

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



Generación de embriones bovinos por transferencia nuclear somática:
Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vivo* e *in vitro* y de la
expresión génica en las etapas pre y peri-implantatorias

Presentado por
Lleretny Rodríguez Alvarez

Chillán-Chile

2009

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Esta tesis ha sido desarrollada en el departamento de Ciencias Pecuarias de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción y en el Instituto de Bioquímica Veterinaria de la Universidad Libre de Berlín.

Fidel O. Castro Reboredo
Ing. Zootecnista; PhD

Profesor Guía

José F. Cox Ureta
D.V.M; PhD

Profesor Asesor

Pedro P. Rojas García
M.V.D; PhD

Profesor Asesor

Mónica de los Reyes Solovera
D.V.M; MSc

Profesor Asesor

Manuel Quezada Orellana
M.V.D; PhD

Director Programa de Doctorado





A mi mamá, Nora

A mi esposo, Fide

A Victoria

*“Las Ciencias tienen las raíces amargas,
pero muy dulces los frutos”*



Aristóteles

AGRADECIMIENTOS

El autor quiere agradecer al Dr. Fidel Ovidio Castro quien ha sido un guía excepcional en todo mi andar por la ciencia, quien nunca puso límites a mi imaginación pero supo frenar a tiempo los impulsos irracionales. Le doy las gracias porque como profesor le debo todo lo que he aprendido y en particular por el desarrollo y culminación de este trabajo. Le doy las gracias porque como esposo ha sido el soporte de mi mundo, cuando siento que todo se derrumba, cuando ya no veo la solución, él ha sabido mantenerme en pie. Gracias por ser mi orgullo, mi amigo, mi familia, mi esposo, mi todo.

Se agradece al Dr. Gabor Vajta por la ayuda brindada en la implementación de la técnica de HMC, a él gracias por compartir desinteresadamente la experiencia acumulada durante años de trabajo, gracias por tu gran aporte en la realización de este trabajo y por tu amistad.

El autor agradece toda la ayuda brindada por el Dr. José Cox, por recibirme en su laboratorio y mirar siempre con una sonrisa cómo me apoderaba de todo. Le agradezco por el trabajo directo en la transferencia y recuperación de los embriones y principalmente por su gran aporte para lograr el nacimiento de Victoria, por involucrarse en todo, sin importar cuanto yo gritara y me enfadara. Se agradece el apoyo incondicional de Felipe Navarrete, Cristian Valdés, Teresa Zamorano, Cristina Godoy, Nelson Vera, Heribelt Tovar y Ariana Bertín por todo el apoyo en el trabajo con los embriones, con la preparación de las hembras receptoras pero especialmente por su amistad incondicional y la dedicación con la que cuidaron a Victoria a pesar de las inclemencias del tiempo y el agotamiento físico, por estar a mi lado en los momentos buenos y también en los más difíciles. Gracias a José Garcé por toda su ayuda.

Se agradece de una forma muy especial a la clínica de la facultad de Ciencia Veterinarias de la Universidad de Concepción y en particular al Dr. Ignacio Cabezas, Florence Hughes, Oscar Aburto, Jaime Cruces, Álvaro Palma, Milenko, Miguel, Reinaldo y a todos aquellos estudiantes y profesionales que de alguna forma hicieron posible el nacimiento de los clones y la sobrevivencia de Victoria. A ellos por la amistad que ha perdurado y que ha ayudado a que algunas cosas sean diferentes. A Oscar Skewes por su aporte con animales y a Patricio Bustamante por el suministro de ovarios y su ayuda, independientemente de la hora y el día.

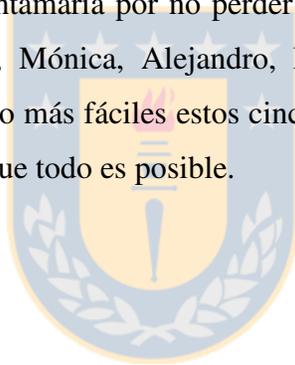
El autor agradece la colaboración y apoyo del Dr. Ralf Einspanier sin el cual no hubiera sido posible desarrollar el análisis de expresión génica. A Soroush Sharbati y Jutta Scholven por la

supervisión de los experimentos de expresión génica, por su amistad e incondicional apoyo que hicieron más llevaderos los meses que pasé lejos de mi hogar, cuando el frío hacía vacilar ante el deseo de continuar. Agradezco a todos los colegas del Instituto de Bioquímica de la Universidad Libre de Berlín por toda la ayuda que de alguna forma, permitió el desarrollo de este trabajo.

A mi familia, mi mamá, mi papá y mi hermano, quienes siempre me han empujado a buscar algo más, quienes, sin importar el tiempo, la distancia, los obstáculos, han encontrado la forma de seguir juntos, compartiendo cada minuto de esta pequeña historia. A mi sobrina, porque me ha enseñado que para querer no hace falta un motivo. A mi abuela que siempre vio lo mejor de mí, porque me quiso tanto que para ella siempre fui única, porque ese amor me hizo fuerte y me enseñó a creer en las cosas maravillosas de la vida, a ella porque desde ese lugar donde descansa aún vela mi sueño para espantar las pesadillas.

Al departamento de Ciencias Pecuarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias por ser mi hogar durante estos años. A Alejandro Santamaría por no perder la paciencia y ayudarme siempre. A todas las personas, amigos, Pedro, Mónica, Alejandro, Pepe, Valeria, Pame, Leonardo, mi pequeña Nandi que han hecho mucho más fáciles estos cinco años lejos de mi familia, mi casa y a través de los cuales he aprendido que todo es posible.

A Victoria por ser única...



Esta tesis fue financiada por:

- Proyecto FIA (FIA-PI-C-2005-1-P-097)

"Conservación de genofondos de especies animales silvestres nativas y endémicas en peligro de extinción"

- Proyecto DAAD (DAAD Ei296/12-2)

"Estudio del estatus de metilación y expresión de Oct4 y otros genes importantes durante el desarrollo pre y peri-implantarios de embriones bovinos producidos por HMC"

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
Aspectos generales sobre transferencia nuclear somática	4
Aplicaciones de la transferencia nuclear somática	5
Aplicaciones biomédicas	6
Aplicaciones agropecuarias	9
Rescate de animales en peligro de extinción	11
Limitaciones de la Transferencia Nuclear Somática	13
Factores que afectan la eficiencia de la TNS	14
Influencia de la célula donante	14
Sincronía entre el citoplasto receptor y el núcleo donante	18
Influencia de la calidad de los ovocitos receptores sobre el desarrollo embrionario temprano	20
Influencia del método de transferencia nuclear sobre el desarrollo embrionario	22
Desarrollo temprano de embriones bovinos	28
Expresión génica durante los periodos pre y peri-implantatorios	29
Expresión génica en embriones clonados	32
Herramientas moleculares para la evaluación de la expresión génica en embriones	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
Esquema general de trabajo	42
Descripción de materiales y métodos	43
1. Aislamiento de líneas celulares para transferencia nuclear somática	43
1.1. Células fetales	43
1.2. Células adultas	43
2. Estandarización de protocolos de transferencia nuclear por Hand Made Cloning (HMC) para cada línea celular	45

2.1. HMC	45
Transferencia nuclear, fusión y cultivo	46
3. Generación de embriones pre-implantatorios (blastocistos <i>in vitro</i>)	47
4. Evaluación del desarrollo <i>in vitro</i> de embriones clonados producidos por dos líneas celulares diferentes (fetales y adultas)	49
5. Transferencia de embriones en estadio de blastocisto a receptoras sincronizadas	50
6. Recuperación y evaluación de embriones clonados y generados por FIV en estadio peri-implantatorio (elongados)	51
7. Evaluación molecular de calidad de embriones clonados en estadio pre y peri-implantatorio	51
7.1. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos	51
Extracción de ARN	51
Transcripción inversa	52
7.2. Estudio cualitativo por PCR de genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano	53
Secuenciación del producto del gen OCT4	54
7.3. Estudio cuantitativo por qPCR de genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano	55
7.4. Estudio de la expresión génica por microarreglo en embriones peri-implantatorios clonados y producidos por FIV	56
7.5. Validación por qPCR de los niveles de expresión de genes diferencialmente expresados en las muestras experimentales (clones) y los controles (FIV)	57
8. Evaluación del desarrollo post-implantatorio de embriones clonados	58
Análisis Estadístico	59
RESULTADOS	61
1. Comparación de la capacidad de diferentes líneas celulares de generar embriones clonados producidos por HMC	61
2. Evaluación de la capacidad de desarrollo de los embriones clonados en estadio pre, peri y post-implantatorio	61
2.1. Evaluación del desarrollo pre-implantatorio de embriones clonados producidos con dos líneas celulares diferentes	63
Evaluación morfológica	63
Expresión génica durante el periodo pre-implantatorio	64
2.2. Evaluación del desarrollo peri-implantatorio de embriones clonados	74
Evaluación morfológica	74
Expresión génica durante el periodo peri-implantatorio	77
2.3. Comparación de la expresión génica durante los periodos pre y peri-implantatorios	82
2.4. Análisis global de la expresión génica en embriones peri-implantatorios	84
2.5. Evaluación del desarrollo post-implantatorio de embriones clonados	90

DISCUSIÓN	91
Evaluación del desarrollo pre-implantatorio de embriones clonados	93
Evaluación morfológica	93
Evaluación de los patrones de expresión génica	94
Cuantificación de la expresión de genes cruciales para el desarrollo (etapa pre-implantatoria)	99
Evaluación del desarrollo peri-implantatorio de embriones clonados	103
Evaluación morfológica	103
Evaluación de los patrones de expresión génica	104
Cuantificación de la expresión de genes cruciales para el desarrollo (etapa peri-implantatoria)	106
Análisis global de la expresión génica en embriones peri-implantatorios	109
Consideraciones generales del desarrollo embrionario pre y peri-implantatorio	113
Desarrollo post-implantatorio de embriones clonados	113
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	118
ANEXOS	133



RESUMEN

La clonación somática es una poderosa herramienta para la producción de animales con un genotipo específico, ya sea para fines productivos a través de la multiplicación de ejemplares de alto valor genético, la creación de animales transgénicos o para la conservación de especies en peligro de extinción. En la última década esta tecnología se ha ido perfeccionando y hoy en día se ha logrado la obtención de clones en dieciséis especies de mamíferos. La aplicación de la transferencia nuclear es limitada debido a la ineficiencia del proceso en término de animales nacidos y al desconocimiento de la expresión génica que gobierna el proceso de clonación, por lo que es sujeto de estudio a nivel mundial.

En este trabajo se empleó una metodología novedosa de transferencia nuclear somática, conocida como Hand Made Cloning (HMC) para generar embriones bovinos clonados, usando dos líneas celulares distintas como donantes de núcleo, una de fibroblastos de piel de un animal adulto y la otra de un feto. Se evaluó el potencial de desarrollo de los embriones generados con ambas líneas, en términos de desarrollo *in vitro* hasta blastocistos, así como morfología y calidad. Se demostró que con la línea celular adulta es posible generar con mayor eficiencia y calidad embriones clonados en bovinos.

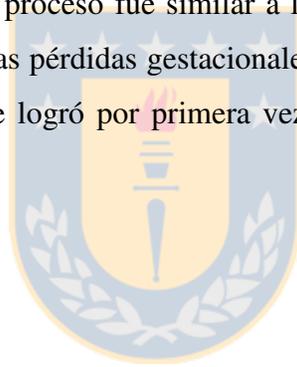
Para caracterizar la expresión génica en blastocistos (etapa peri-implantatoria) generados a partir de ambas líneas se empleó PCR tiempo final y real y se comparó ésta con los patrones de expresión de embriones producidos mediante fecundación *in vitro* (FIV). Se estudiaron los patrones de expresión de genes cruciales para el desarrollo embrionario, concluyendo que los mismos son diferentes entre las líneas celulares y entre éstas y los embriones de FIV. Los patrones de expresión génica de los embriones producidos con la línea celular adulta fueron más parecidos a los de los controles, por ello y por el mayor potencial de desarrollo hasta blastocistos de calidad, se seleccionó esta línea para la producción de embriones elongados (día 17) y de clones a términos.

Se transfirieron a hembras receptoras embriones clonados producidos a partir de la línea celular adulta, así como controles producidos por FIV y se recolectaron al día 17. A partir de estos embriones, se estudiaron los patrones de expresión génica por técnicas de PCR tanto a tiempo real como final de los embriones elongados (etapa peri-implantatoria) clonados y de FIV, siendo diferencial la expresión entre ambos y ésta a su vez diferente con respecto a los blastocistos de

día 7, tanto para FIV como para los clones. Estos hallazgos, así como la cuantificación de los niveles de expresión de algunos genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano, constituyen los primeros reportes de su tipo en la literatura del tema.

Adicionalmente se estudió a nivel global, la expresión génica en embriones clonados a partir de células adultas y producidos por FIV, mediante microarreglos, se encontraron más de mil genes expresados en ambos grupos y de éstos alrededor del 4% se encontró diferencialmente expresado (hiper o hipo expresión) en los embriones clonados. Los datos del microarreglo fueron validados por PCR cuantitativo (PCR tiempo real), lo cual a su vez ofreció resultados novedosos en el tema, al reportarse por primera vez los niveles de expresión de ciertos genes en embriones bovinos elongados.

Como elemento final, se transfirieron embriones clonados a hembras receptoras, lográndose gestación en la mitad de las hembras transferidas, lo que redundó en el nacimiento de dos terneras clonadas. La eficiencia del proceso fue similar a la descrita para la técnica de HMC y para la especie bovina. A pesar de las pérdidas gestacionales observadas, que también coinciden con lo reportado para la especie, se logró por primera vez en Chile el nacimiento de terneros clonados viables.



ABSTRACT

Somatic cell nuclear transfer, commonly known as cloning is a powerful tool for the production of identical animals for productive, biomedical or conservation purposes. In the past decade, the techniques involved in cloning evolved and improved and as today sixteen species of mammals has been cloned. Nevertheless, the efficiency of the process is still low in terms of newborn animals, the causes for such inefficiencies are mainly the lack of knowledge about biological and gene expression processes underlying this complex technology. Many research groups are devoted worldwide to unravel those processes.

In this thesis work, we used a novel technology for somatic cell nuclear transfer known as Hand Made Cloning (HMC) for the creation of bovine cloned embryos using two different fibroblast cell lines as donors of nuclei. The developmental potential of both cell lines (one adult and one foetal) was evaluated in terms of *in vitro* development until the blastocysts stage, as well as in general quality and morphological features. Using the adult fibroblast cell line, it was more efficient to generate cloned bovine blastocysts and their quality was higher.

In order to characterize the pattern of gene expression of blastocysts generated from both cell lines, we used a PCR approach (both final and real time) and compared it with that of embryos produced by *in vitro* fertilization (IVF). The pattern of expression of developmentally important embryonic genes was studied. We found that the pattern of gene expression varied among the two cell lines used and also with respect to IVF controls. The pattern of gene expression of the adult cell line resembled more closely that of the IVF embryos. For this reason and also because of the higher developmental potential *in vitro* up to blastocyst stage, we selected the adult fibroblast cell line for the generation of elongated embryos (day 17) and also of newborn clones upon embryo transfer.

Cloned and IVF embryos were non-surgically transferred to recipient cows and they were collected later at day 17 as elongated embryos. The same RT-PCR approach was conducted with the elongated embryos as described above and we found differential gene expression among cloned and IVF embryos. Also differential was the pattern of expression of developmentally important genes at day 7 (blastocysts) and day 17 (elongated). The findings of our work, as well as the quantification of the expression levels of the genes assayed are new in world literature.

In addition to RT-PCR a microarray approach was used to compare the gene expression profile among cloned and IVF embryos at the massive level. More than one thousand genes were found expressed in both cloned and IVF embryos; however, around 4% of those genes were differentially (up or down regulated) expressed in the cloned elongated embryos. Microarray data were also validated by a qPCR approach, as a result we reported and quantified for the first time, the expression of certain developmentally important genes in bovine embryonic development.

Finally, some cloned embryos were transferred to recipient cattle in order to generate living clones. Half of the recipients became pregnant and two live cloned calves were obtained. The overall efficiency of the cloning procedure was as high, in agreement with that previously described for HMC and for the bovine species. Despite the gestation losses that occurred, which were inside the reported range as in literature, we obtained for the first time in Chile living cloned calves.



LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Secuencia, Temperatura de annealing (Ta) de partidores utilizados para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo final o tiempo real. Tamaño del producto obtenido e identificador de secuencia para cada gen	54
2. Secuencia y Temperatura de annealing (Ta) de partidores de genes utilizados para la cuantificación de la expresión de los genes seleccionados para la validación de los datos del microarreglo. Tamaño del producto obtenido e identificador de cada gen incluido en el estudio	58
3. Media de embriones reconstruidos, fundidos y vivos después de la fusión. Promedio de la eficiencia de fusión y sobrevida de embriones reconstruidos con células somáticas, fetales y adultas	61
4. Desarrollo <i>in vitro</i> hasta estadio de blastocisto de embriones producidos por HMC a partir células somáticas fetales y adultas	62
5. Comparación de la calidad de los blastocistos producidos a partir de dos líneas celulares en términos morfológicos y cantidad de células totales	64
6. Detección de la expresión de genes importantes para el desarrollo temprano en embriones clonados a partir de dos líneas celulares y embriones de FIV	67
7. Resumen de la expresión génica determinada por PCR tiempo final en embriones producidos por transferencia nuclear con células fetales y adultas y embriones de FIV	67
8. Desarrollo <i>in vivo</i> hasta día 17 de blastocistos bovinos producidos por transferencia nuclear somática y por FIV	75
9. Detección de la expresión de genes importantes para el desarrollo durante el periodo peri-implantatorio de embriones clonados y producidos por FIV	78
10. Genes con diferencia de expresión superior a dos veces entre clones y embriones producidos por FIV	85
11. Resumen del desarrollo post-implantatorio de embriones clonados producidos con la línea celular adulta	90

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación esquemática del origen del mRNA en las diferentes etapas de desarrollo de embriones bovinos pre-implantatorios. Basado en: Heikinheimo et al., 1998	20
2. A. Esquema general de transferencia nuclear con micromanipuladores (sistema tradicional). B. Enucleación de ovocitos en MII	23
3. Esquema general de transferencia nuclear sin micromanipuladores o HMC	24
4. Visualización del plato metafásico en ovocitos bovinos maduros después de la incubación con demecolcina	26
5. Esquema general de uso de los blastocistos generados mediante FIV y transferencia nuclear utilizando células fetales (LCF) y células adultas (CWA)	49
6. Clasificación de blastocistos clonados según sus características morfológicas. A: Blastocistos clase I, B: Blastocistos clase II. La flecha cerrada indica el ICM, flecha abierta indica TB	64
7. Gel de agarosa (2%) y tinción con bromuro de etidio del producto de PCR de la expresión de los genes incluidos en este estudio en blastocistos clonados y producidos por FIV. MW=patrón de peso molecular, las bandas más intensas corresponden a 250 pb y 500 pb. C-: se refiere a la reacción para cada gen sustituyendo el templado por agua estéril. HMC-LCF (F, F6): blastocistos clonados producidos con LCF. HMC-CWA (W2, 5, 6 y 7): blastocistos clonados producidos con CWA. FIV (FIVblas): Blastocistos producidos por FIV. LCF: Línea celular fetal. CWA: Línea celular adulta. El gen en estudio se nombra en la columna extrema derecha	68
8. Cuantificación de la expresión génica en blastocistos (etapa pre-implantatoria) clonados producidos a partir de células fetales y adultas (HMC-LCF y HMC-CWA respectivamente) y blastocistos producidos por fecundación <i>in vitro</i> (FIVblas). a, b y c: letras diferentes dentro de un mismo gráfico significan diferencia significativa con $P < 0.05$	70
9. Variabilidad de la expresión génica entre los grupos de embriones clonados producidos a partir de cada línea celular. HMC-LCF y HMC-CWA: blastocistos clonados a partir de células fetales y adultas respectivamente. (A) Promedio de la variabilidad de la expresión de cada gen estudiado entre los grupos de embriones producidos a partir de cada línea celular. Los genes están organizados en orden decreciente de variabilidad. (B) Variabilidad de la expresión de OCT4 entre los grupos de embriones producidos a partir	

de cada línea celular. (C) Variabilidad total de la expresión de todos los genes estudiados para cada línea celular	72
10. Cuantificación de la expresión de OCT4 (A) y NANOG (B) en las líneas celulares utilizadas como donantes de núcleo para clonación. LCF y CWA, línea fetal y adulta respectivamente. a,b letras diferentes dentro de un mismo gráfico significan diferencias significativas con $P < 0.05$	73
11. Microfotografía de embriones elongados recuperados en el día 17 de desarrollo (etapa peri-implantatoria). a, b y c: embriones producidos por FIV. d, e y f: embriones producidos por HMC.	76
12. Microfotografía de embriones elongados recuperados día 17 (etapa peri-implantatoria). La flecha muestra disco embrionario. a, b: Embriones producidos por FIV. c, d: Embriones producidos por HMC	77
13. Gel de agarosa (2%) y tinción con bromuro de etidio del producto de PCR de la expresión de los genes incluidos en este estudio en embriones clonados y de FIV en estadio de elongación. 1, 2, 3: embriones producidos por FIV. 4, 5, 6: embriones producidos por HMC. MW=patrón de peso molecular, las bandas más intensas corresponden a 250 pb y 500 pb. C- se refiere a la reacción para cada gen sin adición de muestra. El nombre del gen correspondiente se lista en la columna extrema derecha	79
14. Cuantificación de la expresión génica durante el periodo peri-implantatorio en embriones clonados (HMC) y embriones producidos por fecundación <i>in vitro</i> (FIV). a, b: letras diferentes en un mismo gráfico significa diferencia significativa con $P < 0.05$	81
15. Nivel de expresión de todos los genes incluidos en la cuantificación por PCR tiempo real para los embriones clonados (HMC) y los de FIV (FIV)	82
16. Cuantificación de los niveles de expresión de marcadores del ICM (A y B) y del TE (C) durante los periodos pre y peri-implantatorio en embriones clonados y de FIV. HMC-blas, FIV-blas: blastocistos clonados y de FIV respectivamente. HMC-elong, FIV-elong: embriones alongados clonados y de FIV respectivamente. a,b, c: letras diferentes dentro de un mismo gráfico indican diferentes significativas con $P < 0.05$	83
17. Análisis global de la expresión génica mediante microarreglo en embriones clonados (HMC) y embriones producidos por FIV (FIV)	85
18. Clasificación según su función biológica de los genes diferencialmente expresados en los embriones clonados y de FIV. Clasificación basada en el programa DAVID Bioinformatics Resources 2008 (http://david.abcc.ncifcrf.gov)	88

19. Correlación entre la proporción de la expresión entre embriones clonados y producidos *in vitro* obtenida por qPCR y por microarreglo. Las réplicas biológicas son las mismas que se utilizaron para el microarreglo 89
20. Cuantificación de la expresión de genes encontrados diferencialmente expresados en el estudio por microarreglo en embriones elongados clonados (HMC) y producidos por fecundación *in vitro* (FIV)
a, b: letras diferentes en un mismo gráfico significa diferencia significativa con $P < 0.05$ 88
21. Victoria, ternera clonada a partir de la línea celular adulta (CWA).
a: a las 24 horas de vida. b: a los dos meses de vida 90
22. Representación esquemática del modelo transcripcional gobernado por los factores OCT4 y la familia Sox. SOX2 y otros factores Sox regulan, de forma redundante, la expresión de los genes dependientes del enhancer Oct-Sox, mientras que sólo SOX2 regula múltiples factores de transcripción los cuales pueden tener un efecto positivo o negativo sobre la expresión de OCT4. Tomado de: Masui et al., 2007) 98



INTRODUCCIÓN

Existe un intenso interés científico en el campo de la transferencia nuclear somática, principalmente para la multiplicación de animales de alto valor genético así como para la producción de animales transgénicos con propósitos agropecuarios o biomédicos. La realización de estas aplicaciones involucra técnicas de manipulación celular que facilitan la reprogramación nuclear y la adquisición de totipotencia de una célula somática adulta, permitiendo el desarrollo embrionario hasta dar lugar a una cría viva saludable.

El éxito de la producción de animales después de la transferencia nuclear depende de muchos factores técnicos y biológicos dentro de los cuales se incluyen la metodología, los ovocitos receptores y la línea celular empleada. El método más utilizado para la transferencia nuclear se basa en el empleo de micromanipuladores para eliminar el núcleo del ovocito receptor e introducir la célula donante en el espacio perivitelino. Esta técnica ha sufrido muy pocas modificaciones en los últimos 20 años. Actualmente solo un pequeño grupo de científicos ha comenzado a desarrollar nuevas técnicas o métodos de transferencia nuclear que permitan ampliar el uso de esta metodología así como la disminución de los costos asociados a ella. La clonación somática sin micromanipuladores o “Hand made cloning” (HMC) ha surgido como una de estas nuevas alternativas de transferencia nuclear en la cual ya no es necesario el uso de microscopios y micromanipuladores sofisticados y altamente costosos (Vajta et al., 2001).

La mayoría de los investigadores utilizan células fetales como donante de núcleo para la producción de animales clonados, basándose en que estas células presentan menos daños genéticos y una mayor habilidad proliferativa en comparación con las células adultas (Miyoshi et al., 2003). No obstante existen datos que afirman que las células adultas pueden producir embriones clonados con igual o mayor eficiencia que las células fetales utilizando el método convencional de transferencia nuclear (con micromanipuladores) (Keefer et al., 2002; Chesné et al., 2002; Yin et al., 2005). Adicionalmente al usar células fetales como donantes de núcleo, se desconoce el verdadero genotipo y fenotipo de éstas y sólo se le puede comparar con el de los progenitores de forma independiente.

Aún cuando la eficiencia alcanzada para la producción de embriones clonados hasta estadio de blastocisto es alta, comparada con los porcentajes de desarrollo obtenidos por fecundación *in vitro*, se ha visto que la capacidad de desarrollo *in vivo* es muy baja para los embriones clonados.

Esto convierte a la clonación somática en una técnica ineficiente en términos del número de crías vivas con respecto a la cantidad de embriones producidos y transferidos a hembras receptoras. Se ha demostrado que la placentación anormal es una de las mayores causas de la pérdida de gestaciones después de la transferencia de embriones clonados (Stice et al., 1996; Van Wagendonk-de Leeuw et al., 1998 y Wells et al., 1999). Además, la mayoría de los fetos e incluso las crías nacidas vivas, presentan malformaciones de órganos, problemas respiratorios y desbalance en el peso con respecto a los animales producidos de forma natural.

Estos problemas asociados con la transferencia nuclear son el resultado de una incorrecta reprogramación del núcleo donante en el citoplasma receptor que conlleva a una expresión aberrada de los genes necesarios para el desarrollo temprano de los embriones. Como se mencionó anteriormente, la adecuada reprogramación nuclear va a depender tanto de los factores biológicos: célula donante y ovocito, así como de la metodología empleada. Hasta el momento existen muy pocos datos que indiquen cuál es el efecto de la clonación somática sin micromanipuladores sobre el desarrollo de embriones producidos a partir de células adultas y fetales, la reprogramación nuclear y la expresión de genes durante los periodos pre, peri y post-implantatorios.

En este trabajo se demostró que el origen de la línea celular (fetal o adulta) utilizada como donante de núcleo influye sobre la calidad de los embriones bovinos clonados pre-implantatorios, producidos mediante la técnica de HMC. Para ello se obtuvieron dos líneas celulares de fibroblastos bovinos (adultos y fetales). Las células fueron transferidas a ovocitos en metafase II y se evaluó la capacidad para permitir el desarrollo embrionario *in vitro* hasta estadio de blastocisto. La calidad de los embriones clonados fue medida a través de su capacidad de desarrollo *in vitro* así como aspectos morfológicos y de expresión génica, comparado con blastocistos producidos por fecundación *in vitro*.

Además se determinó que la clonación somática afecta el desarrollo de embriones bovinos durante el periodo peri-implantatorio. El desarrollo peri-implantatorio de los embriones se evaluó en términos morfológicos y de expresión de genes marcadores embrionarios y trofoblásticos, comparado con embriones producidos por fecundación *in vitro* (FIV). Adicionalmente, se llevará a cabo un estudio global de la expresión génica durante el periodo peri-implantatorio de embriones clonados por HMC y embriones producidos por FIV, utilizando la tecnología de

microarreglos. Finalmente se evaluará la capacidad de los embriones clonados producidos por HMC, de continuar el desarrollo *in vivo* a término.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aspectos generales sobre transferencia nuclear somática

La clonación es la confección de copias idénticas de algún elemento biológico, en animales específicamente, se refiere a la obtención de seres genéticamente idénticos. Los gemelos homocigóticos en mamíferos, surgen de forma espontánea por la bipartición de un embrión pre-implantatorio. Con el deseo de obtener animales genéticamente idénticos para experimentación o la propagación de genotipos de alto valor, se han desarrollado técnicas de micromanipulación de embriones que pueden generar nacimientos de animales viables. La transferencia nuclear somática (TNS) o clonación somática se refiere a la obtención de copias idénticas de animales a partir de la transferencia de una célula diferenciada a un ovocito previamente enucleado.

Los primeros intentos de experimentos relacionados con la transferencia nuclear (TN) fueron realizados por Hans Spemann cuando se cuestionó la capacidad de una célula de revertir su estado de diferenciación. En 1928 para dar respuesta a su pregunta, realizó las primeras transferencias nucleares en salamandra. Diez años más tarde sugirió “El fantástico experimento de la clonación en mamíferos”. En 1952, Briggs y King fueron los primeros en definir las bases de la técnica de acuerdo con el experimento de Spemann, aislando y transfiriendo el núcleo de una célula somática adulta de rana a un ovocito, pero no lograron desarrollo a término de los cigotos obtenidos. Durante las décadas del 60 y del 70, Gurdon y colaboradores usaron la misma técnica y el mismo modelo animal pero esta vez lograron desarrollo hasta estadio larval y en ocasiones hasta estadio adulto (Gurdon et al., 1974). De esta forma, 30 años después que Spemann sugirió sus experimentos, se demostró que el núcleo de una célula diferenciada, era capaz de modificar su programa genético cuando es transferida a un ovocito que funciona como citoplasma receptor, iniciando el desarrollo embrionario a término.

Durante los años 80 se obtuvieron los primeros resultados de clonación en mamíferos; Willadsen y First demostraron que ovinos y bovinos podían ser clonados cuando se transfería el núcleo de una blastómera, aislada de una mórula, a un ovocito enucleado (Willadsen, 1986; First et al., 1987). Wilmut y Campbell demostraron que las ovejas también se podían clonar a partir de una célula somática adulta aislada de la glándula mamaria, respondiendo de esta forma a la hipótesis de Spemann: “el genoma de una célula somática adulta transferida al citoplasma de un ovocito

enucleado puede ser reprogramado y soportar el desarrollo a término hasta el nacimiento de un nuevo individuo”. Como resultado de los experimentos de Wilmut y Campbell nació la oveja Dolly en 1996, rompiendo con el mito de la irreversibilidad de la diferenciación celular en animales (Wilmut et al., 1997). A Dolly le siguieron otras especies de mamíferos incluyendo animales de granja, mascotas y animales silvestres, algunos en peligro de extinción. Hasta el momento se han clonado 16 especies de mamíferos: bovinos, ratones, chivos, puercos, gaur, gatos, conejos, mulos, caballos, venados, ratas, gato silvestre africano, perros, hurones y más recientemente lobo gris (Cibelli et al., 1998a; Wakayama et al., 1998; Baguisi et al., 1999; Polejaeva et al., 2000; Lanza et al., 2000; Shin et al., 2002; Chesne et al., 2002; Woods et al., 2003; Galli et al., 2003; College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences, Texas A&M University, 2003*; Zhou et al., 2003, Gómez et al., 2004; Lee et al., 2005; Li et al., 2006a y Oh et al., 2008).

Aplicaciones de la transferencia nuclear somática

Sin lugar a duda, la transferencia nuclear somática representa un gran avance de la biotecnología en las últimas décadas. Las aplicaciones potenciales de esta técnica han sido revisadas por muchos investigadores (Colman, 1999; Faber et al., 2003, Denning y Priddle, 2003, Paterson et al., 2003), sugiriendo que estas aplicaciones en lo que respecta a animales de granja, pueden ser divididas en dos áreas generales: agropecuaria y biomédica. No obstante la clonación somática ha brindado una nueva herramienta para el rescate de animales en peligro de extinción e incluso ya extintos. Finalmente, la investigación básica por lo general es menos mencionada pero la transferencia nuclear somática ha permitido por primera vez, el estudio de los procesos biológicos que conllevan a la reprogramación de núcleos diferenciados, la expresión génica durante el desarrollo y diferenciación, así como el crecimiento y envejecimiento celular (Rieck y Dean, 2002).

* El primer ciervo clonado no fue publicado en revistas científicas.

Aplicaciones biomédicas

El mayor potencial de la transferencia nuclear somática en animales, está basado en las aplicaciones biomédicas, principalmente para la creación de animales transgénicos, los cuales son útiles en la producción de biofármacos, como modelo para el estudio de diferentes enfermedades y para el xenotrasplante. Desde la década de los 80 fue posible producir animales genéticamente modificados mediante la inyección de copias de genes de interés en uno de los dos pronúcleos del cigoto. Sin embargo, este método es ineficiente ya que la mayoría de los embriones inyectados no se desarrollan, debido a los daños que se producen al pronúcleo por el volumen inyectado o por la simple manipulación y sólo un pequeño porcentaje se desarrolla a término. La eficiencia para producir animales transgénicos mediante este método es menor del 1% para animales de granja y no más de un 3% en ratones. Por otra parte, la microinyección solo permite introducir nuevos genes y por lo general la integración del transgén ocurre al azar, obteniéndose los llamados animales mosaicos en los que no todas las células contienen el gen de interés (Paterson et al., 2003).

A pesar que se han tratado todos los métodos alternativos, la clonación somática constituye el sistema más eficiente para la producción de animales transgénicos. La clonación somática permite la utilización de células que han sido manipuladas genéticamente (células transgénicas), como donantes de núcleos. Ésto facilita comprobar la integración del transgén antes de la transferencia nuclear. De esta forma se ahorra tiempo, esfuerzo y dinero ya que garantiza que solo los embriones que portan la modificación genética se transfieren a hembras receptoras, por tanto el 100% de las crías obtenidas serán transgénicas. Una vez seleccionadas las células portadoras de la modificación genética, éstas pueden ser expandidas en cultivo y mantenidas en congelación de forma indefinida. La combinación del mantenimiento de las células transgénicas con la transferencia nuclear, hace que la posibilidad de generar animales transgénicos mediante esta técnica sea ilimitada. A diferencia de la microinyección, la manipulación de las células permite no sólo la introducción de genes exógenos sino la delección de genes del genoma que está siendo manipulado (Bosch et al., 2004).

La aplicación más inmediata de la clonación animal, es la creación de modelos de enfermedades y de biorreactores. Desde el punto de vista estrictamente económico, la ineficiencia asociada a esta tecnología no es un problema, asumiendo que los animales creados que portan el cambio

genético de interés, tendrían un alto valor comercial y estos podrían ser rápidamente multiplicados también mediante clonación (Paterson et al., 2003). Hasta el momento se han producido animales clonados y transgénicos de especies como ovejas, vacas, cerdos y cabras (Schnieke et al., 1997; Cibelli et al., 1998b; Salamone et al., 2006; McCreath et al., 2000; Dai et al., 2002; Lai et al., 2002; Denning et al., 2001a y b; Keefer et al., 2001).

Los modelos animales para enfermedades son diseñados para expresar el genotipo y/o el fenotipo de alguna enfermedad humana. Estos animales pueden ser usados para entender el proceso biológico involucrado en dicha enfermedad y para probar posibles tratamientos. Desde la creación de los primeros transgénicos se ha producido un gran número de ratones como modelos, sin embargo, esta especie tiene una serie de limitaciones debido a las diferencias fisiológicas con el hombre y la limitada vida de los ratones. Genéticamente el uso de animales de granja podría ofrecer una solución a este problema. Las ovejas y en especial los cerdos son animales ideales debido a las semejanzas de la fisiología y la talla de sus órganos con los seres humanos (Bosch et al., 2004).

Los biorreactores también son animales transgénicos que producen proteínas exógenas, por lo general humanas, cuyos genes se encuentran insertos en su genoma, las proteínas pueden ser purificadas y utilizadas en el sector de la medicina. La mayoría de las construcciones génicas diseñadas con este fin permiten la expresión de la proteína de interés en algún fluido corporal, como la leche, sangre, orina o semen, el cual puede ser colectado para la purificación del producto (Niemann et al., 2007). Estos animales transgénicos también pueden ser producidos por microinyección pero además de las ventajas antes mencionadas, la clonación somática también permite seleccionar el origen (hembra o macho) de la línea celular que va a ser utilizada como donante de núcleo. Esto facilita la recuperación de la proteína de interés, dependiendo del sistema que se haya elegido para su expresión (por ejemplo leche o semen).

Después del nacimiento de Dolly se dio a conocer el nacimiento de Polly y Molly, las primeras ovejas transgénicas obtenidas por transferencia nuclear somática, las cuales eran capaces de expresar en la glándula mamaria el gen para el factor IX de coagulación humano (Schnieke et al., 1997). Otro ejemplo es la expresión de hormona de crecimiento humano en la leche de una vaca transgénica obtenida por transferencia nuclear (Salamone et al., 2006).

Como se mencionó al inicio de esta sección, una tercera aplicación de la transferencia nuclear somática en el área biomédica es la creación de animales donantes de órganos para

xenotransplante (transplante de órganos o tejidos entre diferentes especies). Dentro de las aplicaciones de la TN, ésta es una de las más controversiales debido a sus implicaciones éticas y sociales. No obstante el xenotransplante podría ser la única alternativa para suplir la gran demanda de órganos humanos y así eliminar la larga lista de pacientes que requieren un transplante urgente. En el año 2002, en Estados Unidos se reportó que solo un tercio de los pacientes recibieron un órgano en tiempo y más de 6000 murieron sin la posibilidad de ser trasplantados (Port et al., 2003).

A pesar de la ventaja que representa el uso de órganos de cerdos para el xenotransplante existen algunas barreras entre cerdos y humanos que deben ser eliminadas antes que esta tecnología sea considerada como una opción en la medicina humana. Una de estas limitaciones es la compatibilidad anatómica y fisiológica entre el órgano donado y el sistema humano en el cual debe cumplir la función fisiológica; de lo cual aún no existen muchos reportes (Vajta y Gjerris, 2006). Los primeros trasplantes de órganos porcinos a primates no humanos fueron capaces de mantener los parámetros bioquímicos dentro de los rangos fisiológicos. La mayor limitación de esta técnica es la rápida reacción inmunológica que se produce una vez que se trasplanta un órgano porcino a un ser humano. Esta respuesta híperaguda (HAR, según siglas en inglés) ocurre debido a la reacción de los anticuerpos ante la presencia de los antígenos de superficie de los órganos porcinos seguido por daños de los tejidos medido por la acción del complemento.

Se ha descrito que la enzima 1,3 galactosiltransferasa (presente en la superficie celular de casi todos los mamíferos excepto humanos, simios y primates del viejo mundo) está involucrada en la respuesta HAR (Phelps et al., 2003). Unas de las estrategias que se podrían seguir para eliminar esta respuesta serían el silenciamiento del gen que codifica para esta enzima y/o la inactivación del complejo. En el año 2002, Lai y colaboradores, dieron a conocer el nacimiento de los primeros cerdos transgénicos carentes de esta enzima. Los cerdos fueron producidos mediante transferencia nuclear somática utilizando como donante de núcleo células carentes del gen para la 1,3 galactosiltransferasa lo cual se conoce como “knock-out” génico (Lai et al., 2002). No obstante, existen otras reacciones que no son inmediatas pero que producen anticuerpos xenoreactivos y que son patológicamente similares a la respuesta HAR. A pesar de los avances que se han realizado en éstos temas, la complejidad de la respuesta inmunológica ante la presencia de un órgano extraño, probablemente requiere la combinación de diferentes modificaciones genéticas dentro de un mismo animal para obtener órganos y tejidos que puedan

ser aceptados por el hospedero (Ramsoondar et al., 2003; Kuwaki et al., 2005; Sprangers et al., 2008).

Finalmente debido al amplio debate sobre el tema, sería conveniente mencionar la posibilidad de utilizar la clonación somática en humanos con fines reproductivos. Esta aplicación está limitada por la ineficiencia del proceso y por las aberraciones genéticas que presentan los individuos creados mediante transferencia nuclear. Dichos problemas genéticos pueden ser el resultado de procesos biológicos complejos que ocurren tanto en el citoplasma receptor como en el núcleo donante o por la técnica en sí. Además cabría discutir las consideraciones éticas asociadas a la creación de individuos humanos sin la participación de dos padres y la influencia que esto tendría en su desarrollo social. No obstante el empleo de la clonación somática con fines terapéuticos podría ser la solución a muchas enfermedades, para las cuales, no se cuenta con tratamientos efectivos. La clonación somática permite la derivación de células madres totipotentes a partir de embriones humanos clonados. Una vez obtenidas estas células, se podrían derivar tejidos diferenciados específicos, los cuales serían utilizados en terapias de reemplazo.

Aplicaciones agropecuarias

Las aplicaciones de la transferencia nuclear somática en el área agropecuaria parecen tener un futuro más lejano que los usos biomédicos. A pesar que los problemas biológicos y técnicos son los mismos, las aplicaciones agropecuarias deben ser altamente productivas para ser viables desde el punto de vista económico. No obstante, la posibilidad de crear copias idénticas de animales de alto valor genético como vacas con una alta producción de leche o toros con una calidad de carne excepcional, ha despertado un gran interés entre científicos y productores. La clonación de un animal con determinadas características productivas, aumentaría la posibilidad de generar crías, mejorando la calidad genética del rebaño en general. Un ejemplo de la aplicación real de esta tecnología para la multiplicación de animales de alto valor productivo se materializó en el 2001 con el nacimiento de Cyagra y Génesis. Ambas terneras son clones de Zita, una vaca Holstein que ganó premios internacionales por su alta producción y calidad de su leche (Westhusin et al., 2003; FoxNew.com., 2006).

Existen estudios sobre las propiedades biológicas y bioquímicas de los productos de animales clonados para determinar si existen riesgos para la salud humana debido al consumo de dichos

productos. Takahashi y Yoshihio (2004) demostraron que no existen diferencias biológicas en muestras de carnes de animales clonados a partir de células embrionarias o somáticas y animales no clonados. Tomé y colaboradores (2004) no encontraron diferencias significativas entre los valores nutricionales de la leche y la carne derivados de bovinos clonados y no clonados. Estos datos demuestran que los productos obtenidos de animales clonados no constituyen ningún riesgo para la salud humana.

La combinación de la transferencia nuclear somática con las modificaciones genéticas, proporcionan una nueva oportunidad para los esquemas de mejora genética. Los principales objetivos que se persiguen con el uso de estas tecnologías son la creación de animales con mayor resistencia a enfermedades como la mastitis (Wall et al., 2005) o toros transgénicos capaces de producir solo crías hembras o machos (Faber et al., 2003). Otras posibles aplicaciones podrían ser la creación de vacas que produzcan leche de mejor calidad proteica o de animales que reduzcan el efecto negativo de la agricultura sobre el medioambiente.

