



CLONACIÓN E ICSI INTERESPECÍFICA EN FELINOS Y REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

Lic. Moro Lucia N.

Tesis para optar al grado de doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Facultad de Ciencias Veterinarias en el área de Reproducción Animal

Director: Dr. Daniel Salamone

Laboratorio de Biotecnología Animal

Facultad de Agronomía

Universidad de Buenos Aires, Argentina

2015

1. Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. ÍNDICE..... | 2 |
| 2. ABREVIATURAS | 4 |
| 3. RESUMEN..... | 6 |
| 4. ABSTRACT | 9 |
| 5. INTRODUCCIÓN | 12 |
| 5.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LOS FELINOS..... | 12 |
| 5.2 IMPORTANCIA DE REALIZAR TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN EL GATO DOMÉSTICO | 15 |
| 5.3 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA GATA | 16 |
| 5.4 BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN EL GATO DOMÉSTICO Y ESPECIES SILVESTRES..... | 19 |
| 5.4.1 <i>Sincronización de celo</i> | 19 |
| 5.4.2 <i>Inseminación artificial</i> | 20 |
| 5.4.3 <i>Fecundación in vitro</i> | 21 |
| 5.4.4 <i>Inyección intracitoplasmática del espermatozoide</i> | 22 |
| 5.4.5 <i>Transferencia nuclear de células somáticas</i> | 23 |
| 5.5. AGREGACIÓN EMBRIONARIA | 25 |
| 5.6 REPROGRAMACIÓN NUCLEAR..... | 27 |
| 5.7 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO PROPUESTO..... | 28 |
| 6. HIPÓTESIS | 30 |
| 7. OBJETIVOS | 30 |
| 7.1 OBJETIVOS GENERALES..... | 30 |
| 7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 30 |
| 8. CAPÍTULO I..... | 31 |
| 8.1 RESUMEN | 32 |
| 8.2 INTRODUCCIÓN | 34 |
| 8.3 MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| 8.3.1 <i>Reactivos</i> | 36 |
| 8.3.2 <i>Utilización de animales para investigación</i> | 36 |
| 8.3.3 <i>Diseño experimental</i> | 37 |
| 8.3.4 <i>Colecta de ovocitos y maduración in vitro</i> | 38 |
| 8.3.5 <i>Colecta y congelación de espermatozoides</i> | 39 |
| 8.3.6 <i>Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI)</i> | 40 |
| 8.3.7 <i>Cultivo in vitro de embriones</i> | 41 |
| 8.3.8 <i>Análisis de cariotipo</i> | 42 |
| 8.3.9 <i>Sincronización de celo y transferencia de embriones</i> | 42 |
| 8.3.10 <i>TUNEL y microscopía confocal</i> | 43 |
| 8.3.11 <i>Análisis estadístico</i> | 44 |
| 8.4 RESULTADOS | 45 |

| | |
|--|------------|
| 8.4.1 Observaciones preliminares..... | 45 |
| 8.4.2 Desarrollo in vitro de embriones de gato doméstico generados por ICSI y SHAM con distintos tratamientos..... | 45 |
| 8.4.3 Sincronización de celo y transferencia de embriones..... | 45 |
| 8.4.4 Desarrollo in vitro de embriones de ICSI interespecíficos asistidos o no con activación química. .. | 47 |
| 8.4.5 Análisis de cariotipo..... | 50 |
| 8.4.6 Obtención de ovocitos de leopardo e ICSI en esta especie..... | 50 |
| 8.4.7 Evaluación de los blastocistos de ICSI por ensayo de TUNEL..... | 52 |
| 8.5 DISCUSIÓN..... | 55 |
| 8.6 CONCLUSIÓN..... | 59 |
| 9. CAPÍTULO II..... | 60 |
| 9.1 RESUMEN..... | 61 |
| 9.2 INTRODUCCIÓN..... | 63 |
| 9.3 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 65 |
| 9.3.1 Diseño experimental..... | 65 |
| 9.3.2 Colecta de ovocitos y maduración in vitro..... | 67 |
| 9.3.3 Activación partenogenética..... | 67 |
| 9.3.4 TUNEL y microscopía confocal..... | 67 |
| 9.3.5 Cultivo de células somáticas..... | 67 |
| 9.3.6 Preparación de los ovocitos..... | 68 |
| 9.3.7 Transferencia nuclear de células somáticas..... | 69 |
| 9.3.8 Fecundación in vitro..... | 71 |
| 9.3.9 Cultivo de embriones..... | 71 |
| 9.3.10 Inmunicitoquímica..... | 72 |
| 9.3.11 Microscopía de escaneo confocal láser..... | 72 |
| 9.3.12 Análisis de expresión génica..... | 73 |
| 9.3.13 Sincronización de celo y transferencia de embriones..... | 75 |
| 9.3.14 Análisis estadístico..... | 76 |
| 9.4 RESULTADOS..... | 77 |
| 9.4.1 Desarrollo in vitro de embriones partenogenéticos de gato doméstico utilizando diferentes condiciones, y ensayo de TUNEL..... | 77 |
| 9.4.2 Desarrollo in vitro de embriones de gato doméstico reconstituidos por tres técnicas de clonación homoespecífica diferentes..... | 79 |
| 9.4.3 Efecto de la agregación embrionaria en el desarrollo in vitro y la calidad de los blastocistos en embriones de gato doméstico, bengal, tigre y chita producidos por clonación..... | 81 |
| 9.4.4 Efecto de la agregación y SCNTi en la expresión génica de OCT4, SOX2, CDX2 y NANOG de blastocistos de gato doméstico, bengal y chita generados por clonación..... | 87 |
| 9.4.5 Sincronización de celo y transferencia de embriones..... | 89 |
| 9.5 DISCUSIÓN..... | 90 |
| 9.6 CONCLUSIÓN..... | 99 |
| 10. CONCLUSIONES GENERALES..... | 100 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 105 |

2. Abreviaturas

#: Porcentaje
μg: Microgramo
μL: Microlitro
μM: Micromolar
ADN: Acido desoxirribonucleico
ARN: Acido ribonucleico
ARNm: Acido ribonucleico mensajero
ATB: Antibiótico
Be: Bengal
BO: Brackett y Oliphant
BSA: Suero albumina bovina
CA: California
CD: corriente directa
Ch: Chita
CIV: Cultivo *in vitro*
CO₂: Dióxido de Carbono
COCs: Complejos cúmulus ovocitos
CP: Corpúsculo polar
D.E.: Desvío estándar
DMAP: 6-Dimetilaminopurina
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPBS: Solución buffer fosfato dulbecco
EEUU: Estados Unidos de América
eCG: Gonadotrofina coriónica equina
FAUBA: Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
Fig: Figura
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FIV: Fecundación *in vitro*
FSH: Hormona folículo estimulante
g: Fuerza centrífuga
GD: Gato doméstico
GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas
gr: Gramo
h: horas
hCG: gonadotrofina coriónica humana
Hz: Hertz
i.m: Intramuscular
IA: Inseminación artificial
ICSI: Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
Io: Ionomicina
IPSc: células madre pluripotentes inducidas
ITS: Insulina-transferrina y selenio
IUCN: Unión Internacional para la conservación de la Naturaleza

Kb: Kilobase
Kg: Kilogramos
L: Litro
Leo: Leopardo
LH: Hormona luteinizante
MII: Metafase II
MEM: Medio esencial mínimo
mg: Miligramos
MgSO₄: Sulfato de magnesio
min: minutos
MIV: Maduración *in vitro*
mL: Mililitros
mm: Milímetros
MM: Medio de maduración sin ITS
mM: Milimolar
N₂: nitrógeno
NaCl: Cloruro de Sodio
ng: Nanogramos
nm: Nanómetros
NY: Nueva York
O₂: Oxígeno
°C: Grados centígrados
pb: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PIV: Producción *in vitro*
p/v: Peso en volúmen
PVP: Polivinilpirrolidona
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
s: segundos
SEM: error estándar de la media
SHAM: Inyección en ausencia de espermatozoide
SFB: Suero fetal bovino
SOF: fluido oviductal sintético
TALP-H: Tirodes albumina lactato piruvato con hepes
TCM-199: Medio de cultivo de tejidos 199
TE: Transferencia embrionaria
Ti: Tigre
TN: Transferencia nuclear
SCNT: Transferencia nuclear de células somáticas
SCNTi: Transferencia nuclear de células somáticas inteterespecífica
TX: Texas
UI: Unidades internacionales
UV: Luz ultravioleta
V: Voltios
v/v: Volúmen en volúmen
ZP: Zona pelúcida

