de cultivo aumenta significativamente el número de células totales y la producción de ATP al día 8 (Freistedt *et al.*, 2001). Aunque en el presente estudio la remoción de la zona pelúcida logró aumentar el número de células totales, esta diferencia no fue significativa, posiblemente debido a la gran variación individual entre blastocistos.

En el estudio de Freistedt *et al.* la remoción de la zona pelúcida se realizó al día 6 en blastocistos ya formados, mientras que en este estudio la zona pelúcida fue removida posterior a la FIV. Debido a esto, los embriones generados en este estudio fueron cultivados en el sistema WOW, y en algunos casos no todas las blastómeras lograban agregarse al blastocisto en formación, generando blastocistos de tamaños muy variables,

lo cual podría repercutir en el número de células totales. Por otro lado, se describió que la remoción de la zona pelúcida aumenta la producción de ATP en los blastocistos de gato al día 8 de cultivo (Freistedt *et al.*, 2001).

Se ha descrito que el ATP juega un rol fundamental durante la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario, siendo esencial para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Quinn y Wales, 1971; Van Blerkom *et al.*, 1995; Freistedt *et al.*, 2001). En humanos, ovocitos con un mayor contenido de ATP presentan un mayor potencial para comenzar la embriogénesis y posteriormente implantarse (Van Blerkom *et al.*, 1995). De igual manera, el contenido de ATP en ovocitos y embriones ha sido considerado un indicador de la capacidad de desarrollo en los modelos murino y bovino (Quinn y Wales, 1973; Stojkovic *et al.*, 2001). Por estas razones se ha postulado que la remoción de la zona pelúcida en embriones de gato generados por FIV podría tener un efecto beneficioso sobre la capacidad de desarrollo, aumentando los niveles de ATP durante el estadio de blastocisto (Freistedt *et al.*, 2001).

Durante el desarrollo temprano en el gato doméstico, la zona pelúcida es degradada por acción enzimática de las células del trofoblasto (Denker *et al.*, 1978). Describiéndose, que este proceso lo que conlleva un gran consumo de energía por parte del blastocisto (Bavister, 2000). Se postula que la remoción de la zona pelúcida en embriones de gato doméstico podría tener un efecto beneficioso sobre el desarrollo *in vivo* posterior, aumentando las concentraciones de ATP y evitando los problemas asociados a la protrusión durante el estadio de blastocisto (Freistedt *et al.*, 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios que evalúen el desarrollo *in vivo* de embriones de gato sin zona pelúcida. En humanos se ha descrito que la remoción de la zona pelúcida aumenta las tasas de embarazos en mujeres con mal pronóstico posterior a IVF/ICSI (Mansour *et al.*, 2000). Similarmente, se han obtenido crías vivas a partir de embriones generados sin la presencia de zona pelúcida en el bovino, murino, porcino y equino (Naito *et al.*, 1992; Vajta *et al.*, 2004; Lagutina *et al.*, 2006; Gambini *et al.*, 2012). Sin embargo, en el gato doméstico se postula que la baja tasa de implantación posterior a la transferencia de embriones en el estadio de blastocisto es debido a que estos comienzan a protruir y la zona pelúcida no se encuentra íntegra (Pope *et al.* 2014). Kanda *et al.*, no lograron generar gestaciones posterior a la transferencia de blastocistos de gato de 7 y 8 días de cultivo (Kanda *et al.*, 1998). Siendo el reporte de Pope *et al.*, el único que describe el

nacimiento de una cría de gato doméstico posterior a la transferencia de blastocitos día 7 generados por IVM/FIV (Pope *et al.*, 2003). Se enfatiza en que aquel nacimiento fue posible gracias a que todos blastocistos transferidos presentaban una zona pelúcida intacta, postulando que en el gato doméstico la integridad de la zona pelúcida es esencial para establecer una gestación (Pope *et al.*, 2014). Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para evaluar el potencial de desarrollo de los embriones de gato generados sin la presencia de zona pelúcida.

Generación de embriones de gato doméstico y de güiña por transferencia nuclear somática zona-libre utilizando el método de agregación embrionaria.

En este estudio se decidió utilizar un sistema de clonación sin la presencia de zona pelúcida debido a las dificultades que se presentan al momento de la fusión en el método de clonación tradicional en el gato doméstico. Recientemente se logró solucionar este problema implementando un sistema de clonación zona-libre, con el cual se logró aumentar la tasa de fusión de un 25,4% en el método de clonación tradicional a un 82,7% en el método zona-libre (Moro *et al.*, 2015b). De igual manera, el método de clonación zona-libre permitió que una mayor proporción de embriones de gato doméstico alcanzaran el estadio de blastocisto expandido (Moro *et al.*, 2015b). Además, el método de clonación zona-libre aumento el número de células totales en los blastocistos generados en comparación al método de clonación tradicional con presencia de zona pelúcida (Moro *et al.*, 2015b). En este estudio, utilizando el método de clonación zona libre fue posible obtener un 16,7% de blastocistos de gato doméstico, lo cual fue similar a lo descrito previamente por el mismo grupo que obtuvieron un 16,4% (Moro *et al.*, 2015). Estas tasas de blastocistos son mayores a las descritas en estudios previos para esta especie en los cuales las tasas varían entre 3-8% de blastocistos utilizando el método de clonación tradicional (Gómez *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008; Thongphakdee *et al.*, 2010). A pesar de esto, las tasas de blastocistos clonados obtenidas en el gato doméstico siguen siendo menor comparadas con los resultados obtenidos en otras especies más estudiadas como el bovino (30-60%), equino (30-55%), murino (20-75%) y porcino (50-80%) (Kishigami *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Rodriguez-Alvarez *et al.*, 2013; Olivera *et al.*, 2016). Este bajo potencial de desarrollo en los embriones generados por

TNS es debido a que el ovocito receptor no es capaz de reprogramar completamente los patrones epigenéticos del núcleo donado.

En relación a esto, se ha demostrado que cada embrión clonado presenta patrones epigenéticos y de expresión génica únicos (Park *et al.* 2002). Se ha descrito que el cultivo en agregado de dos o tres embriones generados por TNS, los cuales son genéticamente idénticos, pero distintos epigenéticamente resulta en un aumento en el número de células totales en el estadio de blastocisto, lo cual se correlaciona con una mejora en el patrón de expresión génica y el desarrollo *in vivo* posterior (Boiane *et al.*, 2003).

Recientemente se ha demostrado que el método de agregación embrionaria en clones de gato doméstico aumenta significativamente la tasa de blastocisto y que regula el patrón de expresión de genes de pluripotencia y diferenciación a un patrón más similar al de los embriones de gato generados por FIV (Moro *et al.*, 2015a, Moro *et al.*, 2015b). De igual manera, el método de agregación embrionaria logró aumentar la tasa de blastocistos generados por TNS_h utilizando células somáticas de chita, pero sin influir positivamente en el patrón de expresión génica de los blastocistos (Moro *et al.*, 2015a). Por estos motivos, se decidió utilizar el método de agregación embrionaria en la generación de embriones de gato doméstico y de güiña por transferencia nuclear somática y evaluar el potencial de desarrollo de estos.

Similar a lo observado por Moro *et al.*, en el presente estudio el método de agregación embrionaria logró aumentar significativamente la tasa de blastocistos de gato generados por TNS. Por otro lado, los embriones de güiña generados por TNS_h y cultivados individualmente no lograron desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. Solo fue posible obtener blastocistos de güiña por medio de TNS_h en el grupo agregado. Esto puede ser debido a que la agregación embrionaria aumento significativamente la tasa de embriones de güiña que alcanzaron el estadio de mórula, logrando que un bajo porcentaje de estas alcanzaran el estadio de blastocisto. Sin embargo, la tasa de blastocistos obtenida en el grupo güiña agregado no fue significativamente distinta al 0% obtenido en el grupo güiña individual. Este resultado es similar a lo reportado previamente en donde la agregación embrionaria no logró aumentar significativamente la tasa de blastocistos generados por

TNSh utilizando células de tigre (Moro *et al.*, 2015b). Sin embargo, el mismo grupo de investigación describió que la agregación embrionaria aumentó significativamente la tasa de blastocistos generados por TNSh utilizando células de chita (Moro *et al.*, 2015a).