Una de las barreras para la implementación de la clonación con usos agropecuarias es el hecho que los clones no son copias exactas de un animal ya existente. El ADN mitocondrial de cada animal podría diferir teniendo en cuenta que éste proviene mayormente del ovocito receptor y en muchos casos de la combinación del ADN mitocondrial del ovocito y de la célula donante (Hiendleder et al., 2003). No obstante aún no queda clara cual es la influencia de la heteroplasmía mitocondrial de los clones sobre su desarrollo y sus capacidades productivas. Por otra parte el fenotipo de un individuo está determinado por la sumatoria de tres factores: genética, ambiente y epigenesis. En el caso de la clonación somática, el primer factor sería común ya que independientemente de la influencia del ADN mitocondrial, la información genética sería exactamente la misma para todos los animales provenientes de la misma línea celular. El factor ambiental sería muy fácil de controlar manteniendo las mismas condiciones de tenencia para todos los animales. La epigenesis por otra parte, son mecanismos de regulación de la expresión génica que no depende de variaciones en el contenido genético del ADN sino en modificaciones de su estructura por tanto podrían ser diferentes en cada animal aun siendo clones.

Uno de los ejemplos más clásicos de variación epigenética en clones es el llamado “Copy cat”, el primer gato obtenido por transferencia nuclear somática. La gatita clonada no resultó ser una copia exacta del animal donante de células somáticas, debido principalmente a diferencias en la

capa de colores por eventos epigenéticos que ocurren al azar durante el desarrollo como la inactivación del cromosoma X (Shin et al., 2002). Otros ejemplos de diferencias fenotípicas entre clones somáticos se han visto principalmente en cerdos y bovinos en los cuales no sólo varía la coloración del pelaje, cantidad de pezones (en el caso de las cerdas) sino también las capacidades de ganancia de peso y la productividad de leche (vacas) (Archer et al., 2003; Mir et al., 2005; Heyman et al., 2007; Watanabe et al., 2008).

Rescate de animales en peligro de extinción

La mayoría de las técnicas reproductivas existentes, como la inseminación artificial, fecundación *in vitro* y transferencia de embriones, pueden ser utilizadas para el rescate de animales o poblaciones en peligro de extinción. En muchos de los casos existen muy pocos ejemplares lo que impide la recuperación de gametos y por tanto la utilización de cualquiera de las técnicas antes mencionadas para la multiplicación de los animales. Sin embargo la transferencia nuclear somática permite la creación de copias de un animal a partir de una muestra de tejido. Aunque este es un tema muy controversial teniendo en cuenta que mediante esta vía se limitaría la diversidad genética y sería imposible restablecer una población a partir de un solo individuo, la clonación permitiría rescatar el pool genético de animales infértiles o que hayan muerto antes de alcanzar la madurez sexual.

Una de las mayores limitaciones para el uso de la clonación como técnica reproductiva para la multiplicación de estos animales, es la poca disponibilidad de citoplastos receptores para la transferencia nuclear y de hembras receptoras de los embriones producidos. Con el fin de suplir estas carencias ha sido necesario el desarrollo de sistemas alternativos que consisten en la utilización de ovocitos y hembras de especies, por lo general domésticas, relacionadas con la especie en peligro de extinción, introduciéndose el concepto de clonación heteroespecífica o interespecie.

La primera clonación interespecie exitosa fue llevada a cabo por Lanza y colaboradores en el año 2000. Estos investigadores lograron el nacimiento de “Noah”, un bóvido en peligro de extinción (*Bos gaurus*) a partir de la transferencia a ovocitos bovinos, de fibroblastos de un ejemplar de esta especie muerto desde 1980 (Lanza et al., 2000). Un año más tarde, Loi y colaboradores reportaron el nacimiento de un muflón (*Ovis orientalis musimon*) a partir de la transferencia de

células somáticas a ovocitos de ovejas domésticas (Loi et al., 2001). Otro ejemplo del éxito de esta tecnología es el nacimiento de "Caty" y "Madge", obtenidas a partir de la transferencia de fibroblastos de gato salvaje africano en ovocitos de gata doméstica (Gómez et al., 2004). Existen muchos estudios que aunque no han sido tan exitosos como los mencionados anteriormente, han permitido establecer nuevos protocolos y dilucidar algunas de las principales dificultades asociadas a la clonación heteroespecífica.

La disponibilidad de ovocitos para la clonación heteroespecífica es menos compleja cuando se trata de ovejas y vacas ya que la obtención de los gametos es menos costosa, son disponibles en la mayoría de los países, además se tiene un amplio conocimiento sobre los sistemas de maduración *in vitro*. No obstante en especies como el Huemul en Chile o el panda en China, la disponibilidad de citoplastos receptores de especies relacionadas es mucho más compleja. Por esta razón sería muy conveniente disponer de un modelo de citoplasto común que pueda ser utilizado como receptor para la transferencia nuclear independientemente de la especie con la que se esté trabajando. Los ovocitos bovinos han sido el primer candidato como "citoplasto universal" para la clonación somática.

En una revisión realizada por Beyhan y colaboradores (2007a) se demuestra que el citoplasma maduro de un ovocito bovino tiene la habilidad de soportar varios ciclos mitóticos dirigidos por el ADN introducido después de la transferencia nuclear heteroespecífica. De esta forma la transferencia de células somáticas de especies como ovejas, cerdos, monos y ratas en un ovocito bovino puede inducir el desarrollo embrionario por lo menos hasta formar estructuras semejantes a un blastocisto. Teniendo en cuenta estos resultados, estos investigadores llegaron a la conclusión que los ovocitos bovinos no discriminan entre las diferentes especies utilizadas como donante de núcleo, independientemente del número de cromosomas o la edad del animal donante (Dominko et al., 1999). En el año 2001, Kitiyanant y colaboradores comprobaron la capacidad de los ovocitos bovinos de soportar el desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto después de la transferencia de fibroblastos de búfalo de agua (*Bubalus bubalis*). En este experimento utilizaron tanto ovocitos de búfalo como ovocitos de vaca con los que no obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de blastocistos obtenidos (39% y 33% respectivamente) ni en la cantidad de células de los embriones a los 7 días de desarrollo. Otros estudios de TN interespecies utilizando ovocitos bovinos como citoplasto universal incluyen el uso de células somáticas de especies como cerdos (Yoon et al., 2001), caballos (Li et al 2002), antilope (Lee et

al., 2003), yak (*Bos grunniens*) (Li et al., 2007), goral o cabrito montés (Oh et al., 2006), gatos (Thongphakdee et al., 2008), cabras (Tao et al., 2008), monos (Lorthongpanich et al., 2008) y humanos (Illmensee et al., 2006).

Limitaciones de la Transferencia Nuclear Somática

Las posibilidades de aplicación de la clonación en la medicina, la industria y la agricultura son teóricamente ilimitadas. Sin embargo, la baja eficiencia de la transferencia nuclear limita o detiene sus aplicaciones desde el punto de vista técnico. La mayoría de las investigaciones recientes se enfocan en el incremento de esta eficiencia o en identificar situaciones donde los presentes niveles de eficiencia arrojen resultados competitivos. El porcentaje de éxito de la transferencia nuclear somática se encuentra entre 1 y 3% en la mayoría de las especies incluyendo bovinos (Solter, 2000). En esta especie, la mayoría de los embriones se pierden durante el primer trimestre de gestación, con una tasa de muerte fetal superior al 60% entre los días 35 y 60, mientras que sólo se observa una pérdida menor del 5% en las gestaciones naturales (Galli et al., 2003). Finalmente, sólo el 50% de los terneros nacidos vivos, sobreviven más de una semana debido a complicaciones de salud principalmente relacionadas con problemas metabólicos, pulmonares, infecciones umbilicales, etc (Heyman, 2007).

La ineficiencia asociada a la clonación somática puede estar atribuida tanto a factores biológicos como técnicos que a su vez están estrechamente relacionados, lo cual hace que sea difícil establecer límites entre ellos. Dentro de los factores biológicos que se tienen en cuenta están: la calidad de los citoplastos y de las células somáticas utilizadas, la interacción célula-ovocito, el estadio del ciclo y tipo de célula donante, así como la reprogramación del núcleo donante después de la transferencia. Los factores técnicos se refieren principalmente a los sistemas de cultivos y los diferentes pasos asociados a la clonación como son: enucleación del ovocito receptor, fusión nuclear y activación. A pesar de la influencia que pueden tener estos factores sobre el desarrollo pre-implantatorio (desde estadio unicelular hasta estadio de blastocisto) de los embriones clonados, los mayores problemas se observan sobre la capacidad del núcleo donante de ser reprogramado correctamente, lo cual se entiende como la disponibilidad de los factores necesarios para la correcta expresión de genes en cada momento del desarrollo.

Aún después de lograr el nacimiento de animales clonados, su viabilidad postnatal puede ser baja. Generalmente los clones presentan un aumento significativo de su talla, malformaciones de sus órganos que frecuentemente conllevan a la muerte del individuo. Otro problema que se ha presentado en estos animales se refiere a la edad biológica, definida como la longitud de los telómeros, de los individuos obtenidos por clonación. Un animal que herede la edad del animal adulto que donó la célula empleada en la transferencia nuclear, muy probablemente comenzaría a padecer tempranamente, enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Sin embargo, existen evidencias que demuestran que no todos los animales clonados presentan telómeros de longitud semejante a las células donantes por lo que la actividad de la telomerasa puede ser reprogramada durante la TN (Kurome et al., 2008).

Factores que afectan la eficiencia de la TNS

Influencia de la célula donante

La célula donante de núcleo es uno de los factores biológicos que determinan el éxito de la transferencia nuclear ya que este núcleo debe ser capaz de dirigir el desarrollo embrionario y dar lugar a un animal normal. Durante la década de los 80 se obtuvieron los primeros animales mediante transferencia nuclear pero en este caso las células donantes fueron obtenidas a partir de la desagregación de las blastómeras de un embrión pre-implantatorio (Willadsen et al., 1986). Las blastómeras a diferencia de las células somáticas son totipotentes y en principio cada una tiene la capacidad de dar lugar a un embrión. La transferencia de una de estas células embrionarias, a un ovocito previamente enucleado puede generar otro embrión sin grandes problemas biológicos. Las mayores limitaciones del uso de blastómeras para clonación son en primer lugar, que el número de embriones obtenidos con las mismas características genotípicas, va a estar limitado por el número de células que contenga el embrión que será clonado y en segundo lugar que no sería posible predecir las características de los animales que se van a obtener.

El nacimiento de Dolly abrió el camino para el uso de células somáticas para la transferencia nuclear con todas las ventajas mencionadas. No obstante, una de las mayores limitaciones biológicas de esta técnica es que las células somáticas son completamente diferenciadas, con

patrones de expresión génica que se correlacionan con la función del tejido del cual se originaron. Por esta razón, durante la primera década después del nacimiento de Dolly, la mayoría de los investigadores concentraron sus trabajos en encontrar el tipo celular y las mejores condiciones de las células donantes para que la información genética pudiera ser reprogramada de forma eficiente en el citoplasto receptor, aumentando la eficiencia de la clonación somática.

Hasta la fecha se han utilizado muchos tipos celulares como donante de núcleo para la producción de animales clonados. Dolly fue creada a partir de la reprogramación del núcleo de una célula de glándula mamaria (Wilmot et al., 1997). Sin embargo, otros resultados exitosos incluyen la utilización de células de la granulosa (Wakayama et al., 1998), fibroblastos fetales y adultos (Kato et al., 1998; Rodriguez et al., 2008), células del oviducto (Kato et al., 2000), leucocitos (Galli et al., 1999), células de la granulosa mural (Wells et al., 1999), células germinales (Bordignon et al., 2003), células de hígado (Brem y Kuhholzer, 2002) entre otras. A pesar de los resultados obtenidos, aún no está claro qué tipo celular es más eficiente para la transferencia nuclear. Las diferencias que se producen en la eficiencia de la transferencia nuclear con diferentes tipos celulares podrían estar más relacionadas con los protocolos de clonación y de mantenimiento de las líneas celulares que con el origen de éstas (Yang et al., 2007).

Hasta el momento se han obtenido resultados contradictorios en cuanto a la eficiencia de la clonación utilizando líneas celulares de diferentes orígenes: por ejemplo Kato y colaboradores no tuvieron diferencias significativas en los porcentajes de blastocistos bovinos utilizando células de diferentes tipos, adultas, fetales, recién nacido, macho y hembra. Sin embargo, estos autores encontraron diferencias cuando las células fueron obtenidas de diferentes órganos incluso de un mismo animal (Kato et al., 2000). Wakayama y Yanagimachi (2001), obtuvieron resultados similares utilizando varios tipos celulares, derivados a partir de ratones de diferentes sexo y edad. La mayoría de los animales clonados se han producido a partir de líneas celulares derivadas de hembras, no obstante, no se ha demostrado que el sexo tenga alguna influencia sobre la eficiencia de la transferencia nuclear somática.

En bovinos y cerdos se ha demostrado que la capacidad de desarrollo *in vitro* de embriones clonados así como la tasa de gestación inicial y el porcentaje de animales nacidos vivos, depende en mayor medida, de la línea celular que del tipo de célula que se utiliza como donante de núcleo (Dinnyés et al., 2002; Miyoshi et al., 2003; Kuhholzer et al., 2001). Teóricamente estas diferencias entre las líneas celulares tanto de bovinos como de cerdos, pueden estar originadas

por efectos epigenéticos. Algunas líneas celulares son más susceptibles que otras para ser reprogramadas después de la transferencia nuclear (Kuhholzer et al., 2001; Miyoshi et al., 2003; Liu et al., 2009).

A pesar que la mayoría de los resultados obtenidos en diferentes especies, indican que la eficiencia de la transferencia nuclear es independiente de la edad del animal del cual se origina la línea celular, muchos investigadores apoyan la teoría que las células fetales son más eficientes ya que son más proliferativas y presentan menos daños genéticos que las células derivadas de animales adultos (Hill et al., 2000). Aún cuando algunos trabajos indican que no existen diferencias en los porcentajes de fusión, división celular y formación de blastocistos entre los embriones derivados de células fetales y adultas en bovinos (Niemann et al., 2002) y gatos (Yin et al., 2005), sí se ha visto que existen mayores pérdidas de gestaciones de aquellos embriones producidos con células adultas (Hill et al., 2000; Niemann et al., 2002). Sin embargo, la utilización de células fetales para transferencia nuclear impediría predecir el genotipo y por tanto el fenotipo de los animales producidos, mientras que las células adultas son derivadas de animales que pueden ser seleccionados a través de sus características fenotípicas.

Una de las ventajas de la transferencia nuclear somática es que el número de animales obtenidos de cada línea celular es prácticamente ilimitado ya que las células pueden ser multiplicadas en cultivo y congeladas para su conservación. No obstante, el cultivo *in vitro* de las células donantes puede provocar daños en el material genético. El porcentaje de aneuploidía aumenta en las células cultivadas por períodos prolongados (Freshney, 2000), sin embargo las células cultivadas por cortos períodos de tiempo (no más de 10 pases) son las más usadas para la transferencia nuclear somática sin que se evidencie diferencias significativas en el desarrollo embrionario temprano entre los pases 1 y 10 (Li et al., 2003).

Por otra parte la congelación de las células a bajas temperaturas provoca cambios en la membrana celular que disminuye la eficiencia del proceso de transferencia nuclear. La fusión del núcleo donante con el citoplasto receptor se realiza aplicando un pulso de corriente directa que produce poros en las membranas celulares. A través de los poros se produce intercambio entre el citoplasma de la célula y del ovocito hasta que desaparece la membrana que los separa y se completa la fusión. Hayes y colaboradores (2005a) demostraron que la disminución brusca de la temperatura provoca graves cambios estructurales en la membrana celular que influyen significativamente sobre el porcentaje de fusión empleando fibroblastos de vaca adulta de la raza

Siboney. El empleo de un método de congelación continuo, donde la temperatura disminuye un grado por minuto, provoca menos alteraciones en la membrana, aumentando con esto el porcentaje de fusión empleando una línea de fibroblastos fetales de fenotipo *Bos taurus* (Hayes et al., 2005a).

Finalmente otro de los aspectos a tener en cuenta es la sincronía requerida entre el ciclo celular de la célula donante y el citoplasto receptor en el momento que se realiza la transferencia nuclear. Los estudios realizados sobre la regulación del ciclo de la célula donante indican que el uso de células en G0 puede ser beneficioso para el éxito de la TN (Wilmot et al., 1997). Por lo general, en la literatura científica las células en G0 y G1 son agrupadas conjuntamente en una categoría denominada G0/G1 incluso cuando estas fases son distintas. Las células en G0 se encuentran fuera del ciclo de división celular, en un estadio de quiescencia, mientras que G1 es un estadio transiente entre la fase M y S en células proliferativas. Las células quiescentes o en G0 son las más comúnmente utilizadas para la TN (Wilmot et al., 1997; Baguisi et al., 1999; Kues et al., 2000; Reggio et al., 2001; Gibbons et al., 2002; Wells et al., 2003; Yu et al., 2003; Hayes et al., 2005b) y el método utilizado para inducir este estadio, puede afectar marcadamente el desarrollo embrionario, la sobrevida fetal y del neonato (Gibbons et al., 2002; Hayes et al., 2005b).

El método más utilizado para inducir G0 es la deprivación de suero durante el cultivo, no obstante este procedimiento puede provocar una reducción de la sobrevida celular y un incremento de la fragmentación del ADN (Lanza et al., 2000; Keus et al., 2000). Las células cultivadas en ausencia de suero, son además, susceptibles a un incremento de los daños en los telómeros debido a la baja actividad de la telomerasa en células en estadio quiescente. Estudios realizados por Gibbons y colaboradores (2002), muestran que la pérdida fetal en experimentos con células sincronizadas con deprivación de suero, puede estar relacionada con la replicación inapropiada del ADN o porque los daños del ADN no son correctamente reparados durante el desarrollo embrionario/fetal (Gibbons et al., 2002). En el mismo estudio se demostró el efecto positivo sobre la eficiencia de la transferencia nuclear, del tratamiento de las células donantes con roscovitina, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas. La roscovitina, aumenta la eficiencia de la sincronización del ciclo celular y la capacidad de reprogramación del núcleo de la célula donante. El empleo de dicho producto en el cultivo de las células donantes redujo la pérdida de gestaciones, lográndose el nacimiento de un número mayor de animales saludables.

Es posible que los embriones obtenidos con células tratadas con roscovitina, presenten un menor daño del ADN por la mayor efectividad de la sincronización o que los mecanismos de corrección del ADN están intactos y eficientes. Además se observó una diferencia en los patrones de fragmentación del ADN en animales de diferentes edades (Gibbons et al., 2002).

Sincronía entre el citoplasto receptor y el núcleo donante

En mamíferos, los ovocitos se encuentran detenidos en estadio de vesícula germinal de la primera división meiótica (MI). Ante determinados estímulos hormonales, la meiosis se reanuda y se produce la ruptura de la vesícula germinal, se completa la primera división meiótica liberándose el primer cuerpo polar y nuevamente se produce el arresto meiótico, en este caso en la metafase de la segunda división (MII). Los cambios que se producen hasta el arresto del ovocito en MII se denominan maduración ovocitaria, a partir de la cual el ovocito puede ser fertilizado y dirigir el desarrollo embrionario. Durante la fecundación, se completa la segunda división meiótica y se libera el segundo cuerpo polar. Esto es seguido por la decondensación de la cromatina de ambos núcleos (materno y paterno) y se forman los pronúcleos. Después de la replicación del ADN se produce la segregación equitativa del material genético por mitosis y el cigoto se divide en dos blastómeras idénticas.

Se han identificado las principales moléculas que participan en el arresto meiótico del ovocito, la continuidad de la meiosis y la activación después de la fecundación. El AMP cíclico (AMPc) es uno de los factores involucrados en el arresto meiótico. Altos niveles de AMPc dentro del ovocito mantienen detenida la meiosis y su decremento, favorece su progresión (Downs, 1993). Los niveles basales de AMPc (altos: tomando como punto de partida un ovocito en arresto mitótico), activan una quinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual mantiene fosforiladas (inactivas) las proteínas necesarias para la ruptura de la membrana nuclear, manteniendo el arresto meiótico.

El reinicio de la meiosis es determinado por un decremento de los niveles de AMPc por la acción de la AMPc fosfodiésterasa (PDE). PKA controla directamente la actividad de CDK1 (p34^{cdc2}), una quinasa dependiente de ciclina B que se encuentra de forma estable en el ovocito y requiere ser parcialmente desfosforilada para ser activa. CDK1 se activa al unirse con la ciclina B formando el factor promotor de la maduración/meiosis/mitosis (MPF, según siglas en inglés). El

MPF, es detectado tanto en células germinales como somáticas y su función es provocar la ruptura de la membrana nuclear, regular la condensación de los cromosomas e interviene en la organización del aparato mitótico por fosforilación de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPK).

Durante la maduración ovocitaria, el MPF alcanza su máximo nivel, manteniéndose hasta la activación mediada por el espermatozoide o por un estímulo químico, momento en el que declina rápidamente. El desarrollo de los embriones obtenidos después de la transferencia nuclear, depende en gran medida de la sincronía entre el citoplasto receptor y el estadio del ciclo de la célula donante. Como se mencionó anteriormente, el núcleo de la célula donante debe estar en G0 ó G1 y se ha visto que cuando estas células son transferidas a ovocitos en MII que presentan altos niveles de MPF, se mantiene la correcta ploidía de las blastómeras después de la primera división celular (Campbell et al., 1996). El MPF provoca la ruptura de la membrana del núcleo donante y la condensación de los cromosomas independientemente del estadio del ciclo celular de la célula donante. Esto permite que el material genético transferido se encuentre expuesto a los factores citoplasmáticos presentes en el ovocito. Teóricamente este aspecto conllevaría a la reprogramación del núcleo diferenciado y por tanto al establecimiento del nuevo patrón de expresión génica que conllevaría al desarrollo embrionario. Posterior a la activación se produce una disminución de los niveles de MPF lo cual restablece la envoltura nuclear, produciéndose la duplicación del ADN y la mitosis donde cada célula hija tendrá la misma dotación cromosómica que la célula madre.

Inicialmente se utilizaron dos tipos de citoplastos receptores para la TN: 1) el ovocito en MII era activado después de la enucleación y antes de la reconstrucción (bajo MPF) y 2) el ovocito era enucleado y la activación se realizaba después de la reconstrucción (alto MPF) (Campbell et al., 1996; Dinnyés et al., 2002). No obstante, cuando los núcleos en G0 son transferidos a citoplastos con bajos niveles de MPF, no se produce la ruptura de la membrana nuclear ni la condensación de la cromatina, lo cual conlleva a una división celular prematura, posiblemente antes que se produzca la reprogramación nuclear (Vignon et al., 1998; 2000). Por otra parte, la transferencia a citoplastos no activados de células en estadio S o G2, donde el número de cromosomas se encuentra duplicado (4n), genera células hijas con el doble la dotación cromosómica normal (fenómenos de poliploidía). Consecuentemente, sólo cuando se transfieren a ovocitos no activados, núcleos que no han entrado en la fase S, se logra producir embriones clonados

normales (Campbell et al., 1996) por tanto células en G0/G1 con citoplastos en MII son la combinación más eficiente para la transferencia nuclear somática.

Influencia de la calidad de los ovocitos receptores sobre el desarrollo embrionario temprano

En la mayoría de los programas de producción *in vitro* de embriones incluyendo la TN, los ovocitos receptores son obtenidos de hembras sacrificadas en mataderos y posteriormente madurados *in vitro*. Esta es una fuente barata y prácticamente ilimitada de ovocitos, con el único inconveniente que la calidad de los citoplastos por lo general es mucho menor que aquellos que son madurados *in vivo*. Los ovocitos de mamíferos poseen una complejidad molecular que contrasta con su simple morfología. Un ovocito totalmente maduro posee todos los componentes moleculares necesarios para completar la meiosis, entrar en el ciclo mitótico, activar el genoma embrionario, modificar la estructura de la cromatina y las propiedades epigenéticas e iniciar la correspondiente transcripción de genes para poner en marcha el programa de desarrollo embrionario (Latham et al., 2001). Estos procesos son mantenidos y dirigidos por el contenido materno de ARNm, proteínas y otros componentes moleculares del ovocito, los cuales son acumulados durante la maduración. Los ovocitos que fallan en la acumulación de dichos elementos presentan una capacidad reducida para soportar la embriogénesis temprana después de la fecundación o de la transferencia nuclear ya que los ARNm del ovocito o maternos, gobernarán el desarrollo hasta la activación del genoma embrionario que en el caso de bovinos ocurre al estadio de 8 células (Figura 1).

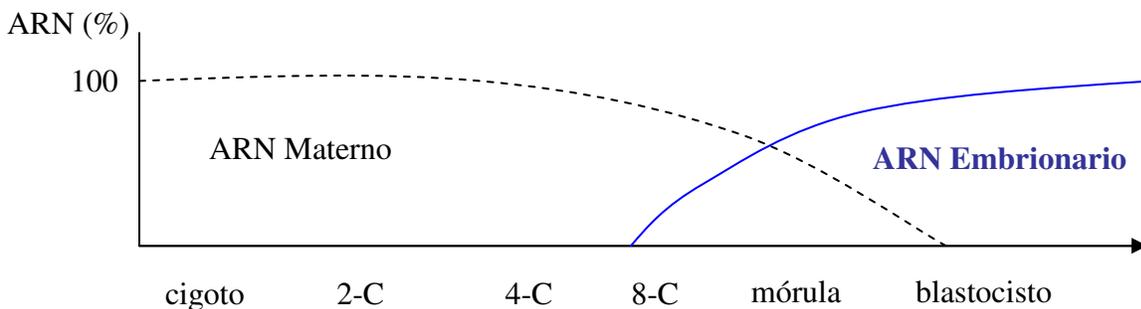


Figura 1. Representación esquemática del origen del ARNm en las diferentes etapas de desarrollo de embriones bovinos pre-implantatorios. Basado en: Heikinheimo et al., 1998

Muchos investigadores han tratado de identificar y definir la contribución de los ovocitos a la calidad del embrión. Los procesos de fecundación, desarrollo embrionario, inducción de preñez hasta el nacimiento están relacionados con los tres tipos de eventos de maduración observados en el ovocito: nuclear, citoplasmática y molecular (Sirard et al., 2006). Estos eventos a su vez son mayormente afectados durante la maduración *in vitro*, periodo en el cual se adquiere la competencia ovocitaria que es el estado o condición que le permite al ovocito soportar el desarrollo embrionario. Los ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro* tienen niveles similares de maduración nuclear, fecundación y división pero claramente se diferencian en su potencial de desarrollo (Sirard y Blondin, 1996). Esta diferencia en cuanto a la capacidad de desarrollo se observa en embriones bovinos entre los días 6 y 7 post fecundación (mórula-blastocisto) (Hyttel et al., 1997). El 85% de los ovocitos ovulados de forma natural son capaces de ser fecundados y establecer gestaciones, sin embargo, sólo un tercio de los ovocitos madurados *in vitro*, son capaces de soportar el desarrollo temprano (Picton et al., 2003).

In vitro, la maduración ovocitaria es independiente del ciclo estral y la ruptura de la vesícula germinal ocurre más tempranamente que *in vivo*. Se han descrito diferencias en cuanto a los patrones de síntesis de proteínas, abundancia de ARNm maternos, a nivel de ultraestructura como la localización de los gránulos corticales y expansión de las células del cúmulo en ovocitos madurados *in vitro* comparados con aquellos madurados *in vivo* (Hendriksen et al., 2000). La adquisición de 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 etapa del año (principalmente en especies estacionarias), las condiciones de cultivo y las características morfológicas del ovocito (Naoi et al., 2008).

Hasta el momento existen muy pocos reportes que indiquen el efecto de la competencia ovocitaria sobre la capacidad de desarrollo de los embriones después de la transferencia nuclear somática. No obstante, se ha demostrado que los ovocitos son una de las fuentes principales de variaciones en la eficiencia de la transferencia nuclear, siendo éstos la única célula capaz de reprogramar un núcleo donante (Miyoshi et al., 2003). Miyoshi y colaboradores (2003) reportaron que la maduración *in vivo* o *in vitro*, los tiempos de ovulación y la edad reproductiva de las donantes de ovocitos, influyen sobre la capacidad de desarrollo de embriones producidos por TN en cerdos y bovinos. En gatos también se ha demostrado que la fuente de citoplastos

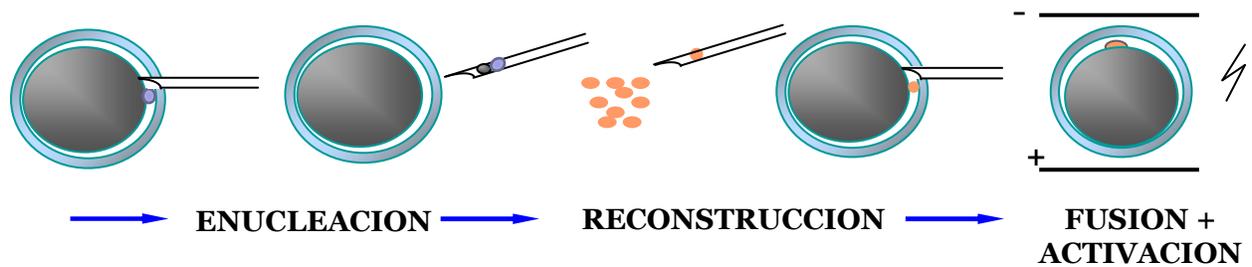
receptores así como la calidad morfológica de éstos, influye sobre la tasa de blastocistos producidos. Sin embargo no se han encontrado evidencias que indiquen que el estadio del ciclo estral tenga influencia sobre la capacidad de desarrollo de los embriones producidos por FIV o TN (Naoi et al., 2008).

Influencia del método de transferencia nuclear sobre el desarrollo embrionario

El procedimiento general de transferencia nuclear incluye tres pasos fundamentales: La enucleación del ovocito receptor, la transferencia de la célula donante y la activación del embrión reconstruido. Posteriormente, los embriones clonados son cultivados *in vitro* durante un periodo que va a depender de la especie hasta alcanzar el estadio óptimo para ser transferido a una hembra “sustituta”. Durante el proceso de enucleación, el núcleo del ovocito es removido aportando solamente el citoplasma como receptor del núcleo de la célula somática donante. Este proceso de enucleación involucra cambios estructurales en el citoplasma y pérdida de contenidos citoplasmáticos como proteínas y ARNm maternos que como se discutió anteriormente, son necesarios para la reprogramación del núcleo donante y el correcto desarrollo embrionario.

Los cromosomas de los ovocitos de especies como conejos, ovejas, cerdos, cabras y bovinos no pueden ser visualizados sin la ayuda de la tinción del ADN y exposición a luz ultravioleta (UV), esto dificulta la enucleación de los ovocitos que serán utilizados como citoplastos receptores. La forma de enucleación más empleada consiste en la aspiración del plato metafásico adyacente al primer cuerpo polar, con la ayuda de micromanipuladores y una micropipeta (Figura 2). Mediante esta forma de enucleación, el ovocito puede perder desde un 5-50% del volumen citoplasmático (Westhusin et al., 1992; 1996). La influencia de la enucleación de los ovocitos receptores sobre la calidad de los embriones reconstruidos y por tanto sobre la eficiencia general de la transferencia nuclear, fue uno de los temas más discutidos desde el comienzo de la aplicación de esta tecnología, incluso antes del nacimiento de “Dolly”.

A-



B-



Figura 2: A. Esquema general de transferencia nuclear con micromanipuladores (sistema tradicional). B. Eucleación de ovocitos en MII

Existen numerosos estudios de la influencia sobre el desarrollo embrionario de la pérdida de citoplasma durante la enucleación. Greising y colaboradores en 1994 y más tarde en 1997, Zakhartchenko y colaboradores, demostraron que se produce un decremento del desarrollo de los embriones producidos por TN cuando el volumen remanente del citoplasma de los ovocitos receptores fue muy reducido después de la enucleación. En 1996, Westhusin realizó experimentos reduciendo el volumen citoplasmático desde un 5-50%, donde no se observaron diferencias significativas en el desarrollo a blastocisto pero sí disminuyó significativamente el número de células de los blastocistos cuando se removió el 50% del citoplasma (Westhusin et al., 1996).

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica de transferencia nuclear somática en la cual no es necesario el uso de micromanipuladores ni micropipetas para la enucleación de los ovocitos ni para la reconstrucción de los embriones clonados (Figura 3). Esta técnica recibe el nombre de clonación somática sin micromanipuladores o “Hand Made Cloning” (HMC). Para la enucleación mediante HMC, se elimina la zona pelúcida de los ovocitos maduros permitiendo

hacer un corte del ovocito con ayuda de una microcuchilla. En este proceso se elimina la porción de citoplasma que contiene el plato metafásico, el cual es localizado con la formación de un cono en la membrana citoplasmática después de la incubación con demecolcina. Dentro de las principales ventajas de esta técnica es la recuperación del volumen citoplasmático, ya que durante la fusión se utilizan dos mitades del citoplasma para la reconstrucción del embrión clonado. De esta forma se logra reconstituir de un 90 al 100% del volumen citoplasmático y con ello el contenido de ARNm y proteínas maternas (Vajta et al., 2001; Vajta, 2007). Si bien se añaden mitocondrias y miARNs (microARN) de otras fuentes, su efecto sobre el éxito de la clonación no ha sido estudiado.

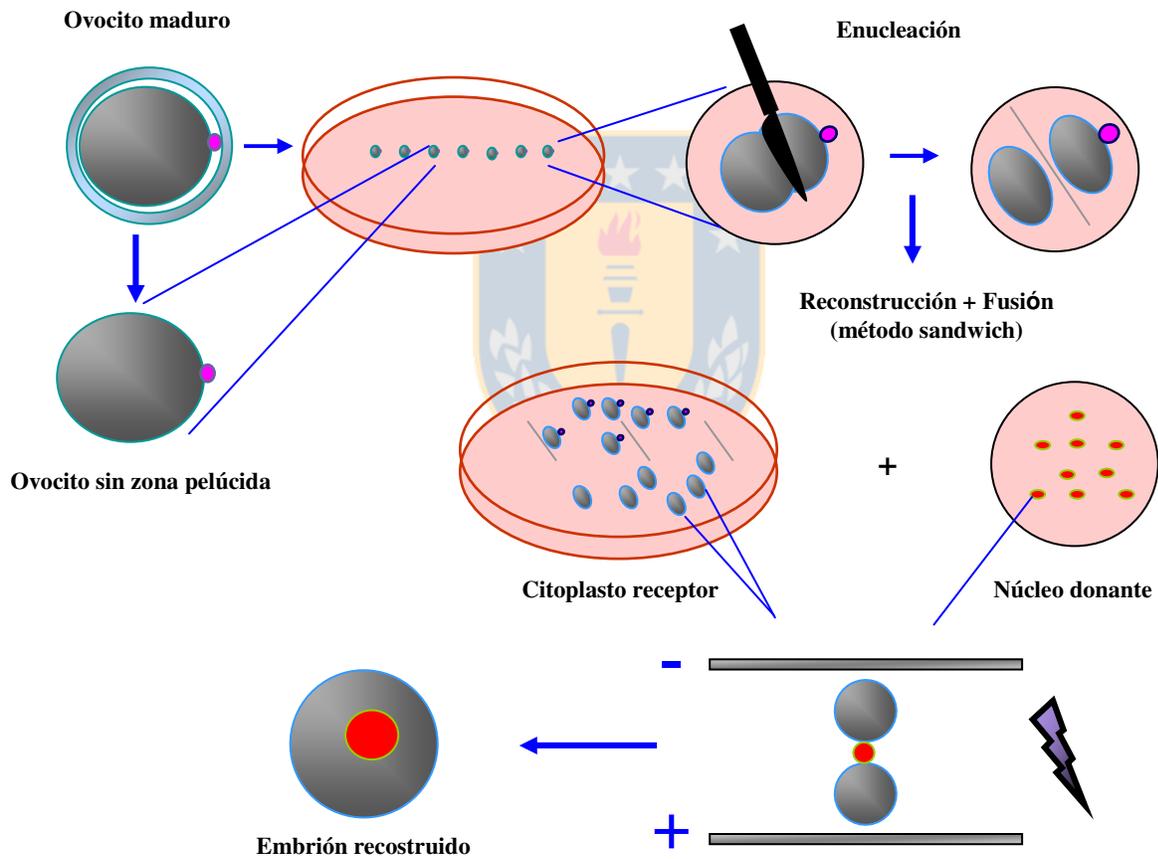


Figura 3: Esquema general de transferencia nuclear sin micromanipuladores o HMC

La eficiencia de enucleación mediante esta técnica es de 98-100% sin necesidad de visualizar el plato metafásico a través de la tinción y exposición a UV. La exposición a UV de ovocitos bovinos, de conejos y de xenopus, por menos de 15 segundos, no afecta el desarrollo

embrionario (Westhusin et al., 1992), sin embargo, la exposición por más de 30 segundos provoca pérdida en la integridad de la membrana, decrece la incorporación de metionina, altera los patrones de síntesis de proteínas en ovocitos bovinos (Smith, 1993), disminuye la viabilidad de los embriones de conejos (Yang et al., 1990) y causa desarrollo anormal en el 30% de los ovocitos de xenopus (Gurdon, 1960). Existen reportes sobre la utilización de otros métodos químicos que ayudan a la visualización del plato metafásico para la enucleación, eliminando de esta forma la exposición prologada del ovocito a UV. El tratamiento de ovocitos de ratón y bovinos con 3% y 0.3 M de sucrosa respectivamente facilitó la visualización del material genético utilizando un microscopio con luz blanca (Wang et al., 2001; Liu et al., 2002a y b).

Yin y colaboradores (2002) produjeron clones porcinos utilizando ovocitos en metafase II que fueron enucleados después de la incubación con demecolcina. La demecolcina, al igual que la sucrosa, promueve la formación de un cono o vesícula en la membrana plasmática conteniendo el plato metafásico, la cual es fácilmente visualizada y aspirada con ayuda de la pipeta de enucleación sin necesidad de tinción y exposición a UV (Figura 4). Después de la incubación en demecolcina por una hora, el 70% de los ovocitos porcinos presentaron el cono en la membrana plasmática. Aún no quedan claro los mecanismos de acción de la demecolcina, no obstante la aparición de la vesícula puede estar relacionada con la condensación de los cromosomas maternos (Yin et al., 2002). Nuestro grupo ha demostrado que la fusión de dos citoplasmas previamente enucleados y activados posterior a la fusión, solo permite divisiones tempranas (4-6 células) pero no se alcanzan los estadios de mórula o blastocistos. Estos resultados demuestran la ausencia de genoma embrionario y posiblemente las primeras divisiones sean a expensas de los ARNm y proteínas provenientes del ovocito maduro (datos no publicados).

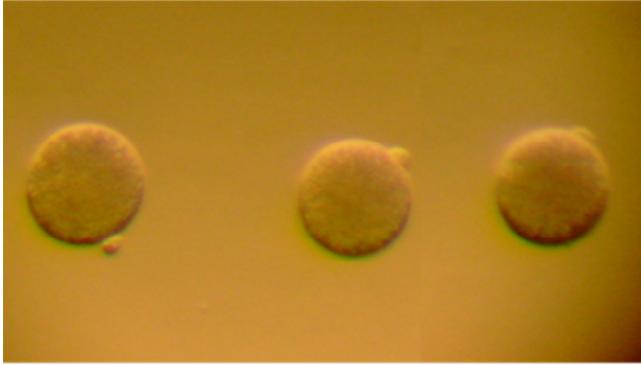


Figura 4. Visualización del plato metafásico en ovocitos bovinos maduros después de la incubación con demecolcina

La clonación sin micromanipuladores o HMC introduce el término “zona free” ya que la zona pelúcida es removida como se mencionó anteriormente. Este procedimiento demuestra que esta estructura no es esencial para el correcto desarrollo embrionario. Existe un crecimiento gradual en las investigaciones que demuestran la posibilidad del desarrollo de embriones producidos por FIV, partenogénesis así como por transferencia nuclear somática en ausencia de zona pelúcida. Los mayores resultados que avalan la eficiencia del procedimiento “zona free” se han obtenido a través del nacimiento de animales clonados por esta técnica en varias especies como bovino, porcino, ovinos y caballos (Peura et al., 2003; Vajta et al., 2004; Kragh et al., 2004; Du, 2007). La transferencia de los embriones carentes de zona pelúcida a hembras receptoras, no presenta mayores dificultades que la transferencia de embriones con zona. Por el contrario, parece ser que los embriones libres de la zona, superan las dificultades para protruir que suele ser una limitante en los embriones producidos *in vitro*, debido al endurecimiento de la zona pelúcida como consecuencia del cultivo *in vitro* (Vajta, 2007). Las tasas de gestación a partir de la transferencia de embriones “zona free” son alrededor del 50% tanto en bovinos como en cerdos (Lagutina et al., 2007).

La ausencia de zona pelúcida genera un inconveniente en el cultivo *in vitro* ya que estos embriones tienden a agregarse y formar un macizo celular a partir de varios embriones. Este problema ha sido resuelto a través de la implementación del sistema de cultivo “Well on the Well” (WOW) (Vajta et al., 2000a). Este sistema consiste en realizar pequeñas perforaciones o pozos en el fondo de una placa de cultivo, los embriones son ubicados individualmente en cada uno de los pozos y de esta forma se evita la agregación entre ellos.

La mayor dificultad de este sistema es que aún no existen comercialmente, placas de cultivo con esta modificación por lo que tienen que ser preparadas en el laboratorio para cada día de trabajo con los riesgos de contaminación que involucra la manipulación. Otra dificultad que presenta este sistema de cultivo es que los blastocistos expandidos pueden adherirse fácilmente a las paredes de los pocillos, lo cual dificulta su recuperación provocando el colapso de los embriones. El cultivo en microgotas de los embriones carentes de zona, sería una alternativa para evitar la aglomeración de éstos. No obstante, este sistema no permite el intercambio de nutrientes y factores paracrinos que se produce entre los embriones durante el cultivo, los cuales ejercen un efecto positivo sobre la capacidad de desarrollo de los embriones. Por el contrario, el sistema WOW sólo mantiene el aislamiento físico de los embriones pero compartiendo el mismo medio de cultivo.

Finalmente una de las mayores ventajas de la clonación somática sin micromanipuladores son los bajos costos asociados a la técnica y la baja complejidad del proceso. Como su nombre lo indica el hecho de no necesitar sistemas sofisticados para la micromanipulación, incluyendo un set de dos micromanipuladores y un microscopio invertido con sistema de fluorescencia, equivale a un ahorro significativo en los costos asociados a equipamiento. Además no es necesaria la compra de instrumentos auxiliares para la fabricación de microinstrumentos como pipetas de enucleación, reconstrucción y sujeción, cuyo costo es similar o superior al del sistema de micromanipulación.

A pesar de los avances en los estudios relacionados con la implementación de la transferencia nuclear somática sin micromanipuladores, se han logrado resultados concretos en pocas especies. La mayoría de los datos existentes se refieren a la eficiencia de la técnica para la producción de embriones pre-implantatorios. Hasta el momento, existe muy poca información en la literatura sobre los aspectos moleculares relacionados con la reprogramación nuclear y el desarrollo pre y peri-implantatorio (se refiere al desarrollo desde el estadio de blastocisto hasta el momento de la implantación) de embriones producidos por HMC que puedan indicar la calidad de estos embriones y predecir el éxito de la técnica en término de animales nacidos vivos.