3. Resumen

La extinción de especies animales es una de las consecuencias más alarmantes provocada por el deterioro ambiental y nos priva, de manera irreversible, de un material genético único e irremplazable. La Familia *Felidae* no escapa a esta problemática y es por este motivo que las biotecnologías reproductivas se convierten en herramientas muy poderosas para la conservación de estas especies. La hipótesis de la presente tesis doctoral radica en que es posible utilizar ovocitos u ovoplastos de gata doméstica (Gd) para desarrollar técnicas reproductivas aplicables a felinos silvestres. Por ende, nuestro principal objetivo fue adaptar las biotecnologías existentes, para reproducir y conservar felinos en peligro de extinción. Debido a la limitada disponibilidad de ovocitos de felinos silvestres, se utilizó como modelo experimental ovocitos de Gd para desarrollar las diferentes técnicas. En el Capítulo I, se estudiaron diferentes condiciones de maduración y cultivo embrionario para mejorar los resultados de la técnica de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) en el Gd. De esta manera, determinamos que utilizando el suplemento insulina-transferrina y selenio (ITS) durante la maduración de los ovocitos, y baja tensión de oxígeno (5% O₂) durante el cultivo, se obtienen mayores tasas de formación de blastocistos, que realizando la maduración sin ITS o cultivando con 21% O₂. Luego, se seleccionaron las mejores condiciones para generar embriones interespecíficos inyectando espermatozoides de chita (Ch, *Acinonyx jubatus*) y leopardo (Leo, *Panthera pardus*) en ovocitos de Gd. En este experimento, se obtuvieron tasas similares de formación de blastocisto tanto en el control de ICSI homoespecífica de Gd como en los embriones interespecíficos, sin necesidad de realizar activación química luego de la inyección del espermatozoide. Con

este trabajo fue posible evaluar la capacidad de desarrollo de los espermatozoides de felinos silvestres por la técnica de ICSI interespecífica utilizando ovocitos de Gd.

En el capítulo II, se estudió la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, del inglés somatic cell nuclear transfer) en felinos. El objetivo consistió en desarrollar nuevas estrategias de SCNT para mejorar la técnica en el Gd y en felinos silvestres. En primer lugar evaluamos tres técnicas diferentes de SCNT en el Gd, dos de las cuales no habían sido previamente reportadas en esta especie. Las tres técnicas fueron: fusión de la célula donante de núcleo en ovoplastos con zona pelúcida (ZP), inyección de la célula donante de núcleo en ovoplastos con ZP, y fusión de la célula donante de núcleo en ovoplastos libres de ZP. Esta última fue la que resultó más eficiente por lo que se decidió utilizar esta técnica para determinar la capacidad del ovoplasto de Gd de reprogramar células de felinos filogenéticamente distantes por SCNT interespecífica (SCNTi). Las células donantes utilizadas fueron de gato bengal (Be, híbrido entre gato doméstico y leopardo asiático), chita y tigre (Ti, *Panthera tigris*). Asimismo, se evaluó el efecto de la agregación embrionaria cultivando los embriones reconstituidos libres de ZP en micropozos de manera individual (1X) o de a 2 clones de la misma especie juntos (2X, embriones agregados), con el objetivo de mejorar el desarrollo *in vitro* y la calidad de los embriones, tal como se había reportado para otras especies. En este experimento, se obtuvieron embriones hasta el estadio de blastocisto de todas las especies. La agregación de embriones mejoró la tasa de desarrollo en todos los grupos y la calidad de los blastocistos de Gd y de Ti. Además, se estudiaron los niveles relativos de expresión de genes asociados a pluripotencia y diferenciación temprana (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *CDX2*) en blastocistos clones de Gd, Be y Ch. Este estudio reveló que los embriones de Gd1X tenían mayor nivel relativo de

expresión de los cuatro genes comparado con embriones del grupo control de fecundación *in vitro* (FIV). Sin embargo, esta sobre-expresión se vio reducida en los blastocistos derivados del grupo Gd2X, en los que se determinó que los cuatro genes alcanzaron niveles relativos de expresión similares a los de FIV. Por otra parte, los niveles relativos de expresión de los cuatro genes en los embriones de chita fueron inferiores que los del control, observándose también este resultado para los niveles relativos de expresión del gen *OCT4* en embriones de bengal.

Como conclusión, podemos afirmar que la técnica de ICSI representa una metodología directamente aplicable a la reproducción de felinos silvestres, especialmente cuando las muestras seminales son de baja calidad. Con respecto a la SCNT y SCNTi, los ovocitos de gata doméstica fueron capaces de reprogramar células de otras especies silvestres y generar blastocistos. Además, la agregación de clones ha demostrado mejorar el desarrollo de los embriones en todos los grupos y normalizar la expresión relativa de genes en el gato doméstico, pero no en los embriones interespecíficos. La SCNT representa una alternativa para generar animales que no están en edad reproductiva o que han muerto y sus células fueron criopreservadas. La presente tesis aporta nuevas metodologías biotecnológicas y conocimiento para la reproducción en felinos.

Palabras clave: Felinos, ICSI, clonación, reprogramación nuclear

4. Abstract

The extinction of animals is one of the most alarming consequences caused by environmental degradation, and deprives us of unique genetic materials. The *Felidae* family does not escape to this problem and it is for this reason that reproductive biotechnologies become very useful tools for the conservation of these species. The hypothesis of this doctoral thesis suggests that it is possible to use domestic cat oocytes or ooplasts to develop reproductive techniques applicable to wild felids. Thus, our principal objective was to adapt the existing biotechnologies to reproduce and preserve endangered felid species. Due to the limited availability of oocytes from wild cats, domestic cat oocytes (Dc) were used as an experimental model to develop different reproductive techniques. In Chapter I, different conditions of maturation and embryo culture were studied to improve the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique in the Dc. Thus, we determined that by using the insulin-transferrin and selenium supplement (ITS) during maturation of the oocytes and low oxygen tension (5% O₂) during embryo culture, higher rates of blastocyst formation were obtained. These conditions were chosen to generate interspecific embryos by injecting cheetah (Ch, *Acinonyx jubatus*) and leopard (Leo, *Panthera pardus*) spermatozoa in Dc oocytes. In this experiment, we obtained similar blastocyst rates in both the Dc homoespecific ICSI and the interspecific ICSI, without the need of chemical activation after sperm injection. This work was useful to evaluate the developmental ability of wild cat sperm by the interspecific ICSI technique, using Dc oocytes.