Otro factor relevante podría ser el potencial clonogénico de las líneas celulares de güiña utilizadas durante la TNSh, en este estudio se utilizaron dos líneas celulares de güiña, una de las cuales no produjo blastocistos posterior a la TNSh, mientras que la otra línea produjo el 5,5% de blastocistos que se muestra en los resultados en el método de agregación embrionaria. La poca disponibilidad de individuos limita el uso una mayor cantidad de líneas celulares de güiña. Sin embargo, se ha descrito que el patrón de expresión de *OCT4* en líneas celulares bovinas se correlaciona positivamente con el potencial de desarrollo *in vitro* en los embriones generados por TNS (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2013). Estudios posteriores podrían destinarse a evaluar el patrón de expresión de *OCT4* en las líneas celulares de güiña y correlacionarlas con el potencial de desarrollo *in vitro* de los embriones generados por TNSh.

Se ha descrito que la eficiencia de la TNSh se reduce a medida que aumenta la distancia filogenética entre las especies donantes de ovocitos y de células somáticas (Gómez *et al.*, 2009a). Esto puede ser debido a una incompleta reprogramación del núcleo donado por parte de los factores citoplasmáticos del ovocito, lo que puede llevar a aberraciones epigenéticas de los embriones generados y/o a alteraciones metabólicas causadas por la heteroplasmia de mitocondrias (Gómez *et al.*, 2009a).

La güiña (*Leopardus guigna*) es una especie perteneciente al género *Leopardus*, el cual se caracteriza porque sus especies solo presentan 36 pares de cromosomas y una posición metacéntrica del cromosoma C3, a diferencia de las otras especies que conforman la familia *Felidae* que presentan 38 pares de cromosomas, incluyendo al gato doméstico (Pecon Slattery *et al.*, 1994; Castro, 2007; Eroğlu *et al.*, 2017). Esta diferencia en los números de cromosomas entre ambas especies podría haber sido la causa del reducido potencial de desarrollo en los embriones de güiña generados por TNSh.

La diferencia en el número de cromosomas, el reordenamiento de estos, y las incompatibilidades de ADN mitocondrial actúan como barrera reproductiva en la cruce interespecies (Ma *et al.*, 2016). Se ha descrito que posterior a la TNSh, no todos los

embriones generados presentan la misma dotación cromosómica que la célula donante. En embriones ovinos generados por TNSh utilizando ovocitos de vaca, solo un 66% de los embriones generados presentan el mismo número de cromosomas que la célula donante, lo cual puede deberse a una incompleta reprogramación nuclear (Hua *et al.*, 2008).

Similarmente, se describe que en embriones generados por TNSh la interacción núcleo-mitocondria se complica debido a que el núcleo donado debe interactuar con citoplasma que presenta heteroplasmia de mitocondrias o que presentan un solo tipo de mitocondrias pero que no están relacionadas con el genoma nuclear (Mastromonaco *et al.*, 2007). Alteraciones en la estructura, ubicación y número de copias del ADNm, generan alteraciones en los niveles de ATP, lo cual podrían impedir al embrión alcanzar las demandas energéticas necesarias para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto (Stojkovic *et al.*, 2001).

A pesar de todo esto, se han logrado reproducir especies por TNSh utilizando ovocitos y células somáticas con distinta dotación cromosómica y ADNm. Siendo un ejemplo de esto la generación de crías vivas de Gaur (*Bos gaurus*, $2n=56$) mediante TNSh utilizando ovocitos bovinos (*Bos taurus*, $2n=60$) (Lanza *et al.*, 2000). Adicionalmente, al analizar el ADN mitocondrial de los fetos generados, se demostró que solamente presentaban ADNm bovino, sin presencia de ADNm de Gaur (Lanza *et al.*, 2000). Lo cual indica, que la diferencias en el dote cromosómico entre especies no es una limitante para la generación de embriones por TNSh y que además las mitocondrias aportadas por la célula donante de núcleo son eliminadas a medida que el embrión se va desarrollando, por lo menos en este caso particular (Lanza *et al.*, 2000). A pesar de esto la cría de Gaur obtenida por TNSh vivió solo por 48 horas, sin embargo, los autores indican que esto no fue debido al proceso de clonación (Vogel, 2001).

Por otra parte, existe información limitada respecto a la capacidad de reprogramación del ovocito de gata doméstica. Distintos estudios demuestran que tanto el ovocito bovino como el de coneja son capaces de reprogramar células de gato doméstico por TNSh, logrando la generación de blastocistos en bajo porcentaje (Thongphakde *et al.*, 2006; Wittayarat *et al.*, 2013b). Sin embargo, no hay estudios que demuestren la capacidad del

ovocito de gata para reprogramar células somáticas con distinta dotación cromosómica. Siendo este el primer estudio en donde se evaluó la capacidad de reprogramación del ovocito de gata utilizando células somáticas de güiña, especie la cual presenta una dotación cromosómica distinta al gato doméstico.

En cuanto al análisis de expresión génica de los embriones generados por TNS y TNSh, en este estudio solo fue posible analizar la expresión génica de los embriones clonados de gato doméstico. Solo una de las muestras de clones de güiña presentó una leve expresión de *OCT4*, lo cual podría deberse a una escasa cantidad de material inicial dado a que solo se produjeron 6 blastocistos clonados de güiña de diversa calidad. También podría deberse a una ineficiente reprogramación nuclear y que efectivamente solo uno de los blastocistos de güiña generados expresara *OCT4*. Se descarta que la falta de expresión se deba a la inespecificidad de los primers utilizados, debido a que los primers diseñados ya fueron utilizados en embriones clonados de Chita amplificando eficientemente los genes *SDHA*, *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *CDX2* (Moro *et al.*, 2015a). En este caso los productos de PCR fueron secuenciados para corroborar la correcta amplificación de los primers. Además, los primers de *SDHA* fueron utilizados exitosamente en fibroblastos de güiña en el experimento 1.2 de la etapa 1, para el análisis de apoptosis celular por RT-qPCR. De igual manera, los primers de *OCT4* y *NANOG* fueron utilizados exitosamente en células mesenquimales de güiña (Echeverry *et al.*, 2018, Aceptado, en prensa).

En relación a la expresión génica de los embriones clonados, se observó que la expresión relativa de *OCT4* en los blastocistos de gato generados por FIV, tendió a ser mayor ($P=0,053$) en comparación a la de los blastocistos clonados en el grupo 1x. Esto coincide con estudios previos en los que se describe que los blastocistos clonados de gato presentan una expresión aberrante de *OCT4* en comparación a los blastocistos generados por FIV, lo cual se correlaciona con su reducida capacidad de desarrollo (Imsoonthornruksa *et al.*, 2010; Moro *et al.*, 2015a). De igual manera, Imsoonthornruksa *et al.* que describieron que en embriones de gato jaspeado (*Pardofelis marmorata*) generados por TNSh la expresión de *OCT4* es menor en comparación a la de embriones de gato generados por TNS y FIV, sin presentar variaciones desde el estadio de 8 células

hasta el estadio de blastocito (Imsoonthornruksa *et al.*, 2010). Se ha descrito que una mayor expresión de *OCT4* en los embriones de gato generados *in vivo* está asociada con una mayor capacidad de desarrollo en comparación a sus contrapartes generadas por FIV (Filliers *et al.*, 2012).