Desarrollo temprano de embriones bovinos

Desde el momento de la fecundación o activación en el caso de la transferencia nuclear hasta el estadio de mórula, día 5 en embriones bovinos, solo se produce división celular, sin aumento en el tamaño de los embriones, las mórulas presentan un diámetro de 150 μm . El período entre la fecundación y el estadio de blastocisto se conoce como etapa pre-implantatoria. La primera división celular se produce entre las 18 y las 24 horas después de la fecundación y a los 5-6 días el embrión contiene entre 16 y 32 células, en este momento comienzan a formarse uniones estrechas entre las células llevando a la compactación y se alcanza el estadio de mórula. Se conoce que la compactación es el primer paso esencial para la diferenciación y es fundamental para dar lugar a un blastocisto viable. Al día 7 los embriones forman la cavidad y se produce la primera diferenciación celular dando lugar a las células del macizo celular interno (ICM, según siglas en inglés) que dará lugar a tejido embrionario y a las células del trofoblasto, destinado a producir tejido extraembrionario o placentario. En este estadio el embrión tiene alrededor de 120 células de las cuales aproximadamente el 25% pertenecen al ICM y el 75% al trofoblasto (Morris et al., 2001).

In vivo, los embriones en estadio de blastocisto permanecen dentro de la zona pelúcida y continúan expandiéndose o aumentando de tamaño alcanzando un diámetro de 200 μm y aproximadamente 160 células (Morris et al., 2001). Al día 8 los blastocistos expandidos son liberados de la zona pelúcida y continúan expandiéndose hasta el día 13 donde adoptan una forma esférica. Posteriormente los embriones se elongan hasta el momento de la implantación al día 21 post fecundación, alcanzando aproximadamente 300 mm de longitud (Betteridge y Flechon 1988; Hue et al., 2001; Maddox-Hyttel et al., 2003). Estos cambios incluyen dos fases reconocidas como elongación temprana (entre los días 12-14 post-fecundación; estadio ovoide) y elongación tardía (a partir del día 15 hasta la implantación; fase filamentosa). Esta ventana de crecimiento desde que el embrión es liberado de la zona (día 8) hasta el momento previo a la implantación es característica de los mamíferos con implantación tardía como es el caso de rumiantes y se define como etapa peri-implantatoria.

Expresión génica durante los periodos pre y peri-implantatorios

La expresión génica en embriones bovinos pre-implantatorios se caracteriza por dos fases cinéticas; la mayoría de las proteínas expresadas antes de la activación del genoma embrionario son producidas a partir del ARNm materno mientras que la correcta expresión de los genes del cigoto, está conducida por una intensa transcripción y traducción del nuevo genoma. El momento de la activación del genoma embrionario varía en dependencia de la especie, en bovinos esto ocurre entre la cuarta y la quinta división celular y está condicionada a una serie de factores que determinan la continuidad o no del desarrollo embrionario (Figura 1). Durante la etapa de activación del genoma embrionario, éste tiene que ser capaz de expresar todos los genes necesarios para continuar el desarrollo, para ello debe modificar la estructura de la cromatina y responder al estrés causado por el medio donde se desarrolla. Estos cambios son aún más complejos y difíciles de superar cuando se trata de un núcleo totalmente diferenciado como es el caso de una célula somática transferida en un ovocito para producir un embrión clonado.

La expresión de los genes, marcadores de las diferentes etapas de desarrollo, varía entre las especies. La mayoría de la información disponible se refiere a marcadores murinos, sin embargo entre ratones y bovinos la formación del blastocisto y la implantación no solo se diferencian en el tiempo si no también en los mecanismos de regulación de estos procesos. En ratones, se pueden distinguir dos tipos celulares en el trofoectodermo: las células que cubren el ICM o trofoblasto polar y las que rodean el blastocelo o trofoblasto mural. En los embriones bovinos las células del trofoblasto polar que rodean el ICM, también llamada “Rauber’s layer”, desaparece rápidamente después que el blastocisto se expande y protruye (Degrelle et al., 2005).

Uno de los genes más importantes durante la etapa temprana del desarrollo embrionario es OCT4 (Octamer-binding transcription factor-4; según siglas en inglés) el cual pertenece a la familia POU de factores de transcripción. El grado de semejanza del gen de OCT4 y de la proteína entre las especies sugiere que este gen juega un papel similar en todas las especies de mamíferos. Se conoce que esta proteína es de los factores de transcripción que más tempranamente se expresa en embriones y la que tiene mayor efecto en el desarrollo murino pre-implantatorio (Okamoto et al., 1990; Scholler et al., 1989, 1990; Rosner et al., 1990) dependiendo, dicho efecto, de su concentración en el núcleo (Niwa et al., 2000). Por tanto, se reconoce que la sola presencia de la

proteína de OCT4 no define pluripotencia ya que los niveles de expresión de éste gen condicionan su capacidad de mantener el estado indiferenciado de las células.

En embriones pre-implantatorios, OCT4 se expresa uniforme y abundantemente en todas las células hasta el estadio de mórula. En embriones bovinos, OCT4 se expresa tanto en las células embrionarias propiamente, como en las del trofoblasto durante la elongación temprana lo cual tiene una profunda implicación para un fenotipo de intensa proliferación que se observa durante este período de desarrollo (Keefer et al., 2007). Esta expresión se apaga en el trofoblasto mural durante la etapa más tardía de la elongación (Degrelle et al., 2005). En bovinos, la expresión de OCT4 en el trofoblasto del blastocisto se reportó por primera vez por van Eijk y colaboradores (1999). Sin embargo, como ya se mencionó, esta expresión es apagada solamente al término de la elongación en las células del trofoectodermo (Degrelle et al., 2005).

Recientemente se ha aceptado que el desarrollo del linaje trofoblástico sigue una ruta establecida como resultado de la “downregulation” de OCT4 y sus dianas (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000; Pesce y Scholer, 2001). Sin embargo parece ser que la especificación y mantenimiento del trofoblasto son reguladas positivamente a través de la acción de otros factores de transcripción (Donnison et al., 2005; Strumpf et al., 2005). Tres de estos factores son conocidos por estar involucrados en la proliferación del epiblasto/ICM: 1) CDX2 responsable de la especificación del trofoblasto versus células del ICM, 2) Eomesodermin (EOMES) controla la interacción entre las células del trofoblasto polar y mural y 3) ELF5 participa en la decisión de cuál, el ectodermo extraembrionario (ExE) o el cono ectoplacentario (EPC), será formado a partir del linaje polar.

NANOG, al igual que OCT4 es un factor de transcripción que mantiene el estado pluripotente de las células embrionarias y las células madres (Foygel et al., 2008). Recientemente se demostró la expresión de NANOG en embriones bovinos y tal como se esperaba los patrones de expresión de OCT4 sugieren a NANOG como un inductor “Upstream” (Degrelle et al., 2005). Sin embargo, a diferencia de OCT4 la expresión de NANOG no fue silenciada en las células del trofoblasto en blastocistos elongados en la fase más cercana a la implantación, sugiriendo un papel de NANOG en los eventos más tardíos del desarrollo peri-implantatorio por lo menos en bovinos.

Como regla general, la proliferación celular es activa al comienzo de la elongación mientras que las interacciones célula-célula y célula-matriz son predominantes durante el final de la elongación en vacas (Ushizawa et al., 2004, Degrelle et al., 2005). Durante esta etapa de elongación las células del trofoblasto proliferan y se diferencian formando las células

monocleares y las binucleares o células gigantes del trofoblasto (TGC). La población de células mononucleares son la mayor contribución del trofoblasto a la placenta y están involucradas en la producción de interferón tau (IFN τ), lo cual constituye la señal para el reconocimiento de la preñez. Las células gigantes pueden alcanzar un contenido de ADN superior a 32n y representan el 20% de las células del trofoblasto, migran a través de las uniones feto-maternas y se funden con las células del epitelio uterino (Klisch et al., 1999). Estas células gigantes producen proteínas relacionadas con la gestación como glicoproteínas, lactógeno placentario y proteínas relacionadas con prolactina.

Es necesaria una apropiada comunicación y regulación recíproca entre el embrión y los compartimentos maternos para que se produzca una adecuada implantación. Este diálogo es inicialmente mediado por factores solubles que son producidos y secretados tanto por la madre como por el embrión. Klein y colaboradores (2006) llevaron a cabo un estudio de transcriptómica de los genes que se encienden durante el periodo peri-implantatorio en endometrios de vacas de 18 días de gestación. De esta forma encontraron 87 genes que se encienden en el endometrio de una vaca gestante versus un control, no gestante, usando un modelo de gemelos homocigóticos para evitar la variabilidad genética. Estos genes identificados, se encuentran involucrados, por lo menos, en cinco procesos de la interacción entre el embrión y el ambiente materno (Klein et al., 2006).

En bovinos, no se conoce la mayoría de los genes que conllevan a la diferenciación del trofoblasto, por tanto los investigadores se han basado en la información de otras especies. Mediante un estudio de inactivación de genes en ratones, se han identificado dos genes que son esenciales para la diferenciación del trofoblasto: MASH2 (factor de transcripción miembro de la familia *achaete-scute*) (Guillemot et al., 1995) y HAND1 (factor de transcripción) (Cross et al., 2005). Estos genes tienen una función opuesta durante el desarrollo del trofoblasto, donde MASH2 estimula la proliferación celular e inhibe la progresión del trofoblasto a una forma terminalmente diferenciada de las células gigantes, mientras que HAND1 provoca la formación de las células gigantes (Rossant et al., 1998; Riley et al., 1998).

En bovinos, MASH2 es expresado específicamente en la placenta pero en mayor abundancia durante la proliferación del trofoblasto antes de la implantación (Arnold et al., 2006). HAND1 no es detectado en embriones bovinos hasta el estadio ovoide (12 días de desarrollo), lo cual coincide con la diferenciación del trofoblasto antes de la implantación (Degrelle et al., 2005). Por

otra parte se sabe que el interferón tau (INFtau) es una de las principales proteínas secretadas por el trofoblasto y es esencial para el reconocimiento y mantenimiento de la preñez temprana. INFtau es expresado por las células monucleadas del trofoblasto, su expresión es detectada durante la formación del blastocele y continúa hasta la implantación en los días 25-28 de gestación. Otra familia de proteínas secretadas por el trofoblastos son las proteínas asociadas a la preñez (PAG), las cuales son expresadas en las células gigantes del trofoblasto (TGC). Estas proteínas son expresadas más tardíamente, alrededor de los días de la implantación (Arnold et al., 2006). Otras proteínas secretadas por el embrión cuya expresión aumenta a medida que el embrión se elonga son: prostaglandina sintetasa (PGHS-2) e inhibidores de proteasas de la familia TKDP (Charpigny et al., 1997; MacLean et al., 2003).

Expresión génica en embriones clonados

Aún no se conoce exactamente cuales son los mecanismos moleculares responsables de la baja eficiencia en la producción de embriones clonados, sin embargo, el éxito de la técnica se basa en una adecuada reprogramación de una célula totalmente diferenciada a un estado totipotente embrionario. Se ha demostrado que la TNS puede provocar por sí misma cambios dramáticos en los patrones de expresión de algunos genes, lo cual puede resultar en la baja capacidad de desarrollo de estos embriones en todos los estadios: pre, peri y post-implantatorios así como múltiples problemas fetales y postnatales como el llamado “Síndrome de feto grande” (Garry et al., 1996; Walker et al., 1996; Ranilla et al., 1998; Zhan et al., 2004).

Durante la transferencia nuclear la célula donante aporta el material genético mientras que el ovocito aporta el citoplasma donde este núcleo será “reprogramado” para dar inicio al desarrollo embrionario. La reprogramación de la información genética se define como la transformación de los patrones de expresión de los genes, característicos del núcleo donante diferenciado, a uno que es adecuado para el desarrollo temprano de los embriones. La expresión inapropiada de algunos genes después de la reprogramación nuclear, es la principal responsable de la baja eficiencia de la técnica, donde se logra de 1-2% de desarrollo a término de los embriones, comparado con un 75% de los embriones que se obtienen por fecundación normal de los ovocitos (Pedersen, 2003). El éxito de la reprogramación puede ser evaluado por cambios visualizables durante el desarrollo pre-implantatorio como el tiempo de división, compactación y formación de la cavidad del

blastocisto. La producción de embriones pre-implantatorios por transferencia nuclear puede ser tan eficiente como la fecundación *in vitro* en término de porcentajes de blastocistos obtenidos. Las diferencias comienzan a manifestarse después de la primera diferenciación celular en el estadio de blastocisto cuando se forma el macizo celular interno y el trofoblasto. En este momento la capacidad de estos embriones de continuar su desarrollo, implantarse y dar lugar al nacimiento de un animal saludable, depende del nivel de reprogramación que sufrió el núcleo donante y por tanto de la expresión de los genes importantes en cada etapa de desarrollo.

Los estudios realizados sobre los patrones de expresión génica en embriones pre y peri-implantatorios han demostrado la existencia de genes esenciales para estas etapas del desarrollo y para el mantenimiento de las características de las diferentes estirpes celulares (ICM y TB). El análisis de la expresión génica embrionaria, es un área en crecimiento. La mayoría de los datos recientes, encontrados en la literatura, se refieren a la expresión génica durante la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario temprano pero no en etapas tardías del desarrollo (Wrenzycki et al., 2001; Badr et al., 2007; Rodríguez-Zas et al., 2008). En bovinos se ha demostrado que se produce la expresión aberrada de muchos genes después de la activación del genoma embrionario. Estos genotipos aberrados incluyen la ausencia de la expresión de genes como HSP70 (proteína de shock térmico 70), así como cambios en los niveles de expresión génica (disminución de la ADN metiltransferasa nuclear: DNMT, incremento de MASH2 y variabilidad en la expresión como interferón tau por mencionar algunos ejemplos) (Wrenzycki et al., 2001).

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo existen múltiples factores que afectan la eficiencia de la TN. Hasta este momento este efecto se ha descrito en números porcentuales que reflejan la capacidad de desarrollo de los embriones, no obstante las bases moleculares que determinan la calidad y capacidad de éstos están dadas por la reprogramación nuclear. Por tanto, los factores mencionados (biológicos y físicos) afectan directamente la expresión génica después de la transferencia nuclear que se ve reflejada en los porcentajes de blastocistos, gestaciones y número de animales nacidos vivos.

La fuente de núcleos donantes es uno de los factores que tiene una mayor influencia sobre los patrones de expresión de los genes en animales clonados (y en embriones). Existen reportes de varios genes cuya expresión se ve afectada por el origen y característica de las células donantes. Ejemplos de estos genes son IL6 (interleuquina 6), FGF4 (factor de crecimiento de fibroblasto

4), FGFr2 (receptor para factor de crecimiento de fibroblasto) y HSP70, cuya expresión se ve afectada en clones bovinos producidos a partir de células de la granulosa pero no a partir de células epiteliales fetales (Daniels et al., 2000; 2001; Wrenzycki et al., 2001). Más recientemente un estudio realizado de la expresión de 13 genes involucrados en funciones que determinan el desarrollo embrionario, en clones bovinos producidos a partir de células del cúmulo y fibroblastos, se determinó que sólo se encuentra altera la expresión del gen BCL-2 (gen anti-apoptótico) en estos embriones (Amarnath et al., 2007).

Por otra parte, Beyhan y colaboradores (2007b) demostraron que en embriones bovinos existen diferencias en la expresión de genes como OCT4, histona deacetilasa-1, -2, -3 (HDAC-1, -2, -3), ADN metiltransferasa-3a (DNMT3A) entre embriones producidos por TN, utilizando células con diferente potencial para producir clones vivos. Los embriones producidos a partir de la transferencia de células con mayor capacidad para producir animales vivos, presentaron una tendencia de expresión de dichos genes, similar a los embriones producidos por FIV aún cuando estos niveles continuaron siendo significativamente diferentes (Beyhan et al., 2007b). Estos resultados demuestran que a pesar de que una línea celular sea más eficiente para la producción de animales clonados, por lo general muchos de los embriones producidos presentan patrones de expresión génica diferentes a los embriones producidos por FIV, lo cual explicaría las diferencias en la eficacia de cada una de estas técnicas.

Otros ejemplos de esto son los estudios realizados por Hall y colaboradores los cuales encontraron que la expresión de Acrogranina, CDX2, EOMES, HAND1 y ERR2 se encuentra derregulada (2005) en blastocistos bovinos clonados (Hall et al., 2005), mientras que Degrelle y colaboradores sí han reportado la expresión de CDX2 y HAND1 en blastocistos producidos de forma natural (Degrelle et al., 2005). Uno de los genes más estudiados es el marcador de pluripotencia OCT4 debido a su importancia durante el desarrollo embrionario temprano. Estudios realizados en clones murinos, bovinos y porcinos han mostrado que la expresión de este gen también puede variar en relación con los niveles de expresión observados en embriones producidos *in vitro* (Boiani et al., 2002; Beyhan et al., 2007b; Kumar et al., 2007).

De forma general existe una gran diferencia entre los patrones de expresión génica de embriones clonados y producidos por FIV o de forma natural, independientemente de la especie. No obstante, ninguno de los genes estudiados, mencionados anteriormente, puede ser responsables por sí solo, de la gran cantidad de clones fallidos. Esto sugiere que la reprogramación nuclear

puede generar marcas epigenéticas anormales en el genoma de los embriones clonados. Las modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN, la acetilación de las histonas, la conformación de la cromatina, la arquitectura nuclear y los microRNA, modulan el funcionamiento genómico (Zuccotti et al., 2000). Cambios en uno de dichos sistemas de regulación epigenética, pueden conllevar a modificaciones en la expresión de los genes y con esto, a anomalías en el desarrollo embrionario. Estudios epigenéticos realizados en embriones clonados, murinos y bovinos, muestran que en estos embriones se produce la inactivación del cromosoma X, no obstante en muchos de estos embriones esta inactivación es incorrecta (Eggan et al., 2000; Wrenzycki et al., 2005).

Las bases fundamentales de la reprogramación nuclear consisten en la capacidad que tiene el citoplasma receptor de borrar los patrones de expresión génica de la célula donante. Para ello es necesario establecer las nuevas características epigenéticas que darán lugar al desarrollo embrionario. Aproximadamente el 75% de las islas de CpG de los promotores en las células somáticas, se encuentran metilados mientras que en embriones pre-implantatorios este porcentaje no sobrepasa el 5%. Se ha demostrado que los porcentajes de metilación de los embriones clonados semejan más al de la célula somática donante de núcleo que a un embrión en su mismo estadio de desarrollo. Existen estudios que indican que en embriones clonados e incluso en diferentes tejidos fetales, genes involucrados en el desarrollo como OCT4 pueden presentar diferentes patrones de metilación, comparados a los embriones producidos por FIV (Kremensky et al., 2006a y b; Yamazaki et al., 2006; Zhang et al., 2008). En embriones de ratón los patrones de metilación del promotor de OCT4, también van a depender de las células utilizadas como donante de núcleo (Blelloch et al., 2006). Estos resultados justifican los problemas asociados a la expresión de OCT4 que se presenta en los embriones clonados de diferentes especies.

Por otra parte, a pesar de la onda de demetilación que se produce en los embriones pre-implantatorios, los genes “imprinted” permanecen metilados o son metilados de novo después de la implantación. Los genes “imprinted” son expresados sólo a partir de uno de los alelos parentales y la metilación del ADN facilita esta expresión monoalélica. Debido a los errores que se producen en el borrado de los patrones de metilación de las células somáticas después de la transferencia nuclear, en los clones muchos de estos genes también presentan diferencias en sus patrones de expresión. En clones bovinos genes “imprinted” como IGF2r (receptor para el factor de crecimiento tipo insulina tipo 2) y SNRPN (pequeña ribonucleoproteína, polipéptido N) se

encuentran diferencialmente expresados con respecto a lo observado en embriones de FIV (Lucifero et al., 2006; Long et al., 2007).

Los estudios realizados sobre el desarrollo de los embriones durante el periodo peri-implantatorio, generalmente se basan en las características morfológicas como tamaño, presencia de botón embrionario o aspecto general del trofoblasto. Estos son indicadores importantes de la viabilidad embrionaria, pero aportan muy poca información sobre las bases moleculares responsables de esas características y la interacción con el ambiente materno. El estudio de la expresión génica en embriones peri-implantatorios, permite identificar los genes que controlan este período de desarrollo y que conllevan a la correcta implantación en el útero materno. Esto es aún de mayor importancia en embriones clonados, teniendo en cuenta que se ha determinado que mucho de los embriones producidos por transferencia nuclear, presentan un patrón de expresión génica aberrado durante el periodo pre-implantatorio, cuando son comparados con aquellos producidos por fecundación, lo cual podría afectar la expresión de genes que se activan en etapas más avanzadas. Estos datos y el hecho que la mayoría de los embriones clonados que son transferidos a receptoras, son incapaces de continuar su desarrollo e implantarse, llevarían a pensar que mucho de estos embriones, aún cuando son capaces de alcanzar el estadio de blastocisto, presentan una aberrada expresión de los genes necesarios para la etapa del desarrollo peri-implantatoria.

Existen muy pocos reportes a cerca de la expresión génica en embriones bovinos durante el periodo de elongación. No obstante se ha demostrado que la expresión de genes como MASH2, INFtau, HAND1 y PAG9, se encuentra derregulada en comparación con los niveles de expresión determinada en embriones de FIV o producidos *in vivo* (Arnold et al., 2006). Es muy probable que las alteraciones del desarrollo de embriones clonados bovinos u otras especies, sean el resultado de una incompleta reprogramación epigenética de las células donantes. Esta inadecuada reprogramación, causaría directa o indirectamente, la sobre expresión de genes como MASH2 ó que los patrones de expresión varíen con respecto al estadio de desarrollo como es el caso de HAND1 ó EOMES. Mediante una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que están involucrados en el desarrollo embrionario, podríamos tener una mejor información sobre aquellos factores que regulan los eventos tempranos de reprogramación nuclear, formación del trofoblasto e implantación en de embriones clonados y como estos eventos pueden ser manipulados para mejorar la eficiencia de esta técnica.

Herramientas moleculares para la evaluación de la expresión génica en embriones

De lo mencionado en las secciones anteriores emerge el concepto de que la expresión génica en embriones es un campo en dinámica expansión, que se ha beneficiado del desarrollo de las herramientas analíticas más potentes de la biología molecular moderna aplicadas a las peculiaridades de las muestras biológicas (embriones) que por su pequeño tamaño y reducido número de células representan un reto para los sistemas analíticos. De manera general, las metodologías de estudio de la expresión génica en embriones pueden dividirse en dos grandes ramas, a saber, aquellas que estudian la expresión génica a nivel global y las que lo hacen a nivel de genes individuales. En el primer grupo se incluyen los microarreglos.

Un microarreglo se define como una serie de miles de oligonucleótidos de ADN de una secuencia conocida, representado en cantidades picomolares y adheridos a una superficie sólida (Schena et al., 1995). Los oligonucleótidos por lo general representan una pequeña sección de un gen u otro elemento compuesto por ácidos nucleicos. Estos oligonucleótidos conocidos como “eventos” (features en inglés) son usados como sondas para hibridar con un ADN complementario (ADNc) o un ARN amplificado (aRNA), conocidos como “dianas” o target en inglés. La hibridación sonda-diana es cuantificada mediante fluorescencia específica y se calcula la abundancia relativa de una secuencia determinada en la diana (Schena et al., 1995). Los primeros arreglos de ADN para detectar genes cuya expresión era modulada por interferón fueron fijados a papel de filtro e hibridados con sondas radiactivas (Kulesh et al., 1987). El primer microarreglo miniaturizado fue descrito en 1995 (Schena et al., 1995) y el primer microarreglo conteniendo un genoma completo de eucariontes (*Saccharomyces cerevisiae*) se publicó en 1997 (Lashkari et al., 1997).

En los microarreglos comunes los eventos son adheridos a superficies de silicona (se les conoce como Gene chip o Chips de Affymetrix, por la compañía que los introdujo y produce) o a portaobjetos de vidrio. Comercialmente existen innumerables Chips y portaobjetos que representan genomas expresados de distintos tejidos, órganos o células principalmente de ratón y humanos. Un microarreglo puede contener desde 10 sondas o eventos, hasta 2.1 millones (como es el caso de NimbleGen, de la firma Roche). A los primeros se les conoce en ocasiones como macro arreglos (Nuwaysir et al., 2002).

No existen sin embargo, chips o portaobjetos que contengan oligonucleótidos de embriones preimplantatorios, por lo que para estudiar la expresión de genes en embriones de cualquier especie se usan soportes sólidos que en el mejor de los casos contienen un número representativo de genes expresados en algunos tejidos de las especies de interés. La ausencia de estos sistemas comerciales se debe a las dificultades asociadas con la confección de librerías de expresión génica de embriones, lo cual a su vez está dado por el extremadamente escaso contenido de ácidos nucleicos en los mismos.

En el presente trabajo de tesis, por ejemplo, se utilizó un portaobjetos hecho con el producto de la sustracción de 8 librerías de ADNc de distintos tejidos reproductivos de bovinos, tales como ovario, útero grávido y no grávido, entre otros, que incluía aproximadamente 1800 genes expresados. Este microarreglo fue hecho artesanalmente y ha sido empleado de manera aislada por algunos investigadores para estudiar la expresión de genes embrionarios bovinos (El-Sayed et al., 2006). A través del uso de microarreglos, se pueden obtener los perfiles de expresión génica de miles de genes de modo simultáneo, así como comparar tratamientos versus controles en las más variadas áreas temáticas (célula infectada vs no infectada; célula tumoral vs no tumoral; arroz resistente a frío vs arroz convencional) y una larga lista de etcéteras, entre las que se incluyen embriones clonados vs embriones producidos *in vitro* o *in vivo*.

La desventaja del uso de los microarreglos radica en dos factores fundamentales: 1) el pequeño tamaño de las sondas en ocasiones y 2) la reacción cruzada entre especies. En el primer caso pueden no ser detectados genes cuya expresión sí está presente, pero no logran hibridar correctamente la sonda y la diana, dado el pequeño tamaño de la primera. En el segundo caso, si la sonda y la diana no son de la misma especie pueden implicar reconocimientos inespecíficos o también ausencia de reconocimiento (Adjaye et al., 2004). En el caso de la expresión génica a través de microarreglos en embriones, se presenta fundamentalmente el segundo problema debido a que la mayoría de los sistemas comerciales o artesanales incluyen oligonucleótidos murinos o humanos y no específicos de las especies, es por ello que se requiere de réplicas biológicas y técnicas (como cambio de colores de los fluorocromos sobre un mismo sustrato) para eliminar señales contaminantes o inespecíficas.

Muy ligados a las tecnologías de microarreglos se han desarrollado las herramientas bioinformáticas que permiten el manejo de mega bases de datos, así como de los programas adecuados para el procesamiento estadístico de los mismos, la adquisición de las imágenes, la

normalización de las señales, la eliminación de los ruidos, entre otras actividades. Este campo es enorme y en constante expansión y se sale del objetivo de esta revisión. El resultado de un microarreglo debe ser validado de algún modo, lo más común es seleccionar un grupo de genes encontrados en los arreglos y verificar su presencia y cantidad mediante técnicas como el PCR (siglas en inglés para polimerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa; Saiki et al., 1988).

Estas técnicas son las más comúnmente usadas para el estudio de la expresión de genes individuales. El PCR tradicional o llamado también de tiempo final es cualitativo pues no cuantifica la señal amplificada, mientras que el PCR en tiempo real es cuantitativo. Para el estudio de expresión de genes en ambos casos, se requiere previamente la conversión de los ARN mensajeros a ADN complementarios (ADNc) mediante la reacción de reverso transcripción llevada a cabo por la enzima transcriptasa inversa (RT). El conjunto de estas dos metodologías normalmente se le conoce como RT-PCR, dada la cercanía de términos entre RT y tiempo real (o Real time en inglés) a este PCR se le conoce como qPCR o PCR cuantitativo (Nolan et al., 2006).

Los PCRs cualitativo o cuantitativo son los más empleados para el estudio de la expresión de genes en embriones en diferentes estadios de desarrollo. El PCR es una técnica revolucionaria para la detección de ARN o ADN, sin embargo este ha avanzado desde la detección del producto al final de la reacción (PCR cualitativo) hasta la detección mientras ocurre la reacción (qPCR). El qPCR aporta mayor información sobre la expresión de ciertos genes ya que es mucho más sensible que el PCR tiempo final y permite determinar pequeña diferencias en los niveles de transcrito de dos muestras diferentes. Los métodos más comunes para la cuantificación mediante qPCR, consisten en el uso de tinciones fluorescentes que se intercalan en la hebra de ADN (SYBR Green) y en oligonucleótidos modificados que fluorescen cuando hibridan con el ADN complementario (TaqMan). En embriones se ha descrito el uso de PCR y qPCR para la detección y cuantificación de genes expresados, si bien la cantidad de ARNm y por ende de ADNc que se puede obtener es limitante (Degrelle et al., 2005; Arnold et al., 2006; Beyhan et al., 2007b).

Otros métodos de estudios de expresión génica como Northern blot, no son aplicables a embriones preimplantatorios por su escaso rendimiento de ARNm. En adición a los métodos descritos, la hibridación in situ es el más efectivo para localizar exactamente el sitio o sitios en los cuales está presente un ARNm en un embrión. La limitación de aplicar esta tecnología a

embriones viene dada de nuevo por la pequeña talla de los embriones, si bien se puede realizar (Maddox-Hyttel et al., 2003; Degrelle et al., 2005) y también por las dificultades de automatizar a escala de ensayos masivos. Por ende la hibridación in situ en embriones se usa de forma excepcional para la confirmación de la expresión de un gen o en el mejor de los casos de un reducido número de éstos.



HIPÓTESIS

La transferencia nuclear somática afecta la capacidad de desarrollo, expresada en términos morfológicos y de expresión génica, de los embriones clonados durante los periodos pre y peri-implantatorios, comparando con embriones producidos por fecundación *in vitro*.

OBJETIVO

Evaluar la capacidad de desarrollo *in vitro* e *in vivo* de embriones clonados utilizando análisis morfológicos y de expresión génica durante los periodos pre y peri-implantatorios.

Objetivos específicos

1. Comparar la capacidad de dos líneas celulares, adulta y fetal, de generar embriones clonados.
2. Evaluar la capacidad de desarrollo de los embriones clonados en estadio pre, peri y post-implantatorio.
3. Analizar cualitativa y cuantitativamente, por PCR tiempo final y tiempo real, los patrones de expresión de genes críticos para el desarrollo embrionario en estadio pre y peri-implantatorio.
4. Identificar mediante microarreglo, genes diferencialmente expresados durante el periodo peri-implantatorio, en embriones bovinos clonados comparados con embriones producidos por FIV.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo de tesis se llevó a cabo el siguiente esquema de trabajo.

Esquema general de trabajo

1. Aislamiento de líneas celulares para transferencia nuclear somática.
2. Estandarización de protocolos de transferencia nuclear sin micromanipuladores (HMC) para cada línea celular.
3. Generación de embriones pre-implantatorios (blastocistos *in vitro*)
4. Evaluación del desarrollo *in vitro* de embriones clonados producidos por dos líneas celulares diferentes (fetales y adultas).
5. Transferencia de embriones en estadio de blastocisto a receptoras sincronizadas.
6. Recuperación y evaluación morfológica de embriones clonados y generados por FIV en estadio peri-implantatorio (elongados).
7. Evaluación molecular de calidad de embriones clonados en estadio pre y peri-implantatorio
 - 7.1. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos.
 - 7.2. Estudio cualitativo por PCR de genes importantes para el desarrollo embrionario temprano.
 - 7.3. Estudio cuantitativo por qPCR de genes importantes para el desarrollo embrionario temprano.
 - 7.4. Estudio de la expresión génica por microarreglo en embriones peri-implantatorios clonados y producidos por FIV.
 - 7.5. Validación por qPCR de los niveles de expresión de genes diferencialmente expresados en las muestras experimentales (clones) y los controles (FIV).
8. Evaluación del desarrollo post-implantatorio de embriones clonados.

Descripción de materiales y métodos

Salvo que se indique explícitamente, todos los reactivos y medios de cultivo utilizados tanto para el trabajo con células, como con ovocitos y embriones, fueron de la firma Sigma (St Louis, Missouri, Estados Unidos). El esquema cronológico del desarrollo del trabajo, es presentado en el Anexo 1.

1. Aislamiento de líneas celulares para transferencia nuclear somática

1.1. Células fetales

Para la obtención de la línea celular fetal (LCF) se recuperó un feto hembra a partir de una vaca con 50 días de gestación aproximadamente, la cual fue sacrificada en el matadero (Carnes Ñuble, Región VIII, Chile) dentro los programas rutinarios de sacrificio. Los procedimientos de obtención de líneas celulares han sido descritos anteriormente por Hayes y colaboradores (Hayes et al., 2005a, b). Brevemente, el feto fue colectado en solución salina fisiológica estéril (NaCl 0.9%), suplementado con una mezcla comercial de antibióticos y antimicóticos (Gibco, BRL Bethesda, MD, USA), se tuvo especial cuidado en no romper el saco amniótico para evitar contaminaciones. Una vez en el laboratorio, dentro de la campana de flujo laminar, se extrajo el feto del saco amniótico y se lavó 5 veces con solución buffer fosfato (PBS) suplementada con antibiótico-antimicótico. Se extrajo un fragmento de cuadriceps de una de las extremidades posteriores, el cual se trozó en fragmentos de aproximadamente 1-2 mm². Los fragmentos fueron meticulosamente lavados mediante pases sucesivos (n=10) en la misma solución pero en diferentes placas de cultivo. El tejido fue digerido por 18 horas en 500 µl de colagenasa (1 mg/mL en medio DMEM-F12 suplementado con antibióticos-antimicóticos y 10% SFB) a 37 °C, con agitación orbital. Una vez finalizada la digestión, se resuspendió vigorosamente el tejido para desprender células que aún pudieran encontrarse adheridas al mismo, se dejó reposar por 3 minutos y se recuperó cuidadosamente el sobrenadante, el cual fue sembrado en placas Petri de 60 mm, plásticas y estériles.

El volumen del cultivo se completó a 7 mL con medio DMEM-F12 suplementado con 1 mM de glutamina, 0.2 mM de piruvato, 10 ng/mL de EGF (epidermal growth factor) y 30% de suero

fetal bovino (SFB). El tiempo de cultivo fue de 10 días, durante el cual se cambió una vez (día 5) la mitad del medio, reponiéndose con igual volumen de medio fresco. Transcurrido este período, los cultivos primarios (pase 0) fueron expandidos mediante subcultivo 1:3 a placas nuevas empleando tripsina-EDTA al 0.025% (pase 1). La acción de la tripsina se detiene adicionando medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Las células fueron dejadas en cultivo hasta alcanzar un 100% de confluencia y fueron de nuevo tripsinizadas, colectadas y congeladas en viales Nalgene de 2 mL (Nalgene, Inc, Dinamarca) a razón de 3×10^6 células/mL (pase 2) en medio de cultivo suplementado con 10% SFB y 8% de DMSO (dimetil sulfóxido). La congelación se llevó a cabo mediante un gradiente de -1 °C por minuto, empleando el sistema Mister Frosty (Nalgene, Inc, Dinamarca) en el interior de un congelador comercial de -80 °C. Los viales de congelación permanecieron en este sistema por 72 horas, después de las cuales se les introdujo al interior de un tanque criogénico con nitrógeno líquido a -196 °C.

De este modo, se creó un banco maestro congelado con células en pase 2. Para el trabajo de rutina, se descongeló un vial del banco maestro, mediante inmersión en baño a 39 °C por 1 minuto, las células se sembraron y cultivaron como se ha descrito y se expandieron 1:5 en pase 3, para posteriormente congelarlas en pase 4, tal como se describió anteriormente, creando así el banco de trabajo. Para el trabajo de rutina en el laboratorio, se emplearon siempre células descongeladas del banco de trabajo.

1.2. Células adultas

La línea celular adulta (CWA) fue obtenida a partir de una muestra de oreja de una vaca adulta de raza Wagýú, según los protocolos establecidos por Tovar y colaboradores (2008). Para ello la oreja se limpió varias veces con alcohol hasta eliminar cualquier resto de suciedad, posteriormente se rasuró para evitar la contaminación adherida a los pelos. Una vez limpia la oreja, con ayuda de un bisturí se tomó un pequeño fragmento de pabellón auricular y éste se lavó 10min en etanol al 70%. Transcurrido el tiempo de lavado en etanol, el fragmento de tejido se pasó a un tubo con PBS con antibiótico para ser trasladado al laboratorio. En el laboratorio, se eliminaron los restos de pelos con bisturí estéril y el trozo de piel se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 mm cuadrado. El tejido cortado se lavó varias veces en PBS con antibióticos antes de ser sometido a la digestión con colagenasa. El cultivo primario, expansión, congelación

y creación de los bancos maestros y de trabajo se llevó a cabo de manera idéntica a la descrita para las células fetales. Los cultivos celulares fueron chequeados bajo microscopio invertido (Nikon, Nikon Corporation, USA).

2. Estandarización de protocolos de transferencia nuclear sin micromanipuladores (HMC) para cada línea celular

2.1. HMC

La transferencia nuclear somática se realizó siguiendo los procedimientos generales según el método descrito por Vajta y colaboradores (2001). Como citoplastos receptores se utilizaron ovocitos obtenidos de ovarios de vacas de matadero y madurados *in vitro*. Para cada grupo de trabajo se colectaron aproximadamente 30 ovarios y fueron trasladados al laboratorio en solución salina más antibióticos/antimicóticos a una temperatura entre 33 y 35 °C. Se puncionaron los folículos entre 3 y 8 mm con ayuda de una jeringa y aguja de 18G. El líquido folicular se colectó en tubos de 15 mL y se mantuvo a 37 °C hasta el momento de la selección de los ovocitos. Para la colecta se dejó decantar el contenido de líquido folicular y se eliminó la mayor cantidad posible de sobrenadante, el sedimento se mezcló con medio de manipulación (TCM199 con 4 mM de bicarbonato, 18 mM de hepes, 10% de SFB y 50 µg/mL de gentamicina).

Se seleccionaron los ovocitos grado I y II que corresponden a aquellos que presentan un citoplasma homogéneo y oscuro y abundantes células del cúmulo (no degenerado). La maduración se realizó en una placa de cuatro pocillos (Nunc, Rochester, NY, USA) (entre 25 y 30 ovocitos por pocillos), durante 21 horas a 39 °C y atmósfera de 5% de CO₂ en medio TCM199 suplementado con 0.6 mM de glutamina, 0.2 mM de piruvato, 0.01 U/mL de FSH y LH, 1 µg/mL de estradiol, 50 µg/mL de gentamicina, 10 ng/mL de EGF y 10% SFB. Transcurrido el tiempo de cultivo, se evaluó la maduración ovocitaria mediante la expansión de las células del cúmulo y posteriormente por la extrusión del primer cuerpo polar. Se eliminaron las células del cúmulo pasando los ovocitos a un tubo de 1.5 mL con una solución de 0.3 mg/mL de hialuronidasa en medio de manipulación y se aplicó vórtex por 6 min a temperatura ambiente (TA: 25 °C). Una vez eliminadas las células del cúmulo, se realizó una segunda clasificación

donde se eligieron para la enucleación, los ovocitos con primer cuerpo polar y sin daños en la membrana citoplasmática.

Posteriormente, se adicionó Demecolcina (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al medio de maduración empleado para promover la formación del cono con el plato metafásico que sirvió como guía para la enucleación. Los ovocitos se incubaron en el medio con demecolcina por 2 horas previo a la enucleación. Finalizado este periodo, se eliminó la zona pelúcida mediante incubación de los ovocitos a 35 °C en TCM Hepes (2% SFB) más 2 mg/mL de pronasa, la placa se agitó constantemente para ayudar a la digestión de la zona. Los ovocitos desnudos carentes de zona se transfirieron a gotas de 20 μl de medio de manipulación (TCM hepes con 30% de SFB) en grupos de 10 ó 12 ovocitos por gota. La enucleación consistió en la eliminación de una parte del citoplasma que contiene el plato metafásico con la ayuda de una microcuchilla (AB technology, Pullman, WA, USA). Se seleccionaron las mitades enucleadas mayor o igual que el 50% del volumen citoplasmático original para la reconstrucción de los embriones. La manipulación se realizó bajo un estereomicroscopio en aumento 40x utilizando contraste para la visualización del plato metafásico (Leica, Wild, Suiza).

Transferencia nuclear, fusión y cultivo

Como donante de núcleo se utilizó por separado, una de las líneas celulares obtenidas (LCF y CAW) entre los pases 4 y 8. Las células fueron descongeladas a 39 °C y mantenidas en cultivo sin privación de suero de forma que alcanzaran la confluencia en medio DMEM-F12 más 10% SFB. Para la transferencia nuclear se utilizaron células con al menos 24 horas de confluencia. Solo fueron utilizadas aquellas células con la membrana citoplasmática intacta y que no presenten citoplasma granulado ni signos de desprendimiento de la superficie de la placa de cultivo. Aproximadamente una hora antes de la transferencia nuclear, las células fueron colectadas de la placa de cultivo mediante tratamiento con tripsina 0.025%. Las células individualizadas se mantuvieron a TA en un tubo de 1.5 mL con 1 mL de medio de cultivo hasta el momento de la reconstrucción de los embriones.

La reconstrucción y la fusión se realizaron por el método “sandwich” que consiste en adherir una célula somática a una de las mitades enucleadas y posteriormente adicionar un segundo citoplasto enucleado. Para ello, la primera mitad de citoplasto se incubó aproximadamente 5

segundos en una solución de 1 mg/mL fitohemoaglutinina (PHA) en TCM Hepes sin SFB. El complejo citoplasto-célula-citoplasto se fundió mediante un pulso de corriente directa de 100V (2 kV/cm) durante 9 μ seg en medio de fusión de 0.3 M de Manitol, 0.05 mM de CaCl₂, 0.1 mM de MgCl₂ y 1 mg/mL de polivinilalcohol (PVA). Se utilizó un electrofusor marca BLS (Budapest, Hungría, <http://www.bls-ltd.com>) y cámara de fusión BTX de 0.5mm de separación entre los electrodos, modelo 450, 01-000209-01 (BTX Corp, San Francisco, CA, Estados Unidos). Los complejos se pasaron a una gota con medio TCM Hepes más 20% SFB. La fusión se evaluó 30 min posterior al pulso eléctrico y se seleccionaron los embriones reconstruidos sin signos de lisis.

Para la reprogramación nuclear los presuntos embriones se incubaron por dos horas a 39 °C y atmósfera de 5% de CO₂ en medio TCM199 con 10% de SFB. Posteriormente el complejo reconstruido fue activado químicamente mediante la incubación durante 5 minutos a TA en 7% de etanol absoluto en medio TCM Hepes más 20% SFB, seguido por 5 horas de incubación a 39 °C y atmósfera de 5% de CO₂ en medio TCM199 más 5 μ g/mL de citocalacina B y 10 μ g/mL de cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas. Una vez finalizada la activación, los embriones reconstruidos se cultivaron durante 7 días, hasta estadio de blastocisto.

Los embriones se cultivaron de forma individual en sistema de cultivo “well on the well” (Vajta et al, 2000) en medio SOF, suplementado con 0.4 mM piruvato de sodio, 0.2 mM de L-glutamina, 1X de aminoácidos esenciales y no esenciales, 10 ng/mL de EGF, 2% de SFB, 0.1 mg/mL de ácido cítrico, 0.5 mg/mL de myo-Inositol y 0.3% de albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos. La placa de cultivo se selló en una bolsa hermética la cual se gasificó con una mezcla de aire que contiene 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂. Finalmente la bolsa con la placa de cultivo se mantuvo en una incubadora a 39°C durante todo el periodo de cultivo. No se evaluó la división a las 24h para evitar cambios en el pH y temperatura del medio de cultivo.