In Chapter II, the somatic cell nuclear transfer (SCNT) was studied in felids. The aim was to develop new strategies to improve this technique in the Dc and wild felids. Firstly, we

evaluated three different SCNT techniques in the Dc, two of which had not been previously reported in this species. The three techniques were: fusion of the donor cell to an ooplast with zona pellucida (ZP), injection of the donor cell in an ooplast with ZP, and fusion of the donor cell to an ooplasts ZP free. The latter one was the most efficient, so we decided to use this technique to determine the ability of Dc ooplasts to reprogram phylogenetically distant feline cells by interspecific SCNT (iSCNT). The donor cells used were from bengal cat (Be, an hybrid between Dc and asian leopard), cheetah or tiger (Ti, *Panthera tigris*). The effect of embryo aggregation was also assessed by culturing ZP free reconstructed embryos in microwells, individually (1X), or 2 clones of the same species together (2X, aggregated embryos), in order to improve the *in vitro* development and the quality of the embryos, as had been previously reported for other species. In this experiment, we obtained embryos until the blastocyst stage of all the groups. Aggregation improved embryonic development in all the species and the quality of Ti2X and Gd2X blastocysts. Furthermore, the relative expression of genes related to pluripotency and early differentiation (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2* and *CDX2*) was studied in Dc, Be and Ch clone blastocysts. This analysis found that cat embryos had higher relative expression level of the four genes compared to the *in vitro* fertilized embryos (IVF, control group). However, this overexpression was reduced in Dc2X blastocysts reaching similar relative levels of gene expression as those of the IVF control. Moreover, the relative expression level of the four genes in cheetah embryos were lower than the control, obtaining the same result for the relative expression level of *OCT4* in bengal embryos.

In conclusion, the ICSI technique represents a method directly applicable to wild felids reproduction, especially when semen samples are of poor quality. With respect to SCNT

and iSCNT, cat oocytes were able to reprogram wild felid cells and to generate blastocysts. Furthermore, clone aggregation has shown to improve embryo development in all the groups and to normalize the relative gene expression only in the Dc but not in interspecific embryos. The SCNT is an alternative technique to generate animals that are not in good reproductive conditions or that have died and their cells were cryopreserved. This thesis provides new knowledge to biotechnological methodologies and reproduction in felids.

Keywords: Felids, ICSI, cloning, nuclear reprogramming

5. Introducción

5.1 Situación actual de los felinos

La familia *Felidae* está compuesta por 37 especies diferentes, y todas, excepto el gato doméstico, se encuentran actualmente amenazadas como consecuencia del deterioro ambiental, la reducción de los diferentes ecosistemas y la fragmentación del hábitat (IUCN, Durant y col. 2010, <http://www.iucnredlist.org>), lo que genera poblaciones cada vez más aisladas y con menos individuos. Como consecuencia, las poblaciones animales pierden variabilidad genética y son cada vez más endogámicas lo cual puede conducir a la acumulación de genes recesivos deletéreos, denominado “depresión endogámica”. La acumulación de estos genes genera una disminución en la fecundidad, aumento de la mortalidad, crecimiento enlentecido, defectos de desarrollo, aumento de la susceptibilidad a enfermedades, disminución de la capacidad de adaptación y de tolerancia al estrés (Lacy 1997). Las consecuencias de la endogamia sobre la fecundidad han sido reportadas en varios estudios los cuales destacan un aumento en anomalías espermáticas, disminución de los niveles hormonales normales y dificultad para reproducirse en cautividad (O’Brien y col. 1985; O’Brien y col. 1996; Wildt y col. 1987).

Una de las estrategias que ha surgido para tratar de prevenir la extinción de ciertas especies endogámicas ha sido el denominado rescate genético. Este consiste en introducir en la población problema individuos de la misma especie que no están relacionados parentalmente. La introducción de este nuevo material genético actúa aumentando la variabilidad en las poblaciones y reduciendo o eliminando la frecuencia de genes recesivos perjudiciales (Hedrick y Fredrickson, 2010). Esta estrategia fue utilizada con éxito para

prevenir la extinción de la pantera de Florida (*P. c. corryi*), una subespecie del *Puma concolor*. Esta subespecie había restringido su hábitat al 5% de su área original en Norteamérica y como consecuencia el número de individuos llegó a ser de 100 en 2010 (Johnson y col. 2010), lo que generó disminución de la variabilidad genética y endogamia, con los efectos que trae aparejados. El rescate genético consistió en introducir 8 pumas hembra de Texas para promover la reproducción con estos individuos. De esta manera el número de individuos se triplicó, la tasa de crecimiento de la población aumentó del 0 al 12% anual, se duplicó la heterocigosidad, aumentó la supervivencia, y los factores relacionados con la consanguinidad se vieron reducidos (Hedrick y Fredrickson, 2010; Johnson y col. 2010). Esta misma estrategia se utilizó para aumentar la diversidad genética de una población del gato pescador (*Prionailurus viverrinus*). Con un programa de modelado se determinó que la diversidad genética de esta especie decrecería del 90% al 73% en un periodo de 50 años si no se tomaba ninguna otra medida en este periodo y del 90% a 81% si se incorporaba otro nuevo individuo cada 5 años. Por otro lado, si se incorporaba un nuevo individuo cada año por 50 años se podría mantener una variabilidad genética del 90% (Swanson y col. 2006, Figura 1).

En la Argentina existen 10 especies diferentes de felinos silvestres, *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Leopardus guttulus*, *Leopardus colocolo*, *Leopardus jacobitus*, *Leopardus geoffroyi* y *Leopardus guigna*, cada una de ellas con algún grado de amenaza.

Por lo expuesto anteriormente, las biotecnologías reproductivas que se practican en la actualidad, como la inseminación artificial (IA), la producción *in vitro* de embriones (PIV) y la transferencia de embriones (TE) se convierten en herramientas muy poderosas para la

preservación y la redistribución de la diversidad genética. Las ventajas de las técnicas de reproducción asistida son varias, entre ellas, que se puede mantener la diversidad genética de poblaciones en cautiverio sin necesidad de transportar animales silvestres o de diferentes instituciones. Esto se logra a partir de la posibilidad de transportar gametas o embriones de estos individuos para inseminar o transferir a los animales presentes en otros establecimientos (Wildt y col. 1997; Swanson y col. 2006; Swanson y col. 2007). Además, el material biológico se puede criopreservar y la utilización de semen congelado proveniente de estos animales estaría contribuyendo así a la variabilidad genética de las poblaciones en cautiverio.

Debido a la dificultad para obtener gametas provenientes de felinos silvestres y realizar técnicas de reproducción asistida, el gato doméstico ha sido utilizado como modelo para estudiar y establecer las condiciones para desarrollar este tipo de técnicas. Los avances logrados han permitido obtener crías en especies silvestres aunque con baja eficiencia aún (Donoghue y col. 1990; Howard y col. 1996; Swanson y col. 1996; Pope, 2000; Swanson 2012) por lo que es necesario continuar investigando diferentes alternativas para mejorar los resultados.

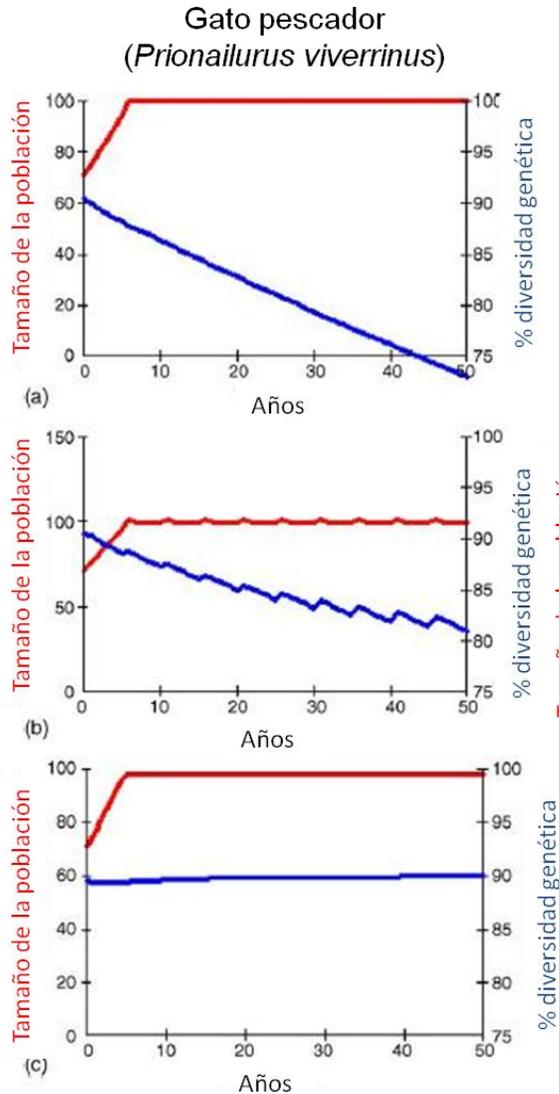


Figura 1. Modelado para una población del gato pescador que representa los cambios en el tamaño y diversidad genética de una población en un periodo de 50 años si (a) no se introducen nuevos genes de otros individuos (b) se introduce un nuevo individuo cada 5 años o (c) se introduce un nuevo individuo cada año (adaptado de Swanson y col. 2006).