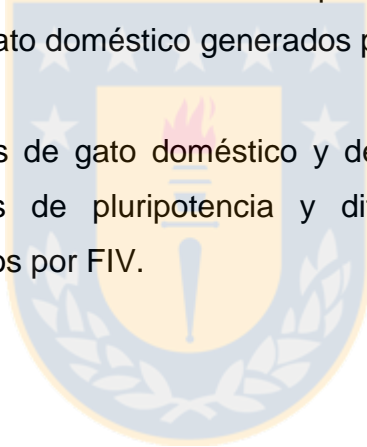
Por otro lado, en este estudio la agregación embrionaria no afectó significativamente la expresión relativa de *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *GATA6*, lo cual no se correlacionó con el aumento en la tasa de blastocistos clonados observado en el grupo agregado (clon gato 2x). Esto difiere con los resultados anteriormente descritos que indican que la agregación embrionaria de clones de gato doméstico disminuye la expresión relativa de *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* a un patrón de expresión más similar al de los embriones de gato generados por FIV (Moro *et al.*, 2015a). Sin embargo, tanto en este estudio como en el de Moro *et al.*, la agregación embrionaria disminuyó significativamente la expresión relativa de *CDX2* en los embriones de gato generados por TNS (Moro *et al.*, 2015a). Durante la primera diferenciación celular la expresión de *CDX2* promueve la diferenciación de las células hacia trofoblasto inhibiendo la expresión de *OCT4* y *NANOG* (Strumpf *et al.* 2005). Se ha descrito que la agregación de embriones clonados de ratón regula la expresión de *CDX2* a un patrón más similar al de los embriones generados por FIV (Balbach *et al.*, 2010). Es posible que en este estudio la expresión aberrante de *CDX2* en los blastocistos clonados de gato (clon gato 1x) disminuyera la expresión de *OCT4*, tendiendo a ser menor en comparación a los blastocistos generados por FIV. Lo cual se correlacionaría con la menor capacidad de desarrollo de los embriones generados en el grupo clon gato1x. Por el contrario, en los blastocistos del grupo clon gato 2x, la expresión relativa de *CDX2* es reducida, y no se observa diferencia o tendencia significativa en la expresión relativa de *OCT4* en comparación a los blastocitos generados por FIV. Lo cual podría estar relacionado con el aumento en la tasa de blastocistos en el grupo clon gato 2x.

En resumen, es posible generar embriones de güiña mediante TNSh utilizando ovocitos de gata doméstica y estos son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto en bajo porcentaje utilizando el método de agregación embrionaria. Sin embargo, se pone en evidencia que la capacidad del ovocito de gata doméstica para reprogramar células somáticas de güiña es reducida, lo cual se evidencia en la baja tasa de blastocistos y en la ausencia en la expresión de genes de pluripotencia y diferenciación en estos.

Los próximos estudios destinados a continuar con esta línea de investigación debieran centrarse en aumentar el potencial de desarrollo de los embriones de gúña generados por TNSh. Esta tesis ya demostró que solo es posible generar blastocistos de gúña utilizando el método de agregación embrionaria, agregando dos embriones generados por TNSh. Otros estudios han demostrado que la agregación de tres o más embriones clonados aumenta significativamente el potencial de desarrollo, lo cual puede variar dependiendo de la especie (Gambini *et al.*, 2016). Otra alternativa a parte de la agregación embrionaria sería el uso de tratamientos que modifiquen el patrón epigenético de los embriones generados por TNSh. Se ha demostrado previamente que el tratamiento con Tricostatina A, un inhibidor de la actividad de las histonas desacetilasas, en los embriones reconstruidos, mejora el patrón de expresión de marcadores de pluripotencia en embriones de gato patinegro (*Felis nigripis*) generados por TNSh (Gómez *et al.*, 2011). Posteriormente, el mismo grupo de investigación demostró que el tratamiento tanto en las células somáticas como en los embriones reconstruidos con 5-aza-2'-desoxicitidina, un inhibidor de la actividad de las DNA metiltransferasas, en combinación con Scriptaid, mejora el patrón de expresión de marcadores de pluripotencia y el desarrollo *in vitro* de embriones de gato patinegro generados por TNSh (Gómez *et al.*, 2012). Resumiendo, existen diversas alternativas que podrían ayudar a mejorar el bajo potencial de desarrollo y el patrón de expresión génica aberrante en los embriones de gúña generado por TNSh. Lo cual se hace necesario evaluar para aumentar las tasas de blastocistos y permitir el posterior estudio del potencial de desarrollo *in vivo* de estos embriones.

VII. CONCLUSIONES

1. Es posible obtener ovocitos competentes de gata doméstica a lo largo del año utilizando un protocolo de estimulación ovárica basado en la administración de eCG.
2. Los tratamientos de privación de suero e inhibición por contacto aumentan la proporción de fibroblastos de gato doméstico y güiña en la fase G0/G1 del ciclo celular.
3. Los embriones de gato doméstico y de güiña generados por TNS y TNSh, respectivamente, presentan una reducida capacidad de desarrollo en comparación a los embriones de gato doméstico generados por FIV.
4. Blastocistos clonados de gato doméstico y de güiña presentan una expresión aberrante de genes de pluripotencia y diferenciación en comparación a blastocistos generados por FIV.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baguisi, A., E. Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempes, C. Cammuso, J.L. Williams, S.D. Nims and Y. Echelard, *et al.* 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17(5): 456-461.
2. Balbach, S.T., T.C. Esteves, T. Brink, L. Gentile, K.J. McLaughlin, J.A. Adjaye, M. Boiani. 2010. Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. *Dev. Biol.* 343(1-2), 71-83.
3. Bavister, B. D. 2000. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, 53(2): 619-626.
4. Beaujean, N., G. Hartshorne, J. Cavilla, J. Taylor, J. Gardner, I. Wilmut, R. Meehan and L. Young. 2004. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr. Biol.* 14(7): R266-R267.
5. Beyhan, Z., A.E. Lager and J.B. Cibelli. 2007. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell* 1(5): 502-512.
6. Blelloch, R., Z. Wang, A. Meissner, S. Pollard, A. Smith and R. Jaenisch. 2006. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells.* 24(9): 2007-2013.
7. Bochenek, M., L. Katska, G. Kania, B. Rynska, Z. Smorag and M. Pienkowski. 2001. Cell cycle analysis of somatic cell lines in the cloning of the domestic cat. *Theriogenology*, 55(1): 256 (Abst.)
8. Boiani, M., S. Eckardt, N.A. Leu, H.R. Schöler and K.J. McLaughlin. 2003. Pluripotency deficit in clones overcome by clone–clone aggregation: epigenetic complementation?. *The EMBO journal.* 22(19): 5304-5312.
9. Bogliolo, L., G. Leoni, S. Ledda, S. Naitana, M. Zedda, A. Carluccio and S. Pau. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 56(5): 955-967.
10. Bogliolo, L., G. Leoni, S. Ledda, M.T. Zedda, P. Bonelli, L. Madau, C. Santucci, S. Naitana and S. Pau. 2004. M-phase promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinases (MAPK) activities of domestic cat oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. *Clon. Stem Cells* 6(1): 15-23.