3. Generación de embriones pre-implantatorios (blastocistos *in vitro*)

El desarrollo embrionario fue evaluado el día 7 de cultivo y se seleccionaron los embriones en estadio de blastocisto. De los embriones generados a partir de cada línea celular, se tomaron 10 blastocistos al azar para el conteo celular. El resto de los embriones fueron utilizados para el estudio de la expresión génica durante los períodos pre y peri-implantatorios o para generar

gestaciones a término. Para el estudio de expresión génica se organizaron dos grupos de 10 blastocistos generados a partir de la línea celular fetal y cuatro grupos de 10 blastocistos generados con la línea adulta. Los embriones se mantuvieron en ARN^{later} (Ambion, Applied Biosystems) para la posterior extracción de ácidos nucleicos. El resto de los blastocistos generados con la línea celular adulta fueron transferidos para la evaluación del desarrollo *in vivo* (Figura 5).

Como controles se utilizaron embriones producidos por fecundación *in vitro* (FIV), para ello se utilizaron ovocitos madurados *in vitro* (según procedimiento descrito anteriormente). Los ovocitos fueron fecundados a las 24 horas de IVM con semen de un animal de raza Angus Rojo cuya motilidad y capacidad fecundante fue chequeada previamente. La capacitación del semen se realizó siguiendo los procedimientos de “swim up” en medio TALP Heps suplementado con 2 mM de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina y 3.0 mg/mL de BSA (Barile et al., 1990). Para la fecundación se transfirieron 25 ovocitos maduros a cada pocillo de una placa de cuatro pocillos y se incubaron con 1 millón de espermatozoides por 1 mL de medio de fecundación (TALP fecundación suplementado con 0.01 mg/mL de heparina, 2 mM de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina y 6 mg/mL de BSA libre de ácidos grasos). Una vez transcurrido el tiempo de fecundación los embriones fueron desnudaron y se cultivaron durante 7 días en medio SOF en placa de 4 wells, bajo las mismas condiciones que los embriones clonados. De los blastocistos producidos, 10 se utilizaron para la extracción de ácidos nucleicos y el resto se transfirieron a hembras receptoras para el estudio de desarrollo *in vivo*.

Los embriones utilizados para el estudio de expresión génica fueron transportados en ARN^{later} a TA al laboratorio de biología molecular del Instituto de Bioquímica Veterinaria de la Universidad Libre de Berlín, Alemania.

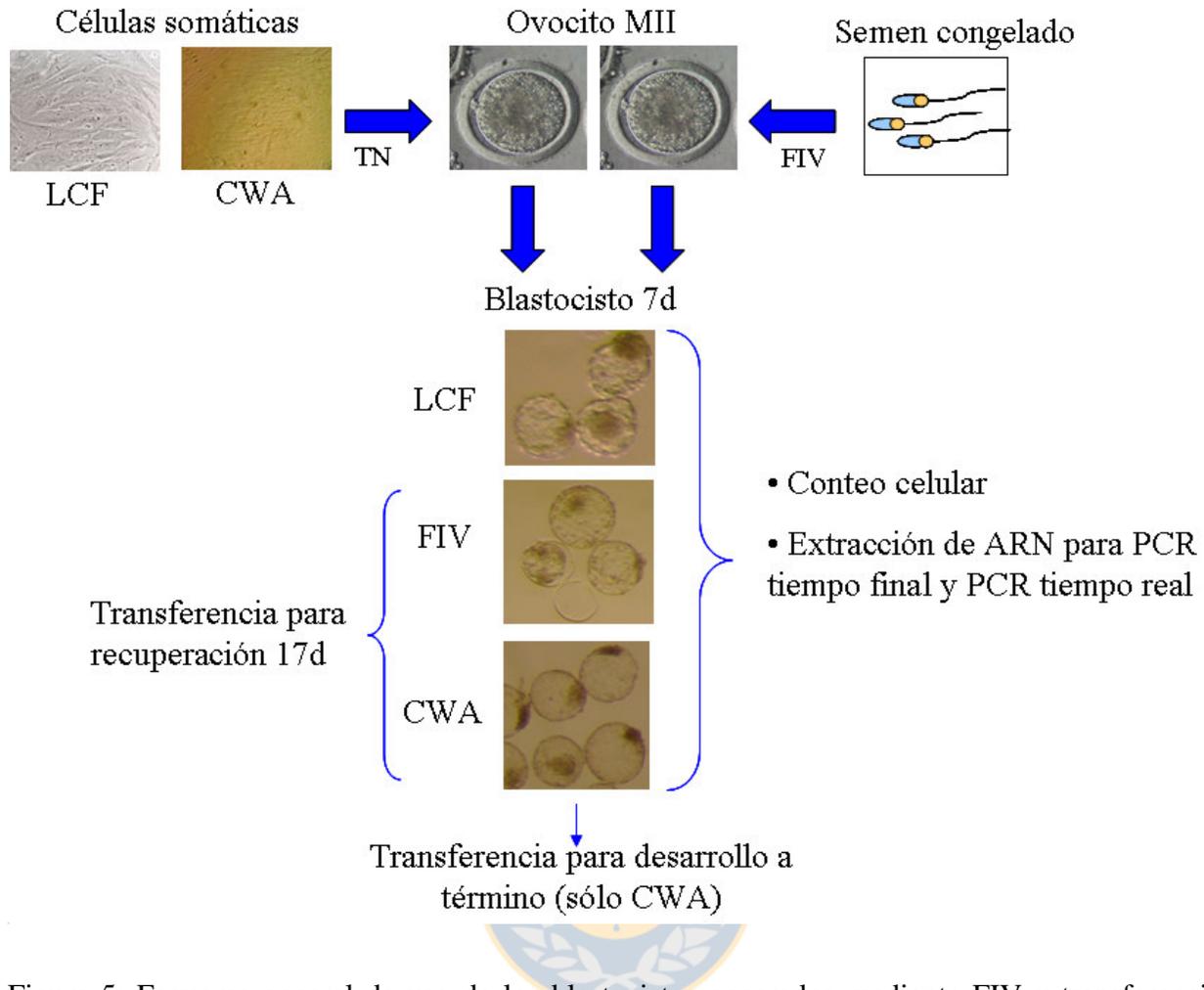


Figura 5: Esquema general de uso de los blastocistos generados mediante FIV y transferencia nuclear utilizando células fetales (LCF) y células adultas (CWA)

4. Evaluación del desarrollo *in vitro* de embriones clonados producidos por dos líneas celulares diferentes (fetales y adultas)

Para determinar la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones clonados generados a partir de ambas líneas celulares, se determinó el porcentaje de embriones en estadio de blastocisto a los 7 días de cultivo *in vitro*. Los blastocistos a su vez fueron clasificados según el grado de desarrollo en: blastocistos expandidos y blastocistos tempranos, características morfológicas (clara definición del macizo celular interno y del trofoblasto) (Gardner et al., 200) y además se determinó el número de células totales. El conteo celular se realizó fijando los blastocistos (clones y FIV) durante 24 horas en una solución de ácido acético/metanol (1:3 v/v).

Posteriormente se tiñeron con una solución de 1% de orceína en ácido acético 45% por 30 min. Finalmente las células totales fueron contadas bajo microscopio de contraste de fases.

5. Transferencia de embriones en estadio de blastocisto a receptoras sincronizadas

Los embriones en estadio de blastocistos (día 7) generados por FIV y por transferencia nuclear utilizando sólo la línea celular adulta como donante de núcleo, fueron transferidos de forma no quirúrgica a vacas receptoras previamente sincronizadas. Para el estudio del desarrollo peri-implantatorio se transfirieron 30 embriones clonados a 6 receptoras (5 embriones por receptora) y dos receptoras con grupos de 5 y 6 embriones de FIV. Posteriormente los embriones fueron recuperados al día 17 de desarrollo (10 de la transferencia) para la evaluación del desarrollo peri-implantatorio desde el punto de vista morfológico y molecular.

La sincronización de las receptoras se llevó a cabo a través del uso de dispositivos intravaginales de progestágeno sintético (1.38 gramos por esponja CIDR; EAZI-Breed™, InterAg, Hamilton, NZ) por 7 días, seguido por la administración intramuscular de 1 dosis de 1000 mg de PGF2 α , al momento de la remoción del dispositivo. Las vacas presentaron celo 24 horas después que se retiró el dispositivo intravaginal. El día del celo coincide con el día previo al desarrollo embrionario (considerando día 1 el día de la fecundación in vitro o de la TN).

Al día 7 de desarrollo los embriones clonados y de FIV fueron retirados de los pocillos de cultivo para evaluar el grado de desarrollo. Se seleccionaron para la transferencia aquellos embriones que se encontraban en estadio de blastocisto, preferiblemente grado I (expandido con clara formación de botón embrionario). Los embriones se transportaron dentro de las pajuelas de transferencia en PBS suplementado con 6% de BSA a 37 °C. Las hembras receptoras se mantuvieron en fundos privados en un radio cercano a la Universidad de Concepción, Campus Chillán, de forma que el tiempo de transporte de los embriones no excediera los 45 minutos.

Además en un experimento independiente, se transfirieron 17 blastocistos clonados generados con la línea celular CWA a 14 hembras sincronizadas para la evaluación del desarrollo a término de los clones.

6. Recuperación y evaluación de embriones clonados y generados por FIV en estadio peri-implantatorio (elongados)

Los embriones clonados y FIV transferidos en grupos a vacas receptoras, fueron recuperados al día 17 de desarrollo para su evaluación morfológica y el estudio de expresión génica durante el periodo peri-implantatorio. Para ellos las vacas receptoras fueron sacrificadas en un matadero local (Carnes Ñuble, Región VIII, Chile) y se recuperó el tracto reproductivo el cual fue trasladado hasta el laboratorio en solución salina más antibióticos/antimicóticos para la colecta de los embriones elongados. El cérvix fue ligado y los cuernos se lavaron en dirección craneal con solución salina tibia suplementada con BSA hasta la recuperación de los embriones.

Se evaluó morfológicamente el desarrollo de los embriones utilizando como parámetros la longitud total y la presencia del botón embrionario. Se comparó la tasa de recuperación, la longitud de los embriones y la presencia de botón embrionario entre los clones y los embriones de FIV.

Una vez evaluados, se hicieron grupos de hasta 3 embriones peri-implantatorios, (elongados: FIV y clones) los cuales fueron conservados en *ARNlater* a TA para el posterior estudio de la expresión génica durante el estadio peri-implantatorio. Todos los embriones en *ARNlater* fueron trasladados a TA, al laboratorio de biología molecular del Instituto de Bioquímica Veterinaria de la Universidad Libre de Berlín, Alemania.

7. Evaluación molecular de calidad de embriones clonados en estadio pre y peri-implantatorio

7.1. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos

Extracción de ARN

El estudio de expresión génica durante los periodos pre y peri-implantatorios se realizó en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Bioquímica Veterinaria de la Universidad Libre de Berlín, Alemania. En el caso de los embriones pre-implantatorios, la extracción del ARN se realizó siguiendo las instrucciones del Kit NucleoSpin RNA XS (Total RNA isolation, NucleoSpin RNA XS; Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La elusión se realizó en un volumen

de 20 μL . No se realizó cuantificación ni análisis del RNA debido a la baja cantidad de ácidos nucleicos que se obtiene a partir de embriones pre-implantatorios, cuyo número de células es aproximadamente 100 y su diámetro 180 μm . Para los embriones peri-implantatrios y de las células utilizadas para la transferencia nuclear (LCF y AWC), el aislamiento del ARN se realizó siguiendo instrucciones del Kit mirVana (*mirVana*TM miRNA Isolation Kit, Ambion, Woodshole, MA, Estados Unidos). Este Kit permite la extracción total de ARN, incluyendo los pequeños ARNs como miRNA, siARN y snARN. Los ARN totales fueron conservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La calidad y cantidad de ARN extraído fue chequeada utilizando el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (ARN Nanochip; Agilent, Waldbronn, Alemania).

Transcripción inversa

El ARN total fue sometido a la reacción de transcripción reversa para la producción de ADNc tanto de las muestras experimentales (embriones pre y peri-implantatorios) como de los controles (FIV). En el caso de los embriones pre-implantatorios se utilizaron 8 μL del ARN total, para los embriones peri-implantatorios y las células somáticas, se tomó 1 μg del ARN procedente de cada muestra. La transcripción inversa se realizó siguiendo los protocolos generales descritos por Scholven y colaboradores (2009). Brevemente, la muestra se trató con DNasa I (libre de RNAsas) para eliminar la contaminación de ADN presente. Esta reacción se realizó en un volumen de 10 μL (1 μL de buffer 10x y 1 U de DNasa I (Fermentas, GmbH, St. Leon-Roth, Alemania), volumen correspondiente a ARN y se completaron los 10 μL de reacción con volúmenes adecuados de agua tratada con DEPC). Para la digestión enzimática se incubó la reacción a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, posteriormente se adicionó 1 μL de 25 mM de EDTA y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos para la inactivación de la enzima.

La reacción de transcripción reversa se realizó en un volumen final de 20 μL (30 ng/ μL random primers, 1 mM de cada dNTP, 0.5 μL agua tratada con DEPC, 4 μl first-strand buffer 5x, 200 U/mL de transcriptasa reversa M-MuLV (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Alemania) y 11 μL de la reacción de ARN tratada con DNasa I). Los parámetros de reacción consistieron: en 10 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y posteriormente 10 min a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.2. Estudio cualitativo por PCR de genes importantes para el desarrollo embrionario temprano

Tomando como material de partida el ADNc descrito con anterioridad, la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l (mezcla: 1x de buffer de reacción 10x, 2mM de $MgCl_2$, 0.4 mM de cada dNTP, 0.5 U de Immolase ADN polimerasa (Bioline, Luckenwalde, Alemania)). Se utilizaron 10 pmoles de cada partidor y 1 μ l de ADNc independientemente del origen de las muestras (blastocistos o embriones elongados). Los oligonucleótidos (primers o partidores) fueron diseñados utilizando las secuencias reportadas para cada gen publicadas en NCBI, preferiblemente bovinas o secuencias homólogas de humanos y ratón. El análisis de los partidores se realizó utilizando el programa Gene Runner (Versión 3.01; Hastings Software Inc.). Las secuencias de los mismos, así como la temperatura de “annealing” (T_a), la talla del producto esperado y el código identificador se muestran en la Tabla 1.

Los productos de PCR se verificaron a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, se comprobó la presencia y la talla de la banda correspondiente a cada gen en estudio. La validación del ADNc de embriones pre-implantatorios se basó en la detección de un control positivo (gen constitutivo) y un control negativo usando RT-PCR cualitativo. Como control positivo se utilizaron partidores que amplifican B-actina mientras que como control negativo se utilizó un marcador específico de ovocitos cuya expresión es silenciada en los embriones (growth differentiation factor 9: GDF-9).

Los genes estudiados tanto en blastocistos como en elongados fueron: OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4 ó POU class 5 homeobox 1), NANOG (Nanog homeobox), INFtau (interferon tau), EOMES (eomesodermin), CDX2 (caudal type homeo box 2), SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2), FGF4 (fibroblast growth factor 4). Estos genes se escogieron por ser relevantes en el desarrollo embrionario *in vivo*. GDF9: control negativo, B-actina: Control positivo interno. Además en cada reacción de PCR se incluyó un control negativo en el cual se reemplazó el templado por agua estéril.

Tabla 1. Secuencia, Temperatura de annealing (Ta) de partidores utilizados para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo final o tiempo real. Tamaño del producto obtenido e identificador de secuencia para cada gen

Nombre del gen	Secuencia partidores	Ta (°C)	Producto	Identificador NCBI
OCT4	F: 5'-GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC 3' R: 5'-ACACTCGGACCACGTCTTTC 3'	Ta= 55°C	314bp	NM_174580
NANOG	F: 5'-TTCCCTCCTCCATGGATCTG 3' R: 5'-ATTTGCTGGAGACTGAGGTA 3'	Ta = 58°C	219bp	NM_001025344
SOX2	F: 5'-CGAGTGGAAACTTTTGTC CG 3' R: 5'-GGTATTTATAATCCGGGTGT 3'	Ta = 55°C	101bp	NM_001105463
INFtau	F: 5'-GCCCTGGTGCTGGTCAGCTA 3' R: 5'-CATCTTAGTCAGCGAGAGTC 3'	Ta = 58°C	584bp	XM_871285
EOMES	F: 5'-GCAGAGGCTCTTATCAGA 3' R: 5'-GCGTTAATGTCCTCACACTT 3'	Ta = 55°C	256bp	XM_001251929
CDX2	F: 5'-CCTGTGCGAGTGGATGCGGAAG 3' R: 5'-CCTTTGCTCTGCGGTTCT 3'	Ta = 58°C	230bp	XM_871005
FGF4	F: 5'-TGCGGAGGCTGTA CTGCAAC 3' R: 5'-TCTCTGAACCTGCACTCGTCG 3'	Ta = 58°C	229bp	NM_001040605
GDF9	F: 5'-GCTGCTTTGCCTGGCTCTGT 3' R: 5'-TGTCACATCAATCTCAATCC 3'	Ta = 55°C	617bp	NM_174681
B-actina	F: 5'-CGG TGC CCA TCT ATG AGG 3' R: 5'-GAT GGT GAT GAC CTG CCC 3'	Ta = 58°C	266bp	BT030480

Secuenciación del producto del gen OCT4

Además se realizó la secuenciación del producto génico OCT4 obtenido a partir del PCR de las muestras estudiadas, incluyendo las células somáticas para comprobar la identidad del segmento amplificado. Para ello la banda del producto de PCR se extrajo a partir del gel de agarosa siguiendo las instrucciones del Kit Invisorb Spin DNA Extraction (Invitek GmbH, Berlín, Alemania). Para la secuenciación se amplificó el producto de PCR extraído con cada uno de los partidores de OCT4 por separado (reverse y forward). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 10 µl (1 µl de uno de los partidores (6.4 pMoles), 7 µl del producto de PCR obtenido (aproximadamente 10 ng/µl y 2 µl del Kit de amplificación (BigDye® Terminator

v1.1/3.1, Applied Biosystems). El programa de amplificación consiste en 10 seg a 96 °C seguido de 25 ciclos de 5 seg a 50°C, 4 min a 60 °C y 10 seg a 96 °C. La secuenciación fue realizada según el protocolo del Kit Prism Big Dye™ FS Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa Vector NTI 10.3.0 package (Invitrogen) y la identidad del producto se comprobó mediante BLAST con las secuencias publicadas en NCBI (National Center for Biotechnology Information- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

7.3. Estudio cuantitativo por qPCR de genes importantes para el desarrollo embrionario temprano

De los genes estudiados por PCR tiempo final se eligieron 5 para un estudio cuantitativo por PCR tiempo real (qPCR). Los genes seleccionados fueron: OCT4, NANOG, INFTau, EOMES y FGF4. Para la curva estándar se utilizaron los productos obtenidos del PCR cualitativo de cada gen, extraídos a partir de la banda del gel de agarosa mediante el Kit Invisorb Spin DNA Extraction (Invitek GmbH, Berlín, Alemania). Se determinó la concentración del producto obtenido mediante el sistema Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) utilizando 2 µl del producto purificado. La curva estándar se obtuvo haciendo al menos 6 diluciones seriadas (1:10) del producto de PCR de cada gen. Para el qPCR se utilizaron 2 µl del producto de PCR y se realizaron dos réplicas para cada punto de la curva. En el caso de las muestras, se utilizaron 2 µl de ADNc y dos réplicas de cada muestra para cada gen, lo cual se considera como réplica técnica. Además se incluyeron al menos dos réplicas biológicas de cada estadio de desarrollo.

La reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen total de 10 µl utilizando 5 µl de 2x SensiMix DNA Kit (Quantace Ltd., Berlín, Alemania) (contiene hot start polimerasa, dNTPs y buffer), 0.2 µl de 50x SYBRGreen (Quantace Ltd., Berlín, Alemania). Para la reacción se utilizó el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). El “crossing point” (CP) fue calculado por el software suministrado por los fabricantes del equipo de PCR. Se utilizó un control de B-actina para la normalización de los resultados obtenidos de cada PCR para cada gen. Para ello se calculó el cociente de la división de las cantidades de gen diana con respecto a las cantidades de B-actina, multiplicado por un factor constante (1000) y se expresó en fg de producto por fg de B-actina.

7.4. Estudio de la expresión génica por microarreglo en embriones peri-implantatorios clonados y producidos por FIV

Para el análisis global de expresión génica en estadio peri-implantatorio se realizó un “screening” por microarreglo para determinar las diferencias entre embriones clonados y embriones producidos por fecundación *in vitro*. Para ello se utilizaron “slides” bovinos (Bovine Blue Chip) producidos en la Universidad de Laval, Québec, Canadá y gentilmente cedidos por el Dr. Marc-André Sirard. El slide está compuesto por clones de ADNc de talla promedio aproximada de 215 bp, representando 1800 genes únicos los cuales fueron seleccionados a partir de las siguientes librerías de substracción:

- Ovocito - célula somática
- Ovocito - blastocisto
- Blastocisto - ovocito
- Blastocisto - célula somática
- 8 células - 4 células
- 4 células - M-II
- Ovocitos competentes - ovocitos incompetentes



Además, en cada slide los clones de ADNc están contenidos en 16 bloques (11x6) con tres réplicas cada uno. Para cada hibridación se usaron 15 µg de ARN total, el marcaje fluorescente se realizó siguiendo las instrucciones del Kit SuperScript™ Plus Indirect cDNA Labeling System (Alexa Fluor, Invitrogen). Se realizaron tres réplicas biológicas y una réplica técnica que consiste en una segunda hibridación con una de las réplicas biológicas pero con cambio de colores en el marcaje. Para las réplicas biológicas se siguió un patrón donde los clones (muestras= clones) se marcaron en rojo (Alexa Fluor® 647) y los embriones de FIV (controles) en verde (Alexa Fluor® 555).

Para la hibridación las muestras se mezclaron después de la última purificación y se secaron totalmente en una liofilizadora (según protocolo del kit de marcaje), posteriormente se resuspendieron en 200 µL de buffer de hibridación (GlassHyb) previamente calentado a 50 °C. La hibridación se realizó por 16 horas a 50 °C de forma automática utilizando la estación de

trabajo a-Hyb™ Hybridization Station (Miltenyi Biotec, Berlín, Alemania). El lavado se realizó también de forma automática en el mismo equipo, con buffer de lavado que contiene diferentes concentraciones de SDS (Dodecilsulfato sódico) y Tween20 (Merck, Darmstadt, Germany). Se siguió el siguiente protocolo de lavado:

1. Buffer 1 (2x SDS, 1% Tween20) 4 minutos
2. Buffer 2 (1x SDS, 0,1% Tween20) 4 minutos
3. Buffer 3 (0,1x SDS, 0,1% Tween20) 4 minutos
4. H₂O (varias veces para eliminar los restos de buffer)

Finalmente el slide se secó para garantizar la lectura de cada marca. La intensidad de la fluorescencia de cada “spot” fue medida por escáner láser en la máquina GenePix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvalley CA, USA). La imagen fue cuadrículada utilizando los datos suministrados por los productores del chip (bluechipv3) y el análisis y normalización de los resultados se realizó a través del software Acuity 4.0 (Molecular Devices, Sunnyvalley CA, USA). Se consideró expresión diferencial de los genes cuando el logaritmo en base dos de la proporción de las medianas fue mayor que 1 y menor que -1. Se consideró que los genes están igualmente expresados, cuando el logaritmo en base dos, de la proporción de las medianas se encuentra entre los valores mencionados.

7.5. Validación por qPCR de los niveles de expresión de genes diferencialmente expresados en las muestras experimentales (clones) y los controles (FIV)

Después del análisis de la expresión global de los genes en embriones peri-implantatorios, del total de genes diferencialmente expresados, se seleccionaron al azar, 6 genes para la validación de los datos obtenidos a partir del microarreglo. Para ello, mediante qPCR, se realizó la cuantificación de los valores de expresión de los genes seleccionados de cada muestra utilizada para la hibridación. Se seleccionaron tres genes sobre expresados en los embriones de FIV: SNRB1 (small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1), SPARC (secreted protein, acidic, cysteine-rich (ostenelectina)) y CBPP22 (calcium binding protein P22) y tres genes sobre

expresados en los embriones clonados: TP1 (trophoblast protein-1), TKDP1 (trophoblast Kunitz domain protein 1) y HSP70 (heat shock 70 kDa protein 8).

Los partidores se diseñaron utilizando las bases de datos para las secuencias de los genes seleccionados, las secuencias se muestran en la tabla 2. El qPCR se realizó siguiendo los mismos protocolos descritos anteriormente. La curva estándar se obtuvo a partir de diluciones seriadas (1:10) del producto de PCR obtenido a partir de cada gen. Los valores de expresión génica en cada caso fueron normalizados utilizando los valores de expresión del gen B-actina.

Tabla 2: Secuencia y Temperatura de annealing (Ta) de partidores de genes utilizados para la cuantificación de la expresión de los genes seleccionados para la validación de los datos del microarreglo. Tamaño del producto obtenido e identificador de cada gen incluido en el estudio

Nombre del gen	Secuencia Partidores	Ta (°C)	Producto	Identificador NCBI
TP1	F: 5'-TCACCTGAAGGTTACCCAGAC 3' R: 5'-GATCCTTCTGGAGCTGGTTGC 3'	Ta=55°C	283bp	NM_001015511
TKDP1	F: 5'-TGGCTGTGAAGGAAATGGAAAC 3' R: 5'-CACGTTGACCAATGGAGGAAAG 3'	Ta = 55°C	243 bp	AF241776
HSP70	F: 5'-AGCAAAGAACCAAGTCGCAATG 3' R: 5'-AAGGTAGGCTTCTGCGATTTC 3'	Ta = 55°C	244bp	BC105182
SNRPB1	F: 5'-TATCCTGCAAGATGGCCGTATC 3' R: 5'-TCTACCAGCAGCTCTGCCAATC 3'	Ta = 55°C	280 bp	BC112634
SPARC	F: 5'-GAATTGATGATGGTGCTGAGG 3' R: 5'-GTATTTGCAAGCCCGATGTAG 3'	Ta = 55°C	294 bp	NM_174464
CBPP22	F: 5'-TGCTTGGTGTCTTTCTCATGGC 3' R: 5'-TGGCGTCCAGCATTAACTTGTG 3'	Ta = 55°C	252 bp	BC103418

8. Evaluación del desarrollo post-implantatorio de embriones clonados

Como criterio final para evaluar la calidad de los embriones clonados, se empleó la capacidad de desarrollo *in vivo* a término. Para ello, se transfirieron 17 blastocistos calidad I a 14 hembras receptoras sincronizadas previamente siguiendo el mismo protocolo de sincronización descrito anteriormente. A tres de las 14 hembras se le transfirieron dos embriones. El diagnóstico de la gestación se realizó al día 35 de la transferencia y su evolución se evaluó a los días 85, 210 y 240.

La transferencia de los embriones así como la evaluación de las gestaciones se realizó según los protocolos descritos por De Armas y colaboradores (1994).

Las vacas gestantes se mantuvieron en condiciones de campo y solo las que llegaron a término fueron trasladadas a la Clínica de la Universidad de Concepción. Debido a las posibles complicaciones al parto de las gestaciones con clones, se planificaron cesáreas una vez pasados los 275 días de gestación. Al día 275 se administró una dosis única (8 mg) de triamcinolona un corticosteroide de acción lenta, para inducir la maduración pulmonar. Siete días después, coincidente con 30 horas anteriores a la cesárea programada, se inyectó por la misma vía 25 mg de dexametasona (Intervet; Boxmeer, Holanda) seguida por 5 mg de prostaglandina F₂α en un volumen de 5 mL de excipiente líquido. Finalmente se realizó cesárea 24 horas después de la inducción. Los animales nacidos vivos fueron evaluados en términos de tiempo de sobrevivida.

Análisis Estadístico

Inicialmente se realizó un análisis estadístico que permitiera determinar la capacidad de las líneas celulares de producir embriones mediante HMC. Se determinó mediante un análisis de correlación de Pearson, la influencia de la línea celular sobre los porcentajes de fusión, de producción de blastocistos totales y además la influencia de los porcentajes de fusión y sobrevivida después de la fusión sobre el porcentaje de blastocistos totales. El análisis estadístico del porcentaje de blastocistos producidos a partir de cada línea celular y de blastocistos tipo I y II, se realizó a través de una prueba no paramétrica Wilcoxon para muestras independientes. El análisis estadístico de las células totales entre los embriones producidos por líneas celulares diferentes, se realizó a través de una prueba *t* de student para muestras independientes.

Para evaluar el desarrollo embrionario durante la etapa peri-implantatoria, se comparó la tasa de recuperación, la longitud de los embriones y la presencia de botón embrionario entre los clones y los embriones de FIV. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba *t* de student.

El análisis estadístico para la comparación de los niveles de expresión génica se realizó a través de pruebas no paramétricas. En el caso de los embriones pre-implantatorios (donde se compararon tres grupos) se utilizó una prueba de Kruskal Wallis. Para los embriones peri-implantatorios (donde se compararon dos grupos) y para las células fetales se utilizó la prueba

Wilcoxon. El análisis de variación de la expresión de genes seleccionados durante las etapas pre y peri-implantatorias se realizó a través de una prueba de Kruskal Wallis.

La validación de los resultados obtenidos a partir del microarreglo se realizó a través del análisis de correlación de Pearson entre los valores de expresión génica obtenidos por PCR tiempo real y los datos del microarreglo (log en base 2 de la proporción de las medianas). Ver diseño estadístico en Anexo 1.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas con $P < 0.05$. Todos los análisis fueron utilizando el programa estadístico InfoStat (Buenos Aires, Argentina, 2002).



RESULTADOS

5. Comparación de la capacidad de diferentes líneas celulares de generar embriones clonados producidos por HMC

Para la generación de citoplastos receptores se colocaron a madurar aproximadamente 1700 ovocitos. De ellos, se enuclearon 1095 ovocitos en metafase II y con presencia de cono después de la incubación en demecolcina. Del total de ovocitos enucleados, 524 fueron utilizados para la reconstrucción de embriones con la línea celular fetal (LCF) en 9 experimentos y 571 con la línea celular adulta (CWA) en 8 experimentos.

Los porcentajes de fusión y sobrevida de los embriones fueron independientes de la línea celular empleada para la transferencia nuclear somática (Tabla 3, Anexo 2). Además se determinó que el porcentaje de blastocistos obtenidos no dependió de los porcentajes de fusión ni de la sobrevida de los embriones después de la reconstrucción, independientemente de la línea celular utilizada como donante de núcleo.

Tabla 3. Media de embriones reconstruidos, fundidos y vivos después de la fusión. Promedio de la eficiencia de fusión y sobrevida de embriones reconstruidos con células somáticas, fetales y adultas

Línea Celular	Media de embriones reconst. \pm SD	Media de Embriones fundidos \pm SD	Media de sobrevida a la fusión \pm SD	% embriones fundidos	% sobrevida a la fusión
LCF	25 \pm 5	24 \pm 5	24 \pm 3	98.8*	95.5**
CWA	33 \pm 3	31 \pm 2	29 \pm 4	93.6*	94.0**

*: se refiere a % de embriones fundidos con respecto a número de embriones reconstruidos

** : se refiere a % de embriones que sobreviven con respecto a los embriones fundidos

Se demostró que las líneas celulares sobrevivieron el cultivo, la congelación y descongelación (no se muestran los datos) y además generaron porcentajes elevados de fusión después de la transferencia a citoplastos receptores. Se evaluó la capacidad de ambas para producir embriones clonados hasta estadio de blastocisto y la calidad morfológica. Para ello se realizaron 9 grupos de clonación con la línea LCF y 8 grupos con la línea CWA, determinándose la cantidad de

blastocistos obtenidos a partir de cada una (Tabla 4 y Anexo 2). Los resultados obtenidos demostraron que la línea celular adulta (CWA) tuvo una mayor capacidad de producir embriones clonados (expresada en términos de eficiencia de generación de blastocistos) que la línea fetal (65.7% vs 38.2%) (P<0.05). Se obtuvieron blastocistos en todos los grupos de trabajo realizados (n=17), sin embargo se observó una mayor repetibilidad en el porcentaje de blastocistos obtenidos a partir de la línea celular adulta (rango 48.5-75). No obstante, la eficiencia de blastocistos obtenidos con ambas líneas celulares estuvo en el rango e incluso fue superior a los reportados para la producción de clones bovinos por el método tradicional con micromanipuladores.

Tabla 4. Desarrollo *in vitro* hasta estadio de blastocisto de embriones producidos por HMC a partir células somáticas fetales y adultas

Línea celular	Ovocitos			Blastocistos (%** ± SD)	No. de repeticiones	Rango de blastocistos/grupo
	Enucleados	Fundidos	Cultivados*			
LCF	524	223	212	81 (38.2 ^a ± 9.3)	9	4-13 (18.2-60)
CWA	571	251	236	155 (65.7 ^b ± 13.9)	8	16-24 (48.5-75)

* se refiere a embriones reconstruidos cultivados *in vitro* después de la fusión, reprogramación y activación.

** porcentaje de blastocistos con respecto a los embriones cultivados

a,b letras diferentes dentro de una misma columna significan diferencia significativa con P<0.05

De los resultados presentados se concluye que a partir de ambas líneas celulares se produjo de forma eficiente, blastocistos d7 después de la transferencia nuclear mediante HMC. Sin embargo, utilizando la línea celular adulta se obtuvieron resultados significativamente mayores que con la línea fetal.

2. Evaluación de la capacidad de desarrollo de los embriones clonados en estadio pre, peri y post-implantatorio

2.1- Evaluación del desarrollo pre-implantatorio de embriones clonados producidos con dos líneas celulares diferentes

Evaluación morfológica

Los blastocistos generados en los experimentos discutidos anteriormente fueron estudiados, evaluándose su calidad en términos morfológicos (expansión y correcta formación del macizo celular interno) o cuantitativos (número de células totales). Los blastocistos expandidos con una estructura delimitada del trofoblasto y un macizo celular interno (ICM) oscuro y bien definido y que no mostraron signos de degeneración celular fueron agrupados en la categoría I. Los embriones que presentaron una menor expansión del blastocele o ausencia de homogeneidad del macizo intracelular y/o del trofoblasto fueron agrupados en la categoría II (Figura 6) (Tabla 5 y Anexo 3).

Del total de blastocistos obtenidos cerca del 80% correspondió a clase I y cerca del 20% a clase II. Notablemente no se obtuvieron blastocistos de calidad III (mala calidad, se refiere a degeneración de las células del macizo y/o trofoblasto que impide la parcial total visualización de dichas estructuras). En este caso la línea celular tuvo un efecto significativo sobre la calidad de los embriones producidos, obteniendo el mayor porcentaje de blastocistos clase I con la línea celular adulta. No se observó diferencias significativas en el número de células de los blastocistos obtenidos a partir de cada una de las líneas celulares. No obstante, existe una mayor desviación estándar en el número de células de los embriones producidos con la línea fetal (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de la calidad de los blastocistos producidos a partir de dos líneas celulares en términos morfológicos y cantidad de células totales

Línea celular	Blastocistos tipo I (%)	Blastocistos tipo II (%)	Total blastocistos	Media del No. de células totales \pm SD
LCF	57 (70.4) ^a	24 (29.6) ^a	81	95.38 \pm 30.64
CWA	130 (83.9) ^b	25 (16.1) ^b	155	98.00 \pm 16.97

a,b letras diferentes dentro de una misma columna significan diferencia significativa con $P < 0.05$

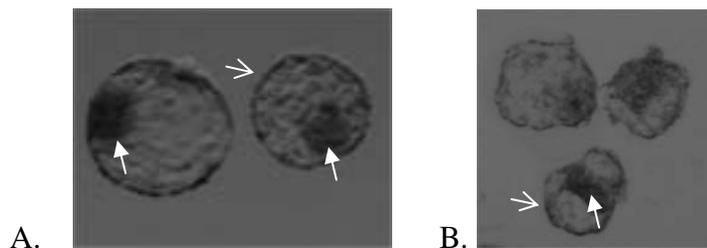


Figura 6. Clasificación de blastocistos clonados según sus características morfológicas.

A: Blastocistos clase I, B: Blastocistos clase II. La flecha cerrada indica el ICM, flecha abierta indica TB

Expresión génica durante el periodo pre-implantatorio

Después de establecer las diferencias morfológicas entre los embriones clonados producidos a partir de las líneas celulares, fetal y adulta, se realizó un estudio para determinar la reprogramación del núcleo de estas células en el citoplasto receptor. Para ello se realizó un estudio por PCR tiempo final y PCR tiempo real (cuantitativo), determinándose los niveles de expresión de genes cruciales para el desarrollo embrionario, tanto en blastocistos clonados y controles (FIV), así como en las células donantes de núcleos.

Con el fin de evaluar la expresión génica durante el periodo pre-implantatorio se utilizaron dos grupos de 10 blastocistos clonados a partir de las células fetales que fueron denominados como F y F6 y cuatro grupos de 10 blastocistos producidos a partir de las células adultas denominados como W2, W5, W6, W7. Cada grupo de embriones clonados fue el resultado de un día de trabajo manteniendo las mismas condiciones para la transferencia nuclear, solo se emplearon para este estudio blastocistos clase I. Se utilizó como control positivo para la expresión génica durante el

periodo pre-implantatorio, un grupo de 10 blastocistos producidos por fecundación *in vitro* utilizando las mismas condiciones de cultivos que se emplearon para los embriones clonados. Los embriones de FIV fueron identificados como FIVblas.

A partir de un ADNc único se llevó a cabo tanto el PCR tiempo final como el PCR tiempo real. De esta forma se logra correlacionar la presencia del transcripto de cada gen con sus niveles de expresión reales en cada muestra. Se realizó la amplificación por PCR tiempo final de 7 genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano, tanto del macizo celular interno (ICM) como del trofoblasto (TE). Los genes en cuestión fueron OCT4, SOX2, FGF4, NANOG, EOMES, CDX2, INFtau. Estos mismos marcadores fueron estudiados en las células donantes de núcleo para comprobar si la expresión de estos genes en los embriones clonados, son el resultado de la reprogramación del núcleo donante.

Inicialmente se analizó la calidad del ADNc producido mediante la amplificación de un segmento de B-actina como gen constitutivo, obteniéndose una banda específica a la altura de 266 pb según lo esperado. Por el contrario no se obtuvo amplificación del control negativo (GDF9). En el grupo W5 no fue posible realizar la amplificación los genes SOX2 y CDX2 debido a degradación del ADNc (Tabla 6 y Figura 7). De los genes estudiados, OCT4, CDX2 e INFtau se expresaron en todos los grupos de embriones independientemente del método de producción (TN o FIV). Contrariamente el gen EOMES no fue detectado en ninguno de los embriones ensayados, lo que sugiere que los niveles de expresión no son detectables por PCR tiempo final. Los embriones producidos por FIV además expresaron todos los genes estudiados (excepto EOMES). Sólo el grupo de embriones W7 (producidos con la línea CWA), presentó un patrón de expresión génica, similar a los embriones de FIV, el resto de los grupos tuvieron un patrón de expresión diferencial, incluso entre los grupos de embriones clonados, provenientes de una misma línea celular (Tabla 6).

NANOG sólo se detectó en uno de los grupos de embriones producido a partir de la línea CWA (W7) y FGF4 se detectó en dos de los 4 grupos de blastocistos producidos con ésta línea celular (W2 y W7). SOX2 se detectó tanto en los embriones producidos con células fetales como adultas (Tabla 7). En concordancia con su rol de diana o “target” de OCT4 y SOX2, FGF4 sólo se expresó en los grupos de embriones que expresan dichos genes (W2 y W7), no así en los embriones derivados de las células fetales (F6).

Ambas líneas celulares utilizadas como donantes de núcleo expresaron OCT4 y SOX2 así como NANOG en el caso de la línea celular fetal. Esto constituye un nuevo hallazgo teniendo en cuenta que estos genes se consideran marcadores de totipotencia en células madres de ratón y humanas. El producto obtenido de cada muestra (para el gen OCT4) fue purificado a partir del gel de agarosa y secuenciado para comprobar la identidad del gen expresado en estas células. Las secuencias obtenidas fueron chequeadas mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El análisis demostró que la secuencia del gen OCT4, proveniente de las células somáticas, embriones clonados y embriones producidos por FIV, presenta un 99% de homología con el gen OCT4 bovino (Código NCBI: AY490804.1; NM_174580.1). La alineación de las secuencias de OCT4 de las células somáticas y los embriones (clones y FIV) mostraron un 99% de identidad entre ellas, lo cual demuestra que efectivamente las células somáticas expresan el gen OCT4 (Anexo 4) (Programa: BLAST 2 SEQUENCES; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Debido a que la expresión de estos genes en las células donantes puede tener un efecto significativo para el desarrollo embrionario, también se incluyeron las células donantes en los estudios cuantitativos por PCR tiempo real de los niveles de transcritos de los genes en estudio. Como se aprecia en la Tabla 6, los patrones de expresión de las líneas celulares usadas en clonación, fueron diferentes de los embriones generados a partir de cada una de ellas (LCF vs F, F6; CWA vs W2, 5, 6 7).

Tabla 6. Detección de la expresión de genes cruciales para el desarrollo temprano en embriones clonados a partir de dos líneas celulares y embriones de FIV

gen muestra	OCT4 ICM	SOX2 ICM	FGF4 ICM	NANOG ICM, TB	EOMES TB, ICM	CDX2 TB	INFtau TB	GDF9	B-actina
F	+	-	-	-	-	+	+	-	+
F6	+	+	-	-	-	+	+	-	+
W2	+	+	+	-	-	+	+	-	+
W5	+	*	-	-	-	*	+	-	+
W6	+	-	-	-	-	+	+	-	+
W7	+	+	+	+	-	+	+	-	+
FIVblas	+	+	+	+	-	+	+	-	+
CWA	+	+	-	-	-	-	-	-	+
LCF	+	+	-	+	-	-	-	-	+
C-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* No se realizó amplificación en esta muestra

CWA, LCF: línea celular adulta de Wagyu y línea fetal respectivamente.

TB, ICM: trofoblasto y macizo celular interno respectivamente.

C-: Control de la reacción de PCR sustituyendo el templado por agua estéril.