5.2 Importancia de realizar técnicas de reproducción asistida en el gato doméstico

Nuestro interés en desarrollar diferentes técnicas de reproducción asistida en el gato doméstico es principalmente por su potencial aplicación en especies silvestres amenazadas. Sin embargo, la PIV de embriones de gato se ha utilizado también para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo temprano de embriones felinos, como la activación del genoma embrionario, la reprogramación nuclear y el metabolismo

embrionario (Herrick y col. 2007; Imsoonthornruksa y col. 2010; Waurich y col. 2010). Además, el gato doméstico se ha utilizado como modelo de investigación biomédica, gracias a su fisiología, tamaño, longevidad y genoma, los cuales son más similares al humano que el modelo murino (Menotti-Raymond y O'Brien, 2008; Murphy y col. 2000). Por ejemplo, el gato se ha utilizado para evaluar diferentes tratamientos para la mucopolisacaridosis y la α -manosidosis, siendo ambas enfermedades metabólicas que afectan al humano (Ellinwood y col. 2004; Vite y col. 2005). Otra aplicación de las técnicas de reproducción asistida en gatos es la generación y aislamiento de células madre embrionarias. Hasta el momento no se ha reportado la generación de líneas estables de este tipo de células en el gato, pero sí en otras especies como el ratón, rata, humanos y otros primates (Evans y Kaufman, 1981; Thomson y col. 1995; Thomson y col. 1998; Buerh y col. 2008). La producción de líneas estables permitiría que éstas sean utilizadas para la regeneración de tejidos o para la producción de embriones quiméricos (Eckardt y col. 2011).

Para comprender la evolución de las biotecnologías reproductivas y la PIV de embriones, es necesario primero describir las características de la fisiología reproductiva de la gata y los eventos ocurridos *in vivo*. En la próxima sección se desarrollarán las características del ciclo reproductivo de la gata y el desarrollo embrionario temprano.

5.3 Fisiología reproductiva de la gata

La gata doméstica alcanza la pubertad entre los 4 y 12 meses de edad, momento en el que alcanza el 75% del peso corporal (Tsutsui y Stabenfeldt, 1993). Al igual que otras especies como el equino, la oveja y la cabra, la gata es poliéstrica estacional, con intervalos de 21

días. La hembra cicla sólo durante una estación reproductiva, en este caso primavera y verano cuando los días son más largos. Sin embargo, si están expuestas a 14 horas de luz artificial diarias, las hembras ciclan todo el año (Robledo y col. 2003).

Otra particularidad de la gata es que posee ovulación inducida por coito (Shille y col. 1995). La ovulación de la gata ocurre por un reflejo neuroendocrino iniciado por una estimulación mecánica de los receptores sensoriales de la piel en la región perianal, en la vulva y el cérvix durante el coito. Se sabe también que la ovulación puede ser inducida por una estimulación similar al coito (Cueva-Rolón y col. 1994), como la utilización de un hisopo para la estimulación de vagina. Lo que genera esta estimulación es la secreción de GnRH, la cual determina liberación pulsátil de LH y desencadena así la ovulación (Robinson y Sawyer, 1987). La duración y magnitud de la liberación de LH están relacionadas con la cantidad de estimulación recibida, y es necesario que la gata sea servida o estimulada mecánicamente varias veces durante el día para alcanzar la ovulación. Además, la liberación de LH presenta una amplia variación individual (Glover y col. 1985), y se produce, en general, unos 15 minutos después de la cópula, alcanzando un máximo en dos horas (Johnson y Gay, 1981). La ovulación se produce 24 a 64 h después de la estimulación al romperse los folículos pre-ovulatorios (2,5 a 3,5 mm) presentes en los ovarios (Wildt y col. 1980, 1981; Swanson y col. 1994). En algunos casos, sin embargo, puede suceder también que algunos individuos ovulen de manera espontánea.

Los ovocitos de gata crecen de 20-30 μm en los folículos primordiales a 85-100 μm al momento de la ovulación, siendo los folículo ovulatorios de 2-3 mm de diámetro (Bristol-Gould y Woodruff, 2006). Una vez que la gata ha ovulado, ocurre la fecundación, y la primera división embrionaria sucede a las 30 h. Como ocurre también en otras especies, las

primeras divisiones embrionarias suceden bajo el control del ovocito ya que no hay transcripción genómica. Hasta el momento de la activación del genoma embrionario (cuando el embrión de gato tiene entre 5 y 8 blastómeras), el embrión se desarrolla utilizando los transcritos y proteínas provenientes del ovocito y que han sido adquiridos durante la maduración del mismo (Hoffert y col. 1997). Luego de la activación del genoma embrionario, el embrión continúa dividiéndose hasta la formación de la mórula a día 4 y la de blastocisto a día 5-6 (Figura 2). La transición oviducto-útero ocurre en la etapa de mórula compacta o blastocisto temprano (Swanson y col. 1994). Una vez en el útero, el blastocisto se expande hasta liberarse de la zona pelúcida por un proceso denominado eclosión.

Para realizar las diferentes técnicas de reproducción asistida es necesario tratar de emular los acontecimientos ocurridos *in vivo*. A pesar de haberse mejorado mucho las condiciones *in vitro*, la PIV de embriones es aún más ineficiente que los embriones *in vivo* en cuanto a la capacidad de desarrollo (Roth y col. 1994). Por ende, todavía se debe continuar mejorando las condiciones *in vitro* para obtener mejores resultados.

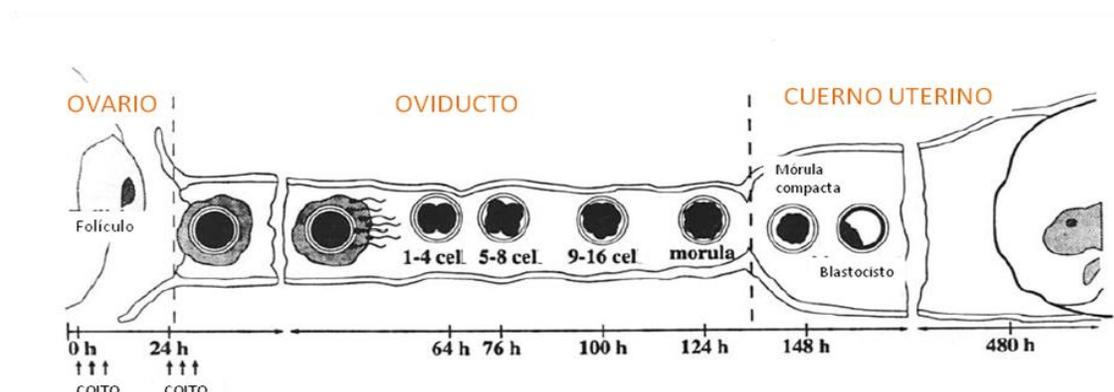


Figura 2. Diagrama del desarrollo embrionario *in vivo* del gato doméstico (Adaptado de Swanson y col. 1994)

5.4 Biotecnologías reproductivas en el gato doméstico y especies silvestres

Las biotecnologías reproductivas que se describirán a continuación, han contribuido a la propagación de diferentes individuos de la familia *Felidae*, ya sea del gato doméstico como algunas especies silvestres (Farstad, 2000; Luvoni y col. 2000; Pope y col. 2006 a,b). Las primeras biotecnologías desarrolladas fueron la sincronización del celo de las hembras, IA y TE. Sin embargo, actualmente diferentes grupos de investigación han desarrollado la FIV, ICSI, SCNT, sexado de espermatozoides, generación de células madre y producción de gatos transgénicos (Gómez y col. 2000; Shin y col. 2002; Spinaci y col. 2007; Ciani y col. 2008; Yu y col. 2008; Gómez y col. 2009; Pope y col. 2009).