11. Bonk, A.J., R. Li, L. Lai, Y. Hao, Z. Liu, M. Samuel and R.S. Prather. 2008. Aberrant DNA methylation in porcine *in vitro*-, parthenogenetic-, and somatic cell nuclear transfer-produced blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 75(2): 250-264.
12. Boquest, A.C., B.N. Day and R.S. Prather. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.* 60(4): 1013-1019.
13. Bower, C. and M Hansen. 2005. Assisted reproductive technologies and birth outcomes: overview of recent systematic reviews. *Reprod. Fertil Dev.* 17(3): 329-333.
14. Cai, J., H. Y. Lou, M. Y. Dong, X. E. Lu, Y. M. Zhu, H. J. Gao and H. F. Huang. 2007. Poor ovarian response to gonadotropin stimulation is associated with low expression of follicle-stimulating hormone receptor in granulosa cells. *Fertil Steril.* 87(6): 1350-1356.
15. Cai, K.Q., C.D. Capo-Chichi, M.E. Rula, D.-H. Yang and X.-X. Xu. 2008. Dynamic GATA6 expression in primitive endoderm formation and maturation in early mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* 237(10): 2820-2829.
16. Caiafa, P. and M. Zampieri. 2005. DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *J. Cell. Biochem.* 94(2): 257-265.
17. Campbell, K.H., P. Loi, P.J. Otaegui and I. Wilmut. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.* 1(1): 40-46.
18. Campbell, K.H. 1999. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1(1): 3-15.
19. Castro, R.A. 2007. Establecimiento de un banco genético de células fibroblásticas de un ejemplar güiña (*Oncifelis guigna*). Memoria de título, Med. Vet. Universidad de Chile. Fac. Cien. Vet. Pec. Esc. Cien. Vet. Santiago, Chile.
20. Chang, K.H., J.M. Lim, S.K. Kang, B.C. Lee, S.Y. Moon and W.S. Hwang. 2003. Blastocyst formation, karyotype, and mitochondrial DNA of interspecies embryos derived from nuclear transfer of human cord fibroblasts into enucleated bovine oocytes. *Fertil. Steril.* 80(6): 1380-1387.
21. Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 16(1): 395-419.
22. Chen, D.-Y., D.-C. Wen, Y.-P. Zhang, Q.-Y. Sun, Z.-M. Han, Z.-H. Liu, P. Shi, J.-S. Li, J.-G. Xiangyu, L. Lian, Z.-H. Kou, Y.-Q. Wu, Y.-C. Chen, P.-Y. Wan, Z.-H. Kou.

2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol. Reprod.* 67(2), 637-642.
23. Cho, S.J., X.J. Yin, E. Choi, H.S. Lee, I. Bae, H.S. Han, S.T. Yee, N.H. Kim and I.K. Kong. 2007. DNA methylation status in somatic and placenta cells of cloned cats. *Cloning Stem Cells* 9(4): 477-484.
24. Chung, Y.G., S. Ratnam, J.R. Chaillet and K.E. Latham. 2003. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 69(1): 146-153.
25. Concannon, P., B. Hodgson and D. Lein. 1980. Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biol. Reprod.* 23(1): 111-117.
26. Couse, J. F., M. M. Yates, B. J. Deroo and K. S. Korach. 2005. Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology.* 146(8): 3247-3262.
27. Crosier, A. E., P. W. Farin, M. J. Dykstra, J. E. Alexander and C. E. Farin. 2001. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.* 64(5): 1375-1385.
28. Cui, X. S., Y. N. Xu, X. H. Shen, L. Q. Zhang, J. B. Zhang and N. H. Kim. 2011. Trichostatin A modulates apoptotic-related gene expression and improves embryo viability in cloned bovine embryos. *Cell. Reprogram. (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 13(2): 179-189.
29. Dard, N., M. Breuer, B. Maro and S. Louvet-Vallée. 2008. Morphogenesis of the mammalian blastocyst. *Mol. Cell. Endocrinol.* 282(1-2): 70-77.
30. de Barros, F.R.O., M.D. Goissis, H.V.A Caetano, F.F. Paula-Lopes, M.A. Peres, M.E.O.A. Assumpção and J.A. Visintin. 2010. Serum starvation and full confluency for cell cycle synchronization of domestic cat (*Felis catus*) foetal fibroblasts. *Reprod. Dom. Anim.* 45(1): 38-41.
31. Dean, W., F. Santos, M. Stojkovic, V. Zakhartchenko, J. Walter, E. Wolf and W. Reik. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(24): 13734-13738.
32. Denker, H. W., L.A. Eng and C.E. Hamner. 1978. Studies on the early development and implantation in the cat. *Anat. Embryol.* 154(1): 39-54.

33. Denker, H. W. 2000. Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells Tissues Org.* 166(2), 180-207.
34. Donoghue, A.M., L.A. Johnston, U.S. Seal, D.L. Armstrong, R.L. Tilson, P. Wolf, K. Petrini, L.G. Simmons, T. Gross and D.E. Wildt. 1990. *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.* 43(5): 733-744.
35. Dunstone, N., L. Durbin, I. Wyllie, R. Freer, G.A. Jamett, M. Mazzolli and S. Rose. 2002. Spatial organization, ranging behaviour and habitat use of the kodkod (*Oncifelis guigna*) in southern Chile. *J. Zool., Lond* 257: 1-11.
36. Eroğlu, H.E. 2017. The comparison of the Felidae species with karyotype symmetry/asymmetry index (S/AI). *Punjab Univ. J. Zool.* 32 (2): 229-235.
37. Evans, M.J., C. Gurer, J.D. Loike, I. Wilmut, A.E. Schnieke and A.E. Schon. 1999. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat. Genet.* 23(1): 90-93.
38. Farstad, W. 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 375-387.
39. Farin, C. E., K. F. Rodriguez, J. E. Alexander, J. E. Hockney, J. R. Herrick, and S. Kennedy-Stoskopf. 2007. The role of transcription in EGF-and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 98(1-2): 97-112.
40. Feldman, E.C., R.W. Nelson. 2004. Feline reproduction. pp: 1016-1044. In: *Canine and feline: endocrinology and reproduction*. (3rd. ed.). Saunders. Elsevier Sciences. St. Louis, USA.
41. Filliers, M., K. Goossens, A. Van Soom, B. Merlo, C.E. Pope, H. De Rooster, K. Smits, L. Vandaele and L.J. Peelman. 2012. Gene expression profiling of pluripotency and differentiation-related markers in cat oocytes and preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 24(5): 691-703.
42. Freistedt, P., M. Stojkovic and E. Wolf. 2001. Efficient *in vitro* production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. *Biol. Reprod.* 65(1): 9-13.
43. Freistedt, P., P. Stojkovic, E. Wolf and M. Stojkovic. 2001. Energy status of nonmatured and *in vitro*-matured domestic cat oocytes and of different stages of *in vitro*-produced embryos: enzymatic removal of the zona pellucida increases

- adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. *Biol. Reprod.* 65(3): 793-798.
44. Fulka, H., M. Mrazek, O. Tepla and J. Fulka. 2004. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* 128(6): 703-708.
 45. Fulka, J., H. Fulka, T. Slavik, K. Okada and J. Fulka Jr. 2006. DNA methylation pattern in pig *in vivo* produced embryos. *Histochem. Cell Biol.* 126(2): 213-217.
 46. Gambini, A., A. De Stéfano, J. Jarazo, C. Buemo, F. Karlanian, D.F. Salamone. 2016. Embryo aggregation does not improve the development of interspecies somatic cell nuclear transfer embryos in the horse. *Theriogenology.* 86: 1081-1091.
 47. Gioia, L., B. Barboni, M. Turriani, G. Capacchietti, M.G. Pistilli, P. Berardinelli, and M. Mattioli. 2005. The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. *Reproduction* 130(1): 29-39.
 48. Gómez, M.C., C.E. Pope, R. Harris, A. Davis, S. Mikota and B.L. Dresser. 2000. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 12(8): 423-433.
 49. Gómez, M.C., E. Pope, R. Harris, S. Mikota and B.L. Dresser. 2003. Development of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology.* 60(2). 239-251.
 50. Gómez, M.C., J.A. Jenkins, A. Giraldo, R.F. Harris, A. King, B.L. Dresser and C.E. Pope. 2003. Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol. Reprod.* 69(3): 1032-1041.
 51. Gómez, M.C., C.E. Pope, A. Giraldo, L.A. Lyons, R.F. Harris, A.L. King, A. Cole, R.A. Godke and B.L. Dresser. 2004. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 6(3): 247-258.
 52. Gómez, M.C., C.E. Pope, R.H. Kutner, D.M. Ricks, L.A. Lyons, M. Ruhe, C. Dumas, J. Lyons, M. López, B.L. Dresser and J. Reiser. 2008. Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells* 10(4): 469-484.
 53. Gómez, M.C., C.E. Pope, D.M. Ricks, J. Lyons, C. Dumas and B.L. Dresser. 2009a. Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. *Reprod. Fertil. Dev.* 21: 76-82.