Tabla 7: Resumen de la expresión génica determinada por PCR tiempo final en embriones producidos por transferencia nuclear con células fetales y adultas y embriones de FIV

Gen	Origen de los embriones		
	FIV (%)	Embriones NT-LCF (%)	Embriones NT-CWA (%)
OCT4	100	100	100
SOX2	100	50	66.6
FGF4	100	0	50
NANOG	100	0	50
EOMES	0	0	0
CDX2	100	100	100
INFtau	100	100	100
B-actina	100	100	100
GDF9	0	0	0

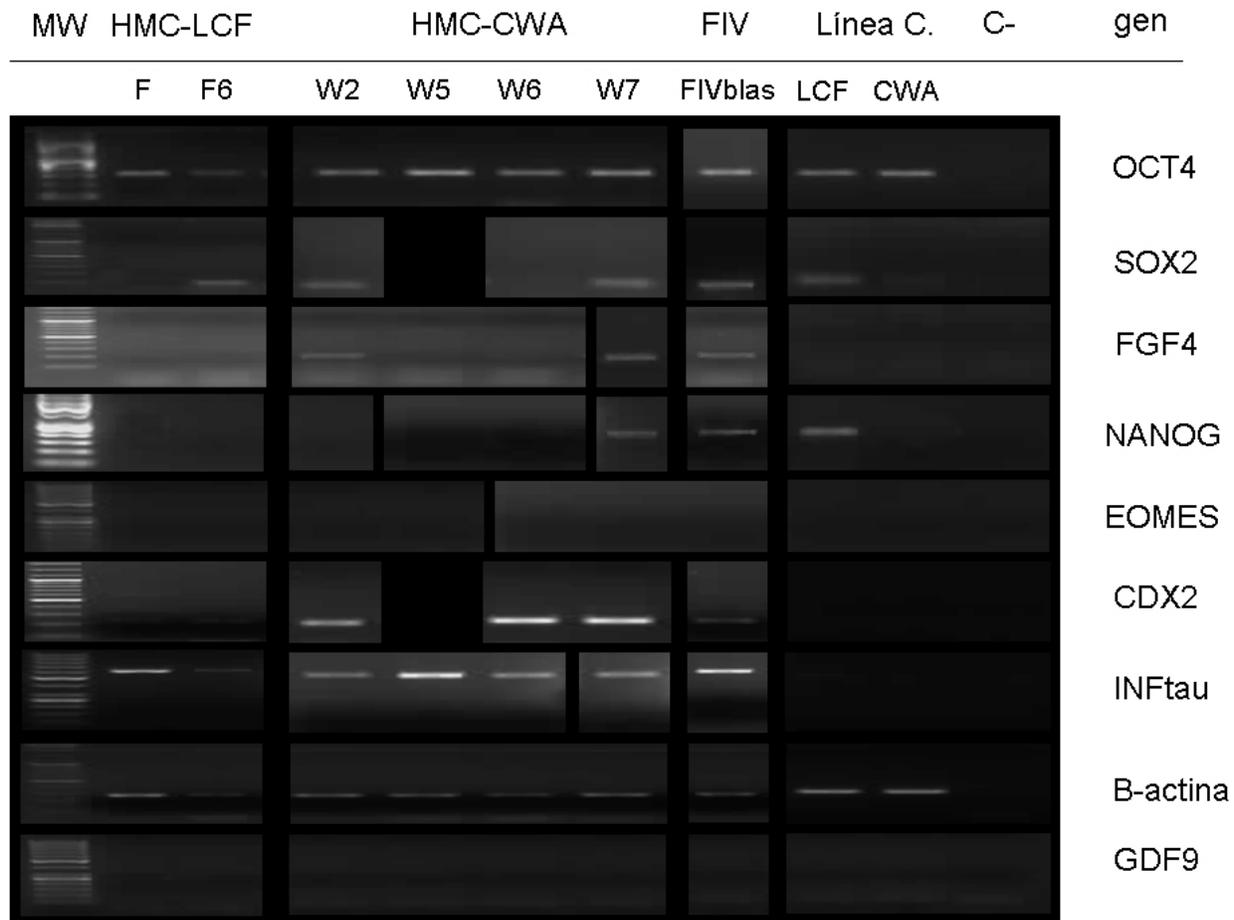


Figura 7. Gel de agarosa (2%) y tinción con bromuro de etidio del producto de PCR de la expresión de los genes incluidos en este estudio en blastocistos clonados y producidos por FIV. MW=patrón de peso molecular, las bandas más intensas corresponden a 250 pb y 500 pb. C-: se refiere a la reacción para cada gen sustituyendo el templado por agua estéril. HMC-LCF (F, F6): blastocistos clonados producidos con LCF. HMC-CWA (W2, 5, 6 y 7): blastocistos clonados producidos con CWA. FIV (FIVblas): Blastocistos producidos por FIV. LCF: Línea celular fetal. CWA: Línea celular adulta. El gen en estudio se nombra en la columna extrema derecha

Una vez realizado el análisis cualitativo de la expresión génica en los grupos de blastocistos clonados y producidos por FIV, se seleccionaron cinco genes (OCT4, EOMES, INFtau, NANOG, FGF4) para la cuantificación de sus niveles de transcrito durante este periodo de desarrollo. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados con respecto a un control endógeno (B-actina). De los 5 genes estudiados sólo OCT4, INFtau y FGF4 pudieron ser amplificados dentro de la región cuantificable de la curva del PCR tiempo final, mientras que

NANOG y EOMES no, pero sí se logró la amplificación de ambos transcritos. No se obtuvo amplificación en el control negativo y la curva de disociación es similar para cada una de las muestras lo cual indica que el producto amplificado corresponde al gen en estudio (datos no mostrados).

Los mayores niveles de expresión de OCT4 se obtuvieron en los grupos de embriones clonados producidos con células adultas, mientras que los niveles de transcritos de este gen fueron estadísticamente similares para los embriones de FIV y para los clones de células fetales (Figura 8a). Los mayores niveles de expresión de INFTau se detectaron en los embriones producidos por FIV pero no hubo diferencia significativa entre estos valores y los niveles de expresión de los embriones clonados a partir de células adultas. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los niveles de transcritos de INFTau de los embriones clonados a partir de ambas líneas celulares pero sí entre los clones de células fetales y los embriones de FIV (Figura 8b). FGF4 tuvo un patrón de expresión similar a INFTau, siendo los niveles de transcritos significativamente diferentes entre los embriones clonados a partir de las líneas celulares fetal y adulta (Figura 8c).



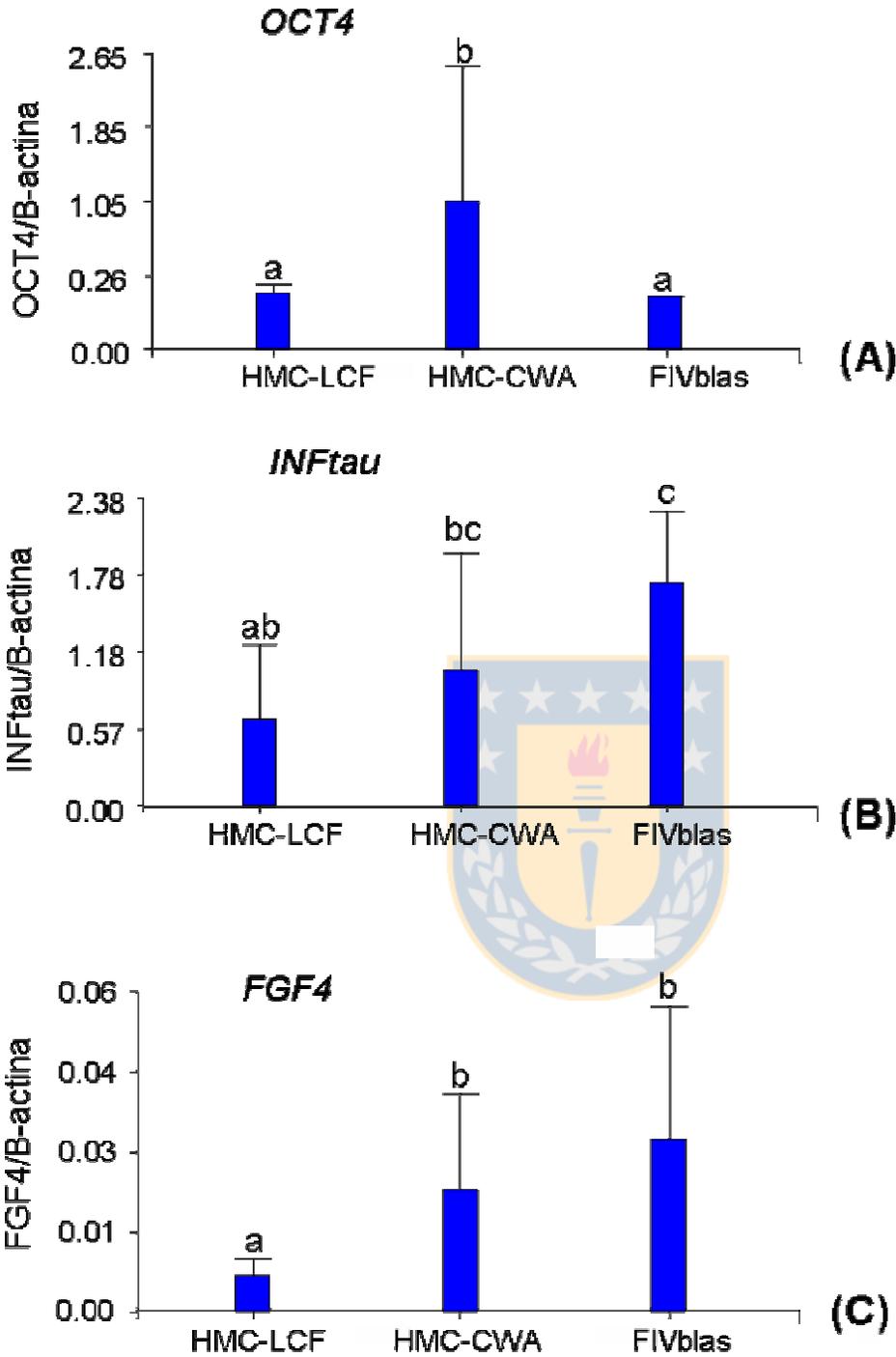


Figura 8. Cuantificación de la expresión génica en blastocistos (etapa pre-implantatoria) clonados producidos a partir de células fetales y adultas (HMC-LCF y HMC-CWA respectivamente) y blastocistos producidos por fecundación *in vitro* (FIVblas)

a, b y c: letras diferentes dentro de un mismo gráfico significan diferencia significativa con $P < 0.05$

En este estudio se determinó la expresión génica en grupos de embriones producidos a partir de dos líneas celulares diferentes, pero a la vez cada grupo de embriones fue el resultado de un mismo experimento o grupo de clonación (un día de trabajo). De este modo se estudió adicionalmente, la influencia de las líneas celulares en la variabilidad del proceso de clonación en sí. Para ello, se llevó a cabo un análisis de la variabilidad de la expresión de cada gen incluido en este estudio para cada una de las líneas celulares. Sólo OCT4 presentó una variabilidad significativa con $P < 0.01$ entre los embriones clonados producidos a partir de cada una de las líneas celulares (Figura 9a). Esta diferencia está dada principalmente por la variabilidad en la expresión de OCT4 en cada grupo de embriones producidos con las células adultas, mientras que no se observa variabilidad en los grupos de embriones producidos con la línea fetal (Figura 9b). Por otra parte a pesar que los niveles de transcripto de FGF4 fueron significativamente diferentes entre las dos líneas celulares, la variabilidad en la expresión es prácticamente la misma.

Finalmente se evaluó la variabilidad total de la expresión génica de los genes estudiados dentro de cada grupo de embriones. Se puede observar en la Figura 9c que la media de la variabilidad de la expresión es significativamente superior para los embriones producidos con la línea celular adulta que para los embriones clonados a partir de la línea fetal. No obstante, el aumento de la variabilidad total está influenciado principalmente por la variabilidad en la expresión de OCT4 en estos embriones.

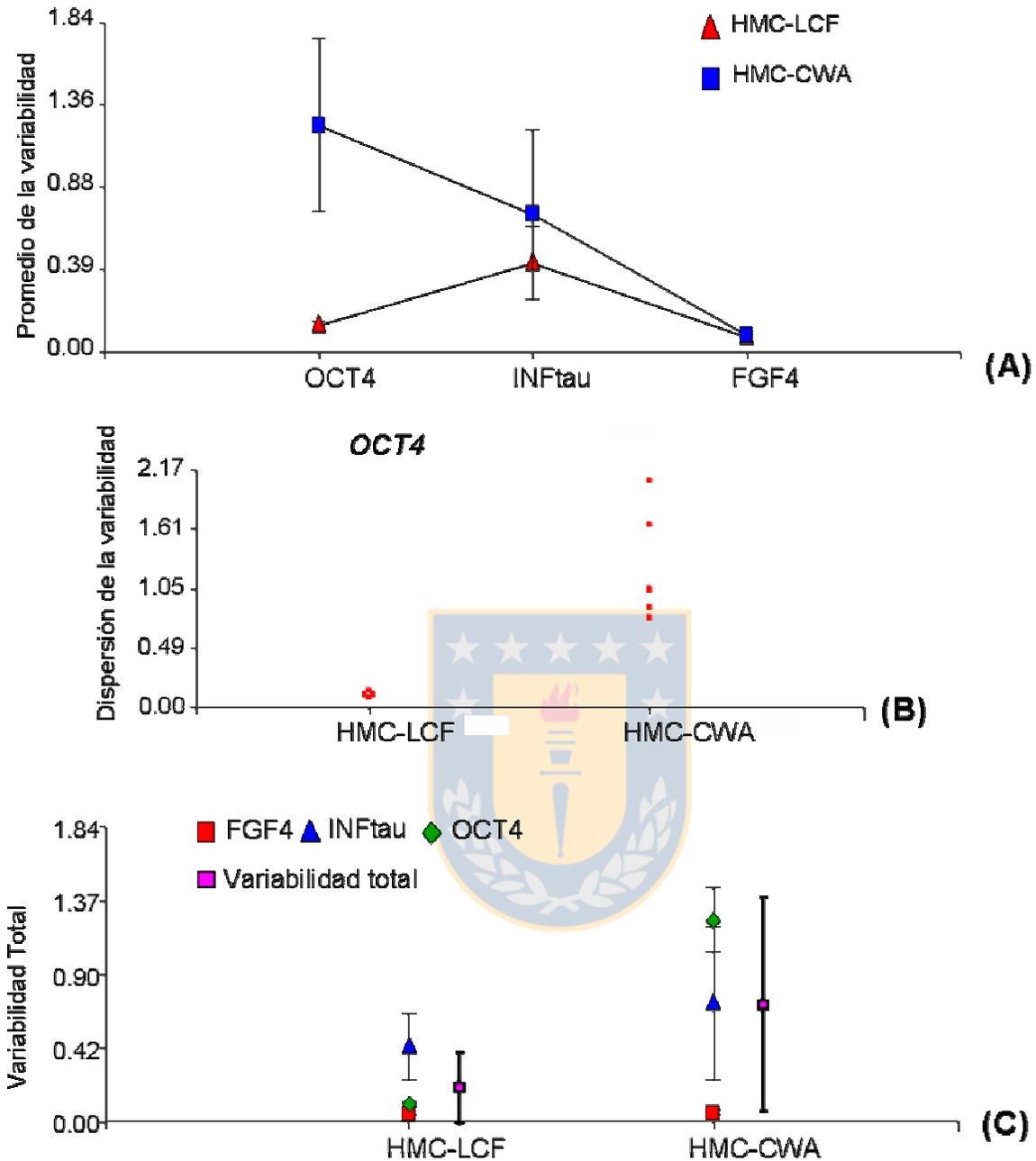


Figura 9: Variabilidad de la expresión génica entre los grupos de embriones clonados producidos a partir de cada línea celular. HMC-LCF y HMC-CWA: blastocistos clonados a partir de células fetales y adultas respectivamente. (A) Promedio de la variabilidad de la expresión de cada gen estudiado entre los grupos de embriones producidos a partir de cada línea celular. Los genes están organizados en orden decreciente de variabilidad. (B) Variabilidad de la expresión de OCT4 entre los grupos de embriones producidos a partir de cada línea celular. (C) Variabilidad total de la expresión de todos los genes estudiados para cada línea celular

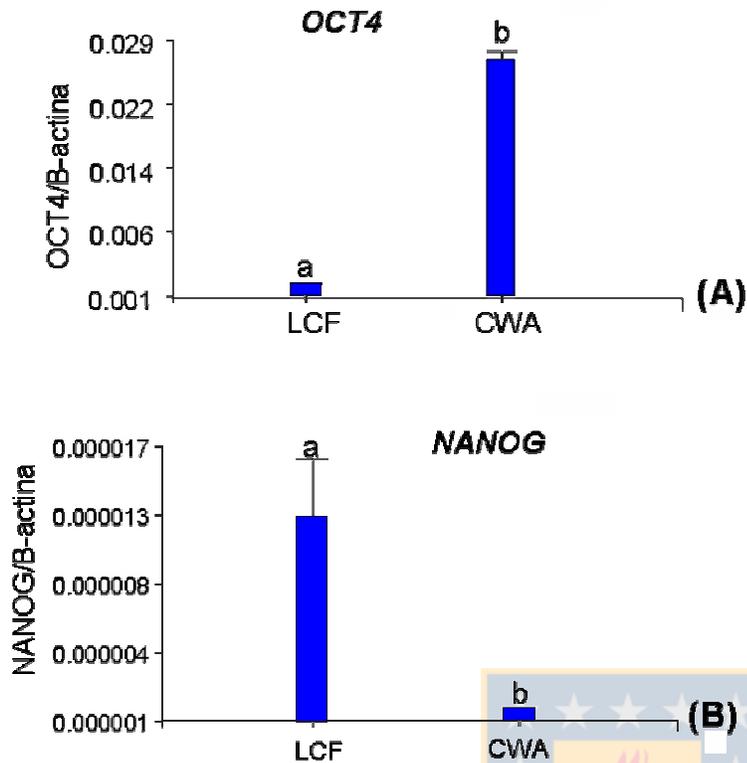


Figura 10. Cuantificación de la expresión de OCT4 (A) y NANOG (B) en las líneas celulares utilizadas como donantes de núcleo para clonación. LCF y CWA, línea fetal y adulta respectivamente

a,b letras diferentes dentro de un mismo gráfico significan diferencias significativas con $P < 0.05$

Como se mencionó anteriormente, se pudo detectar mediante PCR tiempo final, que ambas líneas de células donantes utilizadas para la transferencia nuclear somática expresaron OCT4, mientras que NANOG solo se detectó en la línea fetal. Debido a las diferencias encontradas en la expresión de estos genes entre los embriones producidos a partir de cada una de estas líneas, se cuantificaron los niveles de ARNm tanto para OCT4 como para NANOG en las células donantes. Tal como mostró el PCR tiempo final, CWA no expresa NANOG mientras que los niveles de transcritos de este gen para LCF se encuentran dentro de la región cuantificable de la curva estándar. Este dato demuestra la expresión de NANOG en las células fetales utilizadas para la transferencia nuclear. En cuanto a los niveles de expresión de OCT4, estos fueron significativamente mayores en las células adultas que en las células fetales (Figura 10). Esto constituye un nuevo hallazgo, ya que NANOG y OCT4 son genes marcadores de indiferenciación por tanto sólo deberían expresarse en embriones o en células madres.

2.2- Evaluación del desarrollo peri-implantatorio de embriones clonados

Evaluación morfológica

La calidad o el éxito de la reprogramación nuclear se evaluó teniendo en cuenta la eficiencia del desarrollo de los embriones clonados en términos de cantidad de blastocistos así como su calidad morfológica y expresión de genes cruciales para el desarrollo embrionario temprano. De los resultados presentados en esta sección se concluye que ninguna de las dos líneas celulares posee un patrón de expresión génica idéntico al de los embriones de FIV. Sin embargo, y a pesar de la mayor expresión de OCT4 (pero también su mayor variabilidad), la línea CWA presentó un patrón de expresión más cercano al de los embriones de FIV que la línea LCF, además ésta línea celular fue más eficiente para la producción de embriones clonados y éstos a su vez tuvieron el mayor porcentaje de blastocistos clase I. Debido a estos resultados, la línea celular CWA fue elegida para evaluar la calidad y capacidad de desarrollo *in vivo* de embriones clonados comparados con embriones de FIV.

Para el estudio del desarrollo de los embriones clonados en estadio peri-implantario se determinó la capacidad de éstos de continuar su desarrollo hasta estadio de elongación. Con este fin, se evaluó la expresión de genes cruciales para el desarrollo mediante PCR tiempo final y PCR tiempo real y finalmente se realizó un estudio global de la expresión génica mediante microarreglo, comparando en todos los casos, con embriones producidos *in vitro*. Los embriones clonados y de FIV recuperados al día 17 de desarrollo, fueron inicialmente evaluados morfológicamente (longitud de los embriones y la presencia del disco embrionario) y posteriormente agrupados para el estudio de expresión génica en este periodo.

En la Tabla 8 se muestran las tasas de desarrollo tanto de los embriones clonados como de los producidos por FIV. De 30 embriones clonados que fueron transferidos se recuperaron 19 (63.3%) y 6 embriones de FIV de 11 transferidos (54.5%). En el caso de los embriones de FIV se obtuvo una menor tasa de recuperación debido a infección vaginal que presentó una de las vacas transferidas lo cual dificultó el lavado de los cuernos y por tanto la recuperación de los embriones. El 100% de los embriones recuperados se encontraron en estadio filamentosos o de elongación por lo que se concluye que tanto los embriones clonados como los de FIV fueron capaces de continuar su desarrollo *in vivo*. No obstante, la tasa de crecimiento de los embriones

clonados fue significativamente menor que los embriones de FIV con un promedio de longitud de 91.8 y 174 mm respectivamente. Además 8 de los embriones clonados recuperados se encontraron en un estadio más temprano de desarrollo que correspondía a tamaños entre 15 y 30 mm, lo cual demuestra un desarrollo más lento de los clones durante el periodo peri-implantatorio (Figura 11). Por otra parte, 5 de los embriones de FIV presentaron una estructura visible de botón embrionario (83.3%) mientras que el 63% de los embriones clonados presentaron un disco embrionario claro y bien definido (Figura 12).

Tabla 8. Desarrollo *in vivo* hasta día 17 de blastocistos bovinos producidos por transferencia nuclear somática y por FIV

Tipo de embriones	Embriones		longitud (mm ± SD)	# embriones elongados		Con botón embrionario (%)
	transferidos	Recuperados (%)		Tardío	Temprano	
HMC	30	19 (63.3)	91.8 ± 45.8 ^a	11	8	12 (63) ^a
FIV	11	6 (54.5)	174 ± 50 ^b	6	0	5 (83.3) ^b

a,b letras diferentes dentro de una misma columna significan diferencia significativa con P<0.05

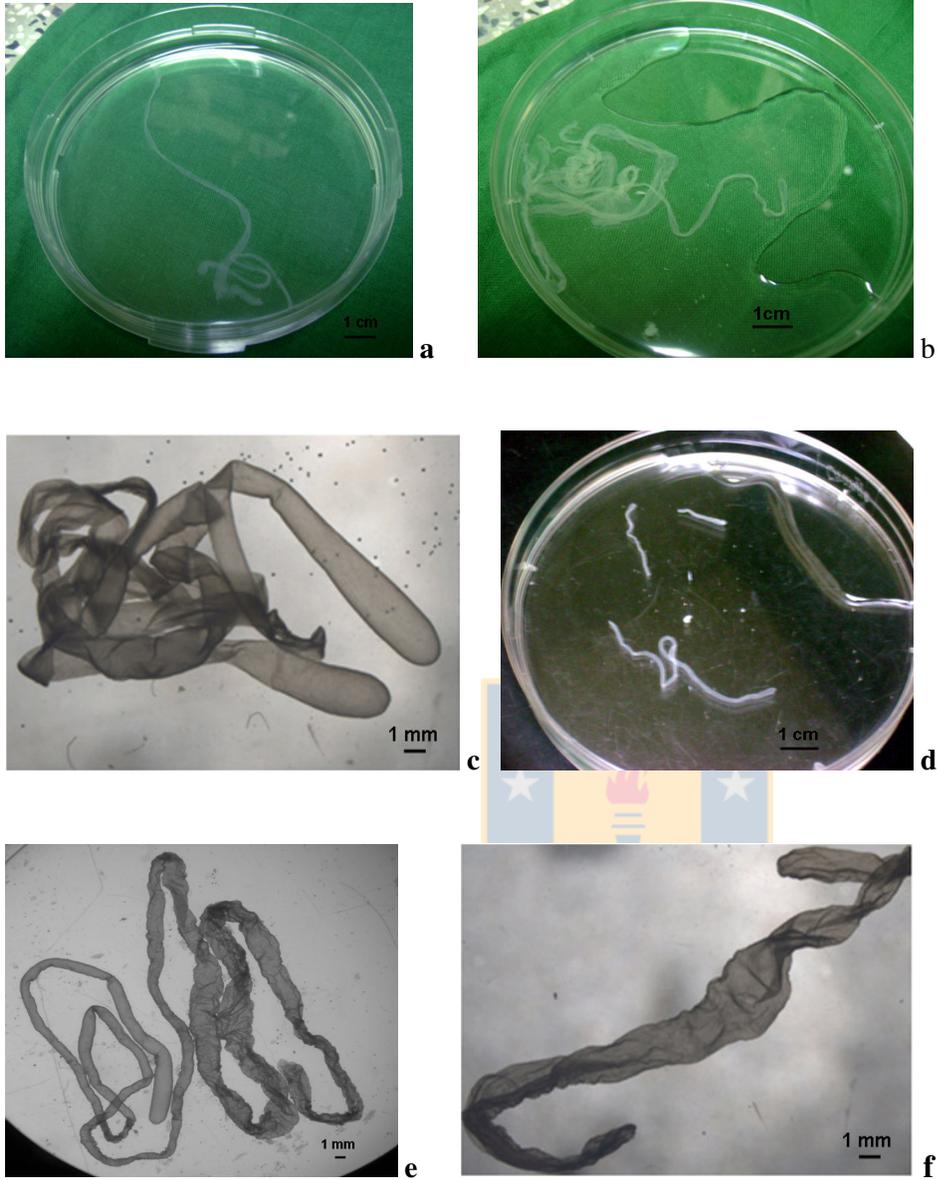


Figura 11: Microfotografía de embriones elongados recuperados en el día 17 de desarrollo (etapa peri-implantatoria).

a, b y c: embriones producidos por FIV. d, e y f: embriones producidos por HMC.

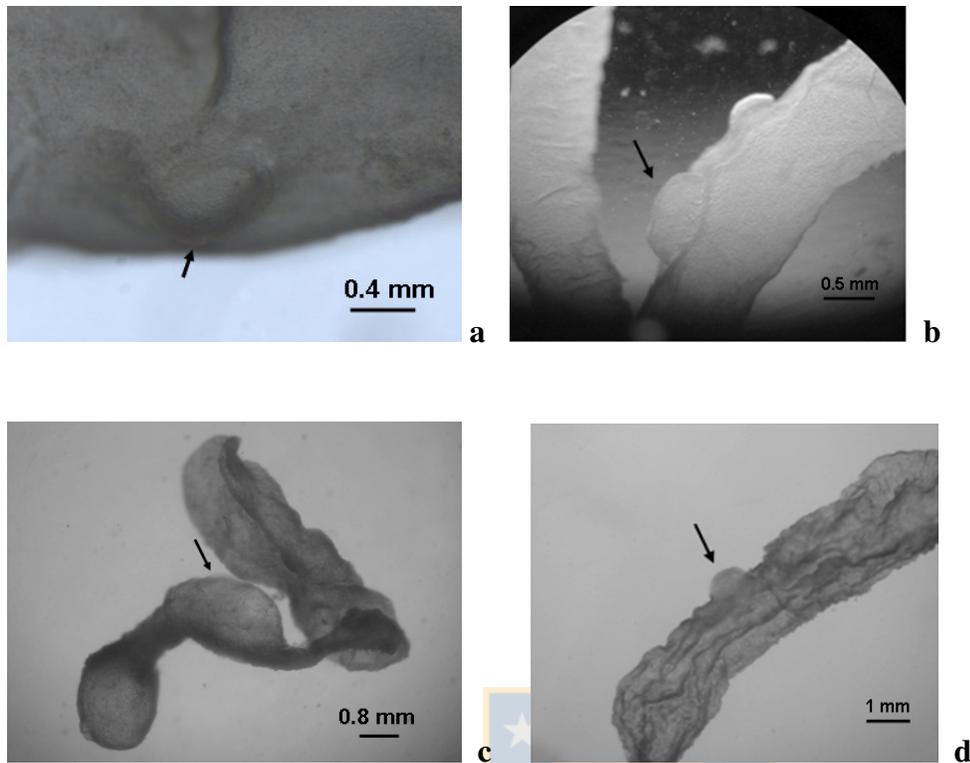


Figura 12: Microfotografía de embriones elongados recuperados día 17 (etapa peri-implantatoria). La flecha muestra disco embrionario.

a, b: Embriones producidos por FIV

c, d: Embriones producidos por HMC

Expresión génica durante el periodo peri-implantatorio

Para el estudio de expresión génica durante el periodo peri-implantatorio se utilizaron todos los embriones de FIV que fueron recuperados al día 17 y de los embriones clonados se seleccionaron aquellos con mayor tasa de desarrollo en términos de elongación (longitud mayor o igual a 80mm). Los embriones se distribuyeron en muestras de 1, 2 y 3 embriones tanto para los clones como para los FIV según muestra la Tabla 9. Se obtuvo amplificación de B-actina (control positivo) en todas las muestras estudiadas excepto en el RT negativo (C-), mientras que no hubo amplificación en el control negativo de GDF9.

Se comprobó la expresión de todos los genes estudiados en los embriones producidos por FIV. En el caso de los embriones producidos por transferencia nuclear somática, los genes OCT4, SOX2, EOMES, INFtau y CDX2 se expresaron en todas las muestras de embriones estudiadas

mientras que NANOG y FGF4 no se detectaron en las muestras HMC6, en el caso de FGF4 no se detectó además en HMC4 (Tabla 9 y Figura 13).

Tabla 9. Detección de la expresión de genes cruciales para el desarrollo durante el periodo peri-implantatorio de embriones clonados y producidos por FIV

Gen	OCT4	SOX2	NANOG	EOMES	INFtau	FGF4	CDX2	GDF9	B-actina
Muestra									
FIV1 2 embriones	+	+	+	+	+	+	+	-	+
FIV2 1 embrión	+	+	+	+	+	+	+	-	+
FIV3 3 embriones	+	+	+	+	+	+	+	-	+
HMC 4 3 embriones	+	+	+	+	+	-	+	-	+
HMC 5 1 embrión	+	+	+	+	+	+	+	-	+
HMC 6 2 embriones	+	+	-	+	+	-	+	-	+
C-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

HMC 4, 5, 6: Embriones elongados producidos por clonación

FIV1, 2, 3: Embriones elongados producidos por FIV

C-: Control de la reacción de PCR sin ADNc

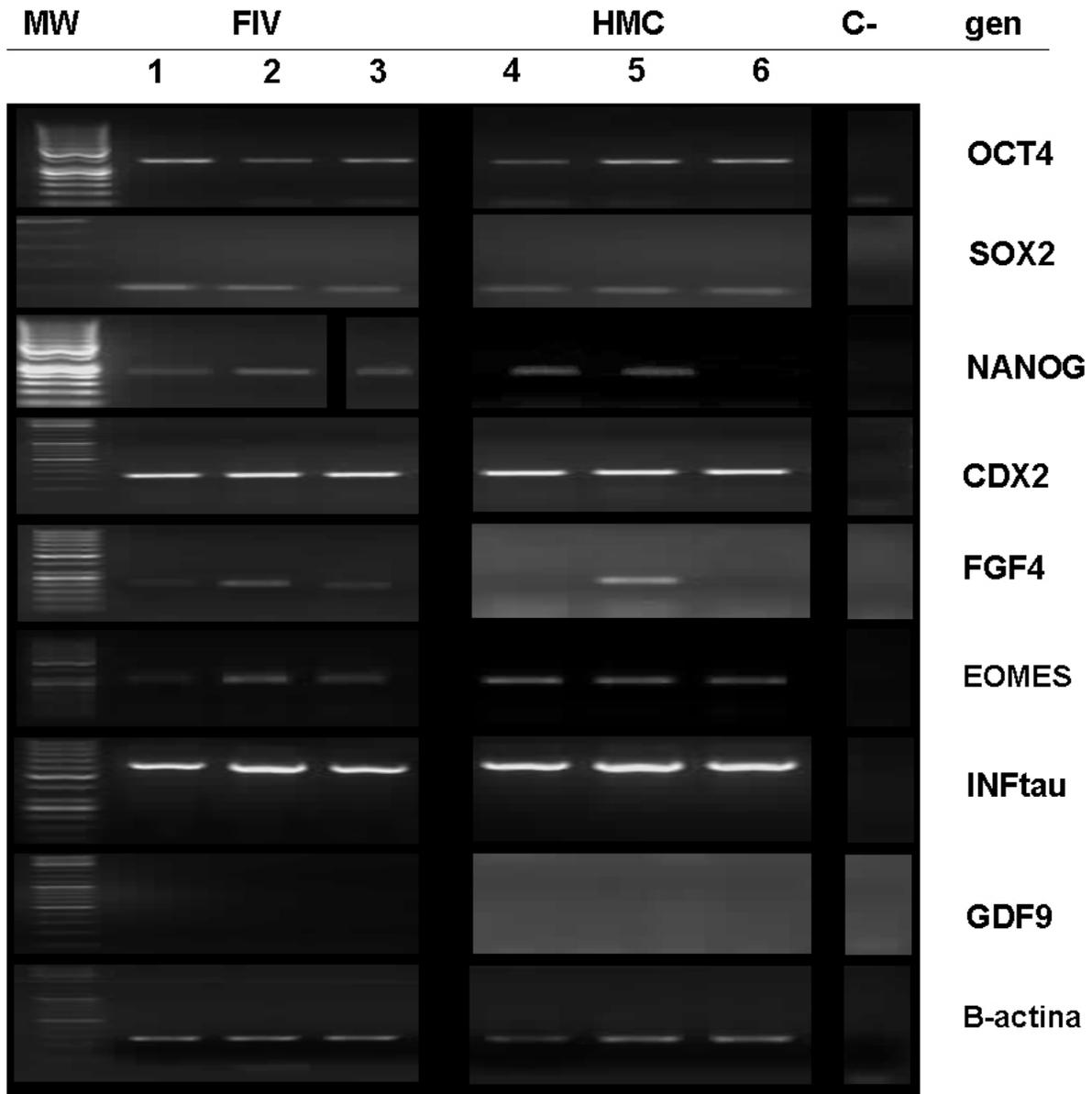


Figura 13. Gel de agarosa (2%) y tinción con bromuro de etidio del producto de PCR de la expresión de los genes incluidos en este estudio en embriones clonados y de FIV en estadio de elongación. 1, 2, 3: embriones producidos por FIV. 4, 5, 6: embriones producidos por HMC. MW=patrón de peso molecular, las bandas más intensas corresponden a 250 pb y 500 pb. C- se refiere a la reacción para cada gen sin adición de muestra. El nombre del gen correspondiente se lista en la columna extrema derecha

Posteriormente se realizó la cuantificación mediante PCR tiempo real de los genes OCT4, EOMES, NANOG, FGF4 e INFtau. Los genes CDX2 y SOX2 no fueron incluidos en este

estudio ya que las cantidades de producto obtenido mediante PCR tiempo final de ambos, no fue suficiente para la curva estándar. Las curvas estándares utilizadas fueron las mismas que se emplearon para la cuantificación de estos genes en los embriones pre-implantatorios. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados con la expresión de un gen constitutivo, B-actina para eliminar la variabilidad atribuida a cada muestra en particular. Para el análisis estadístico de la expresión génica, se utilizaron los valores de la relación entre los niveles de expresión de cada gen y los de B-actina (fg/fg).

De forma general todos los genes tuvieron un patrón de expresión similar, obteniéndose mayores niveles de transcritos en los embriones producidos por FIV. Los niveles de expresión de los genes EOMES y FGF4 fueron casi 100 veces mayores en los embriones de FIV que en los clonados y 10 veces en el caso de NANOG, siendo estas diferencias significativas con $P < 0.05$. Los niveles de expresión de OCT4 e INFTau fueron similares entre ambos grupos, donde la relación de expresión es 1,1 veces en ambos casos (Figura 14). Al realizar una comparación entre los niveles de expresión de todos los genes estudiados durante este periodo de desarrollo, INFTau presenta los mayores niveles de transcritos tanto en los embriones clonados como en los producidos por FIV (Figura 15).



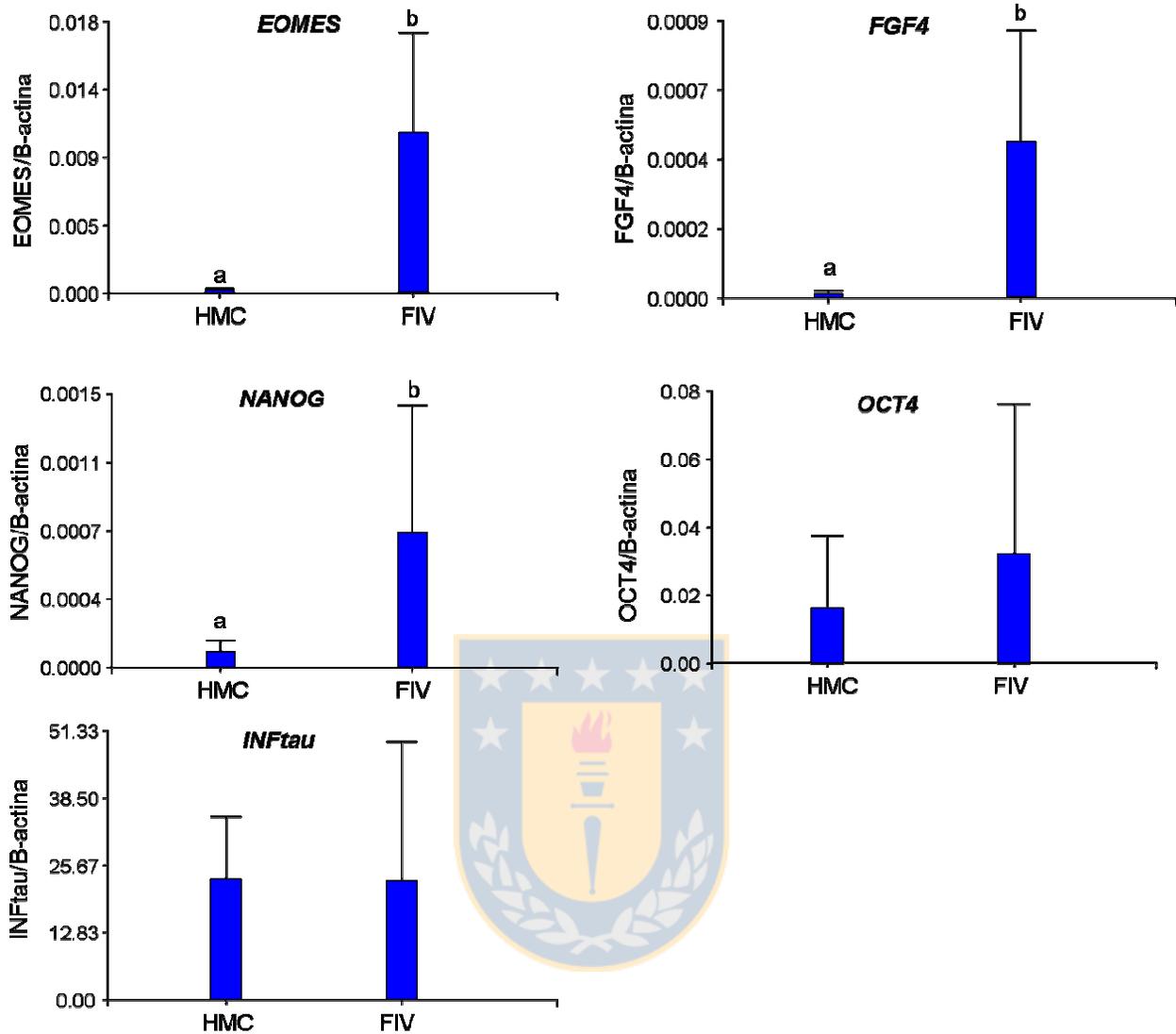


Figura 14. Cuantificación de la expresión génica durante el periodo peri-implantatorio en embriones clonados (HMC) y embriones producidos por fecundación *in vitro* (FIV)

a, b: letras diferentes en un mismo gráfico significa diferencia significativa con $P < 0.05$

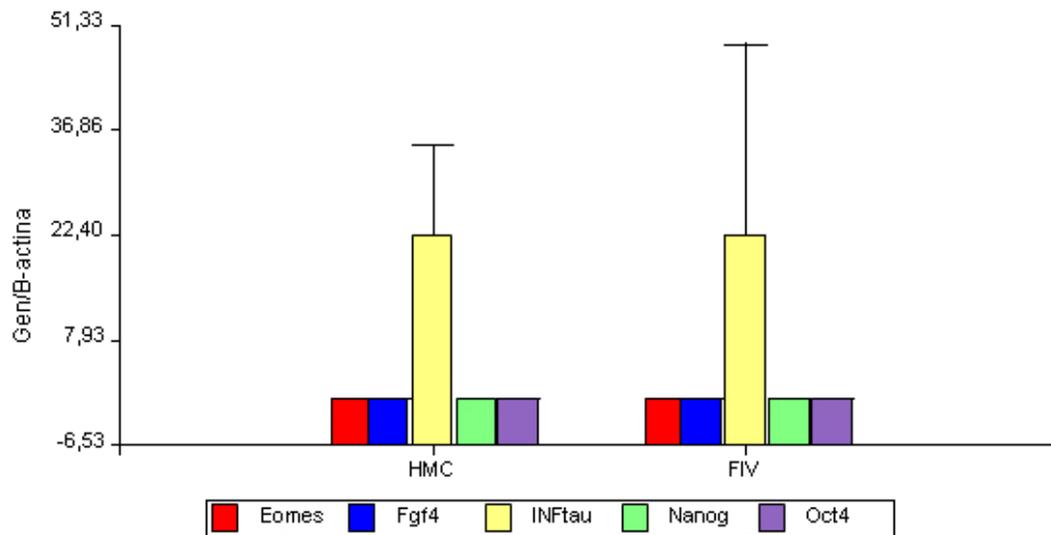


Figura 15. Nivel de expresión de todos los genes incluidos en la cuantificación por PCR tiempo real para los embriones clonados (HMC) y los de FIV (FIV)

2.3-Comparación de la expresión génica durante los periodos pre y peri-implantatorios

Adicionalmente se realizó un análisis del comportamiento de la expresión de los genes OCT4, FGF4 e INftau en los dos estadios de desarrollo estudiados (pre y peri-implantatorios), tanto para los embriones clonados como para los producidos por FIV, con el objetivo de determinar las variaciones en la expresión de dichos genes a medida que avanza el desarrollo embrionario. Los marcadores de indiferenciación, OCT4 y FGF4 presentaron una tendencia de expresión similar, observándose los mayores niveles de transcrito en los embriones pre-implantatorios. Los niveles de FGF4 fueron significativamente diferentes entre los embriones pre y post-implantatorios, ya sea en los obtenidos por FIV o por transferencia nuclear somática (Figura 16a). En cuanto a OCT4 los clones en estadio pre-implantatorio, presentaron niveles de expresión significativamente mayores que el resto de los grupos estudiados (HMC-elong, FIV-blas e FIV-elong). No obstante, aunque no significativamente, los blastocistos de FIV (FIV-blas) presentaron una tendencia a niveles de expresión de OCT4 superiores que los embriones elongados, ya sean obtenidos por clonación o por FIV (HMC-elong y FIV-elong respectivamente) (Figura 16b). Los niveles de INftau aumentaron significativamente entre el estadio pre y peri-implantatorio, también independiente mente del método de producción de los embriones (TN o

FIV), observándose los mayores niveles de transcritto de este gen en el estadio peri-implantatorio (Figura 16c).