5.4.1 Sincronización de celo

Para aumentar la capacidad reproductiva de las hembras, ya sea de gata doméstica o de especies silvestres, se han evaluado diferentes protocolos con estimulación hormonal. Al igual que lo que sucede en otras especies, las respuestas ováricas ante el mismo protocolo varían entre individuos y entre especies de felinos (Kutzler 2007). Es por eso que a pesar de que existen varios protocolos para estimular el crecimiento folicular y la ovulación, no se ha establecido un régimen ideal de administración de gonadotrofinas.

Para lograr la ovulación en las hembras sin utilizar un macho se han utilizado diferentes protocolos, tales como una o varias inyecciones de FSH, una inyección de hCG o de su análogo leuprolide (Chakraborty y col. 1979; Pelican y col. 2006), y en cada caso diferentes concentraciones de hormona. La hCG por ejemplo se ha administrado desde 25 a 500 UI, y se ha reportado que si se aplica durante el periodo de anestro tiene efecto foliculogénico (Swanson y col. 1996).

Margarey y col. (2005) han reportado mejoras en lograr la ovulación utilizando 100 UI de eCG seguido de 1000 UI de LH comparado con el régimen de sincronización utilizando eCG/hCG.

Hasta la fecha se ha logrado estimular la foliculogénesis y ovulación para IA y FIV en un tercio de las especies felinas, sin embargo se han obtenido diferentes resultados en cuanto a porcentaje de preñez, siendo este menor al 20%. El principal problema son las respuestas variables y sensibilidad a los tratamientos con gonadotrofinas, especialmente en especies que poseen ovulación inducida (Brown, 2011).

El manejo de la sincronización del celo de la gata y de otros felinos silvestres es muy importante para el desarrollo de todas técnicas de reproducción asistida ya que es necesario simular el ambiente oviductal y uterino para mantener el desarrollo embrionario. Se han logrado algunas mejoras en los protocolos utilizados, sin embargo es necesario continuar estudiando alternativas para controlar de manera más eficiente el celo de las hembras.

Una de las técnicas de reproducción asistida que se aplican en felinos y que dependen del control exacto del momento de la ovulación es la IA, la cual se describe a continuación.

5.4.2 Inseminación artificial

La IA utilizando semen congelado-descongelado proporciona ventajas significativas para la reproducción de felinos. La aplicación de esta técnica en el gato doméstico ha sido de utilidad como modelo de estudio para otras especies silvestres. En general la IA se realiza mediante laparoscopia y se deposita el semen en el extremo del útero, cerca del oviducto. Sin embargo, una de las limitantes de la IA intrauterina por laparoscopia es el requerimiento de un gran número de espermatozoides móviles (>10 millones /IA) para asegurar la llegada de los espermatozoides al oviducto y permitir la fecundación. Es por

este motivo que recientemente se ha desarrollado la técnica de IA por laparoscopia oviductal, en la cual se utilizan un número menor de espermatozoides móviles y de esta manera se puede inseminar con una muestra de menor calidad y un único eyaculado puede fraccionarse para realizar varias IA (Conforti y col. 2011).

Una vez que la IA fue realizada con éxito en el gato doméstico, ésta fue aplicada para la reproducción de felinos silvestres tales como tigre, chita, leopardo de las nieves, puma, ocelote, tigrina y gato leopardo (Wildt y Roth 1997).

Un ejemplo sobre la utilidad de esta técnica en felinos silvestres fue la obtención de preñeces de chitas en EEUU, logradas tras realizar IA con semen de machos en cautividad en Namibia que fue criopreservado y transportado (Howard y col. 1997).

5.4.3. Fecundación in vitro

La FIV y la transferencia de embriones ofrecen otra herramienta con gran potencial para la conservación de felinos silvestres cuando la muestra seminal es de buena calidad.

La utilización de aspiración folicular por laparoscopia y luego FIV, han permitido la producción de embriones en especies como el tigre, chita, puma, ocelote, tigrina, gato montés y gato pallas (Swanson y Brown 2002; Swanson y col. 2002; Wildt y Roth 1997) y el nacimiento de tigres, gatos silvestres africanos, caracal, gato pescador y serval (Donoghue y col. 1990; Pope 2000; Pope y col. 2006 a; Pope y col. 2006 b; Figura 2).

En el gato doméstico, el primer nacimiento a partir de embriones de FIV fue logrado en 1988 tras realizar transferencia de embriones tempranos clivados en el oviducto de una gata (Goodrowe y col. 1988). Se ha reportado también que entre el 40% y el 70% de los embriones clivados luego de la FIV alcanzan el estadio de blastocisto, dependiendo de las

condiciones de cultivo (Karja y col. 2002; Pope y col. 2006; Herrick y col. 2007). A pesar de los logros alcanzados, los embriones producidos *in vitro* poseen menor capacidad de desarrollo que aquellos obtenidos *in vivo* (Roth y col. 1994; Pope y col. 2006), pudiendo ser esto atribuido principalmente a condiciones de cultivo deficientes. A diferencia de otras especies en las que se han realizado muchos estudios de FIV como la murina o en humanos, la producción de embriones de gato doméstico ha sido mucho menor (Pope, 2014) y esto hace que el avance en el tema más lento.

5.4.4. Inyección intracitoplasmática del espermatozoide

La ICSI es una técnica de reproducción asistida que consiste en la introducción de un único espermatozoide en el citoplasma de un ovocito maduro con la ayuda de un micromanipulador. Los primeros experimentos en mamíferos se realizaron con modelos animales, principalmente hámster y ratón (Uehara y Yanahimachi 1976; Kimura y Yanahimachi 1995). Hasta la fecha se ha obtenido descendencia viva de las especies humana (Palermo y col. 1992), murina (Kimura y Yanahimachi 1995), bovina (Goto y col. 1990), equina (Grondahl y col. 1997), felina (Pope y col. 1998) y ovina (Catt 1996). El primer gato nacido por ICSI fue producido mediante la utilización de semen eyaculado y ovocitos madurados *in vivo* (Pope y col. 1998, Figura 2). Pope y col. también obtuvieron resultados preliminares en los cuales se logró fecundar, por ICSI, ovocitos de *Puma yagouaroundi* utilizando semen de gato doméstico (Pope y col. 1998).

En felinos silvestres la baja calidad espermática es una característica común (Wildt y col. 1988) y cuando esto ocurre, es un factor limitante para la aplicación de prácticas de IA o FIV. Por este motivo la ICSI se proyecta como una alternativa para la generación de nuevos individuos a partir de muestras seminales problemáticas. Sin embargo, todavía no se han

logrado nacimientos de felinos silvestres generados por esta técnica (Figura 3). Esto puede deberse a que requiere de un laboratorio con más equipamiento y personal calificado, a diferencia de las biotecnologías descritas anteriormente.

En nuestro laboratorio la ICSI se ha desarrollado en diferentes especies (Pereyra Bonnet y col. 2008), y en el marco de la presente tesis doctoral se ha optimizado esta técnica para el gato doméstico, con la producción de embriones hasta el estadio de blastocisto y consiguiendo una preñez temprana.