54. Gómez, M.C., C.E. Pope, R.H. Kutner, D.M. Ricks, L.A. Lyons, M.T. Ruhe, C. Dumas, J. Lyons, B.L. Dresser and J. Reiser. 2009b. Generation of domestic transgenic cloned kittens using lentivirus vectors. *Cloning Stem Cells* 11(1): 167-176.
55. Gómez, M.C., M.A. Serrano, C.E. Pope, J.A. Jenkins, M.N. Biancardi, M. López, C. Dumas, J. Galiguis and B.L. Dresser. 2010. Derivation of cat embryonic stem-like cells from *in vitro*-produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells. *Theriogenology* 74(4): 498-515.
56. Gómez, M.C., C.E. Pope, M.N. Biancardi, C. Dumas, J. Galiguis, A.C. Morris, G. Wang and B.L. Dresser. 2011. Trichostatin A modified histone covalent pattern and enhanced expression of pluripotent genes in interspecies black-footed cat cloned embryos but did not improve *in vitro* and *in vivo* viability. *Cellular Reprogramming* 13(4): 315-329.
57. Gómez, M.C., M.N. Biancardi, J.A. Jenkins, C. Dumas, J. Galiguis, G. Wang and C.E. Pope. 2012. Scriptaid and 5-aza-2' deoxycytidine Enhanced expression of pluripotent genes and *in vitro* developmental competence in interspecies Black-Footed cat cloned embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 47(s6): 130-135.
58. Goodrowe, K.L., R.J. Wall, S.J. O'brien, P.M. Schmidt and D.E. Wildt. 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* 39(2): 355-372.
59. Goodrowe, K.L., M. Hay and W.A. King. 1991. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.* 45(3): 466-470.
60. Grabiec, A., A. Max and M. Tischner. 2007. Parthenogenetic activation of domestic cat oocytes using ethanol, calcium ionophore, cycloheximide and a magnetic field. *Theriogenology* 67(4): 795-800.
61. Gupta, M. K., S. J. Uhm, D. W. Han and H. T. Lee. 2007. Embryo quality and production efficiency of porcine parthenotes is improved by phytohemagglutinin. *Mol. Reprod. Dev.* 74(4): 435-444.
62. Hamner, C.E., L.L. Jennings and N.J. Sojka. 1970. Cat (*Felis catus* L.) spermatozoa require capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 23(3): 477-480.
63. Hashem, M., D.P. Bhandari, S.K. Kang and B.C. Lee. 2007. Cell cycle analysis and interspecies nuclear transfer of *in vitro* cultured skin fibroblasts of the Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Mol. Reprod. Dev.* 74(4): 403-411.

64. Hayes, O., B. Ramos, L.L. Rodriguez, A. Aguilar, T. Badia and F.O. Castro. 2005. Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 87(3): 181-192.
65. Heikinheimo, O., W.E. Gibbons. 1998. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol. Hum. Reprod.* 4(8): 745-756.
66. Herrick, J.R., J.B. Bond, G.M. Magarey, H.L. Bateman, R.L. Krisher, S.A. Dunford, and W.F. Swanson. 2007. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of *in vitro* fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown *in vivo*. *Biol. Reprod.* 76(5): 858-870.
67. Herrick, J.R., F. Mehrdadfar, M. Campbell, G. Levens, K. Leiske and W.F. Swanson. 2010. Birth of sand cat (*Felis margarita*) kittens following *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Biol. Reprod.* 83: 28 (abst).
68. Hiendleder, S., S.M. Schmutz, G. Erhardt, R.D. Green and Y. Plante. 1999. Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 54(1): 24-31.
69. Hiendleder, S. and E. Wolf. 2003. The mitochondrial genome in embryo technologies. *Reprod. Dom. Anim.* 38(4): 290-304.
70. Hillier, S. G. 1994. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 9(2), 188-191.
71. Hoffert, K.A., G.B. Anderson, D.E. Wildt and T.L. Roth. 1997. Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 48(2): 208-215.
72. Hribal, R., B.C. Braun, J. Ringleb and K. Jewgenow. 2012a. Capabilities and challenges of examination of gene expression for quality assessment of domestic cat embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 47(Suppl. 6): 147-151.
73. Hribal, R., K. Jewgenow, B.C. Braun and P. Comizzoli. 2012b. Influence of culture medium composition on relative mRNA abundances in domestic cat embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 48(2): 245-251.

74. Hua, S., Y. Zhang, K. Song, J. Song, Z. Zhang, L. Zhang, C. Zhang, J. Cao and L. Ma. 2008. Development of bovine–ovine interspecies cloned embryos and mitochondria segregation in blastomeres during preimplantation. *Anim. Reprod. Sci.* 105(3-4): 245-257.
75. Hussein, T.S., J.G. Thompson and R.B. Gilchrist. 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.* 296(2): 514-521.
76. Hwang, I., Y.W. Jeong, J.J. Kim, H.J. Lee, M. Kang, K.B. Park, J.H. Park, Y.W. Kim, W.T. Kim, T. Shin, S.H. Hyun, E.-B. Jeung and S.H. Hyun. 2013. Successful cloning of coyotes through interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic dog oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 25(8): 1142-1148.
77. Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, M. Ketudat-Cairns and R. Parnpai. 2010. Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 22(4): 613-624.
78. Iriarte, A. 2008. *Mamíferos de Chile*. Lynx Edicions. Barcelona, España.
79. IUCN (UK). 2014. The IUCN red list of threatened species [en línea]. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, UK. <www.iucnredlist.org/search>. [Consulta: 28 febrero 2015].
80. Jaffe, L.A., R.P. Norris. 2010. Initiation of the meiotic prophase-to-metaphase transition in mammalian oocytes. pp: 181–198. In: M.-H. Verlhac and A. Villeneuve (Eds.). *Oogenesis: the universal process*. Wiley-Blackwell. Jhon Wiley & Sons. Chichester, UK.
81. Jedrusik, A., A. Cox, K.B. Wicher, D.M. Glover and M. Zernicka-Goetz. 2015. Maternal-zygotic knockout reveals a critical role of Cdx2 in the morula to blastocyst transition. *Dev. Biol.* 398(2): 147-152.
82. Jin, H. F., B.M. Kumar, J.G. Kim, H.J. Song, Y.J. Jeong, S.K. Cho, S. Balasubramanian, S.Y. Choe and G.J. Rho. 2003. Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 51(1): 85-90.
83. Johnston, L.A., S.J. O'brien and D.E. Wildt. 1989. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Res.* 24(3): 343-356.

84. Johnston, L.A., A.M. Donoghue, S.J. O'Brien and D.E. Wildt. 1991. Rescue and maturation *in vitro* of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. Biol. Reprod. 45(6): 898-906.
85. Johnston, L.A., A.M. Donoghue, S.J. O'Brien and D.E. Wildt. 1993. Influence of culture medium and protein supplementation on *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the domestic cat. Theriogenology 40(4): 829-839.
86. Kang, Y.K., D.B. Koo, J.S. Park, Y.H. Choi, A.S. Chung, K.K. Lee and Y.M. Han. 2001. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. Nat. Genet. 28(2): 173-177.
87. Karja, N.W.K., T. Otoi, M. Murakami, M. Fahrudin and T. Suzuki. 2002a. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. Theriogenology 57(9): 2289-2298.
88. Karja NW, T. Otoi, M. Murakami, M. Yuge, M. Fahrudin, T. Suzuki. 2002b. Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos. Reprod Fertil Dev. 14: 291-296
89. Kańska-Książkiewicz, L., B. Ryńska, G. Kania, Z. Smoraż, B. Gajda and M. Pieńkowski. 2003. Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. Theriogenology 59(7): 1567-1574.
90. Kharche, S.D., H.S. Birade. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for *in vitro* embryo production: a review. Adv. Biosci. Biotechnol. 4(2): 170-182.
91. Katz-Jaffe, M.G., B.R. McCallie, K.A. Preis, J. Filipovits, and D.K. Gardner. 2009. Transcriptome analysis of *in vivo* and *in vitro* matured bovine MII oocytes. Theriogenology, 71(6): 939-946.
92. Kawashima, I., T. Okazaki, N. Noma, M. Nishibori, Y. Yamashita and M. Shimada. 2008. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. Reproduction. 136(1), 9-21.
93. Kishigami, S., E. Mizutani, H. Ohta, T. Hikichi, N. Van Thuan, S. Wakayama, H. Bui. and T. Wakayama. 2006. Significant improvement of mouse cloning technique