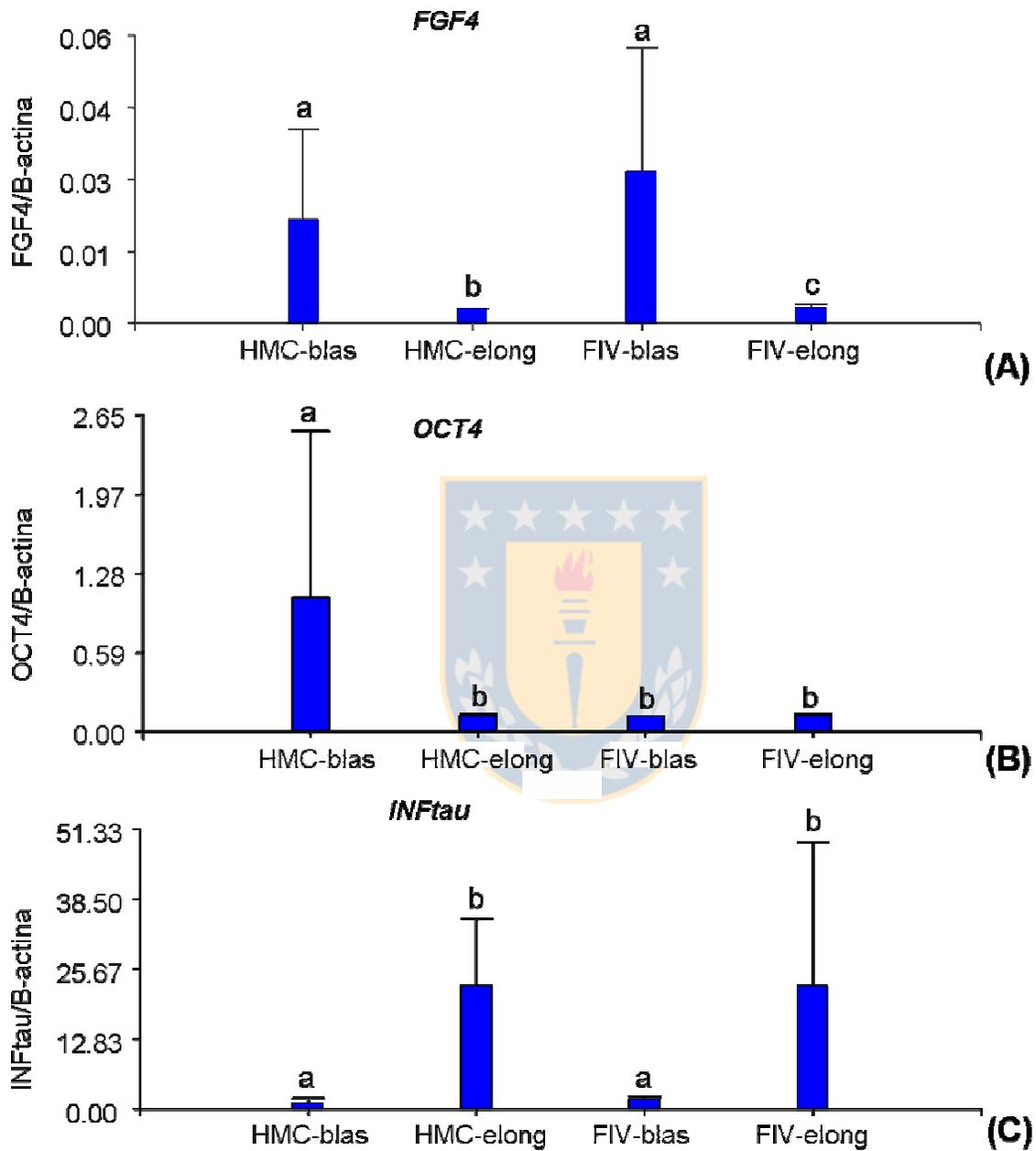


Figura 16. Cuantificación de los niveles de expresión de marcadores del ICM (A y B) y del TE (C) durante los periodos pre y peri-implantatorio en embriones clonados y de FIV.

HMC-blas, FIV-blas: blastocistos clonados y de FIV respectivamente.

HMC-elong, FIV-elong: embriones alargados clonados y de FIV respectivamente.

a,b, c: letras diferentes dentro de un mismo gráfico indican diferentes significativas con $P < 0.05$

2.4-Análisis global de la expresión génica en embriones peri-implantatorios

Finalmente se realizó un estudio por microarreglo de la expresión global génica en los embriones producidos por transferencia nuclear somática y por fecundación *in vitro*, durante el periodo peri-implantatorio. Con este fin se utilizó un arreglo bovino que contiene ADNc de 1800 genes individuales los cuales fueron obtenidos a partir de 8 librerías sustractivas como se explica en “Materiales y Métodos”. Cada slide contiene tres impresiones de cada gen que constituyen réplicas dentro de cada hibridación. Se realizaron tres experimentos de hibridación dentro de los cuales se consideraron réplicas técnicas para minimizar los cambios falsos de la expresión génica e identificar los genes que realmente se encuentran diferencialmente expresados. Para la hibridación se utilizaron los ARNm totales, obtenidos a partir de los embriones elongados correspondientes a las muestras HMC4 y 5 e FIV1.

De los 1800 genes representados en el arreglo, 1321 (73.4%) se encontraron expresados en los embriones estudiados (clones y FIV). Del total de genes expresados, 1274 presentan niveles de expresión similares en los clones y en los controles (FIV) (96.4%). El resto de los genes se encuentran derregulados en los embriones clonados con respecto a los embriones de FIV con una diferencia en los niveles de expresión superior a 2 veces ($-1 \geq \log_2 \text{mediana} \geq 1$). De forma general se determinó que 30 genes estuvieron sobre expresados en los embriones producidos por HMC mientras que 17 genes estuvieron sobre expresados en los embriones de FIV (Figura 17). De los 47 genes que se encuentran derregulados en los embriones clonados (ya sea hiper o hipo expresión), 2 no se encuentran identificados, el resto de los genes están identificados y sus secuencias publicadas en la base de datos del NCBI (Tabla 10). Los 45 genes identificados fueron clasificados según su función biológica utilizando el programa DAVID Bioinformatics Resources 2008 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). Esta clasificación mostró que 42 de estos genes tienen una función biológica conocida, las cuales están relacionadas con la síntesis de proteínas, unión a calcio, expresión génica, respuesta a estímulos y metabolismo entre otras (Figura 18). Algunos genes a su vez codifican para proteínas que participan en más de una función biológica.

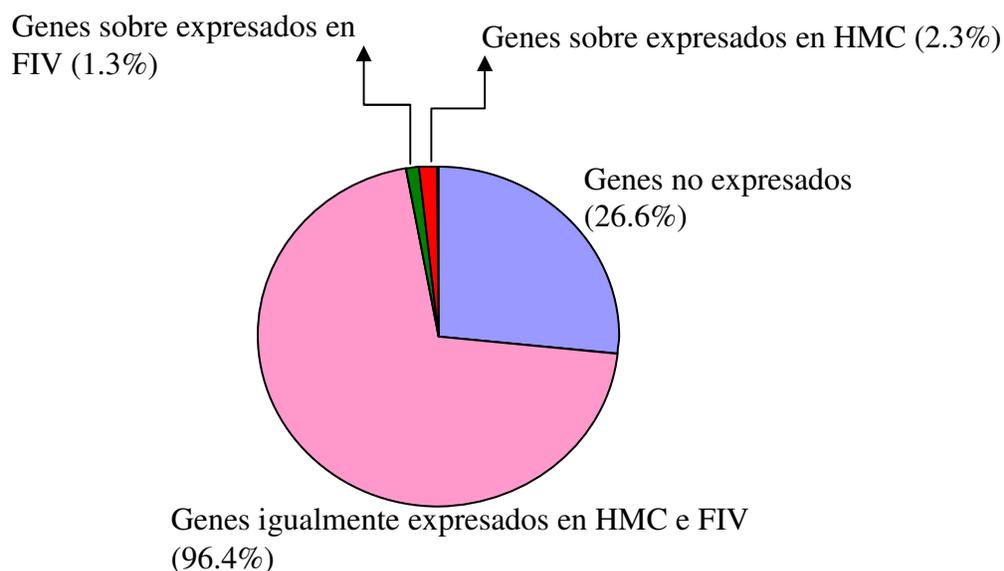


Figura 17. Análisis global de la expresión génica mediante microarreglo en embriones clonados (HMC) y embriones producidos por FIV (FIV)

Tabla 10: Genes con diferencia de expresión superior a dos veces entre clones y embriones producidos por FIV

log	Gen	Código de Acceso	Símbolo
GENES HIPO EXPRESADOS EN CLONES			
-1.79	Bos taurus similar to H2A histone family, member Y isoform 2	BC113287	H2AFY
-1.7	PREDICTED: Bos taurus similar to Wee1-like protein kinase (WEE1hu)	XM_598279	WEE1
-1.64	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4025331, chimeric	BC025983	-
-1.5	PREDICTED: Bos taurus hypothetical protein LOC616433 (LOC616433)	XM_881654	DPPA3
-1.5	Bos taurus Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide B/B' Isoform B'	BC112634	SNRPB1
-1.45	PREDICTED: Bos taurus similar to leucine-rich repeats and calponin	XM_581598	LRCH1
-1.32	Bos taurus calcium binding protein P22, mRNA (cDNA clone MGC:127971	BC103418	CHP (CBPP22)
-1.28	Homo sapiens serine/threonine protein kinase Kp78 splice variant	AF159295	TAK75a

Tabla 10 Continuación

-1.26	Mus musculus 18S ribosomal RNA-like mRNA, partial sequence	AY248756	-
-1.24	Bos taurus similar to chromosome 16 open reading frame 50, mRNA	BC111354	CCDC135
-1.22	Sus scrofa transposase DDE-like protein mRNA, complete cds	AY864607	-
-1.22	Bos taurus secreted protein, acidic, cysteine-rich (SPARC), mRNA	NM_174464	SPARC
-1.21	full-length cDNA clone CS0DM004YB03 of Fetal liver of Homo sapiens	CR596839	C17orf45
-1.18	PREDICTED: Bos taurus similar to Adapter-related protein complex	XM_580685	-
-1.11	PREDICTED: Bos taurus similar to NACHT, leucine rich repeat and	XM_583927	-
-1.1	PREDICTED: Bos taurus similar to projection protein PF6 (LOC535545),	XM_615649	SPAG17
-1.04	Homo sapiens bromodomain containing 4 (BRD4), transcript variant	NM_058243	BRD4
GENES SOBRE EXPRESADOS EN CLONES			
1.03	Bos taurus ribosomal protein, large P2, mRNA (cDNA clone MGC:133557	BC110143	RPLP2
1.04	Bos taurus ribosomal protein L35a (RPL35A), mRNA	NM_001025321	RPL35A
1.29	Bos taurus Aurora-A, mRNA (cDNA clone MGC:134472 IMAGE:8055804)	BC111181	AURKA
1.31	Bos taurus similar to chaperonin containing TCP1, subunit 2	BC103298	CCT2
1,35	Bos taurus tubulin, alpha 1 (testis specific) (TUBA1), mRNA	NM_001034204	TUBA4A
1.39	Bos taurus ribosomal protein S25 (RPS25), mRNA	NM_001025315	RPS25
1.42	Bos taurus ribosomal protein S3, mRNA (cDNA clone MGC:127206	BC102090	RPS3
1.42	PREDICTED: Bos taurus similar to synaptotagmin-like 2 isoform	XM_877270	-
1.46	PREDICTED: Bos taurus nucleolin, transcript variant 9 (NCL)	XM_874293	NCL
1.48	PREDICTED: Bos taurus similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	XM_880722	HSP60
1.55	20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase [cattle, testes, mRNA Partial	S54973	AKR1B1
1.56	Bos taurus ribosomal protein S12 (RPS12) mRNA, complete cds	AY528251	RPS12
1.59	Bos taurus tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)	NM_001014388	TPT1
1.66	Bos taurus guanine nucleotide binding protein (G protein), beta	BC102286	GNB2L1

Tabla 10 Continuación

1.73	Bos taurus enolase 1, mRNA (cDNA clone MGC:127526 IMAGE:7948635)	BC103354	ENO1
1.78	Bos taurus ribosomal protein S11 (RPS11), mRNA	NM_001024568	RPS11
1.81	Bos taurus ribosomal protein L10a, mRNA (cDNA clone MGC:127799)	BC102653	RPL10A
1.95	Bos taurus prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin	NM_174445	PTGS2
2.09	Bos taurus heat shock 70 kDa protein 8, mRNA (cDNA clone MGC:128130)	BC105182	HSPA8 (HSP70)
2.31	Bos taurus similar to interleukin enhancer binding factor 2,	BC111202	ILF2
2.36	Bos taurus keratin 8 (KRT8), mRNA	NM_001033610	KRT8
2.45	PREDICTED: Canis familiaris similar to nuclear autoantigenic	XM_532597	NASP
2.73	PREDICTED: Bos taurus similar to Keratin, type I cytoskeletal	XM_582930	KRT18
3.14	Bos taurus similar to nucleophosmin 1, mRNA (cDNA clone MGC:127254)	BC102099	NPM1
3.18	Bos taurus ribosomal protein L23, mRNA (cDNA clone MGC:127875)	BC102556	RPL23
3.98	Bos taurus trophoblast protein-1 (TP-1), mRNA	NM_001015511	TP1
4.17	PREDICTED: Bos taurus similar to Interferon delta-1 precursor	XM_871285	
5.61	Bos taurus trophoblast Kunitz domain protein 1 (TKDPI) mRNA	AF241776	TKDPI

Filas en negrita se refiere a los genes que fueron utilizados para la validación de los datos del microarreglo

Log: valor obtenido a partir de los experimentos de hibridación el cual fue utilizado para determinar las diferencias de expresión de los genes presentes en las muestras estudiadas (clones y embriones de FIV)

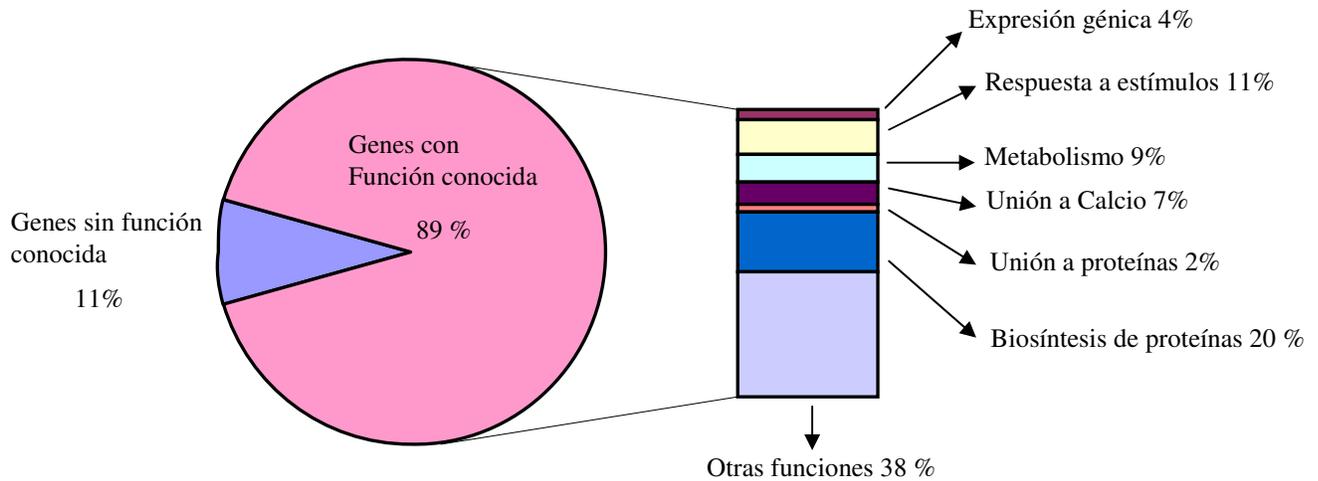


Figura 18. Clasificación según su función biológica de los genes diferencialmente expresados en los embriones clonados y de FIV. Clasificación basada en el programa DAVID Bioinformatics Resources 2008 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)

Para la validación de los datos obtenidos a partir del microarreglo se determinaron los niveles de expresión, mediante PCR tiempo real, de 6 genes que se encontraron derregulados en este experimento y los cuales fueron seleccionados al azar. Basados en los valores obtenidos a partir del microarreglo se seleccionaron tres genes que se encontraron sobre expresados en los clones (TP1, TKDP1, HSP70) y tres sobre expresados en los embriones de FIV (SPARC, SNRB1 y CBPP22). El análisis de correlación se realizó incluyendo las muestras de clones y embriones de FIV que fueron utilizadas para los experimentos de hibridación (HMC4, HMC5 y FIV1). De los seis genes seleccionados, cinco de ellos (TP1, TKDP1, SPARC, SNRB1 y CBPP22) tuvieron un comportamiento similar en el microarreglo y en el PCR tiempo Real con $R^2=0.92$ y $P<0.05$ (Figura 19). Cuando se compararon los niveles de expresión obtenidos por PCR tiempo final, se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) para los genes TP1, TKDP1, SPARC y HSP70, por el contrario no hubo diferencia significativa entre los niveles de expresión de clones e FIV para los genes SNRB1 y CBPP22 (Figura 20).

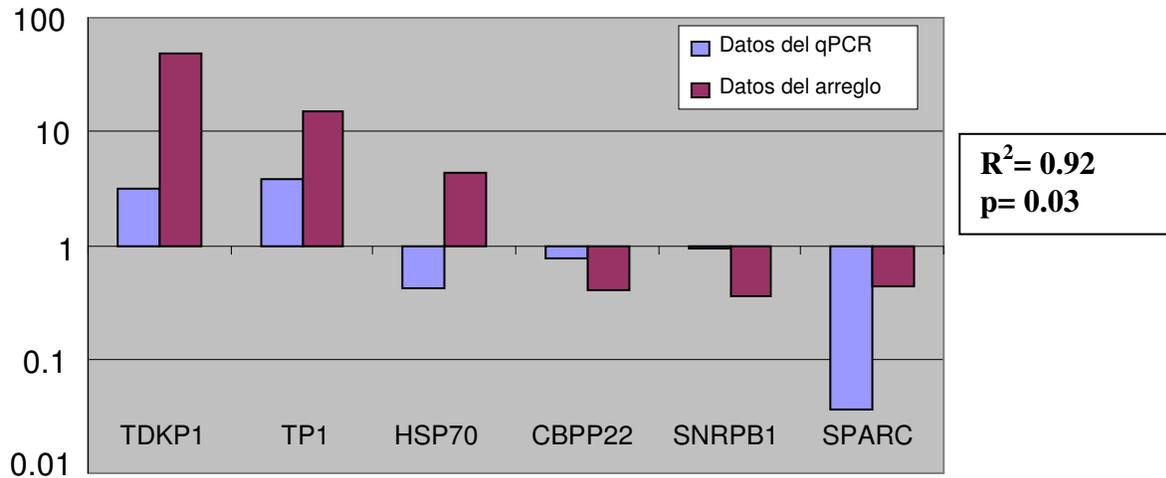


Figura 19. Correlación entre la proporción de la expresión entre embriones clonados y producidos *in vitro* obtenida por qPCR y por microarreglo. Las réplicas biológicas analizadas en el qPCR son las mismas que se utilizaron para el microarreglo

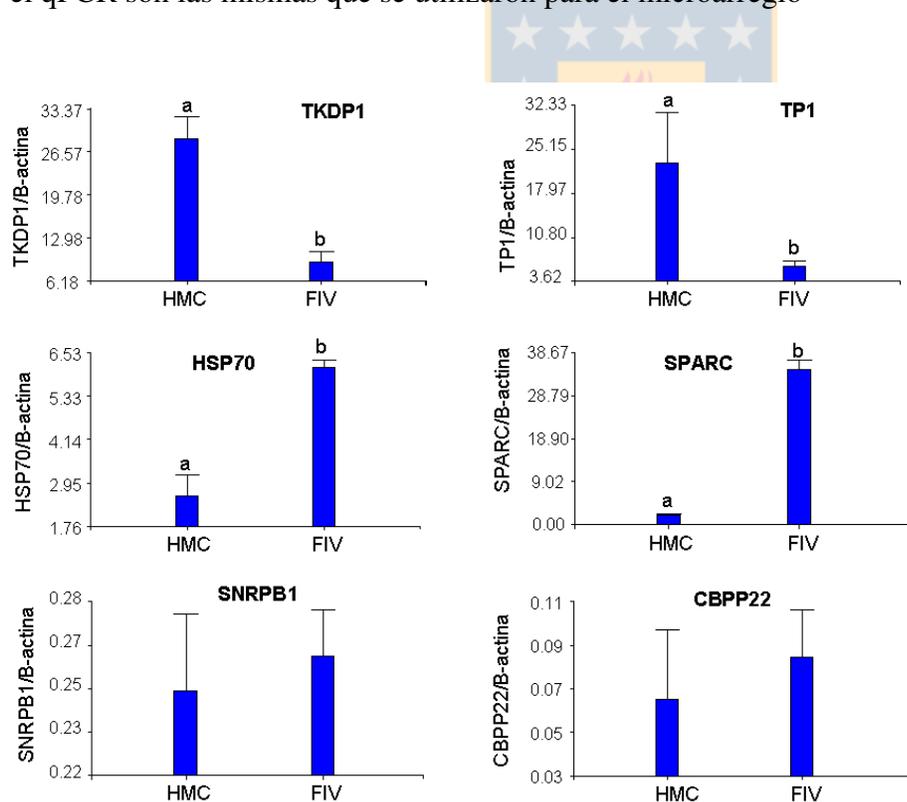


Figura 20. Cuantificación de la expresión de genes encontrados diferencialmente expresados en el estudio por microarreglo en embriones elongados clonados (HMC) y producidos por fecundación *in vitro* (FIV)

a, b: letras diferentes en un mismo gráfico significa diferencia significativa con $P < 0.05$

2.5-Evaluación del desarrollo post-implantatorio de embriones clonados

Como se muestra en la Tabla 11, 9 de los 17 blastocistos transferidos se implantaron. Las gestaciones fueron detectadas al día 35, diagnosticándose cinco gestaciones simples y dos gestaciones gemelares. Al día 85 solo se mantuvieron 4 gestaciones simples las cuales continuaron hasta el último trimestre. Uno de los fetos se perdió por aborto espontáneo al séptimo mes y un segundo feto al octavo mes de gestación. El resto de los fetos continuaron su desarrollo a término y ambos nacieron vivos pero solo uno de ellos fue capaz de sobrevivir más de dos meses (Tabla 11 y Figura 21).

Tabla 11. Resumen del desarrollo post-implantatorio de embriones clonados producidos con la línea celular adulta

No. Embriones transferidos	No. Hembras trasferidas	Hembras gestadas al día: (%)					Nacidos Vivos
		35	85	150	210	280	
17	14	7 (50*) (41**)	4 (28.5*) (23.5**)	4 (28.6*) (23.5**)	4 (28.6*) (23.5**)	3 (21.4*) (17.6**)	2 (14.3*) (11.8**)

*: eficiencia por receptoras

** : eficiencia por embriones



a



b

Figura 21. Victoria, ternera clonada a partir de la línea celular adulta (CWA).

a: a las 24 horas de vida. b: a los dos meses de vida

DISCUSIÓN

Capacidad de diferentes líneas celulares de generar embriones clonados

En la primera etapa de este trabajo se evaluó la capacidad de dos líneas celulares, una fetal (LCF) y otra adulta (CWA), de producir embriones clonados mediante una técnica de transferencia nuclear somática no convencional “Hand made cloning” (HMC). Las células donantes de núcleos son uno de los principales factores que afectan la eficiencia de la clonación somática. La capacidad de éstas de fundirse con el citoplasto receptor y posteriormente ser reprogramadas va a depender de la línea celular utilizada como donante de núcleo y esto a su vez influye en la eficiencia de producción de embriones (Miyoshi et al., 2003).

Los experimentos preliminares mostraron que no existen diferencias en los porcentajes de fusión de las líneas celulares LCF y CWA. Además la sobrevivencia a la fusión no dependió de la línea celular utilizada. Se demostró de forma indirecta que la membrana de las células donantes no se afectó significativamente debido al aislamiento de la línea celular, durante las rutinas de trabajo con las células, tales como cultivo *in vitro*, congelación y descongelación, ni por el pulso eléctrico durante la fusión. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hayes y colaboradores (2005a) quienes demostraron el efecto de los métodos de congelación sobre la estructura de las membranas celulares. Daños considerables en las membranas producto de la congelación, se reflejan en una disminución significativa en los porcentajes de fusión (25.62% vs 54.64%). Los porcentajes de fusión obtenidos con ambas líneas celulares fueron superiores a los reportados para la técnica de clonación con micromanipuladores independientemente de las células donantes (Hayes et al., 2005a) y similares a los reportados para HMC en bovinos (Vajta et al., 2003).

Es probable que la alta eficiencia de fusión obtenida, utilizando HMC, esté dada por un mayor contacto entre las membranas de la célula donante y el ovocito receptor debido a la ausencia de la zona pelúcida del ovocito. Por otra parte la producción de blastocistos a partir de cada una de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo, no dependió de la eficiencia de fusión ni de la sobrevivencia de los embriones reconstruidos. Todos los grupos de transferencia nuclear, realizados con ambas líneas celulares produjeron blastocistos al día 7 con una alta eficiencia. De lo discutido anteriormente, se puede concluir que la generación eficiente de embriones clonados

a partir de las dos líneas celulares empleadas, fue independiente de las condiciones de cultivo o tipo de las mismas (fetales y adultas). Esto refleja que los núcleos donantes pueden ser reprogramados al ser transferidos a ovocitos receptores.

No obstante, la eficiencia de generación de blastocistos clonados varió significativamente, obteniéndose mejores resultados con la línea celular adulta (38.2% con LCF y 65.7% con CWA). En la literatura, los resultados más eficientes de producción de blastocistos bovinos mediante transferencia nuclear somática con micromanipuladores, se encuentran alrededor de un 30% (First et al., 2002). Los datos publicados de producción de clones mediante HMC aún son muy escasos incluso en bovinos, aún así, los mejores resultados de producción de blastocistos (52% con una línea celular fetal y 49% con células de la granulosa) fueron publicados por Vajta y colaboradores quienes establecieron esta técnica de clonación en bovinos y posteriormente en porcinos (Vajta et al., 2003; Li et al., 2006b). En este estudio, la eficiencia de generación de embriones clonados, expresada en términos de porcentajes de blastocistos al día 7, para la línea LCF fue similar a la reportada para transferencia nuclear bovina independientemente del método (HMC o convencional), sin embargo, la línea adulta (CWA) produjo de manera repetible un mayor porcentaje de blastocistos que lo reportado hasta ahora para la especie bovina, ya sea por HMC o clonación convencional. Los datos se comparan favorablemente con las tasas de blastocistos que se obtienen en los mejores casos, a través de FIV (Vajta et al., 2001).

Teniendo en cuenta estos resultados se podría deducir que la línea celular adulta es más eficiente para la producción de embriones clonados que la línea fetal. Durante los primeros años, después del nacimiento de Dolly, muchos autores sustentaron la hipótesis que las células fetales son más eficientes para la producción de embriones clonados que las líneas de células adultas. Las células fetales son más cercanas a las embrionarias en cuanto al tamaño de los telómeros y su capacidad de proliferación (Hill et al., 2000). A pesar de esto, los resultados publicados demuestran que las células adultas pueden ser tan eficientes como las fetales y la capacidad de reprogramación nuclear podría estar dada por las diferencias entre cada línea celular más que por el origen de éstas (Kuhholzer et al., 2001; Miyoshi et al., 2003). Por tanto, el hecho que la línea celular CWA sea capaz de producir mayores porcentajes de embriones en estadio de blastocisto que la línea LCF podría ser atribuible a condiciones epigenéticas de este cultivo más que al origen de la línea en lo referente a la edad del individuo donante.

Evaluación del desarrollo pre-implantatorio de embriones clonados

En la mayoría de los estudios en los que se compara la influencia de diferentes líneas celulares sobre la eficiencia de la clonación somática, los resultados son expresados en tasas (porcentuales) de blastocistos producidos a partir de cada una de ellas. Muy pocos de estos trabajos analizan la calidad de los embriones producidos, de forma que se pueda intentar predecir el éxito de la implantación y el desarrollo post-implantatorio. Teniendo en cuenta este aspecto, en este trabajo se determinó la calidad en términos morfológicos y de expresión génica de los embriones clonados en estadio pre-implantatorio, producidos a partir de cada una de estas líneas celulares.

Evaluación morfológica

Uno de los métodos más sencillos para evaluar la calidad de los embriones se basa en características morfológicas tales como el número de células totales. Debido a que los embriones pre-implantatorios crecen por la activa replicación de las blastómeras, el número total de células (NTC) es comúnmente utilizado para evaluar la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones (Ushijima et al., 2008). En bovinos, a los siete días de desarrollo, el embrión tiene aproximadamente 120 células (Morris et al., 2000). Los embriones clonados, producidos con las líneas LCF y CWA tuvieron en promedio, un número de células totales similares (95 y 98 respectivamente). Este número es aceptado por la IETS (International Embryo Transfer Society) para clasificar embriones bovinos producidos *in vitro* dentro de la categoría I. Ushijima y colaboradores (2008) reportaron datos similares para blastocistos bovinos producidos por transferencia nuclear con micromanipuladores.

Además del número de células totales, la evaluación morfológica considera la formación del macizo celular interno (ICM), trofoblasto (TB), una adecuada cavitación y expansión del embrión. Este método no es invasivo y permite determinar la calidad de los embriones, así como predecir el éxito de las gestaciones (Utsunomiya et al., 2008). En el presente trabajo de tesis se realizó una evaluación de la morfología de los embriones clonados al día 7 de desarrollo, producidos a partir de ambas líneas celulares. En este caso los embriones fueron agrupados en las categorías I y II según la apariencia del ICM y del TB, así como la expansión del blastocele. El

promedio de blastocistos clase I producidos con la línea CWA fue significativamente superior a los producidos con la línea LCF (83.9% y 70.4% respectivamente). Nishigai y colaboradores (1999) demostraron que los blastocistos bovinos producidos *in vivo* clasificados en la categoría “excelente” (equivalente a clase I en este trabajo), produjeron tasas de gestaciones significativamente superiores que los embriones de la categoría “buenos” (equivalente a clase II en este trabajo). Esto sugiere que la línea celular adulta es capaz de producir un mayor porcentaje de embriones con mayor probabilidad de continuar su desarrollo a juzgar por su calidad morfológica.

Evaluación de los patrones de expresión génica

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en porcentajes de blastocistos así como en la calidad de los embriones producidos a partir de ambas líneas celulares se podría concluir que la línea celular CWA es más eficiente para producir embriones clonados que la línea LCF. No obstante, este resultado no refleja el estado de reprogramación que sufrió el núcleo donante después de la transferencia. Existen reportes que demuestran que en embriones clonados muchos de los genes necesarios para el desarrollo embrionario no se regulan adecuadamente, aún cuando la morfología y la velocidad de desarrollo indican que son embriones completamente normales (Niwa et al., 2000). Es muy probable que estos problemas en la regulación de genes durante los diferentes estadios de desarrollo sean la causa de la baja eficiencia en la implantación y mantenimiento de las gestaciones que se produce cuando se transfieren embriones clonados. El conocimiento de la habilidad de reprogramación de las células donantes, podría incrementar significativamente la eficiencia de la clonación somática. En este sentido sólo se transferirían a hembras receptoras aquellos clones producidos a partir de células cuyo potencial de reprogramación sea suficiente para generar embriones con patrones de expresión génica que no difieren significativamente de los patrones de embriones producidos por FIV o *in vivo*.

En el presente trabajo se evaluó la expresión de genes cruciales para el desarrollo embrionario, seleccionándose marcadores del ICM y del TB en los embriones clonados producidos a partir de ambas líneas celulares. Los patrones de expresión obtenidos en los clones además fueron comparados con el patrón de blastocistos producidos por FIV (controles). Dentro de estos genes expresados por el ICM se estudiaron los marcadores de totipotencia OCT4, NANOG y SOX2 los

cuales son reguladores positivos del linaje celular del ICM y FGF4 que actúa sobre las células del TB. Los marcadores trofoblásticos estudiados fueron CDX2, INFTau y EOMES.

Similar a lo reportado por otros investigadores, en los blastocistos de FIV, se detectó la presencia de transcritos de todos los genes estudiados excepto EOMES (Hall et al., 2005; Degrelle et al., 2005). EOMES tampoco se detectó en ninguno de los grupos de clones independientemente de la línea celular utilizada. Este resultado contradice los datos reportados por Hall y colaboradores (2005) quienes determinaron la expresión de EOMES en uno de los grupos de embriones bovinos producidos por FIV, incluidos en el estudio realizado por dichos investigadores.

En blastocistos de ratón, EOMES es expresado por las células del trofoblasto polar, controlando la diferenciación entre las células del trofoblasto polar y el mural (Kimber et al., 2008). Sin embargo no está clara la posible función de las células del trofoblasto polar en embriones bovinos. En la mayoría de los mamíferos, excepto en roedores y en primates superiores, el trofoblasto polar desaparece inmediatamente después de la expansión y protrusión del blastocisto (Degrelle et al., 2005). Es muy probable que mediante PCR tiempo final no sea posible detectar los niveles de EOMES en blastocistos bovinos debido al bajo número de células responsables de su expresión en este estadio de desarrollo, lo cual sugiere que este gen es necesario en etapas más tardías en el caso de embriones bovinos. Los datos obtenidos por Hall y colaboradores (2005), podrían ser el resultado de aberraciones en la expresión de EOMES debido al sistema de producción *in vitro*, teniendo en cuenta que solo detectaron EOMES en no de los grupos analizados.

En cuanto a los embriones clonados, solo el grupo W7 (clones producidos con CWA) presentó el mismo patrón de expresión génica que los embriones de FIV por lo que se podría inferir que la línea adulta es capaz de ser reprogramada correctamente después de la transferencia, al menos al tomar en cuenta los genes estudiados. El patrón de expresión difiere esencialmente entre los grupos de clones producidos con células distintas (LCF vs CWA) y entre clones y embriones de FIV (LCF-CWA vs FIV). A pesar de las diferencias globales observadas en los patrones de expresión génica, OCT4, CDX2 e INFTau se expresaron en todos los grupos de embriones independientemente de la línea celular utilizada. Estudios previos han demostrado que la continuidad del desarrollo de embriones de ratón, más allá del estadio de blastocisto depende de la expresión de OCT4 (Nichols et al., 1998) y sus niveles determinan la diferenciación o no de las células madres embrionarias (Niwa et al., 2000). En embriones bovinos en estadio de

blastocisto, la expresión de OCT4 se restringe al ICM (Boiani et al., 2002), no obstante los niveles de proteína permanecen elevados en el TB, posiblemente por la activa proliferación de las células trofoblásticas durante este estadio de desarrollo (Kirchhof et al., 2000). Por tanto, la expresión de OCT4 en todos los embriones producidos es un elemento positivo que sugiere una mayor capacidad de desarrollo *in vitro*.

Por su parte, la expresión constante de INFTau y CDX2 en los embriones clonados, demuestra que efectivamente se produce diferenciación celular y formación de células del TB en el estadio de blastocisto. Recientemente se ha observado que CDX2 juega un papel esencial para la segregación del ICM y del TB en embriones de ratón mediante la represión de OCT4 y NANOG en la células del TB (Strumpf et al., 2005; Ralston et al., 2008). En bovinos CDX2 es crucial para el correcto desarrollo de la placenta y patrones de expresión aberrados de este gen conllevan a problemas en la implantación (Hall et al., 2005; El-Sayed et al., 2007). Hall y colaboradores (2005), reportaron la expresión de CDX2 en embriones bovinos en estadio de blastocisto producidos tanto *in vivo*, por FIV como por transferencia nuclear somática. Sin embargo, la expresión de este gen se ve afectada por los métodos de clonación empleados por estos investigadores (Hall et al., 2005). En rumiantes, INFTau es el responsable del reconocimiento de la gestación mediante la activación de la expresión de proteínas endometriales necesarias para la correcta implantación y mantenimiento de la preñez (Lonergan et al., 2003). Por tanto, la detección de INFTau en todos los grupos de embriones (clones y FIV) incluidos en este trabajo, podría ayudar a predecir de forma preliminar una correcta implantación de éstos.

Los genes SOX2, NANOG y FGF4 presentaron un patrón de expresión diferencial entre los grupos de embriones clonados comparados con los de FIV, incluso entre grupos de clones de una misma línea celular. Existen muy pocos reportes sobre la localización y función de SOX2 y NANOG en embriones bovinos pre-implantatorios. Al menos en ratón, NANOG y SOX2 comparten con OCT4 el rol de mantener las características de las células del ICM (Avilion et al., 2003). A pesar de la aberrada expresión de NANOG y SOX2, todos los embriones estudiados mostraron una morfología excelente, por tanto se podría decir que OCT4 es suficiente para mantener las células del ICM, al menos hasta estadio de blastocisto en embriones bovinos.

Se ha demostrado que en embriones de ratón, OCT4 y SOX2 activan la expresión de FGF4, el cual actúa como señal paracrina sobre la proliferación y diferenciación del trofoectodermo (Rossant y Cross, 2001). Existe un marcado déficit de información científica publicada, referente

a la expresión coordinada de estos factores en embriones bovinos. En ratón la expresión de genes asociados al mantenimiento de pluripotencia incluyendo FGF4, UTF1, FBXO15, LEFTY1 y NANOG, es regulada por un “enhancer” que contiene sitios de respuesta a OCT4 y SOX2 (Oct-Sox). A su vez este enhancer también regula la expresión de SOX2 y OCT4 mediante un mecanismo de retroalimentación positiva (Masui et al., 2007). SOX2 es indispensable para mantener la pluripotencia de las células madres de ratón, la ausencia de SOX2 en estas células promueve la diferenciación en células similares al trofoectodermo, lo cual sugiere que la expresión de OCT4 va a depender de la activación mediada por SOX2. La represión de SOX2 promueve la expresión de genes marcadores del trofoectodermo lo cual se potencia con la disminución paulatina de los niveles de OCT4 debido a la ausencia de SOX2.

Existen evidencias que indican que la función de SOX2 sobre la activación de los marcadores de pluripotencia, puede ser inicialmente remplazada o apoyada por otros miembros de la familia Sox. Masui y colaboradores (2007) demostraron que además de SOX2, al menos en ratón, SOX4, SOX11 y SOX15 también pueden actuar sobre este sitio para la regulación de la expresión de los genes antes mencionados (Figura 22). Esto demuestra que aún en ausencia de SOX2, en embriones de ratón, es posible activar la expresión de OCT4 y posiblemente de otros genes como FGF4 y NANOG.

En este trabajo de tesis no se logró detectar mediante PCR tiempo final la expresión de FGF4 en el grupo experimental F6 (clones de la línea fetal) ni NANOG en el grupo W2 (clones de la línea adulta) a pesar de que ambos grupos expresaron tanto OCT4 como SOX2. A partir de estos resultados, se postula como una hipótesis tentadora, que la expresión conjunta de OCT4 y SOX2 no fue suficiente para inducir la expresión de FGF4 ni NANOG en embriones bovinos. El hecho que en todos los grupos de embriones clonados, se observara la expresión de OCT4 sugiere que en embriones bovinos, probablemente existan circuitos paralelos que actúen sobre un enhancer similar al existente en ratones y que regula la expresión de OCT4, FGF4 y NANOG independientemente de la expresión de SOX2.

Los embriones de ratón, mutantes negativos para el gen FGF4, aún cuando su apariencia morfológica es normal, no son capaces de sobrevivir después de la implantación (Arman et al., 1998). En estos embriones el ICM y las células gigantes del TB degeneran, esto sugiere que FGF4 es necesario más tardíamente para el correcto desarrollo de los embriones (Avilion et al., 2003). Coincidente con los resultados obtenidos por Avilion y colaboradores, existen reportes

que demuestran la deregulación en la expresión de SOX2, FGF4 y NANOG, en embriones bovinos clonados lo cual podría ser una de las causas del bajo potencial de desarrollo de estos embriones a partir del estadio de blastocisto. Amarnath y colaboradores (2007), determinaron que FGF4 es expresado en el 67% de los blastocistos producidos por FIV y en el 44% de los blastocistos clonados. Lo cual concuerda con los datos obtenidos por Daniels y colaboradores (2001) quienes reportaron que sólo el 30% de los blastocistos producidos por transferencia nuclear presentan una relación normal entre el número de células totales y el número de células del ICM y este resultado podría estar atribuido a la carencia o incorrecta expresión de FGF4 en éstos embriones. En nuestro caso, FGF4 fue detectado sólo en el 33% de los grupos de embriones clonados incluidos en este estudio, lo que coincide con lo anteriormente discutido.

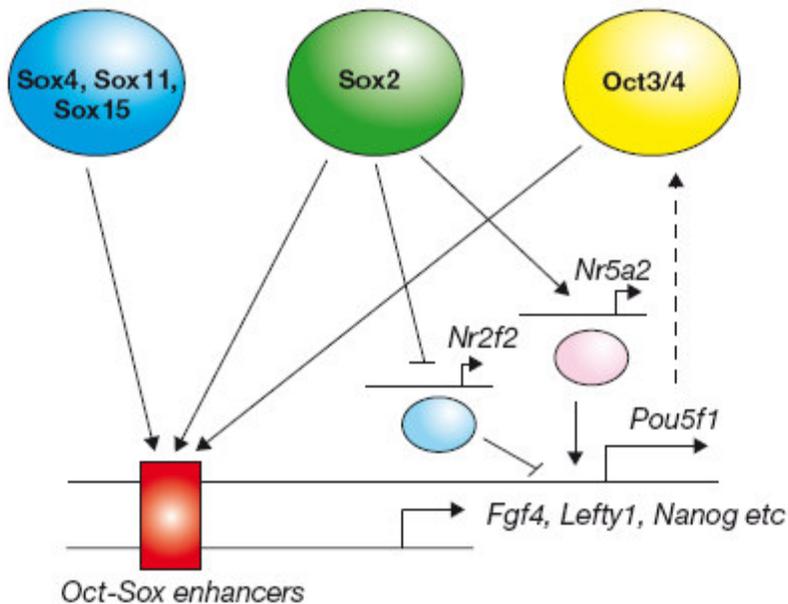


Figura 22. Representación esquemática del modelo transcripcional gobernado por los factores OCT4 y la familia Sox. SOX2 y otros factores Sox regulan, de forma redundante, la expresión de los genes dependientes del enhancer Oct-Sox, mientras que sólo SOX2 regula múltiples factores de transcripción los cuales pueden tener un efecto positivo o negativo sobre la expresión de OCT4. Tomado de: Masui et al., 2007)

Cuantificación de la expresión de genes cruciales para el desarrollo (etapa pre-implantatoria)

Los datos obtenidos mediante el estudio cualitativo indican que existe una deregulación en los patrones de expresión génica entre los clones producidos a partir de ambas líneas celulares y de estos a su vez con los embriones producidos por FIV, aún así no se puede concluir sobre los niveles de deregulación de la expresión de los genes estudiados. Para ello se cuantificaron los niveles de expresión de algunos de los genes estudiados anteriormente. En estudios anteriores se ha demostrado que los niveles de OCT4 son importantes para mantener el estado indiferenciado de las células madres y de las células del ICM en embriones de ratón (Niwa et al., 2000). Por otra parte, dada la importancia del INFtau en el reconocimiento de la gestación por el ambiente materno es muy probable que los niveles de expresión de este gen tengan una influencia significativa para desencadenar la cascada de señalización relacionada con la implantación. Existen varios estudios que vinculan los niveles de ARNm de INFtau así como la habilidad de secretar la proteína con la capacidad de desarrollo y la calidad de los embriones bovinos (Kubisch et al., 1998; Neira et al., 2007; Rizos et al., 2007; Roberts et al., 2008). Teniendo en cuenta estos aspectos se podría pensar que los niveles de expresión de NANOG, EOMES y FGF4 también son fundamentales para la diferenciación y mantenimiento de las células del trofoblasto y del ICM en el estadio de blastocisto.