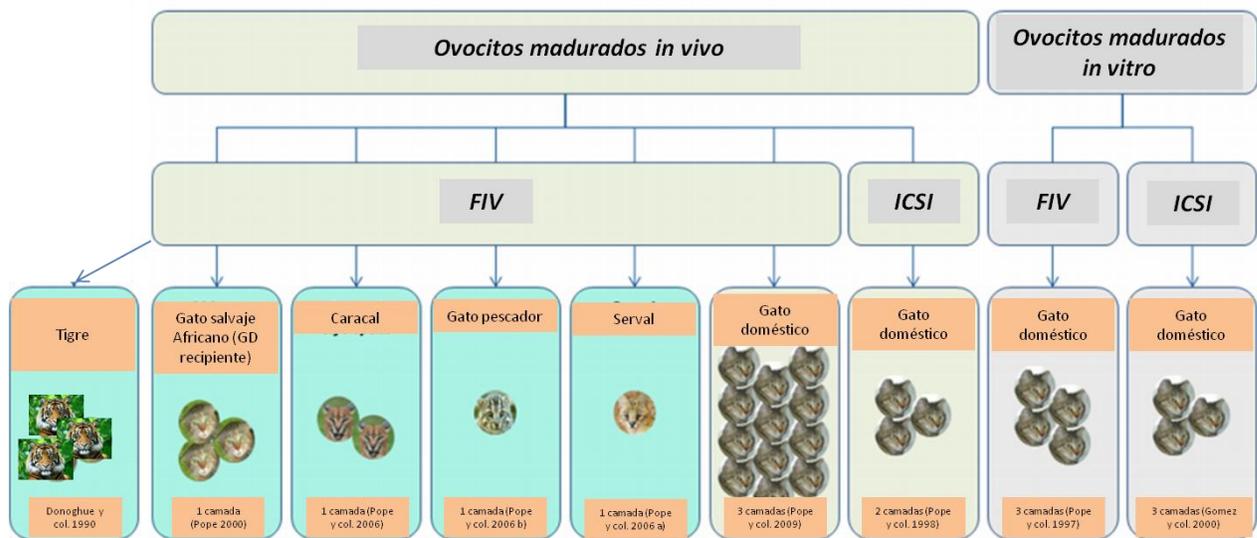


Figura 3. Felinos domésticos y silvestres nacidos por la transferencia de embriones generados por FIV e ICSI utilizando ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. El número de fotografías en cada recuadro representa el total de animales nacidos. (Modificado de Pope 2014).

5.4.5. Transferencia nuclear de células somáticas

Desde la generación del primer animal clonado a partir de células somáticas (Wilmut y col. 1997), la SCNT ha sido utilizada para la generación de individuos idénticos (Shin y col. 2002), también ha servido como modelo para el estudio de la reprogramación nuclear a nivel molecular y celular (Imsoonthornruksa y col. 2010), y actualmente la clonación está

siendo utilizada para la producción de células madre (Beyhan y col. 2007). Además, esta técnica tiene gran potencial para ser utilizada con el objetivo de conservación de ciertos animales para que no se pierda su genética, ya sea porque no está en edad reproductiva o incluso porque han fallecido.

Podemos afirmar que la clonación es una de las varias formas de aumentar el número de individuos dentro de una población. Claramente, la reproducción natural es el método ideal para el mantenimiento de las poblaciones, pero, por los diferentes motivos expuestos anteriormente algunas especies no tienen la posibilidad de reproducirse naturalmente de manera eficiente.

La efectividad de la transferencia nuclear en felinos fue confirmada luego del nacimiento de un gato doméstico clonado, tras la fusión de células del cúmulus en ovocitos enucleados (Shin y col. 2002). La viabilidad de esta técnica se demostró también, tras el nacimiento de gatos silvestres africanos (*GSA, Felis silvestris lybica*) clonados (Gómez y col. 2004), gatos del desierto (*Felis Margarita*; Gómez y col. 2008) y un caracal (*Caracal caracal*; Pope 2014). Para la obtención de estos felinos se realizó transferencia nuclear interespecífica (SCNTi). Para esta técnica el citoplasma del ovocito utilizado para crear al embrión es provisto por una especie diferente a la célula dadora de núcleo.

Aparte de las investigaciones de SCNTi realizadas en felinos, numerosos estudios han confirmado la capacidad del ovocito de mantener los ciclos celulares bajo la dirección de una célula somática adulta de una especie diferente (Tanja y col. 1999; Lanza y col. 2000).

Esta práctica posee un gran potencial para el estudio del desarrollo embrionario en aquellas especies cuya disponibilidad de ovocitos se ve limitada. Los individuos generados tendrán las mitocondrias correspondientes a la especie dadora de ovoplastos. Sin embargo, es

importante destacar que los clones machos en edad reproductiva no transferirán sus mitocondrias a las próximas generaciones (Sutovsky y col. 2000).

En el caso de especies felinas silvestres de pequeño tamaño, es posible también el trasplante heterólogo, es decir transferir embriones de felinos silvestres a vientres de gatas domésticas. Esto ha sido demostrado tras el nacimiento de crías de gato del desierto indio (*Felis Sylvestris Ornata*) en hembras de gato doméstico (Pope 2000). Por lo tanto, el gato doméstico no sólo es un buen modelo para las técnicas de desarrollo *in vitro* sino que también sirve como recipiente para embriones de diferentes especies de felinos pequeños.

En el marco de esta tesis doctoral se ha realizado SCNT utilizando ovoplastos de gata doméstica y células de la misma especie, además de SCNTi con ovoplastos de gata doméstica y células de gato bengal (híbrido entre gato doméstico y gato leopardo asiático), tigre y chita.

5.5. Agregación embrionaria

Como se mencionó anteriormente, las fallas en la producción de embriones por SCNT y por SCNTi están asociadas en general a problemas epigenéticos lo que conlleva a una reprogramación celular inadecuada.

Se ha reportado que cada embrión reconstituido por clonación es único en términos de marcas epigenéticas y expresión génica (Park y col. 2002), como consecuencia del estado epigenético del núcleo utilizado y de la calidad del ovoplasto recipiente. Esta característica afecta la calidad embrionaria y como consecuencia el éxito de la clonación. Además, el desarrollo pre-implantatorio está también regulado por la interacción entre las células de un mismo embrión y este proceso se ve alterado en las especies en que los embriones clonados

poseen menos cantidad de células que los embriones normales. Tal es el caso de los ratones (Chung y col. 2002), conejos (Chesne y col. 2002), bovinos (Koo y col. 2002) y porcinos (Koo y col. 2000)

Teniendo en cuenta estos conceptos, se pensó que clones genéticamente iguales pero epigenéticamente diferentes podrían ser cultivados juntos (lo que se denomina agregación embrionaria) para formar un solo embrión que sea epigenéticamente quimérico. La ventaja sería que el quimerismo compensaría los problemas epigenéticos de un embrión individual y la agregación además compensaría la cantidad de células de los embriones. Esta estrategia fue evaluada en las especies murina, bovina y equina. En el ratón se obtuvieron blastocistos con mayor cantidad de células y mejores tasas de desarrollo *in vivo* (Boiani y col. 2003). Los embriones bovinos generados por agregación embrionaria alcanzaron mayores tasas de formación de blastocistos, mayor cantidad de células y mayores tasas de preñez (Pedersen y col. 2005, Zhou y col. 2008, Ribeiro y col. 2009). Con estos antecedentes, en nuestro laboratorio se utilizó la agregación embrionaria en el equino, y al igual que en ratones y en bovinos, se aumentó la eficiencia de la técnica obteniéndose crías a partir de embriones generados por agregación de 2, 3 y 4 estructuras, y no se obtuvieron crías a partir de embriones no agregados (Gambini y col. 2012).

En la presente tesis doctoral se utilizará la agregación embrionaria como estrategia para mejorar la clonación en felinos y especialmente la clonación interespecífica.

5.6 Reprogramación nuclear

La reprogramación nuclear se define, en el contexto de la transferencia nuclear de una célula diferenciada a un ovoplasto, como la transformación del núcleo de una célula somática en un núcleo embrionario funcional capaz de formar un organismo viable (Boiani y col. 2003).