- by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340(1): 183-189.
94. Koo, O.J., M.S. Hossein, S.G. Hong, J.A. Martinez-Conejero and B.C. Lee. 2009. Cell cycle synchronization of canine ear fibroblasts for somatic cell nuclear transfer. *Zygote* 17(1): 37-43.
 95. Kölle, S., M. Stojkovic, G. Boie, E. Wolf and F. Sinowatz. 2002. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 61(2): 180-186.
 96. Kues, W.A., M. Anger, J.W. Carnwath, D. Paul, J. Motlik and H. Niemann. 2000. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol. Reprod.* 62(2): 412-419.
 97. Kuroda, T., M. Tada, H. Kubota, H. Kimura, S.Y. Hatano, H. Suemori, N. Nakatsuji and T. Tada. 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional *cis* regulation of *Nanog* gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25(6): 2475-2485.
 98. Lagutina, I., G. Lazzari and C. Galli. 2006. Birth of cloned pigs from zona-free nuclear transfer blastocysts developed *in vitro* before transfer. *Cloning Stem Cells.* 8(4): 283-293.
 99. Lagutina, I., H. Fulka, T. A. Brevini, S. Antonini, D. Brunetti, S. Colleoni, F. Gandolfi, G. Lazzari, J. Fulka Jr. and C. Galli. 2010. Development, embryonic genome activity and mitochondrial characteristics of bovine–pig inter-family nuclear transfer embryos. *Reproduction* 140(2): 273-285.
 100. Lane, M. and D. K. Gardner. 1998. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum. Reprod.* 13(4): 991-997.
 101. Lanza, R.P., J.B. Cibelli, F. Diaz, C.T. Moraes, P.W. Farin, C.E. Farin, C.J. Hammer, M.D. West, P. Damiani. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2(2): 79-90.
 102. Latham, K.E., R.M. Schultz. 2001. Embryonic genome activation. *Front. Biosci.* 6: d748-d759.
 103. Leroy, J.L.M.R., G. Opsomer, A. Van Soom, I.G.F. Goovaerts and P.E.J. Bols. 2008. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I the importance of negative energy balance and altered corpus

- luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43(5): 612-622.
104. Li, J., O. Svarcova, K. Villemoes, P.M. Kragh, M. Schmidt, I.B. Bøgh, Y. Zhang, Y. Du, L. Lin, S. Purup, Q. Xue, L. Bolund, H. Yang, P. Maddox-Hyttel and G. Vajta. 2008. High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*. 70(5): 800-808.
105. Lindeberg, M., K. Carlström, O. Ritvos and O. Hovatta. 2006. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum. Reprod.* 22(2): 401-406.
106. Loi, P., G. Ptak, B. Barboni, J. Fulka, P. Cappai and M. Clinton. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19(10): 962-964.
107. Loi, P., J.A. Modlinski and G. Ptak. 2011. Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. *Theriogenology* 76(2): 217-228.
108. Lyons, L.A., M.M. Raymond and S.J. O'Brien. 1994. Comparative genomics: the next generation. *Anim. Biotechnol.* 5(2): 103-111.
109. Ma, H., N.M. Gutierrez, R. Morey, C. Van Dyken, E. Kang, T. Hayama, Y. Lee, Y. Li, R. Tippner-Hedges, D.P. Wolf, L.C. Laurent, S. Mitalipov. 2016. Incompatibility between nuclear and mitochondrial genomes contributes to an interspecies reproductive barrier. *Cell Metab*, 24(2): 283-294.
110. Mansour, R. T., C. A. Rhodes, M. A. Aboulghar, G. I. Serour and A. Kamal. 2000. Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Hum. Reprod.* 15(5): 1061-1064.
111. Marikawa, Y., T.C. Fujita and V.B. Alarcón. 2005. Heterogeneous DNA methylation status of the regulatory element of the mouse Oct4 gene in adult somatic cell population. *Cloning Stem Cells* 7(1): 8-16.
112. Mastromonaco, G.F., L.A. Favetta, L.C. Smith, F. Fillion and W.A. King. 2007. The influence of nuclear content on developmental competence of gaurx cattle hybrid in vitro fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.* 76(3): 514-523.

113. Matoba, S., H. Wang, L. Jiang, F. Lu, K.A. Iwabuchi, X. Wu, K. Innou, L. Yang, W. Press, J.T. Lee, A. Ogura, L. Shen and Y. Zhang. 2018. Loss of H3K27me3 imprinting in somatic cell nuclear transfer embryos disrupts post-implantation development. *Cell stem cell*. 23 (3): 343-354.
114. Mattioli, M., G. Galeati, B. Barboni and E. Seren. 1994. Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 100(2), 403-409.
115. Merlo, B., E. Iacono, D. Zambelli, F. Prati and S. Belluzzi. 2005. Effect of EGF on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology*. 63(7): 2032-2039.
116. Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda and S. Yamanaka. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5): 631-642.
117. Mitalipov, S.M., R.R. Yeoman, K.D. Nusser and D.P. Wolf. 2002. Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. *Biol. Reprod.* 66(5): 1367-1373.
118. Moro, L.N., M.I. Hiriart, C. Buemo, J. Jarazo, A. Sestelo, D. Veraguas, L. Rodriguez-Alvarez, D.F. Salamone. 2015a. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves *in vitro* development but not pluripotent gene expression. *Reproduction* 150(1): 1-10.
119. Moro, L.N., J. Jarazo, C. Buemo, M.I. Hiriart, A. Sestelo and D.F. Salamone. 2015b. Tiger, Bengal and Domestic Cat Embryos Produced by Homospecific and Interspecific Zona-Free Nuclear Transfer. *Reprod. Dom. Anim.* 50(5): 849-857.
120. Naito, K., Y. Toyoda and R. Yanagimachi. 1992. Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zonae pellucidae. *Hum. Reprod.* 7(2): 281-285.
121. Naoi, H., B. Agung, N.W.K. Karja, P. Wongsrikeao, R. Shimizu, M. Taniguchi and T. Otoi. 2008. Effects of the reproductive status on morphological oocyte quality and developmental competence of oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer in cat. *Reprod. Domest. Anim.* 43(2): 157-161.
122. Napolitano, C., W.E. Johnson, J. Sanderson, S.J. O'Brien, A.R. Hoelzel, R. Freer, N. Dunstone, K. Ritland, C.E. Ritland and E. Poulin. 2014. Phylogeography and

- population history of *Leopardus guigna*, the smallest American felid. *Conservation genetics*, 15(3): 631-653.
123. Napolitano, C., N. Gálvez, N. Bennett, G. Acosta-Jamett and J. Sanderson. 2015. *Leopardus guigna*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T15311A50657245.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T15311A50657245.en>. Downloaded on 20 December 2015.
124. Narbonne, P., K. Miyamoto and J.B. Gurdon. 2012. Reprogramming and development in nuclear transfer embryos and in interspecific systems. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22(5): 450-458.
125. Nagano, M., K. Uchikura, Y. Takahashi and M. Hishinuma. 2008. Effect of duration of *in vitro* maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. *Theriogenology* 69(2): 231-236.
126. Navarro, P., N. Festuccia, D. Colby, A. Gagliardi, N.P. Mullin, W. Zhang, V. Karwacki-Neisius, R. Osorno, D. Kelly, M. Robertson and I. Chambers. 2012. OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J.* 31(24): 4547-4562.
127. Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schölers and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95(3): 379-391.
128. Niwa, H., J.I. Miyazaki and A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24(4): 372-376.
129. Nowell, K. and P. Jackson. 1996. Wild cats. Status survey and conservation plan. Gland, Switzerland: IUCN.
130. Oh, H.J., S.G. Hong, J.E. Park, J.T. Kang, M.J. Kim, M.K. Kim, S.K. Kang, D.Y. Kim, G. Janga and B.C. Lee. 2009. Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts. *Theriogenology* 72(4): 461-470.
131. Okumura-Nakanishi, S., M. Saito, H. Niwa and F. Ishikawa. 2005. Oct-3/4 and Sox2 regulate *Oct-3/4* gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280(7): 5307-5317.