A pesar de la importancia que tienen los genes SOX2 y CDX2 en los mecanismos de señalización para la expresión de genes importantes en este período de desarrollo, no fueron incluidos en este estudio ya que la cantidad de copias en estadio de blastocisto no permite la amplificación dentro de la región cuantificable de la curva en el PCR tiempo real (Smith et al., 2007). No fue posible la cuantificación de los genes NANOG y EOMES, posiblemente debido al bajo número de copias de éstos durante este estadio de desarrollo, no obstante se logró la amplificación de ambos transcritos lo que evidencia la activación de ambos genes tanto en embriones producidos *in vitro* como en embriones clonados independientemente de la línea celular utilizada. Este resultado indica que la expresión de EOMES en embriones bovinos, comienza durante la etapa de blastocisto pero sus niveles son probablemente muy bajos como para ser detectados por técnicas menos sensibles como el PCR tiempo final.

Se cuantificaron los niveles de expresión de los genes OCT4, INFtau y FGF4. Para los genes INFtau y FGF4 no se observaron diferencias significativas entre los clones producidos con CWA

y los embriones de FIV pero sí entre los clones de LCF y los embriones de FIV. Este resultado constituye una evidencia que las células adultas son capaces de producir embriones más cercanos a los controles en términos de expresión génica. Yao y colaboradores (2008) así como Arnold y colaboradores (2006) tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de INFTau entre embriones bovinos clonados, producidos por FIV e *in vivo*. Sin embargo, Lo y Summers (2002) reportaron que los blastocistos bovinos con diferencias morfológicas no tienen la misma capacidad para sintetizar y secretar INFTau, lo cual sugiere que la expresión de este gen está relacionada con el estadio de desarrollo y la calidad de los embriones bovinos producidos por diferentes procedimientos. Este planteamiento justificaría las diferencias en los niveles de INFTau entre clones producidos a partir de dos líneas celulares diferentes, demostrando que en el caso de la clonación somática, la línea celular afecta en diferente medida la capacidad de desarrollo de los embriones.

A pesar de no existir diferencias significativas entre los embriones clonados de células adultas y los embriones de FIV, los niveles de transcripto tanto de INFTau como de FGF4, fueron menores en los embriones clonados que en los embriones de FIV. Esta diferencia podría influir sobre el desarrollo del TB en los embriones clonados, teniendo en cuenta el papel de FGF4 sobre la proliferación y diferenciación de las células trofoblásticas. Los niveles de expresión de estos genes se podrían ver reflejados en etapas de desarrollo más tardías como la elongación, el reconocimiento y mantenimiento de la gestación.

OCT4 por el contrario, tuvo niveles de expresión similares entre los clones de LCF y los embriones de FIV, mientras que en los clones de CWA los niveles de expresión de este gen fueron significativamente superiores. Estudios recientes han demostrado anomalías en la expresión de OCT4 en embriones producidos por transferencia nuclear somática (Humphreys et al., 2002; Bortvin et al., 2003; Sebastiano et al., 2005), así como la correlación entre dichas anomalías y la influencia de la clonación sobre la capacidad de desarrollo de embriones de ratón (Boiani et al., 2002). Beyhan y colaboradores (2007b) demostraron que los embriones clonados generados a partir de células con alta capacidad para producir clones vivos, presentaron mayores niveles de expresión de OCT4 que aquellos blastocistos producidos con células menos eficientes (en términos de clones vivos). A su vez, los clones de células altamente eficientes presentaron niveles de expresión de OCT4 superiores a los niveles de expresión de embriones de FIV a los 7

días de desarrollo (Beyhan et al., 2007b). Esto sugiere que los niveles de OCT4 están relacionados directamente con la capacidad desarrollo de los embriones.

Los grupos de embriones clonados, independientemente de la línea celular utilizada, en los que no se detectó la presencia de SOX2 mediante PCR tiempo final, presentaron los mayores niveles de expresión de OCT4. Estos valores a su vez fueron significativamente diferentes (mayores) a los determinados en aquellos grupos de clones que sí expresaron SOX2 (datos no mostrados). Aún cuando estos resultados son preliminares y no arrojan una conclusión definitiva, se puede postular que existe una relación directa entre la expresión de SOX2 y los niveles de expresión de OCT4 en embriones bovinos.

El análisis de la variabilidad en la expresión de OCT4, INFTau y FGF4, indicó que sólo existen diferencias significativas en los niveles OCT4 entre los grupos de embriones clonados a partir de células adultas. Por tanto, la variabilidad total de los genes individuales entre los embriones clonados con la línea fetal y la línea adulta fue significativamente diferente sólo para OCT4. Por el contrario, Smith y colaboradores (2007) no encontraron diferencias significativas en la variabilidad de la expresión de OCT4 u otros genes estudiados entre embriones producidos por TN, FIV o producidos *in vivo*. Lo que sugiere que la diferencia que se produce entre los grupos de embriones producidos a partir de la línea de células adultas puede deberse a que éstas son más refractarias a la reprogramación de la expresión de este gen.

Es necesario destacar que mediante PCR tiempo final, se detectó que las células somáticas utilizadas como donantes de núcleo, expresaron marcadores de totipotencia: OCT4, SOX2 y NANOG en el caso de las células fetales y OCT4 y SOX2 en el caso de las células adultas. Este hallazgo es contradictorio con los datos publicados donde la expresión de estos genes se restringe a las células embrionarias, ICM y células madres, al menos en ratones y humanos (Sharov et al., 2007). Debido a la importancia de estos genes en el desarrollo embrionario, su activación en las células donantes puede influir en su capacidad para ser reprogramadas en el citoplasto receptor. Se conoce que existen pseudogenes de OCT4 por tanto el producto obtenido en las células somáticas podría corresponder a un pseudogen y no a OCT4. Los resultados de la secuenciación del producto de PCR, la inmunohistoquímica para determinar la presencia de la proteína de OCT4 (datos no mostrados) así como la especificidad del producto obtenido mediante qPCR, demostraron que efectivamente se trataba del gen OCT4.

La cuantificación de OCT4 en las células mostró que los niveles de expresión de este gen en la línea adulta fueron significativamente superiores a los de la línea fetal. Como se mencionó anteriormente, OCT4 se expresa en las células germinales y en los embriones pre-implantatorios por tanto, es muy probable que los ovocitos no presenten mecanismos para reprimir la expresión de este gen aún cuando sus niveles excedan los normales (tomando como referencia los niveles de embriones de FIV). Siendo así, los citoplastos receptores no fueron capaces de reprogramar la expresión de OCT4 proveniente de las células donantes, lo que explicaría los altos niveles de ARNm de este gen en los clones producidos con CWA.

Las diferencias en los patrones de expresión génica que se observaron entre los embriones clonados y los embriones de FIV, podrían estar determinadas por un factor adicional, la ausencia de zona pelúcida en los clones. No se conoce el papel de esta estructura en el control de la expresión génica en embriones pre-implantatorios. No obstante, en estudios realizados recientemente en embriones de ratón, donde la zona pelúcida fue removida inmediatamente después de la fecundación, se observó una reducción significativa de los niveles de metilación del ADN en los estadios de dos y cuatro células pero no en los estadios pronuclear, mórula y blastocisto (Ribas et al., 2006). Hasta el momento no existen otras evidencias con las que se puedan comparar los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, de forma que puedan ser atribuidos en parte, a la ausencia de zona en los embriones clonados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta este momento se demostró que las líneas celulares utilizadas como donante de núcleo no sólo presentan diferencias en su capacidad de generar embriones clonados en estadio de blastocisto, sino que estos embriones difieren en cuanto a su calidad, medida en términos morfológicos y de expresión génica. Aún cuando ninguna de las dos líneas celulares generan embriones clonados con un patrón de expresión génica idéntico al de los embriones de FIV, los embriones clonados, producidos a partir de la línea CWA fueron más “cercaños” a los de FIV que los creados con la línea LCF. Además, las células adultas no sólo fueron más eficientes para la producción de embriones clonados sino que estos embriones presentaron un mayor porcentaje de blastocistos clase I. Estos datos demuestran que existe una relación entre la capacidad de una línea celular de generar embriones en estadio de blastocisto y la calidad de estos en términos morfológicos y de expresión génica. Por tanto los métodos no invasivos podrían ser predictivos de la calidad de la expresión génica en embriones clonados.

Evaluación del desarrollo peri-implantatorio de embriones clonados

Debido a la alta eficiencia de la línea celular adulta para generar embriones clonados, ésta fue elegida para evaluar la calidad y capacidad de desarrollo *in vivo* de embriones clonados producidos por HMC. Hasta este momento, la mayoría de los trabajos relacionados con la expresión génica en embriones bovinos, se ha enfocado en la etapa de blastocisto, debido probablemente a la disponibilidad de las muestras a estudiar. Es muy posible que muchos genes que regulan las etapas más tardías de diferenciación no se encuentren expresados durante el periodo pre-implantatorio, de ahí la utilidad de estudiar la expresión génica en la etapa peri-implantatoria.

La capacidad de desarrollo de los embriones clonados producidos a partir de la línea celular CWA fue evaluada a través del desarrollo *in vivo* (elongación del trofoblasto y presencia del botón embrionario) así como mediante el estudio de los patrones de expresión génica comparado con embriones de FIV.

Evaluación morfológica

Las tasas de recuperación de embriones bovinos en estadio peri-implantatorio, coinciden con lo reportado por otros investigadores (Degrelle et al., 2005; Arnold et al., 2006; Sawai et al., 2007) y estas a su vez no fueron significativamente diferentes entre clones y embriones de FIV. El 100% de los embriones recuperados al día 17 de desarrollo se encontró en estadio filamentososo o de elongación por lo que se concluye que tanto los embriones clonados como los de FIV fueron capaces de continuar su desarrollo *in vivo*. A pesar de esto, la talla de los clones fue significativamente menor que la de los embriones de FIV (promedio de 91.8 mm y 174 mm respectivamente). Además el número de embriones clonados con botón embrionario fue significativamente menor que el número de embriones de FIV con ésta estructura claramente definida (63% y 83% respectivamente).

Estos datos sugieren que existen diferencias entre la capacidad de desarrollo de embriones clonados y embriones producidos por FIV, ya que la elongación de los embriones varía significativamente de acuerdo a la calidad de los mismos (Vajta, 2000b; Bertolini et al., 2002). No obstante, la desviación estándar en la longitud de los embriones clonados ($91.8 \text{ mm} \pm 45.8$)

demuestra que muchos de ellos, alcanzaron una talla similar a la de los embriones de FIV y la reportada para embriones producidos *in vivo* (Betteridge y Flechon 1988; Hue et al., 2001; Maddox-Hyttel et al., 2003). Siguiendo este criterio de evaluación, se podría plantear que muchos de los embriones producidos por HMC utilizando la línea CWA tendrían la misma capacidad de desarrollo *in vivo* que los embriones de FIV.

Evaluación de los patrones de expresión génica

A pesar de los datos morfológicos presentados y los supuestos planteados, es muy probable que éstos no permitan establecer conclusiones sobre la eficiencia de la implantación de los embriones clonados así como el mantenimiento de las gestaciones a término. Después de la expansión y protrusión del blastocisto y durante el período peri-implantatorio se produce una nueva onda de diferenciación celular. En este momento, en embriones bovinos, las células del trofoblasto proliferan activamente y se diferencian para formar las células monucleadas y células binucleadas (células gigantes o TGC; Arnold et al., 2006). Esto sólo constituye un ejemplo que demuestra los cambios que se producen en los embriones durante esta etapa de desarrollo y que son el resultado del establecimiento de nuevos patrones de expresión génica. La correcta expresión de los genes involucrados en esta etapa podría predecir el éxito de la implantación y el desarrollo post-implantatorio.

En esta etapa de desarrollo se estudió mediante PCR tiempo final la expresión de los mismos genes estudiados durante la etapa pre-implantatoria (OCT4, FGF4, NANOG, SOX2, CDX2, INFTau y EOMES). Dichos genes fueron seleccionados con dos objetivos: 1- determinar sus patrones de expresión durante esta etapa de desarrollo en embriones bovinos y 2- definir las diferencias que se producen entre la etapa pre y peri-implantatorias. Los embriones de FIV expresaron todos los genes estudiados, incluyendo EOMES, lo cual podría ser consecuencia de la correcta diferenciación del TB acompañada de un adecuado patrón de expresión génica. EOMES también se expresó en todos los embriones clonados lo cual concuerda con lo reportado en la literatura donde se ha detectado la expresión de este gen durante el desarrollo peri-implantatorio (Degrelle et al., 2005). Como se mencionó anteriormente EOMES no se detectó en los embriones pre-implantatorios, independientemente del método de producción empleado (TN o FIV), lo que indica que su expresión es diferenciada entre blastocistos expandidos y embriones elongados

(etapa pre-implantatoria vs etapa peri-implantatoria). El patrón de expresión de EOMES descrito en este trabajo, constituye el primer reporte que indica la expresión diferencial de este gen en embriones bovinos durante los periodos pre y peri-implantatorios.

Otro dato interesante en los resultados obtenidos durante la etapa de elongación es la expresión de SOX2 en todos los grupos de embriones estudiados (clones y FIV), a diferencia de lo observado en los blastocistos clonados. Es muy probable que sólo los embriones pre-implantatorios que expresaron SOX2 continuaran su desarrollo *in vivo*, teniendo en cuenta la función de SOX2 sobre el mantenimiento de las características pluripotentes del ICM en embriones de ratón (Masui et al., 2007). También semejante a lo observado en los blastocistos, la expresión conjunta de OCT4 y SOX2 no fue suficiente para inducir la expresión de FGF4 y NANOG en los embriones clonados elongados, lo que sustenta la hipótesis de la existencia de mecanismos alternativos para la regulación de la expresión de estos genes y posiblemente de otros necesarios para la formación del ICM y mantenimiento del botón embrionario en bovinos.

A diferencia de los embriones elongados producidos por FIV, los clones presentaron un patrón de expresión génica diferencial, representado por los genes NANOG y FGF4. El gen FGF4 se expresó en uno de tres grupos de clones elongados (HMC5) mientras que NANOG se detectó en dos de los tres grupos de clones (HMC4 y HMC5). La derregulación de la expresión de FGF4 puede estar relacionada con el bajo número de clones elongados que presentaron botón embrionario. Daniels y colaboradores demostraron que la expresión de FGF4 varía entre embriones clonados y producidos por FIV pero sólo a nivel de blastocistos, hasta este momento, no existen reportes que indiquen el comportamiento de este gen en embriones bovinos clonados en la etapa de elongación (Daniels et al., 2001).

Es interesante que el grupo HMC5, compuesto por un embrión alargado producido por clonación, presentara el mismo patrón de expresión que los embriones de FIV. Esto significa que en algunos casos (1/6 equivalente al 16%, en este estudio) ocurre una adecuada reprogramación nuclear en los embriones clonados, incluso al momento de la peri-implantación. Este dato coincide con el promedio de la tasa de nacimientos vivos de animales clonados, reportada internacionalmente (10-15%).

Con respecto a NANOG, existen evidencias que demuestran la expresión de este gen en embriones bovinos durante la etapa de elongación (Degrelle et al., 2005). Durante el estadio de blastocisto, la expresión de NANOG se limita al ICM pero a medida que el embrión se elonga la

activación de este gen también se extiende al TB (Degrelle et al., 2005). Se sabe que este gen al igual que FGF4 juega un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de los diferentes linajes celulares. Aún así no existen reportes científicos que demuestren los mecanismos de regulación de la expresión de NANOG así como el efecto de este gen durante la etapa peri-implantatoria en bovinos u otras especies con implantación retardada.

Cuantificación de la expresión de genes cruciales para el desarrollo (etapa peri-implantatoria)

Similar a los ensayos realizados en la etapa pre-implantatoria, se cuantificaron los niveles de transcripto de los genes en estudio en embriones elongados de 17 días de desarrollo. En este caso tampoco estuvieron incluidos los genes CDX2 ni SOX2 pero se logró la amplificación en la región cuantificable de los genes EOMES y NANOG a diferencia de lo obtenido en los blastocistos. Este trabajo de tesis es el primer reporte de la cuantificación de los niveles de expresión de los genes OCT4, NANOG, EOMES y FGF4 en embriones elongados. Los niveles de expresión de todos los genes estudiados (los mencionados anteriormente e INFTau) fueron mayores en los embriones producidos por FIV que los embriones clonados, siendo diferentes estadísticamente los niveles de ARNm de los genes NANOG, EOMES y FGF4. El hecho que los niveles de expresión de todos los genes estudiados sea menor en los embriones clonados puede estar explicado por una inadecuada regulación de la expresión producto de la clonación.

Interesantemente y a diferencia de lo observado en la etapa pre-implantatoria, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de OCT4 entre los embriones elongados clonados y de FIV e incluso los niveles de expresión fueron menores en los embriones clonados. Este dato sugiere que durante la etapa de elongación existen otros mecanismos de regulación de la expresión de OCT4 que lograron silenciar de alguna forma, los altos niveles de expresión que se observaron en los blastocistos clonados producidos con las células adultas. Otra hipótesis es que en etapas más tardías del desarrollo embrionario, la regulación de la expresión de factores de pluripotencia como OCT4 es mucho más fuerte ya que en este momento existen más eventos de diferenciación celular que en blastocistos. Los niveles de ARNm de OCT4 en los embriones de FIV (blastocistos y elongados) se mantuvieron constantes e iguales a los observados en los clones elongados. Beyhan y colaboradores (2007b) demostraron que tanto en embriones producidos por FIV como en clones producidos a partir de diferentes líneas celulares, los niveles

de OCT4 aumentan durante el desarrollo pre-implantatorio, observándose los mayores niveles de expresión en estadio de blastocisto expandido. Los datos obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que la expresión de OCT4 no varía durante la etapa peri-implantatoria y que además existen mecanismos que aseguran la correcta expresión de este gen durante este periodo de desarrollo.

Por otra parte la expresión de FGF4 fue significativamente menor en los embriones clonados que en los embriones de FIV al día 17 de desarrollo. Este resultado coincide con lo observado en los ensayos de expresión mediante PCR tiempo final, donde se determinó que la mayoría de los embriones clonados no expresaron este gen, por lo menos a niveles detectables por dicha técnica. Con respecto a lo observado en los embriones pre-implantatorios, la expresión de FGF4 normalizada contra un gen endógeno, disminuyó significativamente en los embriones elongados independientemente de su origen (clonación y FIV), siendo esta disminución significativamente mayor en los embriones elongados producidos por clonación. Probablemente los bajos niveles de la expresión de FGF4 en los clones, estén relacionadas con la disminución de OCT4 en estos embriones con respecto al estadio de blastocisto.

Estos datos sugieren que los niveles de FGF4 disminuyen en embriones bovinos durante la etapa peri-implantatoria, aún cuando los niveles de OCT4 se mantienen constantes y que todos los embriones expresaron SOX2 como se mencionó anteriormente. Sin embargo, NANOG aumentó en los embriones elongados con respecto a los embriones pre-implantatorios aún cuando este aumento fue significativamente mayor en los embriones de FIV. Todo esto sugiere que NANOG y FGF4 presentan mecanismos de regulación diferentes, al menos en embriones bovinos peri-implantatorios. A juzgar por estos resultados, parece que en embriones bovinos existen otros mecanismos de control de la expresión de FGF4, los cuales posiblemente estén relacionados con la represión de la expresión de este gen si se considera que similar a lo que ocurre en ratón (Figura 22), OCT4 y SOX2 actúan como inductores de la expresión de FGF4. NANOG por su parte tiene un patrón de expresión que pudiera ser la causa de mecanismos de regulación similares a lo descrito en ratones donde la expresión de este gen es regulada positivamente por OCT4 y SOX2 (Masui et al., 2007).

Similar a lo observado con NANOG, la expresión de EOMES aumentó a niveles cuantificables mediante PCR tiempo real, en embriones elongados con respecto a los blastocistos, ya sean producidos por TN o FIV. Esto indica que la expresión de este gen aumenta durante la etapa

peri-implantatoria, lo que puede estar relacionado con la alta proliferación, durante esta etapa de desarrollo, de las células trofoblásticas encargadas de la expresión de EOMES. Es muy probable que similar a lo que ocurre con otros miembros de la familia de factores de transcripción de la caja T (T-box), los niveles de la proteína de EOMES sean importantes para determinar su función. Se ha observado que en otros miembros de esta familia, los alelos mutantes producen un fenotipo de haploinsuficiencia, indicando que los niveles de proteína de los genes T-box son importantes para determinar su función (Wilson y Conlon, 2002). En este caso, el aumento de la expresión de EOMES puede indicar que tanto en los embriones clonados como en los embriones de FIV se ha producido una regulación correcta de la expresión de este gen. Aún así, las diferencias significativas encontradas en los niveles de expresión de EOMES entre clones y embriones de FIV indica que los primeros no logran una activación completa de los genes embrionarios en esta etapa de desarrollo lo que puede influir más tarde, en la capacidad de desarrollo post-implantatorio. Como se mencionó anteriormente, no existen reportes previos para embriones bovinos contra los cuales se puedan discutir estos hallazgos.

INFtau es el gen mayormente expresado con respecto a todos los genes estudiados y a su vez su expresión fue significativamente mayor en los embriones elongados que en los embriones pre-implantatorios independientemente del método de producción (TN y FIV). Estos resultados coinciden con los datos obtenidos por Ushizawa y colaboradores (2004), quienes realizaron un estudio de los perfiles de expresión génica en embriones bovinos, donde demostraron que la expresión de la mayoría de los genes aumenta significativamente entre los días 7 y 14 del desarrollo. Uno de los genes más estudiados durante las etapas pre y peri-implantatorias en embriones bovinos es INFtau y se ha demostrado que al igual que en estos ensayos, los niveles de expresión aumentan significativamente a medida que avanza el desarrollo. En estos trabajos se plantea que la expresión de INFtau es detectada al momento de la formación del blastocelo (Hernandez-Ledezma et al., 1992) y se mantiene hasta los días alrededor de la implantación (días 25-28), observándose los mayores niveles de expresión a los días 16-18 de desarrollo embrionario (Roberts et al., 1992).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de INFtau en los embriones clonados y de FIV a los 17 días de desarrollo. Este resultado coincide con lo reportado por Arnold y colaboradores (2006) quienes demostraron que no existen diferencias en los niveles de expresión de INFtau en embriones bovinos producidos por FIV y clones

producidos mediante transferencia nuclear somática convencional utilizando células fetales. Estos dos reportes son una evidencia de que los embriones clonados, independientemente de la metodología utilizada, funcionan normalmente con respecto a la expresión de INFtau, por tanto, el reconocimiento materno de la gestación no se vería afectado en el caso de los embriones clonados. Esto indica que las pérdidas tempranas de las gestaciones, que se producen generalmente en los clones no son el resultado de aberraciones en el reconocimiento de la gestación mediada por INFtau.

Análisis global de la expresión génica en embriones peri-implantatorios

Como se ha discutido hasta este momento, existen evidencias que indican que la clonación somática afecta los patrones de expresión génica durante las etapas pre y peri-implantatorias y esto a su vez se ve reflejado en el bajo potencial de desarrollo de los embriones. La mayoría de estos datos son el resultado de estudios de genes específicos que son expresados en determinados momentos del desarrollo embrionario pero existen muy pocos reportes que describan el estado global de la expresión génica en embriones clonados. Hasta el momento sólo existe un reporte que estudia la expresión génica de embriones bovinos elongados en los días 14 y 21 de desarrollo pero no hace referencia al día 17 de desarrollo (Ushizawa et al., 2004). En bovinos, durante la etapa peri-implantatoria ocurren múltiples mecanismos de diferenciación celular que permiten la correcta embriogénesis y la implantación. Estos procesos de proliferación y diferenciación están gobernados por una amplia red de señalización en la que participa un gran número de moléculas, por lo que el entendimiento de los mecanismos de regulación se hace más complejo. La derregulación de genes como OCT4, FGF4 ó INFtau puede conllevar a la aberración de otros genes o por el contrario ser el resultado de la derregulación de otros sistemas.

Teniendo en cuenta los aspectos antes mencionados, el conocimiento de los perfiles de expresión génica de los embriones clonados con respecto a los embriones producidos por fecundación, permitiría conocer con más detalle los mecanismos moleculares que están involucrados en las etapas tempranas de desarrollo embrionario y que son afectados por la transferencia nuclear somática. Además de los métodos moleculares tradicionales empleados para el estudio de la expresión de un gen en un momento determinado, el microarreglo de ADNc es una herramienta

útil para el análisis de miles de genes en un solo experimento y la identificación de genes críticos durante el desarrollo temprano.

Una de las principales limitaciones para el uso de este sistema analítico para el estudio de la expresión génica en embriones pre y peri-implantatorios es la disponibilidad de material biológico. Por lo general los sistemas de hibridación requieren no menos de 5 µg de ARNm de cada muestra en estudio. Si se tiene en cuenta el bajo número de células que presenta un embrión en estadio de blastocisto, es imposible realizar un experimento de hibridación con un número de embriones razonable desde el punto de vista técnico y biológico. Los datos publicados sobre los perfiles globales de expresión génica en embriones pre-implantatorios, se basan en la amplificación lineal del ARNm (Ushizawa et al., 2004; Beyhan et al., 2007b). Aún cuando esta técnica permite disponer de material biológico suficiente para la hibridación, la amplificación del ARNm no es exacta y es muy probable que no ocurra de forma lineal para todas las moléculas existentes lo que introduciría errores técnicos a la hora de determinar diferencias en los niveles de expresión de los genes en estudio. Por otra parte los ensayos de microarreglos en la etapa peri-implantatoria en bovinos además de indicarnos el estado de expresión génica en una etapa más cercana a la implantación, permite disponer de material suficiente para la hibridación debido a la activa proliferación que se produce durante esta etapa.

En este trabajo de tesis se obtuvo el perfil de expresión génica de embriones clonados producidos con la línea celular adulta comparados con embriones producidos por FIV. Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que se realiza donde se obtiene un perfil global de la expresión génica en embriones bovinos clonados durante la etapa de elongación. De los 1800 genes representados en el microarreglo, 1322 se encontraron expresados en las muestras estudiadas. Los datos obtenidos fueron el resultado de experimentos de hibridación que además de réplicas biológicas incluyeron réplicas técnicas que consistieron en el cambio de marcaje de las muestras biológicas para sustraer los errores producto de la intensidad de la señal. Del total de genes expresados en los embriones clonados y de FIV, el 3.6% se encontró diferencialmente expresado o aberrado en los clones si asumimos como controles los embriones de FIV. Este resultado concuerda con los datos discutidos anteriormente, demostrando que efectivamente la transferencia nuclear somática afecta los patrones de expresión génica durante la etapa de elongación en los embriones clonados.

El propósito de este experimento fue identificar la mayor cantidad de genes que pudieran estar relacionados con funciones celulares que a su vez ayudaran a predecir cuales son los principales sistemas que son afectados por la transferencia nuclear somática durante el desarrollo embrionario. Esto permitió identificar genes que no han sido descritos previamente y que se encuentran activos transcripcionalmente durante la etapa de elongación de embriones bovinos, lo cual contribuye a la comprensión de los mecanismos de regulación durante este período. La función específica de algunos de los genes identificados no se ha estudiado en embriones pre o peri-implantatorios por lo que es muy complejo vincularlos con procesos biológicos durante esta etapa. No obstante, la mayoría de los genes que se encontraron derregulados están involucrados en funciones celulares importantes como metabolismo, respuesta a estrés (HSP70), expresión génica (SNRPB1), traducción de señales (SPARC, CBPP22) e incluso funciones más específicas de esta etapa del desarrollo como proliferación celular (NPM1, WEE1), embriogénesis (NASP, TPT1) e interacción del embrión con el ambiente materno (TP1, TKDP1, KRT18, KRT8).

Además de los resultados obtenidos a través del microarreglo, se determinaron mediante qPCR, los niveles de expresión de los genes SNRPB1, SPARC, CBPP22, HSP70, TP1 y TKDP1. Estos genes fueron seleccionados para validar los datos obtenidos a partir del ensayo del microarreglo debido a que algunos presentan funciones biológicas directamente relacionadas con el desarrollo embrionario y el reconocimiento de la gestación y otros se han visto derregulados en embriones clonados en la etapa pre-implantatoria. La relación de los niveles de expresión entre clones y embriones de FIV de cinco de los genes estudiados, tuvieron un comportamiento similar a lo observado en el microarreglo con un coeficiente de correlación de 0.92. Este resultado demuestra que es posible predecir el comportamiento de la expresión de los genes en las muestras estudiadas, utilizando los slides bovinos no comerciales (Bovine Blue Chip).

TKDP1 y TP1 son genes cuya función tiene una relación más directa con el desarrollo embrionario, mediando el reconocimiento de la gestación y la interacción entre el embrión y el ambiente materno. Se ha visto que la máxima expresión de ambos genes se produce en los días inmediatos a la implantación (MacLean et al., 2003). Teniendo en cuenta el comportamiento de la expresión de estos genes y su función podríamos decir que comparten mecanismos de regulación así como las vías de señalización. Esto pudiera explicar que ambos se encuentren sobre expresados significativamente en los embriones clonados, además demuestra que en estos embriones existe una derregulación de la expresión de genes trofoblásticos. Otra evidencia de

este planteamiento es la sobre expresión de KRT8 en los embriones clonados. En un estudio realizado por El-Sayed y colaboradores (2006), KRT8 se encontró sobre expresado en blastocistos bovinos que resultaron en gestaciones que fueron reabsorbidas. Estos datos sugieren que la elevada expresión de este gen en los clones, puede influir sobre las tasas de pérdidas de gestaciones que se reportan para éstos embriones.

Un alto porcentaje de los genes que se encontraron sobre expresados en los embriones clonados, son expresados por el trofoblasto lo cual puede ser un indicativo de la existencia de una tasa elevada de aberraciones de la expresión génica en esta estructura. Durante esta etapa el trofoblasto se encuentra en activo cambio debido a los procesos de proliferación y diferenciación celular que se producen para dar lugar a la implantación y mantener la comunicación con el ambiente materno. Coincidentemente, existe consenso con respecto a que las mayores causas de pérdidas y anomalías gestacionales en los clones, son producto de una inadecuada placentación (First et al., 2002) lo que a su vez estaría ocasionado por la incorrecta expresión de los genes trofoblásticos. La activa proliferación de las células trofoblásticas durante la elongación está acompañada por un aumento de la expresión de genes relacionados con dicho proceso. No obstante, la derregulación de dicha expresión podría entrar en contradicción con los mecanismos de diferenciación que también se producen durante esta etapa.

El gen NPM1 codifica para una chaperona que regula la proliferación celular y se ha descrito que el crecimiento celular está acompañado por un aumento de los niveles de su proteína (Chan et al., 1989). En embriones ovinos, la expresión del gen NPM1 aumenta significativamente durante la etapa peri-implantatoria y posteriormente decrece cuando finaliza la elongación (Cammass et al., 2005). Por el contrario, WEE1 se encuentra sobre expresado en los embriones producidos por FIV. WEE1 además tiene una función contraria a NPM1 ya que actúa como regulador negativo de la activación de la mitosis y por tanto de la proliferación celular, mediante el bloqueo de la entrada al núcleo del complejo activo del factor promotor de la mitosis (MPF). Estudios anteriores han demostrado que WEE1 se expresa durante las etapas tempranas de desarrollo hasta estadio de blastocisto en embriones bovinos (Adjaye et al., 2007) pero no existen evidencias del comportamiento de este gen durante la elongación. Los datos obtenidos en este trabajo de tesis, a partir del análisis del microarreglo, demostraron la baja expresión de WEE1 y la sobre expresión de NPM1 en los embriones clonados durante la elongación. Es evidente que durante esta etapa se produce una derregulación de los sistemas de control de la proliferación

celular en los clones, lo que podría tener una influencia negativa sobre la implantación y el desarrollo placentario.

Consideraciones generales del desarrollo embrionario pre y peri-implantatorio

A pesar de los datos presentados, la relevancia biológica de los múltiples cambios de la expresión génica que se produce en los embriones clonados no está completamente clara. La transferencia nuclear somática induce aberraciones significativas en los patrones de expresión global de los genes que gobiernan cada etapa de desarrollo. Aún cuando los embriones clonados pueden ser producidos hasta la etapa de blastocisto, con porcentajes tan elevados como los presentados en este trabajo de tesis y posteriormente continuar su desarrollo hasta etapas más avanzadas como la elongación al día 17, existen mecanismos de regulación que están afectados y que posiblemente se hagan evidentes en etapas más tardías. Posiblemente, aquellos embriones clonados que logran implantarse y dar lugar a animales vivos son el resultado de combinaciones de patrones de expresión génica no letales similares a las que ocurren de forma natural o por otra parte, representan un bajo porcentaje de aquellos embriones en los que ocurrió una reprogramación total del núcleo donante.

Desarrollo post-implantatorio de embriones clonados

Si se toma en cuenta la naturaleza de los cambios del material genético, incluso durante el proceso de fecundación natural y del desarrollo embrionario posterior, es poco probable que el proceso de dediferenciación de una célula somática produzca embriones, sin mencionar fetos y crías viables. Aún cuando un ovocito es capaz de borrar los patrones de expresión génica de una célula diferenciada, este proceso no está exento de errores y daños al material genético que se traducen en un menor potencial de desarrollo de los embriones obtenidos. El nacimiento de animales clonados demuestra que en algunos casos esos daños son compensados. Sin embargo, a juzgar por la pérdida de gestaciones que por lo general acompaña al proceso de clonación, sobre todo en los tercios 1 y 3 de la gestación, este proceso de compensación es muy complejo.

De este modo se han reportado variaciones del desarrollo normal de los embriones bovinos, lo que incluye, disminución de la capacidad de desarrollo *in vivo*, anomalías del desarrollo,

anomalías cromosómicas y de placentación, tal como se describió en la sección de revisión bibliográfica.

En este trabajo y como colofón de la generación de embriones clonados con viabilidad suficiente como para generar animales nacidos, se transfirió grupo de éstos (17 blastocistos) a 14 receptoras. La tasa de gestación temprana, medida a los 35 días por no retorno al celo y confirmada por ultrasonografía, fue de un 50%, lo que está en concordancia con lo reportado para la especie bovina (Heyman et al., 2004). En esta especie alrededor de un 50% de las transferencias dan lugar a implantaciones, o sea a gestaciones tempranas, cifras que coinciden con lo reportando por Hills y colaboradores en los años 1999 y 2000. Los datos publicados por estos autores se refieren a clonación somática con micromanipuladores, lo que implica la transferencia de los embriones contenidos en sus propias zonas pelúcidas. Los resultados con clonación convencional (datos no publicados) de trabajos anteriores (años 2002-2004) resultaron en 14 gestaciones de 28 transferencias, o sea un 50% al igual que en este trabajo de tesis.

Sin embargo, la transferencia de embriones producidos por HMC podría implicar una diferencia en las tasas de implantación, dada por la ausencia de zona pelúcida, lo que en teoría podría ayudar a la implantación por obviarse el paso de la eclosión. Se ha visto que en embriones humanos la eclosión asistida por láser, aumenta la tasa de gestación (Balaban et al., 2006). Por otra parte, la ausencia de zona, también podría repercutir negativamente en la gestación por dos razones fundamentales, la primera, una mayor adhesión del embrión al endometrio uterino, lo que sería negativo, ya que se abortaría el proceso de elongación y la segunda podría ser una mayor exposición del embrión a agentes potencialmente dañinos, tanto de los medios de cultivo, como del acto de transferencia, así como del ambiente uterino. Adicionalmente con la ausencia de la zona pelúcida se pierden las barreras físicas que delimitan en el estadio inicial de desarrollo, las funciones del embrión de las del endometrio.

En la práctica, existen muy pocos datos sobre la transferencia de embriones clonados sin zona a hembras receptoras, en el único estudio comparativo, llevado a cabo por Tecirlioglu y colaboradores (2005), los autores encontraron una tasa de gestación temprana (al día 30) significativamente mayor en las hembras bovinas que recibieron embriones clonados producidos por HMC (62.9%) que en las que fueron transferidas con embriones clonados por la vía convencional (37.8%) e incluso en las que recibieron embriones fecundados *in vitro* (46.4%). Sin embargo, al día 120, las tasas de pérdida de gestación entre las hembras que recibieron

embriones clonados fueron similares (75 vs 76.9%). En este estudio las hembras gestadas con embriones de FIV fueron sacrificadas al día 17, por lo que no existen datos para comparar. La eficiencia de clones nacidos vivos en relación a los embriones transferidos fue de 5.2 y 6.3% respectivamente sin que hubiesen diferencias significativas entre los grupos que recibieron embriones clonados.

Otros grupos, si bien pocos, han trabajado la técnica de HMC en bovinos, obteniendo disímiles tasas de gestación tempranas, de este modo Lewis y colaboradores (2000) reportaron 35% de gestaciones, mientras que Vajta y colaboradores en el 2003 y 2004 reportaron 85% (6/7) y 100% de gestación (3/3) respectivamente. En este trabajo de tesis, la tasa de gestación en el experimento de transferencia de embriones clonados fue de 50% (7/14) y se sitúa más cercana a los datos de Tecirlioglu y colaboradores (2005), los cuales parecen más consolidados al utilizar un mayor tamaño de muestra (61 gestaciones de 97 transferencias).

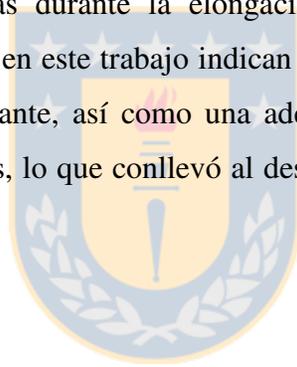
Independientemente de la importancia que reviste el evento de implantación o gestación temprana, es indudablemente la gestación a término y el nacimiento de crías vivas, lo que define la eficiencia del proceso de clonación. En ese sentido, las pérdidas de las gestaciones de embriones clonados se encuentran cercanas al 80% en todos los estudios revisados que involucran HMC (Lewis et al., 2000; Tecirlioglu et al., 2005; Vajta et al., 2004 y 2005). En este trabajo se perdieron 5 de 7 gestaciones ó 71.5%. Estos datos son similares a las pérdidas que se observan en las gestaciones con embriones clonados por el método tradicional (Kato et al., 1998; Hill et al., 1999 y 2000; Wells et al., 1999; Pace et al., 2002).

En nuestro trabajo se perdieron 3 gestaciones antes de los 150 días y dos posteriores a los 7 meses (una a los 210 y otra a los 240 días). Dos gestaciones llegaron totalmente a término dando lugar al nacimiento de dos terneras clonadas. Este trabajo de tesis reporta resultados que se encuentran entre los mayores eficiencias al ser comparados con los datos de los autores mencionados anteriormente por ser los únicos reportes existentes. Por ejemplo Tecirlioglu y colaboradores (2005) obtuvieron 5.2% de clones nacidos vivos con respecto al total de embriones transferidos, Lewis y colaboradores (2000) 10%, Vajta y colaboradores (2003) 15% y Vajta y colaboradores (2004) 20%. En este trabajo se obtuvo un 14% de crías nacidas vivas con respecto a los embriones clonados transferidos.

El total de embriones clonados transferidos, así como el número de receptoras empleado fue relativamente bajo, por lo que es difícil sacar conclusiones. Algo similar ocurre con los escasos

reportes discutidos, que salvo en el caso de Tecirlioglu y colaboradores (2005) emplean sólo unas pocas receptoras y embriones. Esto se une al hecho de que tanto en esos trabajos, como en el nuestro se empleó sólo una línea celular para la generación de clones a término, por lo que no se pueden hacer inferencias comparativas al potencial clonogénico de nuestra línea celular adulta (CWA). No obstante, sí se puede concluir que los resultados de la clonación sin micromanipuladores empleando la línea celular adulta de Wagyu (CWA) redundan en eficiencias de gestación temprana, tardías y a término similares o incluso superiores que las reportadas en la literatura mundial, lo que avala el uso de esta línea en futuros experimentos de transferencia nuclear somática.

Como resultado global de esta tesis se confirmó la hipótesis propuesta, resultando que la clonación somática afectó esencialmente, los patrones de expresión génica de embriones clonados, tanto en la etapa pre-implantatoria, como en la peri-implantatoria. Además se observaron diferencias morfológicas durante la elongación de los embriones clonados. No obstante, los resultados presentados en este trabajo indican que bajo ciertas condiciones se logra la reprogramación del genoma donante, así como una adecuada diferenciación morfológica y funcional de los embriones clonados, lo que conllevó al desarrollo a término de los embriones y el nacimiento de animales vivos.



CONCLUSIONES

- Se generaron embriones clonados con las dos líneas celulares empleadas, no obstante con la línea celular adulta (CWA) se pueden generar de modo más eficiente embriones clonados que con la línea celular fetal (LCF).
- Los embriones producidos por TN a partir de la línea celular adulta presentaron mejor calidad morfológica que los embriones producidos con la línea celular fetal.
- Los embriones pre-implantatorios producidos por TN a partir de las dos líneas celulares (CWA y LCF) presentaron patrones de expresión génica diferentes entre ellos y con respecto a los embriones de FIV.
- Los embriones clonados producidos con la línea celular adulta (CWA) son capaces de continuar su desarrollo una vez transferidos a hembras receptoras y dar lugar a crías vivas, demostrándose la capacidad de reprogramación de la misma.
- Los niveles de expresión de los genes incluidos en este estudio, variaron entre los estadios pre y peri-implantatorios tanto para los embriones clonados producidos a partir la línea celular adulta (CWA) como para los producidos por FIV.
- Se describieron (y cuantificaron) por primera vez para embriones elongados bovinos los patrones de expresión de varios genes cruciales para el desarrollo embrionario.
- Se demostró mediante PCR la expresión diferencial de genes cruciales para el desarrollo durante la peri-implantación en embriones clonados y producidos por FIV.
- Se demostró mediante microarreglo, la diferencia en los patrones globales de expresión génica entre los embriones clonados y los embriones producidos por FIV.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adjaye J, Herwig R, Brink TC, Herrmann D, Greber B, Sudheer S, Groth D, Carnwath JW, Lehrach H, Niemann H. Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. *Physiol Genomics*. 2007. 31:315-27.
2. Adjaye J, Herwig R, Herrmann D, Wruck W, Benkahla A, Brink TC, Nowak M, Carnwath JW, Hultschig C, Niemann H, Lehrach H. Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays. *BMC Genomics*. 2004. 5:83.
3. Amarnath D, Li X, Kato Y, Tsunoda Y. Gene expression in individual bovine somatic cell cloned embryos at the 8-cell and blastocyst stages of preimplantation development. *J Reprod Dev*. 2007. 53:1247-63.
4. Archer GS, Dindot S, Friend TH, Walker S, Zaunbrecher G, Lawhorn B, Piedrahita JA. Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine. *Biol Reprod*. 2003. 69:430-6.
5. Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath JK, Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95:5082-7.
6. Arnold DR, Bordignon V, Lefebvre R, Murphy BD, Smith LC. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction*. 2006. 132:279-90.
7. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003. 17:126-40.
8. Badr H, Bongioni G, Abdoon AS, Kandil O, Puglisi R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote*. 2007. 15:355-67.
9. Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollocks JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter C, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overström EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech*. 1999. 17:456-461.
10. Balaban B, Urman B, Yakin K, Isiklar A. Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2006. 21:2136-40.
11. Barile VL, Dell'Aquila ME, Cinone M, Minoia P. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes in cattle. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1990. 66:899-906.
12. Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev*. 2002. 63:318-28.
13. Betteridge KJ, Flechon JE. The anatomy and physiology of preattachment bovine embryos. *Theriogenology* 1988. 29:155-187.
14. Beyhan Z, Forsberg EJ, Eilertsen KJ, Kent-First M, First NL. Gene expression in bovine nuclear transfer embryos in relation to donor cell efficiency in producing live offspring. *Mol Reprod Dev*. 2007b. 74:18-27.