Para realizar la clonación de manera eficiente, es importante una correcta reprogramación nuclear, o sea, convertir una célula diferenciada en totipotencial, y el ovocito es la única célula en el adulto con esta capacidad (Cibelli y col. 2002). Durante la reprogramación, genes que se encontraban silenciados en el estado diferenciado se activan, mientras que genes activos específicos de la célula somática se silencian.

En una fecundación natural el material genético paterno se desmetila rápidamente, activándose transcripcionalmente, en cambio el núcleo femenino sufre una serie de metilaciones que durante el desarrollo embrionario se van perdiendo (Mayer y col. 2000). Esta reprogramación asimétrica ha sido considerada esencial para establecer la totipotencialidad del cigoto. Las modificaciones (acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones y ubiquitinización) que ocurren en el ADN y en las histonas se denominan modificaciones epigenéticas y son importantes para regular la transcripción y el silenciamiento génico (Santos-Rosa y col. 2002).

Los cambios epigenéticos pueden ser sondeados a partir de la expresión de genes específicos de células indiferenciadas, evaluando la presencia de sus ARNm o de las proteínas. Una opción consiste en su determinación por RT-PCR para transcritos de factores como *Oct4*, *Oct6*, *Sox2*, *Hes1*, *Cdx2* y *Nanog*, entre otros; correspondientes

marcadores genéticos asociados a pluripotencialidad y diferenciación temprana (Cherny y Merei 1994; Hatano y col. 2005). También se ha utilizado la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa para la evaluación de la dinámica de reprogramación en la expresión de diferentes ARNm (Gómez y col. 2011).

Lograr una correcta reprogramación epigenética es fundamental en la clonación animal. Sin embargo, la SCNT ha demostrado ser una técnica ineficiente para alcanzar este objetivo (Gao y col. 2004). Se ha reportado que sólo un tercio de los blastocistos de ratón producidos por clonación muestran un patrón normal de expresión de *Oct4*, un gen esencial para la pluripotencialidad celular embrionaria y el correcto desarrollo (Boiani y col. 2002). En esta tesis doctoral estudiaremos cómo se ve afectada la expresión de genes esenciales para un correcto desarrollo embrionario, tanto en clonación homoespecífica como interespecífica, evaluando también la posibilidad de realizar agregación embrionaria para mejorar la reprogramación nuclear.

5.7 Justificación del trabajo propuesto

Debido a la limitada disponibilidad de ovocitos de felinos silvestres, en la presente tesis doctoral planteamos la utilización de ovocitos de Gd como modelo experimental para desarrollar diferentes técnicas de reproducción asistida, entre ellas la ICSI y la SCNT. La posibilidad de acceder a ovocitos de Gd nos permitió poder realizar estos dos procesos de manera interespecífica utilizando espermatozoides y células de felinos silvestres. De esta manera, fue posible estudiar la capacidad fecundante de estos espermatozoides y la reprogramación nuclear de los clones interespecíficos, aumentando así el conocimiento en estas áreas y determinando la potencialidad de utilizar ambas técnicas en la conservación de

felinos silvestres. En base a todo el conocimiento teórico descripto y teniendo en cuenta la justificación de este trabajo, se plantearon la hipótesis y los objetivos que se detallan a continuación.

6. HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo radica en que es posible utilizar ovocitos u ovoplastos de gata doméstica para evaluar respectivamente: la capacidad fecundante de espermatozoides por ICSI y generar embriones por transferencia nuclear de células somáticas, en ambos casos utilizando material genético de otros felinos silvestres.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivos Generales

El objetivo de este proyecto consiste en la adaptación de las biotecnologías existentes, para reproducir y conservar felinos en peligro de extinción. Se realizará ICSI y SCNT, ambas de manera homoespecífica e interespecífica para la generación de embriones de felinos y el estudio de la reprogramación nuclear. Como modelo experimental se usarán ovocitos de gata doméstica y espermatozoides o células somáticas de igual especie o de felinos silvestres.

7.2. Objetivos Específicos

- Producir embriones de gato doméstico hasta estadíos pre-implantatorios utilizando las técnicas de ICSI y clonación por SCNT.
- Establecer un sistema eficiente para la producción *in vitro* de embriones interespecíficos por ICSI y por clonación utilizando ovocitos de gata doméstica y espermatozoides/células de felinos silvestres.
- Estudiar la reprogramación nuclear de embriones generados por clonación mediante ensayos de inmunofluorescencia y de expresión génica de marcadores asociados a pluripotencia y diferenciación temprana.

8. Capítulo I

ICSI en el gato doméstico y en felinos silvestres

- Los resultados de este capítulo forman parte de un trabajo titulado “*Evaluation of cheetah and leopard spermatozoa developmental capability after interspecific ICSI with domestic cat oocytes*”, publicado en *Reproduction of Domestic Animals* (Moro y col. 2014).

8.1 Resumen

La ICSI es una técnica con gran potencial para ser utilizada en la reproducción de felinos, pero no ha sido aplicada ampliamente en estas especies. El objetivo de este capítulo fue determinar las mejores condiciones para realizar ICSI en el gato doméstico (Gd), para luego generar embriones interespecíficos inyectando espermatozoides de chita (Ch) y de leopardo (Leo) en ovocitos de Gd. En un primer experimento, los ovocitos de Gd fueron madurados en medio TCM suplementado con insulina-transferrina-selenio (ITS) o sin suplementar (MM), y luego de la ICSI los embriones fueron cultivados utilizando tensión de oxígeno atmosférica (21%) o baja tensión de oxígeno (5%). Los grupos experimentales fueron: MM-21%O₂, MM-5%O₂, ITS-21%O₂ e ITS-5%O₂. El grupo ITS-5%O₂ mostró las mayores tasas de blastocisto ($p < 0.05$) y es por este motivo que se eligieron estas condiciones para generar embriones interespecíficos. En un segundo experimento, se realizó ICSI interespecífica con espermatozoides de Ch y Leo, y se evaluó la activación con ionomicina (Io) luego de la ICSI. Los embriones interespecíficos alcanzaron altas tasas de blastocisto, las cuales no mejoraron al utilizar ionomicina: 32.6% vs. 21% para Ch y Ch-Io, 9.8% vs. 21% para Leo y Leo-Io, y 20% vs. 17.4% para Gd y Gd-Io. Con el objetivo de determinar la calidad de los embriones generados, evaluamos la fragmentación nuclear del ADN de los blastocistos obtenidos en el experimento 1 y 2, utilizando el ensayo de TUNEL. La proporción de núcleos fragmentados fue mayor en el grupo ITS-5%O₂ (67.6%). Sorprendentemente, los blastocistos interespecíficos mostraron la menor proporción de núcleos fragmentados: 27% y 29.9% para Ch y Leo, respectivamente. Con estos resultados, concluimos que la suplementación con ITS y el cultivo con 5%O₂ mejoró

la formación de blastocistos en el Gd, aunque generó un aumento en la fragmentación de ADN. Aún más importante, los espermatozoides de chita y de leopardo fueron capaces de generar blastocistos sin activación artificial, lo cual sugiere que la capacidad de desarrollo de los espermatozoides de felinos silvestres puede ser evaluada por la técnica de ICSI interespecífica. Finalmente, consideramos que esta técnica debería ser utilizada para asistir la reproducción de felinos silvestres.

8.2 Introducción

Las técnicas de reproducción asistida han sido ampliamente utilizadas en muchas especies de mamíferos con diferentes objetivos. Una ellas es la ICSI (Palermo y col. 1992), la cual ha mejorado las tasas de fecundación especialmente cuando el semen utilizado es de mala calidad (Donoghue y col. 1992; Penfold y col. 2003). Este tipo de muestras seminales se observan en varias especies de felinos silvestres (Wildt y col. 1988), y limita la aplicación de otras técnicas de reproducción asistida como la IA o la FIV (Wildt y col. 1992). Dos de las especies con este problema son el chita (*Acinonyx jubatus*) y el leopardo (*Panthera pardus*). En ambas especies se observó gran incidencia de espermatozoides anormales con pleiomorfismo estructural causada por la homocigosis genómica existente entre individuos. Se demostró que los eyaculados de chita y de leopardo contienen el 71% y el 80% de espermatozoides morfológicamente anormales, respectivamente, en comparación con el 29.1% en el gato doméstico (Wildt y col. 1983, 1988).