132. Olivera, R., L.N. Moro, R. Jordan, N. Pallarols, A. Guglielminetti, C. Luzzani, S.G. Miriuka and G. Vichera. 2018. Bone marrow mesenchymal stem cells as nuclear donors improve viability and health of cloned horses. *Stem Cells Cloning*. 11: 13-22
133. Oltval, Z. N., C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4): 609-619.
134. Oswald, J., S. Engemann, N. Lane, W. Mayer, A. Olek, R. Fundele, W. Dean, W. Reik and J. Walter. 2000. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol*. 10(8): 475-478.
135. Park, K. W., Lai, L., Cheong, H. T., Cabot, R., Sun, Q. Y., Wu, G. *et al* (2002). Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol. Reprod*. 66(4): 1001-1005.
136. Pakarainen, T., F. P. Zhang, L. Nurmi, M. Poutanen and I. Huhtaniemi. 2005. Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles. *Mol. Endocrinol*. 19(10): 2591-2602.
137. Parrish, J.J. and Foote, R. H. 1987. Quantification of bovine sperm separation by a Swim-up method relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J. Androl*. 8: 259-266.
138. Peacon Slattery, J., W.E. Johnson, D. Goldman and S.J. O'Brien. 1994. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. *J. Mol. Evol*. 39(3): 296-305.
139. Pelican, K. M., D. E. Wildt, B. Pukazhenthil and J. Howard. 2006. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology*. 66, 37–48.
140. Pennetier, S., S. Uzbekova, C. Perreau, P. Papillier, P. Mermillod and R. Dalbiès-Tran. 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes *MATER*, *ZAR1*, *GDF9*, *BMP15*, and *VASA* in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biol. Reprod*. 71(4): 1359-1366.
141. Pope, C.E., G.L. Keller, B.L. Dresser. 1993. *In vitro* fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development *in vitro*,

- cryopreservation and successful intra-and interspecies embryo transfer. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 189-201.
142. Pope, C.E., C.A. Johnson, M.A. McRae, G.L. Keller and B.L. Dresser. 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. Anim. Reprod. Sci. 53(1-4): 221-236.
143. Pope, C.E., R. Schmid and B.L. Dresser. 1999. In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O₂ atmosphere. Theriogenology 51(1): 291.
144. Pope, C.E. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. Theriogenology 53(1): 163-174.
145. Pope, C.E., M.C. Gómez, S.K. Mikota and B.L. Dresser. 2000. Development of *in vitro* produced African wildcat (*Felis silvestris*) embryos after cryopreservation and transfer into domestic cat recipients. Biol. Reprod. 62 (Suppl.1):321(abst.).
146. Pope, C.E. 2004. *In vitro* fertilization and embryo transfer in felids. pp: 227-244 In: H. Schatten (Ed.). Methods in molecular biology. Vol. 254: germ cell protocols. Vol. 2: molecular embryo analysis, live imaging, transgenesis and cloning. The Humana Press. Totowa, USA.
147. Pope, C.E., M.C. Gómez, A. Cole, C. Dumas and B.L. Dresser. 2005. Oocyte recovery, *in vitro* fertilization and embryo transfer in the serval (*Leptailurus serval*). Reprod. Fertil. Dev. 18(2): 223-223 (abst).
148. Pope, C.E., M.C. Gómez and B.L. Dresser. 2006a. *In vitro* production and transfer of cat embryos in the 21st century. Theriogenology 66(1): 59-71.
149. Pope, C.E., M.C. Gómez and B.L. Dresser. 2006b. *In vitro* embryo production and embryo transfer in domestic and non-domestic cats. Theriogenology 66(6): 1518-1524.
150. Pope, C.E., M.C. Gómez, J. Galiguis and B.L. Dresser. 2012. Applying embryo cryopreservation technologies to the production of domestic and black-footed cats. Reprod. Dom. Anim. 47(Suppl. 6): 125-129.
151. Pope, C.E. 2014. Aspects of *in vivo* oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. Theriogenology 81(1): 126-137.
152. Quinn, P. and R. G. Wales. 1971. Adenosine triphosphate content of preimplantation mouse embryos. J. Reprod. Fertil. 25(1): 133-135.

153. Quinn, P. and R.G. Wales. 1973. The relationships between the ATP content of preimplantation mouse embryos and their development *in vitro* during culture. *J. Reprod. Fertil.* 35(2): 301-309.
154. Redford, K.H. and J.F. Eisenberg. 1992. *Mammals of the Neotropics. Volume 2, The southern cone: Chile, Argentina, Uruguay, and Paraguay.* University of Chicago Press, Chicago.
155. Reik, W., W. Dean and J. Walter. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293(5532): 1089-1093.
156. Reik, W. 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447(7143): 425-432.
157. Rinaudo, P. and R. M. Schultz. 2004. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction* 128(3): 301-311.
158. Rodríguez-Alvarez, L., J. Manriquez, A. Velasquez and F.O. Castro. 2013. Constitutive expression of the embryonic stem cell marker OCT4 in bovine somatic donor cells influences blastocysts rate and quality after nucleus transfer. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 49(9): 657-667.
159. Roth, T.L., W.F. Swanson and D.E. Wildt. 1994. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*. *Biol. Reprod.* 51(3): 441-451.
160. Sananmuang, T., T. Tharasanit, C. Nguyen, N. Phutikanit and M. Techakumphu. 2011. Culture medium and embryo density influence on developmental competence and gene expression of cat embryos. *Theriogenology* 75(9): 1708-1719.
161. Sánchez, A.E., M.E. Silva. 2003. Evaluación de respuesta ovárica y calidad de ovocitos en gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH) utilizando dos esquemas de administración. *Arch. Med. Vet.* 35(1): 119-126.
162. Sánchez, A., L. López, M. Silva y M. Berland. 2006. Maduración *in vitro* de ovocitos de gatas tratadas con hormona folículo estimulante (FSH). *Revista Científica FCV-LUZ* 16(2): 124-128.

163. Shi, W., F. Dirim, E. Wolf, V. Zakhartchenko and T. Haaf. 2004. Methylation reprogramming and chromosomal aneuploidy in *in vivo* fertilized and cloned rabbit preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* 71(1): 340-347.
164. Shille, V.M., K.E. Lundström and G.H. Stabenfeldt. 1979. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 β concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol. Reprod.* 21(4): 953-963.
165. Shimada, M., M. Nishibori, N. Isobe, N. Kawano, T. Terada. 2003. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 68(4), 1142-1149.
166. Shin, T., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons and M. Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415(6874): 859.
167. Simonsson, S. and J. Gurdon. 2004. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.* 6(10): 984-990.
168. Sirard, M. A., S. Desrosier and M. Assidi. 2007. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*, 68, S71-S76.
169. Slattery, J.P., W.E. Johnson, D. Goldman and S.J. O'Brien. 1994. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. *J. Mol. Evol.* 39(3): 296-305.
170. Song, B.-S., S.-H. Lee, S.-U. Kim, J.S. Kim, J.-S. Park, C.-H. Kim, K.-T. Chang, Y.-M. Han, K.-K. Lee, D.-S. Lee, D.-B. Koo. 2009. Nucleogenesis and embryonic genome activation are defective in interspecies cloned embryos between bovine ooplasm and rhesus monkey somatic cells. *BMC Dev. Biol.* 9(1): 44.
171. Spindler, R.E., D.E. Wildt. 1999. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 61(1): 188-194.
172. Stewart, F., W. R. Allen and R. Moor. 1976. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J. Endocrinol.* 71(3), 371-382.
173. Stojkovic, M., S.A. Machado, P. Stojkovic, V. Zakhartchenko, P. Hutzler, P.B. Gonçalves and E. Wolf. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation:

- correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64(3): 904-909.
174. Strumpf, D., C.-A. Mao, Y. Yamanaka, A. Ralston, K. Chawengsaksophak, F. Beck and J. Rossant. 2005. *Cdx2* is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132(9): 2093-2102.
175. Swanson, W.F., T.L. Roth and D.E. Wildt. 1994. *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 51(3): 452-464.
176. Swanson, W. F., B. A. Wolfe, J. L. Brown, T. Martin-Jimenez, J. E. Riviere, T. L. Roth and D. E. Wildt. 1997. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 57(2), 295-302.
177. Thompson, J. G., D. K. Gardner, P. A. Pugh, W. H. McMillan and H. R. Tervit. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol. Reprod.* 53(6): 1385-1391.
178. Thongphakdee, A., P. Numchaisrika, S. Omsongkram, K. Chatdarong, S. Kamolnorranath, S. Dumnuai and M. Techakumphu. 2006. In vitro development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Dom. Anim.* 41(3): 219-226.
179. Thongphakdee, A., B. Siriaroonrat, S. Manee-in, N. Klincumhom, S. Kamolnorranath, K. Chatdarong and M. Techakumphu. 2010. Intergeneric somatic cell nucleus transfer in marbled cat and flat-headed cat. *Theriogenology* 73: 120-128.
180. Tovar, H., F. Navarrete, L. Rodríguez, O. Skewes and F.O. Castro. 2008. Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean species in field conditions and subsequent isolation of primary culture cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 44(8-9): 309-320.
181. Tsutsui T., Y. Sakai, Y. Matsui, M. Sato, I. Yamane, I. Murao, *et al.* 1989 Induced ovulation in cats using porcine pituitary gland preparation during the non-breeding season. *Jpn J Vet Sci.* 51:677-83.
182. Tsutsui, T., G.H. Stabenfeldt. 1993. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 29-35.

183. Vajta, G., P. Bartels, J. Joubert, M. de la Rey, R. Treadwell and H. Callesen. 2004. Production of a healthy calf by somatic cell nuclear transfer without micromanipulators and carbon dioxide incubators using the Handmade Cloning (HMC) and the Submarine Incubation System (SIS). *Theriogenology*. 62(8): 1465-1472.
184. Vajta, G., M. Gjerris. 2006. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim. Reprod. Sci.* 92(3-4): 211-230.
185. Van Blerkom, J., P.W. Davis and J. Lee. 1995. Fertilization and early embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum. Reprod.* 10(2): 415-424.
186. Verstegen, J. P., K. Onclin, L. D. Silva, I. Donnay, P. Mettens and F. Ectors. 1993. Superovulation and embryo culture in vitro following treatment with ultra-pure follicle-stimulating hormone in cats. *J. Reprod. Fertil. Supplement*, 47, 209-218.
187. Verstegen, J.P. 1998. Physiology and endocrinology of reproduction in female cats. pp: 11-16. In: G.M. Simpson (Ed.). *Manual of small animal reproduction and neonatology*. British Small Animal Veterinary Association. Gloucester, UK.
188. Vogel, G. 2001. Cloned gaur a short-lived success. *Science*. 291 (5503): 409.
189. Wakayama, T., A.C. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson and R. Yanagimachi. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394(6691): 369-374.
190. Wang, C., Swanson, W. F., Herrick, J. R., Lee, K., & Machaty, Z. (2009). Analysis of cat oocyte activation methods for the generation of feline disease models by nuclear transfer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7(1): 148.
191. Waurich, R., J. Ringleb, B.C. Braun and K. Jewgenow. 2010. Embryonic gene activation in *in vitro* produced embryos of the domestic cat (*Felis catus*). *Reproduction* 140(4): 531-540.
192. Wells, D.N., P.M. Misica and H.R. Tervit. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 60(4): 996-1005.
193. Wen, D., L.A. Banaszynski, Z. Rosenwaks, C.D. Allis and S. Rafii. 2014. H3. 3 replacement facilitates epigenetic reprogramming of donor nuclei in somatic cell nuclear transfer embryos. *Nucleus*. 5(5): 369-375.

194. Wildt, D.E. 1992. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim. Reprod. Sci.* 28(1-4): 247-257.
195. Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H.S Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells* 9(1): 3-7.
196. Wittayarat, M., A. Thongphakdee, K. Saikhun, K. Chatdarong, T. Otoi and m. Techakumphu. 2013a. Cell cycle synchronization of skin fibroblast cells in four species of family felidae. *Reprod. Dom. Anim.* 48(2): 305-310.
197. Wittayarat, M., Y. Sato, L. T. K. Do, Y. Morita, K. Chatdarong, M. Techakumphu, M. Taniguchi, T. Otoi. 2013b. Histone deacetylase inhibitor improves the development and acetylation levels of cat–cow interspecies cloned embryos. *Cell. Reprogram.* 15(4): 301-308.
198. Wolfe, B.A., D.E. Wildt. 1996. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. *J. Reprod. Fertil.* 106(1): 135-141.
199. Wood, T.C., D.E. Wildt. 1997. Effect of the quality of the cumulus–oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 110(2): 355-360.
200. Wrenzycki, C., D. Herrmann, C. Gebert, J.W. Carnwath, and H. Niemann. 2006. Gene expression and methylation patterns in cloned embryos. In *Nuclear Transfer Protocols* (pp. 285-303). Humana Press.
201. Xu, Y., J.J. Zhang, J.A. Grifo and L.C. Krey. 2005. DNA methylation patterns in human tripronucleate zygotes. *Mol. Hum. Reprod.* 11(3): 167-171.
202. Yamazaki, Y., T.C. Fujita, E.W. Low, V.B. Alarcón, R. Yanagimachi and Y. Marikawa. 2006. Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 73(2): 180-188.
203. Yang, J., S. Yang, N. Beaujean, Y. Niu, X. He, Y. Xie, X. Tang, L. Wang, Q. Zhou and W. Ji. 2007. Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced *in vitro*. *Biol. Reprod.* 76(1): 36-42.

204. Yang, M. Y. and R. Rajamahendran. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 70: 159–169.
205. Yin, X.J., H.S. Lee, Y.H. Lee, Y.I. Seo, S.J. Jeon, E.G. Choi, S.J. Cho, S.G. Cho, W. Min, S.K. Kang, W.S. Hwang and I.K. Kong. 2005. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* 129(2): 245-249.
206. Yin, X.J., H.S. Lee, X.F. Yu, E. Choi, B.C. Koo, M.S. Kwon, L.H. Kim, and I.K. Kong. 2008. Generation of cloned transgenic cats expressing red fluorescence protein. *Biol. Reprod.* 78(3): 425-431.
207. Yu, Y., Q. Mai, X. Chen, L. Wang, L. Gao, C. Zhou and Q. Zhou. 2009. Assessment of the developmental competence of human somatic cell nuclear transfer embryos by oocyte morphology classification. *Hum. Reprod.* 24(3): 649-657.
208. Yu, X.F., S.J. Cho, J.I. Bang, H.S. Lee, Y.S. Lee, T.H. Kwon, G.K. Deb and I.K. Kong. 2010. Effect of equine chorionic gonadotropin on the efficiency of superovulation induction for *in vivo* and *in vitro* embryo production in the cat. *Theriogenology* 73(4): 413-420.
209. Zaitseva, I., S. Zaitsev, N. Alenina, M. Bader and A. Krivokharchenko. 2007. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 74(10): 1255-1261.
210. Zinkel, S., A. Gross and E. Yang. 2006. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell. Death. Differ.* 13(8): 1351-1359.
211. Zuccotti, M., S. Garagna and C.A. Redi. 2000. Nuclear transfer, genome reprogramming and novel opportunities in cell therapy. *J. Endocrinol. Invest.* 23(9): 623-629.