15. Beyhan Z, Iager AE, Cibelli JB. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell*. 2007a. 1:502-12.
16. Blelloch R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*. 2006. 24:2007-13.
17. Boiani M, Eckardt S, Schöler H and McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes and Development*. 2002. 16:1209–1219.
18. Bordignon V, Keyston R, Lazaris A, Bilodeau AS, Pontes JH, Arnold D, Fecteau G, Keefer C, Smith LC. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biol Reprod*. 2003. 68:2013-23.
19. Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*. 2003. 130:1673-80.
20. Bosch P, Hodges CA, Stice SL. Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. *Biocnología Aplicada*. 2004. 21:128-136.
21. Brem G, Kühholzer B. The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning Stem Cells*. 2002. 4:57-63.
22. Briggs R, King TG. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1952. 38:455-463.
23. Bryant PA, Venter D, Robins-Browne R, Curtis N. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis*. 2004. 4:100-11.
24. Cammas L, Reinaud P, Dubois O, Bordas N, Germain G, Charpigny G. Identification of differentially regulated genes during elongation and early implantation in the ovine trophoblast using complementary DNA array screening. *Biol Reprod*. 2005. 72:960-7.
25. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Implications of cloning. *Nature*. 1996. 380:383.
26. Chan WY, Liu QR, Borjigin J, Busch H, Rennert OM, Tease LA, Chan PK. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 1989. 28:1033–1039.
27. Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Créminon C, Guillomot M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol Reprod*. 1997. 57:1032-40.
28. Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*. 2002. 20:366-9.
29. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998b. 280:1256-8.
30. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*. 1998a. 16:642-6.
31. Colman A. Dolly, Polly and other 'ollys': likely impact of cloning technology on biomedical uses of livestock. *Genet Anal*. 1999. 15:167-73.
32. Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice—a review. *Placenta*. 2005. 26:S3– S9.

33. Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002. 20:251-5.
34. Daniels R, Hall V, and Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol. Reprod.* 2000. 63:1034–1040.
35. Daniels R, Hall VJ, French AJ, Korfiatis NA, and Trounson AO. Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol. Reprod. Dev.* 2001. 60:281–288.
36. De Armas R, Solano R, Riego E, Pupo CA, Aguilar A, Ramos B, Aguirre A, de la Fuente J, Castro FO. Use of F1 progeny of Holstein x Zebu cross cattle as oocyte donors for in vitro embryo production and gene microinjection. *Theriogenology.* 1994. 42:977-85.
37. Degrelle S, Campion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard J-P, Hue I. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental Biology* 2005. 288: 448 – 460.
38. Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ. Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol* 2001a. 19:559-62.
39. Denning C, Dickinson P, Burl S, Wylie D, Fletcher J, Clark AJ. Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig. *Cloning Stem Cells* 2001b. 3:221-3.
40. Denning C, Priddle H. New frontiers in gene targeting and cloning: success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction.* 2003. 126:1-11.
41. Dinnyés A, De Sousa P, King T, Wilmut I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells.* 2002. 4:81-90.
42. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, First NL. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod.* 1999. 60:1496-502.
43. Donnison M, Beaton A, Davey HW, Broadhurst R, L’Huillier P, Pfeffer PL. Loss of the extraembryonic ectoderm in *Elf5* mutants leads to defects in embryonic patterning. *Development.* 2005. 132:2299–2308.
44. Du Y, Li J, Kragh PM, Zhang Y, Schmidt M, Bøgh IB, Zhang X, Purup S, Kuwayama M, Jørgensen AL, Pedersen AM, Villemoes K, Yang H, Bolund L, Vajta G. Piglets born from vitrified cloned blastocysts produced with a simplified method of delipation and nuclear transfer. *Cloning Stem Cells.* 2007. 9:469-76.
45. Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W, Yanagimachi R, and Jaenisch R. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science.* 2000 290: 1578–1581.
46. El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics.* 2006. 28:84-96.
47. Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Van der Zwaag DF, Ferne LB. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology.* 2003. 59:125–138.

48. First N, Beyhan Z and Ambroggio J: Cloning of Cattle. In: Principles of Cloning Edited by: Cibelli J, Lanza R, Campbell K, West M. San Diego: Academic Press; 2002. 375-390.
49. First NL, Parrish JJ. In-vitro fertilization of ruminants. J Reprod Fertil Suppl. 1987. 34:151-65.
50. FoxNew.com. Farmer: cloned cows may be sold for meat. 2006.
51. Foygel K, Choi B, Jun S, Leong DE, Lee A, Wong CC, Zuo E, Eckart M, Reijo Pera RA, Wong WH, Yao MW. A novel and critical role for Oct4 as a regulator of the maternal-embryonic transition. PLoS ONE. 2008. 3:e4109.
52. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique. Chapter 2: Biology of cultured cells. Willey-Liss, Inc: New York, NY. 2000. 9-15.
53. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I and Lazzari G: Bovine embryo technologies. Theriogenology 2003. 59:599-616.
54. Galli C, Duchi R, Moor RM, Lazzari G. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. Cloning. 1999. 1:161-70.
55. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertility and Sterility. 2000. 73:1155-1158.
56. Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. Theriogenology 1996. 45:141-152.
57. Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltenburg R, Respass D, Venable A, Stice S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. Biol Reprod. 2002. 66:895-900.
58. Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL. Cloning Stem Cells. 2004. 6:247-58.
59. Greising T, Monaghan P, Healy A, Gordon A, Gallagher M, Wahin H, Gordon I. The influence of cytoplasmic composition in recipient oocytes on the development capacity of bovine nuclear transfers embryos. Theriogenology. 1994. 41:208.
60. Guillemot F, Caspary T, Tilghman SM, Copeland NG, Gilbert DSJ, Jenkins NA, Anderson DJ, Joyner AL, Rossant J, Nagy A. Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. Nat Genet. 1995. 9:235-241.
61. Gurdon JB, Laskey RA, DeRobertis EM, Partington GA. Reprograming of transplanted nuclei in amphibian. Int Rev Cytol Suppl. 1979. 9:161-178.
62. Gurdon JB, Laskey RA, Reeves OR. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. J Embryol Exp Morphol. 1975. 34:93-112.
63. Gurdon JB. The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. Q J Microsc Sci. 1960. 101:299-311.
64. Hall VJ, Ruddock NT, French AJ. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine in vivo, in vitro, and nuclear transfer blastocysts. Mol. Reprod. Dev. 2005. 72:16-24.
65. Hayes O, Ramos B, Rodríguez LL, Aguilar A, Badía T, Castro FO. 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. 2005. 87:181-92.
66. Hayes O, Rodríguez LL, González A, Falcón V, Aguilar A, Castro FO. Effect of cryopreservation on fusion efficiency and in vitro development into blastocysts of bovine cell lines used in somatic cell cloning. Zygote. 2005. 13:277-82.

67. Heikinheimo O and Gibbons WE. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Reproduction* 1998. 4:745–756.
68. Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 2000. 53:11-20.
69. Hernandez-Ledezma JJ, Sikes JD, Murphy CN, Watson AJ, Schultz GA, Roberts RM. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod.* 1992. 47:374-80.
70. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Berthelot V, Fromentin G, Hocquette JF, Martignat L, Renard JP. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology.* 2007. 67:134-41.
71. Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Brüggerhoff K, Prella K, Brem G, Stojkovic M, Wolf E. Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer: neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood. *Biol Reprod.* 2003. 68:159-66.
72. Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod.* 2000. 63:1787-1794.
73. Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology.* 1999. 51:1451-1465.
74. Holloway AJ, van Laar RK, Tothill RW, Bowtell DD. Options available--from start to finish--for obtaining data from DNA microarrays II. *Nat Genet.* 2002. 32 Suppl:481-9.
75. Hue I, Renard JP, Viebahn C. Brachyury is expressed in gastrulating bovine embryos well ahead of implantation. *Dev. Genes Evol.* 2001. 211:157– 159.
76. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout III WM, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, and Jaenisch R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001. 293: 95–97.
77. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology.* 1997. 47:23–32.
78. Illmensee K, Levanduski M, Zavos PM. Evaluation of the embryonic preimplantation potential of human adult somatic cells via an embryo interspecies bioassay using bovine oocytes. *Fertil Steril.* 2006. 85:1248-60.
79. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult *Science.* 1998. 282:2095-2098.
80. Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil.* 2000. 120:231-7.
81. Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, Wang B, Bhatia B, Bilodeau AS, Zhou JF, Leduc M, Downey BR, Lazaris A, Karatzas CN. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod.* 2001. 64:849-56.

82. Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod.* 2002. 66:199-203.
83. Keefer CL, Pant D, Blomberg L, Talbot NC. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Anim Reprod Sci.* 2007. 98:147-68.
84. Keus WA, Anger M, Carnwath JW, Motlik J, Nieman H. Cell cycle synchronization of porcine fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol. Reprod.* 2000. 62:412-419.
85. Kimber SJ, Sneddon SF, Bloor DJ, El-Bareg AM, Hawkhead JA, Metcalfe AD, Houghton FD, Leese HJ, Rutherford A, Lieberman BA, Brison DR. Expression of genes involved in early cell fate decisions in human embryos and their regulation by growth factors. *Reproduction.* 2008. 135:635-47.
86. Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H, Niemann H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* 2000. 63:1698-1705.
87. Kitiyanant Y, Saikhun J, Chaisalee B, White KL, Pavasuthipaisit K. Somatic cell cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells.* 2001. 3:97-104.
88. Klein C, Bauersachs S, Ulbrich SE, Einspanier R, Meyer HH, Schmidt SE, Reichenbach HD, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol Reprod.* 2006. 74:253-64.
89. Klisch K, Hecht W, Pfarrer C, Schuler G, Hoffmann B, Leiser R. DNA content and ploidy level of bovine placentomal trophoblast giant cells. *Placenta.* 1999. 20:451-8.
90. Kragh PM, Vajta G, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Callesen H. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev.* 2004. 16:315-318.
91. Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K. DNA methylation profiles of donor nuclei cells and tissues of cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev.* 2006a. 52:259-66.
92. Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, Imai K, Takahashi S, Hashizume K, Yagi S, Shiota K. Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine *Leptin* and *POU5F1* genes in cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev.* 2006b. 52:277-85.
93. Kubisch HM, Larson MA, Roberts RM. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998. 49:254-60.
94. Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod.* 2000. 62:412-9.
95. Kühholzer B, Hawley RJ, Lai L, Kolber-Simonds D, Prather RS. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs. *Biol Reprod.* 2001. 64:1695-8.
96. Kulesh DA, Clive DR, Zarlenga DS, Greene JJ. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987. 84:8453-7.

97. Kumar BM, Jin HF, Kim JG, Ock SA, Hong Y, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. Differential gene expression patterns in porcine nuclear transfer embryos reconstructed with fetal fibroblasts and mesenchymal stem cells. *Dev Dyn*. 2007. 236:435-46.
98. Kurome M, Hisatomi H, Matsumoto S, Tomii R, Ueno S, Hiruma K, Saito H, Nakamura K, Okumura K, Matsumoto M, Kaji Y, Endo F, Nagashima H. Production efficiency and telomere length of the cloned pigs following serial somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev*. 2008. 54:254-8.
99. Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K., Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. Heart transplantation in baboons using 1,3- galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med*. 2005. 11:29-31.
100. Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Colleoni S, Crotti G, Galli C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* 2007. 67:90-98
101. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002. 295:1089-92.
102. Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*. 2000. 2:79-90.
103. Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997. 94:13057-13062.
104. Latham KE, Schultz RM. Embryonic genome activation. *Front Biosci*. 2001. 6:748-59.
105. Lee B, Wirtu GG, Damiani P, Pope E, Dresser BL, Hwang W, Bavister BD. Blastocyst development after intergeneric nuclear transfer of mountain bongo antelope somatic cells into bovine oocytes. *Cloning Stem Cells*. 2003. 5:25-33.
106. Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*. 2005. 436:641.
107. Lewis IM, Peura TT, Owens JL. Outcomes from novel simplified nuclear transfer techniques in cattle. *Theriogenology*. 2000. 53:233.
108. Li G, Seidel GE, Squires E. Interspecies cloning using fresh, stored and dead equine and bovine somatic cells as donor nuclei and bovine cytoplasts. *Theriogenology*. 2002. 57:432.
109. Li J, Du Y, Zhang YH, Kragh PM, Purup S, Bolund L, Yang H, Xue QZ, Vajta G. Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*. 2006b. 8:241-50.
110. Li X, Tremoleda JL, Allen WR. Effect of the number of passages of fetal and adult fibroblasts on nuclear remodelling and first embryonic division in reconstructed horse oocytes after nuclear transfer. *Reproduction*. 2003. 125:535-42.
111. Li Y, Dai Y, Du W, Zhao C, Wang L, Wang H, Liu Y, Li R, Li N. In vitro development of yak (*Bos grunniens*) embryos generated by interspecies nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*. 2007. 101:45-59.

112. Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol.* 2006a. 293:439-48.
113. Liu HB, Lv PR, Yang XG, Qin XE, Pi DY, Lu YQ, Lu KH, Lu SS, Li DS. Fibroblasts from the new-born male testicle of Guangxi Bama mini-pig (*Sus scrofa*) can support nuclear transferred embryo development in vitro. *Zygote.* 2009. 17:147-56.
114. Liu JL, Sung LY, Barber M, Yang X. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovinemetaphase II oocytes. *Biol Reprod.* 2002b. 66:1342-9.
115. Liu JL, Sung LY, Tian XC, Yang X. Hypertonicity-induced projections reflect cell polarity in mouse metaphase II oocytes: involvement of microtubules, microfilaments, and chromosomes. *Biol Reprod.* 2002a. 67:1853-63.
116. Lo WC, Summers PM. In vitro culture and interferon-tau secretion by ovine blastocysts. *Anim Reprod Sci.* 2002. 70:191-202.
117. Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol.* 2001. 19:962-4.
118. Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Reprod Dev.* 2003. 66:297-305.
119. Long JE, Cai X. Igf-2r expression regulated by epigenetic modification and the locus of gene imprinting disrupted in cloned cattle. *Gene.* 2007. 388:125-34.
120. Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Chan AW, Ketudat-Cairns M, Parnpai R. Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocytes. *J Reprod Dev.* 2008. 54:306-13.
121. Lucifero D, Suzuki J, Bordignon V, Martel J, Vigneault C, Therrien J, Filion F, Smith LC, Trasler JM. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod.* 2006. 75:531-8.
122. Lyons P. Advances in spotted microarray resources for expression profiling. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2003. 2:21-30.
123. MacLean II JA, Chakrabarty A, Xie S, Bixby JA, Roberts RM, Green JA. Family of Kunitz proteins from trophoblast: expression of the trophoblast Kunitz domain proteins (TKDP) in cattle and sheep. *Mol. Reprod. Dev.* 2003. 65:30-40.
124. Maddox-Hyttel P, Alexopoulos NI, Vajta G, Lewis I, Rogers P, Cann L, Callesen H, Tveden-Nyborg P, Trounson A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction.* 2003. 125:607-623.
125. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007. 9:625-35.
126. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature.* 2000. 405:1066-9.
127. McGall GH, Christians FC. High-density genechip oligonucleotide probe arrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2002. 77:21-42.
128. Mir B, Zaunbrecher G, Archer GS, Friend TH, Piedrahita JA. Progeny of somatic cell nuclear transfer (SCNT) pig clones are phenotypically similar to non-cloned pigs. *Cloning Stem Cells.* 2005. 7:119-25.

129. Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod.* 2004. 70:260.
130. Morris DG, Diskin MG, Sreenan JM. Protein synthesis and phosphorylation by elongating 13-15-day-old cattle blastocysts. *Reprod Fertil Dev.* 2000. 12:39-44.
131. Naoi H, Agung B, Karja NW, Wongsrikeao P, Shimizu R, Taniguchi M, Otoi T. 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.* 2008. :157-61.
132. Neira JA, Tainturier D, L'Haridon RM, Martal J. Comparative IFN-tau secretion after hatching by bovine blastocysts derived ex vivo and completely produced in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2007. 42:68-75.
133. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998. 95:379-91.
134. Niemann H, Kues WA. Transgenic farm animals: an update. *Reprod Fertil Dev.* 2007. 19:762-70.
135. Niemann H, Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Brambrink T, Kues WA, Carnwath JW. Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning Stem Cells.* 2002. 4:29-38.
136. Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. The Influence of Developmental Stage and Morphological Quality of Frozen-Thawed Bovine Embryos on Pregnancy Rate in Bovine Embryo Transfer. *Journal of Reproduction and Development.* 1999. 45: .
137. Niwa H, Miyazaki J, Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Klewe-Nebenius D, and Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 2000. 24:372-376.
138. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006. 1:1559-1582
139. Oh BC, Kim JT, Shin NS, Kwon SW, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Production of blastocysts after intergeneric nuclear transfer of goral (*Naemorhedus goral*) somatic cells into bovine oocytes. *J Vet Med Sci.* 2006. 68:1167-71.
140. Oh HJ, Kim MK, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Park K, Park C, Sohn SH, Kim DY, Shin NS, Lee BC. Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology.* 2008. 70:638-47.
141. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell.* 1990. 60:461-472.
142. Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pfister-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod.* 2002. 67:334-339.
143. Pedersen RA. Advanced transgenesis and cloning: Genetic Manipulation in Animals. 2003. Electronic Workshop Presentation: Paper No. 11.
144. Pesce, M. and Schöler, H.R. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells.* 2001. 19:271-278.

145. Peura TT, Vajta G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*. 2003 5:257-77.
146. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco , Starzl TE, Dai Y, Ayares DL. Production of α 1,3-galactosyltransferase deficient pigs. *Science*. 2003. 299:411-414.
147. Picton HM, Danfour MA, Harris SE, Chambers EL, Huntriss J. Growth and maturation of oocytes in vitro. *Reprod Suppl*. 2003. 61:445-62.
148. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 2000. 407:86-90.
149. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Organ donation and transplantation trends in the United States, 2002. OPTN / SRTR 2003 annual report. 2003. Available from: URL:[http:// www.optn.org/AR2003/Chapter_I_AR_Print.pdf](http://www.optn.org/AR2003/Chapter_I_AR_Print.pdf).
150. Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophoblast fate in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 2008. 313:614-29.
151. Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL, Bondioli KR. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol Reprod*. 2003. 69:437-45.
152. Ranilla MJ, Gebbie FE, King ME, Carolan C, Sinclair KD, Watt RG, Dolman DF, Beckers JF, Robinson JJ. The incidence of embryo and fetal loss following the transfer of in vitro-cultured sheep embryos. *Theriogenology*. 1998. 49:248.
153. Reggio BC, James AN, Green HL, Gavin WG, Behboodi E, Echelard Y, Godke RA. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol Reprod*. 2001. 65:1528-33.
154. Ribas RC, Taylor JE, McCorquodale C, Maurício AC, Sousa M, Wilmut I. Effect of zona pellucida removal on DNA methylation in early mouse embryos. *Biol Reprod*. 2006. 74:307-13.
155. Rieck W, Dean W. Epigenetic reprogramming: back to the beginning. *Nature*. 2002. 420:127.
156. Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat Genet*. 1998. 18:271-5.
157. Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Mol Reprod Dev*. 2007. 74:716-23.
158. Roberts RM, Chen Y, Ezashi T, Walker AM. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. *Semin Cell Dev Biol*. 2008. 19:170-7.
159. Roberts RM, Leaman DW, Cross JC. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992. 200:7-18.
160. Rodríguez L, Navarrete FI, Tovar H, Cox JF, Castro FO. High developmental potential in vitro and in vivo of cattle embryos cloned without micromanipulators. *J Assist Reprod Genet*. 2008. 25:13-6.
161. Rodríguez-Zas SL, Schellander K, Lewin HA. Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction*. 2008. 135:129-39.

162. Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990. 345:686.
163. Rossant J, Guillemot F, Tanaka M, Latham K, Gertenstein M, Nagy A. Mash2 is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation. *Mech Dev*. 1998. 73:183-91.
164. Rossant J. Lineage development and polar asymmetries in the periimplantation mouse blastocyst. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2004. 15:573– 581.
165. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239:487–491
166. Salamone D, Baraño L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C, Salaberry R, Berra G, Berra I, Fernández N, Papouchado M, Foti M, Judewicz N, Mujica I, Muñoz L, Alvarez SF, González E, Zimmermann J, Criscuolo M, Melo C. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol*. 2006. 124:469-72.
167. Sawai K, Kageyama S, Moriyasu S, Hirayama H, Minamihashi A, Onoe S. Changes in the mRNA transcripts of insulin-like growth factor ligand, receptors and binding proteins in bovine blastocysts and elongated embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev*. 2007. 53:77-86.
168. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995. 270: 467–470.
169. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmot I, Colman A, Campbell KH. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 1997. 278:2130-3.
170. Scholler HR, Balling R, Hatzopoulos AK, Suzuki N, Gruss P. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *EMBO J*. 1989. 8:2551-2557.
171. Scholler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*. 1990. 344:435-439.
172. Scholven J, Taras D, Sharbati S, Schön J, Gabler C, Huber O, Meyer zum Büschenfelde D, Blin N, Einspanier R. Intestinal expression of TFF and related genes during postnatal development in a piglet probiotic trial. *Cell Physiol Biochem*. 2009. 23:143-56.
173. Schulze A, Downward J. Analysis of gene expression by microarrays: cell biologist's gold mine or minefield? *J Cell Sci*. 2000. 23:4151-6.
174. Sebastiano V, Gentile L, Garagna S, Redi CA, Zuccotti M. Cloned pre-implantation mouse embryos show correct timing but altered levels of gene expression. *Mol Reprod Dev*. 2005. 70:146-54.
175. Sharov AA, Ko MS. Human ES cell profiling broadens the reach of bivalent domains. *Cell Stem Cell*. 2007. 1:237-8.
176. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 2002. 415:859.
177. Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*. 1996. 42:417-426.

178. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006. 65:126–136
179. Smith C, Berg D, Beaumont S, Standley NT, Wells DN, Pfeffer PL. Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction*. 2007. 133:231-42.
180. Smith LC. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J Reprod fert*. 1993. 99:39-44.
181. Solter D: Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet*. 2000. 1:199-207.
182. Sprangers B, Waer M, Billiau AD. Xenotransplantation: where are we in 2008? *Kidney Int*. 2008. 74:14-21.
183. Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod*. 1996. 54:100-10.
184. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*. 2005. 132:2093-2102.
185. Takahashi S, Yoshihio I. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning Stem Cells*. 2004. 6:165-171.
186. Tao Y, Cheng L, Zhang M, Li B, Ding J, Zhang Y, Fang F, Zhang X, Maddox-Hyttel P. Ultrastructural changes in goat interspecies and intraspecies reconstructed early embryos. *Zygote*. 2008. 16:93-110.
187. Tecirlioglu RT, Cooney MA, Lewis IM, Korfiatis NA, Hodgson R, Ruddock NT, Vajta G, Downie S, Trounson AO, Holland MK, French AJ. Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod Fertil Dev*. 2005. 17:573-85.
188. Thongphakdee A, Kobayashi S, Imai K, Inaba Y, Tasai M, Tagami T, Nirasawa K, Nagai T, Saito N, Techakumphu M, Takeda K. Interspecies nuclear transfer embryos reconstructed from cat somatic cells and bovine ooplasm. *J Reprod Dev*. 2008. 54:142-7.
189. Tomé D., Dubarry M, Fromentin G. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells*. 2004. 6:172–177.
190. Tovar H, Navarrete F, Rodríguez L, Skewes O, Castro FO. 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*. 2008. 44:309-20.
191. Ushijima H, Akiyama K, Tajima T. Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: in vivo collected and in vitro produced embryos. *J Reprod Dev*. 2008. 54:239-43.
192. Ushizawa K, Herath CB, Kaneyama K, Shiojima S, Hirasawa A, Takahashi T, Imai K, Ochiai K, Tokunaga T, Tsunoda Y, Tsujimoto G, Hashizume K. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2004. 2:77.
193. Utsunomiya T, Kaori Goto, Megumi Nasu, Yoko Kumasako, Yasuhisa Araki, Masaki Yokoo, Takahiro Itoh-Sasaki, and Hiroyuki Abe. Evaluating the Quality of Human Embryos with a Measurement of Oxygen Consumption by Scanning Electrochemical Microscopy. *Journal of Mammalian Ova Research*. 2008. 25:1.

194. Vajta G, Bartels P, Joubert J, de la Rey M, Treadwell R, Callesen H. 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*. 2004. 62:1465-72.
195. Vajta G, Gjerris M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim Reprod Sci*. 2006. 92:211-30.
196. Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 2001. 3:89-95.
197. Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod*. 2003. 68:571-8.
198. Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. New method for culture of zona-included or zonafree embryos: the well-of-the-well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev*. 2000a. 55:256–264.
199. Vajta G. Handmade cloning: the future way of nuclear transfer? *Trends in Biotechnology*. 2007. 25:250-3.
200. Vajta G. Vitriification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2000b. 61:357-64.
201. van Eijk MJ, van Rooijen MA, Modina S, Scesi L, Folkers G, van Tol HT, Bevers MM, Fisher SR, Lewin HA, Rakacolli D, Galli C, de Vaureix C, Trounson AO, Mummery CL, Gandolfi F. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol Reprod*. 1999. 60:1093-1103.
202. van Wagtenonk-de Leeuw AM, Aerts BJ, den Daas JH. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology*. 1998. 49:883-94.
203. Vignon X, Chesné P, LeBourhis D, Fléchon JE., Heyman Y, Renard J.P. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci*. 1998. 321:735-745.
204. Vignon X, LeBourhis D, Adenot P, Marchal J, Lavergne Y, Laloi E. Production of bovine embryos by nuclear transfer of adult skin fibroblasts: the effect of serum starvation. *Theriogenology*. 2000. 53:245.
205. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998. 394:369-74.
206. Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro KL, Niida H, Blanchard DC, Blanchard RJ, Ogura A, Tanemura K, Tachibana M, Perry AC, Colgan DF, Mombaerts P, Yanagimachi R. Cloning of mice to six generations. *Nature*. 2000. 407:318-9.
207. Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and changes. *Theriogenology*. 1996. 45:111-120.
208. Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannermann DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol*. 2005. 23:445-451.
209. Wang MK, Chen DY, Liu JL, Li GP, Sun QY. In vitro fertilisation of mouse oocytes reconstructed by transfer of metaphase II chromosomes results in live births. *Zygote*. 2001. 9:9-14.

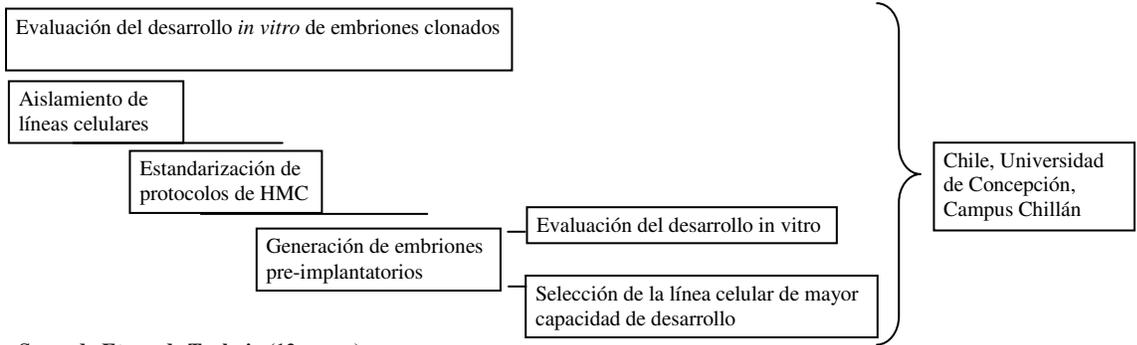
210. Watanabe S, Nagai T. Health status and productive performance of somatic cell cloned cattle and their offspring produced in Japan. *J Reprod Dev.* 2008. 54:6-17.
211. Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, L'Huillier PJ, Tervit HR, Oback B. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology.* 2003. 59:45-59.
212. Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Bio I Reprod.* 1999. 60:996-1005.
213. Westhusin M, Collas P, Marek D, Sullivan E, Stepp P, Pryor J, Barnes F. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation. *Theriogenology.* 1996. 46:243-252.
214. Westhusin M, Hinrichs K, Choi YH, Shin T, Liu L, Kraemer D. Cloning companion animals (horses, cats, and dogs). *Cloning Stem Cells.* 2003. 5:301-17.
215. Westhusin M, Levanduski M, Scarborough R, Loony C, Bondioli K. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J Reprod Fertil.* 1992. 95:475-480.
216. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature.* 1986. 320:63-5.
217. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997. 385:810-813.
218. Wilson V, Conlon FL. The T-box family. *Genome Biol.* 2002. 3.
219. Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A Mule Cloned from Fetal Cells by Nuclear Transfer. *Science.* 2003. 301:1063.
220. Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev.* 2005. 17:23-35.
221. Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, and Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol. Reprod.* 2001. 65:309-317.
222. Yamazaki Y, Fujita TC, Low EW, Alarcón VB, Yanagimachi R, Marikawa Y. Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 2006. 73:180-8.
223. Yang F, Hao R, Kessler B, Brem G, Wolf E, Zakhartchenko V. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction.* 2007. 133:219-30.
224. Yang X, Zhang L, Kovacs A, Tobback C, Foote RH. Potential of hypertonic medium treatment for embryos micromanipulation: II assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, sub-zona insertion and electrofusion of blastomeres to intact of functionally enucleated in rabbit. *Mol Reprod Dev.* 1990. 27:118-129.
225. Yao N, Wan PC, Hao ZD, Gao FF, Yang L, Cui MS, Wu Y, Liu JH, Liu S, Chen H, Zeng SM. Expression of Interferon-tau mRNA in Bovine Embryos Derived from Different Procedures. *Reprod Domest Anim.* 2008.
226. Yin XJ, Lee HS, Lee YH, Seo YI, Jeon SJ, Choi EG, Cho SJ, Cho SG, Min W, Kang SK, Hwang WS, Kong IK. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction.* 2005. 129:245-9.

227. Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 2002. 67:442-446.
228. Yoon T, Choi EJ, Han KY, Shim H and Roh S. In vitro development of embryos produced by nuclear transfer of porcine somatic cell nuclei into bovine oocytes using three different culture systems. *Theriogenology.* 2001. 55:298.
229. Yu XS, Sun XS, Jiang HN, Han Y, Zhao CB, Tan JH. Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblasts in goats. *Theriogenology.* 2003. 59:1277-1289.
230. Zakhartchenko V, Stojkovic M, Palma G, Wolf E, Brem G. Enucleation of bovine oocytes with minimal cytoplasmic volume: Effect on development of nuclear transfer embryos. *Theriogenology.* 1997. 47:238.
231. Zhan S, Kubota C, Yang L, Zhang Y, Page R, O'Neill M. Genomic Imprinting of H19 in Naturally Reproduced and Cloned Cattle. *Biol. Reprod.* 2004. 71:1540-1544.
232. Zhang HJ, Siu MK, Wong ES, Wong KY, Li AS, Chan KY, Ngan HY, Cheung AN. Oct4 is epigenetically regulated by methylation in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Placenta.* 2008. 29:549-54.
233. Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science.* 2003. 302:1179.
234. Zuccotti M, Garagna S, Redi CA. Nuclear transfer, genome reprogramming and novel opportunities in cell therapy. *J. Endocrinol. Invest.* 2000. 23:623-629.

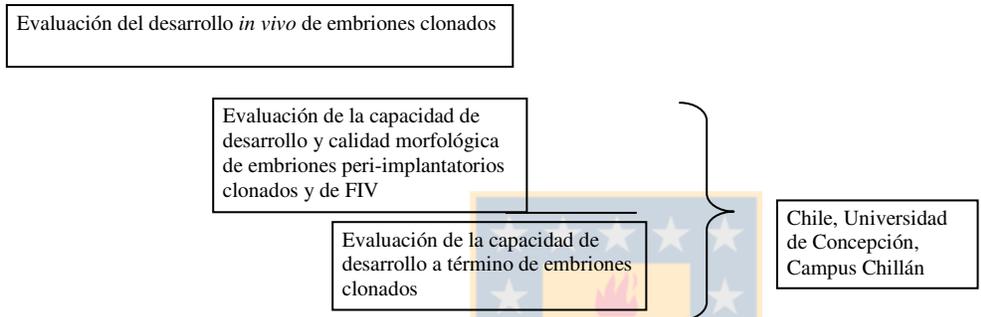


Anexo 1. Esquema cronológico de desarrollo del proyecto de Tesis

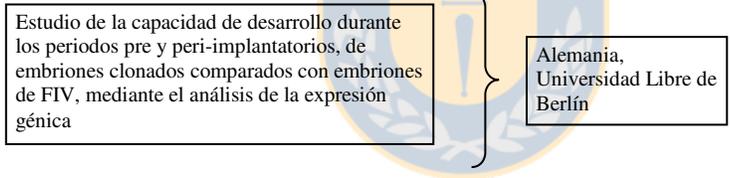
Primera Etapa de Trabajo (12 meses)



Segunda Etapa de Trabajo (12 meses)



Tercera Etapa de Trabajo (6 meses)



Esquema de análisis estadístico del proyecto

Análisis Estadístico

Evaluación del desarrollo de embriones clonados producidos por dos líneas celulares diferentes (fetales y adultas) durante la etapa pre-implantatoria



Efecto de la línea celular sobre la eficiencia de la TNS y efecto pasos de la TNS sobre el desarrollo embrionario

- 1- Efecto de la línea celular sobre: porcentajes de fusión y supervivencia de los embriones
Correlación de Pearson
- 2- Efecto de los porcentajes de fusión y supervivencia a la fusión sobre los porcentajes de blastocistos totales
Correlación de Pearson

Efecto de la línea celular sobre el porcentaje de blastocistos clonados su calidad morfológica

- 1- Porcentaje de blastocistos producidos y porcentaje de blastocistos Tipo I y II
Wilcoxon
- 2- Células totales de blastocistos clonados con células adultas y fetales
t de student

Efecto de la línea celular utilizada como donante de núcleo para la TN y la TN en sí sobre los niveles de expresión de genes seleccionados

- 1- Se realizó un análisis múltiple de los niveles de expresión de los genes seleccionados (tres grupos):
Blastocistos clonados de células fetales y adultas y Blastocistos de FIV
Kruskal Wallis
- 2- Variabilidad de la expresión génica inherente al grupo de TN para cada línea celular
Análisis de residuos
prueba *t* para análisis de residuos

Esquema de análisis estadístico del proyecto (Continuación)

Evaluación del desarrollo de embriones clonados producidos con la línea celular adulta durante la etapa peri-implantatoria



Efecto de la línea celular sobre la eficiencia de la TNS y efecto pasos de la TNS sobre el desarrollo embrionario
1- Comparación de la tasa de recuperación, tamaño de los embriones y presencia de disco embrionarios entre clones y embriones de FIV
 t de student
2- Niveles de expresión de genes seleccionados entre clones y embriones de FIV
Wilcoxon

Variación de los niveles de expresión de genes seleccionados durante las etapas pre y peri-implantatorias
1- Comparación de los niveles de expresión de ciertos genes en blastocistos clonados y de FIV y en embriones elongados producidos por TN y FIV
Kruskal Wallis

Validación de los datos de expresión obtenidos por microarreglo
1- Correlación entre los niveles de expresión de genes seleccionados y los datos obtenidos en el microarreglo
Correlación de Pearson



Anexo 2. Producción de embriones clonados mediante HMC a partir de dos líneas celulares, fetal (LCF) y adulta (CWA)

Línea celular	# Pases	Ovocitos enucleados	Embriones reconstruidos	Embriones Fundidos (%)	Sobrevivida a la fusión (%)	Embriones cultivados	No. blastocistos	% blastocistos
LCF		30	14	14 (100)	14 (100)	14	7	50
LCF	4	50	25	25 (100)	25 (100)	25	5	20
LCF	4	50	23	22 (95,6)	22 (95,6)	22	4	18,2
LCF	4	59	24	24 (100)	23 (95,8)	23	7	30,43
LCF	4	70	29	29 (100)	27 (93,1)	27	12	44,44
LCF		70	33	32 (97)	27 (84,4)	27	12	44,44
LCF		70	29	28 (96,5)	28 (100)	28	13	46,2
LCF	7	59	27	27 (100)	26 (96,3)	26	9	34,61
LCF	8	66	22	22 (100)	21 (95,4)	20	12	60
LCF		524	226	223 (98,7)	213(95,5)	212	81	38,2
CWA	3	76	33	33 (100)	31 (93,9)	31	17	54,8
CWA	4	68	33	32 (97)	31 (96,9)	31	22	70,9
CWA	4	65	32	30 (93,6)	28 (93,3)	28	20	71,4
CWA	6	70	32	32 (100)	32 (100)	32	24	75
CWA		65	31	30 (96,8)	26 (86,7)	26	17	65,4
CWA	5	67	32	32 (100)	27 (84,4)	27	19	70
CWA	7	85	41	28 (68,3)	28 (100)	28	20	71,4
CWA	6	75	34	34 (100)	33 (97)	33	16	48,5
CWA		571	268	251(93,6)	236 (94)	236	155	65,7
		1095	494	474	449	448	236	52,7

Anexo 3. Clasificación de la calidad de los blastocistos producidos a partir de dos líneas celulares.

Línea celular	Blastocistos tipo I	Blastocistos tipo II	Total blastocistos
LCF	3	4	7
LCF	3	2	5
LCF	2	2	4
LCF	5	2	7
LCF	10	2	12
LCF	9	3	12
LCF	10	3	13
LCF	5	4	9
LCF	10	2	12
	57	24	81
CAW	13	4	17
CAW	19	3	22
CAW	17	3	20
CAW	22	2	24
CAW	13	4	17
CAW	17	2	19
CAW	17	3	20
CAW	12	4	16
	130	25	155

Anexo 4. Secuencias del gen OCT4 de las células donantes, embriones pre-implantatorios clonados y producidos por FIV

Blastocistos clonados a partir de células adultas

LOCUS Contig\1 305 bp DNA 03-DEC-2007
 COMMENT This file is created by Vector NTI Advance
 ORIGIN
 1 CACGTCTTTC TCCAGCCCGA GCTGCTGGGC GATGTGGCTA ATTTGCTGCA GGGTGGGCTT
 61 CGGGCACTGC AGGAACATGC TCTCCAGGTT GCCTTCTACT CGGTTCTCGA TACTCGTCCG
 121 CTTTCTCTTT CGGGCCTGCA CAAGGGTCTC TGCCTTGCAT ATCTCCTGCA GATTCTCGTT
 181 GTTGTGAGCT TCCTCCACCC ACTTCTGCAG CAGGGGCCGC AGCTTACACA TGTTCTTGAA
 241 ACTGAGCTGC AAAGCCTCAA AACGGCAGAT AGTCGTTTGG CTGAACACCT TTCAAAAAAG
 301 AACCA

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
NM_174580.1	Bos taurus POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), mRNA	551	551	99%	7e-154	99%	

Blastocistos clonados a partir de células fetales

LOCUS Contig\2 304 bp DNA 03-DEC-2007
 COMMENT This file is created by Vector NTI Advance
 ORIGIN
 1 TACACTCGGG ACCCGTCTTT CTCCAGCCCG AGCTGCTGGG CGATGTGGCT AATTTGCTGC
 61 AGGGTGGGCT TCGGGCACTG CAGGAACATG CTCTCCAGGT TGCCTCTCAC TCGGTTCTCG
 121 ATACTCGTCC GCTTTCTCTT TCGGGCCTGC ACAAGGGTCT CTGCCTTGCA TATCTCCTGC
 181 AGATTCTCGT TGTTGTCAGC TTCCTCCACC CACTTCTGCA GCAGGGGCCG CAGCTTACAC
 241 ATGTTCTTGA AACTGAGCTG CAAAGCCTCA AAACGGCAGA TAGTCGTTTGG GCTGAACACC
 301 TTTC

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	Links
NM_174580.1	Bos taurus POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), mRNA	549	549	99%	3e-153	99%	

Blastocistos de FIV

LOCUS Contig\3 314 bp DNA 03-DEC-2007
 ORIGIN
 1 TGGTTCTCTT TTGAAAGGTG TTCAGCCAAA CGACTATCTG CCGTTTTGAG GCTTTGCAGC
 61 TCAGTTTCAA GAACATGTGT AAGCTGCGGC CCCTGCTGCA GAAGTGGGTG GAGGAAGCTG
 121 ACAACAACGA GAATCTGCAG GAGATATGCA AGGCAGAGAC CCTTGTGCAG GCCCGAAAGA
 181 GAAAGCGGAC GAGTATCGAG AACCGAGTGA GAGGCAACCT GGAGAGCATG TTCCTGCAGT
 241 GCCCGAAGCC CACCCTGCAG CAAATTAGCC ACATCGCCCA GCAGCTCGGG CTGGAGAAAG
 301 ACGGGTCCCG AGTG

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY490804.1	Bos taurus oct4 (oct4) mRNA, partial cds	497	497	87%	1e-137	99%	

Línea celular adulta (CWA)

LOCUS Contig\4 314 bp DNA 03-DEC-2007
 COMMENT This file is created by Vector NTI Advance
 ORIGIN
 1 TGGTTCTTTT TTGAAAGGTG TTCAGCCAAA CGACTATCTG CCATTTTGGAG GCTTTGCAGC
 61 TCAGTTTCAA GAACATGTGT AAGCTGCGGC CCCTGCTGCA GAAGTGGGTG GAGGAAGCTG
 121 ACAACAACGA GAATCTGCAG GAGATATGCA AGGCAGAGAC CCTTGTGCAG GCCCGAAAGA
 181 GAAAGCGGAC GAGTATCGAG AACCAAGTGA GAGGCAACCT GGAGAGCATG TTCCTGCAGT
 241 GCCCGAAGCC CACCCTGCAG CAAATTAGCC ACATCGCCCA GCAGCTCGGG CTGGAGAAAG
 301 ACGGGACCCG AGTG

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY490804.1	Bos taurus oct4 (oct4) mRNA, partial cds	497	497	87%	1e-137	99%	

Línea celular fetal (LCF)

LOCUS Contig\1 242 bp DNA 20-DEC-2008
ORIGIN
1 CCAAACGACT ATCTGCCGTT TTGAGGCTTT GCAGCTCAGT TTCAAGAACA TGTGTAAGCT
61 GCGGCCCTG CTGCAGAAGT GGGTGGAGGA AGCTGACAAC AACGAGAATC TGCAGGAGAT
121 ATGCAAGGCA GAGACCCTTG TGCAGGCCCG AAAGAGAAAG CGGACGAGTA TCGAGAACCG
181 AGTGAGAGGC AACCTGGAGA GCATGTTCTT GCAGTGCCCG AAGCCCACCC TGCTGCAAAT
241 TA

Sequences producing significant alignments:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>	<u>Links</u>
NM_174580.1	Bos taurus POU class 5 homeobox 1 (POU5F1), mRNA	442	442	100%	3e-121	99%	