Dado que la ICSI permite la selección del espermatozoide que será inyectado en el ovocito, es posible seleccionar aquellos espermatozoides morfológicamente normales, incluso a partir de muestras teratospérmicas (Penfold y col. 2003). Por esta razón, la ICSI sería relevante para ayudar a la reproducción y preservar la biodiversidad genética existente en estas especies y en otros felinos silvestres. Debido a las similitudes entre los felinos silvestres y el Gd, las mejoras en la producción de embriones de esta especie y embriones interespecíficos por ICSI pueden contribuir a la conservación de especies de felinos silvestres amenazados (Nowell y Jackson 1996).

Hasta la fecha se ha reportado que los ovocitos de Gd pueden ser fecundados por ICSI con espermatozoides testiculares o provenientes de eyaculado (Comizzoli y col. 2006). Los

primeros trabajos publicados de ICSI en el Gd demostraron que los cigotos generados pueden desarrollarse hasta el estadio de blastocisto *in vitro*, y puede resultar en el nacimiento de crías normales (Pope y col. 1998; Gómez y col. 2000). Sin embargo, todavía existen controversias acerca de la necesidad de inducir la activación artificial de los ovocitos después de la ICSI en el Gd. Algunos autores han informado que la activación artificial es necesaria para reiniciar el ciclo celular de los ovocitos (Bogliolo y col. 2001; Commizoli y col. 2006), mientras que otros han observado desarrollo del embrión sin ningún tipo de tratamiento de activación (Penfold y col. 2003, Pope y col. 1998).

Además de dilucidar la necesidad de asistir la ICSI con activación química, es necesario mejorar la maduración de los ovocitos y el cultivo de los embriones. Se ha reportado que para optimizar la producción de embriones *in vitro*, los ovocitos y embriones necesitan estar protegidos contra el estrés oxidativo (Johnson y Nars-Esfahani 1994; Thompson y col. 1990). Estudios previos en porcinos han indicado que la reducción de la tensión de oxígeno del 20% al 10% o 5% durante el cultivo *in vitro* disminuye la formación de especies reactivas de oxígeno y la fragmentación del ADN, mejorando de esta manera el desarrollo *in vitro* de embriones hasta el estadio de blastocisto (Karja y col. 2004; Kitagawa y col. 2004).

Además de reducir la tensión de oxígeno, otra estrategia es la suplementación del medio de maduración con antioxidantes, como el compuesto ITS. La insulina es una hormona que estimula la captación de glucosa y aminoácidos. La transferrina sirve como un portador para el hierro y ayuda a reducir los niveles tóxicos de los radicales de oxígeno y peróxido. El selenio es un co-factor para la peroxidasa del glutatión que se utiliza como un anti-oxidante en los medios (Ebert y col. 2006). La suplementación con ITS ha sido

ampliamente utilizada en cerdos (Lee y col. 2005; Jeong y col. 2008) y bovinos (Cordova y col. 2010), pero todavía no se ha estudiado en el Gd.

El objetivo de este trabajo fue, en primer lugar, determinar las condiciones óptimas para la generación de embriones por ICSI en el Gd, con el fin de utilizar esta técnica y evaluar la capacidad de desarrollo de embriones de ICSI interespecíficos producidos por la inyección de espermatozoides de chita y leopardo en los ovocitos de Gd. Además, ovocitos de leopardo fueron fecundados por ICSI para generar embriones de leopardo homoespecíficos. De esta manera, estaríamos demostrando la aplicación de la técnica de ICSI en felinos silvestres.

8.3 Materiales y métodos

8.3.1 Reactivos

Excepto cuando se especifique lo contrario, todos los productos químicos se obtuvieron de la compañía Sigma Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EE.UU.). Los medios se prepararon semanalmente y fueron filtrados con filtros de 0,22 μm .

8.3.2 Utilización de animales para investigación

El diseño de estos estudios fue aprobado por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. La manipulación de los animales fue realizada de acuerdo a la reglamentación de la Dirección Nacional de Fauna. Además se siguieron los estándares establecidos por el código de ética de la Asociación Latinoamericana de Parques Zoológicos y Acuarios. Las castraciones para la obtención de los ovarios fueron realizadas por profesionales veterinarios en centros de zoonosis habilitados para tal fin.

8.3.3 Diseño experimental

En el primer experimento se evaluó el desarrollo de los embriones de Gd luego de la ICSI homoespecífica utilizando cuatro condiciones diferentes: 1) Medio de maduración sin ITS (MM) y tensión de oxígeno del 21% durante el cultivo de embriones (21%O₂), 2) MM y 5% de oxígeno tensión durante el cultivo de embriones (5%O₂), 3) MM suplementado con ITS y 21%O₂ y 4) MM suplementado con ITS y 5%O₂. Los grupos de ICSI fueron: MM-21%O₂, MM-5%O₂, ITS-21%O₂ y ITS-5%O₂. A su vez, se realizaron controles que consistieron en realizar la inyección en ausencia del espermatozoide (SHAM), los grupos fueron: MM-21%O₂^{CT}, MM-5%O₂^{CT}, ITS-21%O₂^{CT} y ITS-5%O₂^{CT}. En el segundo experimento, se evaluó el desarrollo *in vitro* de embriones de ICSI interespecíficos generados por la inyección de espermatozoides de chita o leopardo en ovocitos de Gd, utilizando las mejores condiciones de acuerdo con los resultados del experimento 1. Además se evaluó la asistencia con ionomicina (Io) de los ovocitos inyectados. Los grupos experimentales fueron Ch y Ch-Io (cuando se utilizaron espermatozoides de chita), Leo y Leo-Io (cuando se utilizaron espermatozoides de leopardo), Gd y Gd-Io (cuando se utilizaron espermatozoides de Gd), Gd^{CT} y Gd-Io^{CT} (grupos SHAM control). Por último, se determinó el número de células totales y la fragmentación del ADN de blastocistos de todos los tratamientos evaluados en el experimento 1, y de blastocistos de ICSI generados con los espermatozoides de chita y leopardo. A partir de un caso clínico de una hembra leopardo del Zoológico de Buenos Aires que tuvo que ser sometida a ovariectomía, realizamos ICSI homoespecífica en esta especie utilizando la misma pajuela de semen que en el experimento 2.

8.3.4 Colecta de ovocitos y maduración *in vitro*

Los ovarios de Gd se recuperaron de gatas sometidas a ovariectomía y se transportaron al laboratorio dentro de las 2 h. Allí se lavaron en tiroides albumina lactato piruvato con hepes (TALP-H, Bavister y Yanagimachi 1977). Los complejos cumulus-ovocito (COCs) fueron liberados de los folículos por punción y raspado de los ovarios. Los ovarios de leopardo se obtuvieron de una hembra con hiperplasia endometrial que se sometió a ovariectomía después de tratamientos con antibióticos sin éxito. Los COCs de leopardo se obtuvieron por aspiración de folículos antrales visibles y luego de la aspiración se continuó con el raspado de los ovarios para obtener COCs de los folículos no visibles. El medio de maduración fue TCM 199 (31100-035; Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.), suplementado con 1 UI/mL de hCG (Ovusun, Syntex, Bs As, Argentina), 10 ng/mL eCG (Novormon, Syntex), lactato de calcio 2,2 mM, piruvato 0,3 mM (p2256), BSA 0,3% p/v y 3% v/v antibiótico-antimicótico (ATB; penicilina, estreptomina y anfotericina B; 15240-096; Gibco). Dependiendo del grupo experimental, se suplementó al medio de maduración con 1 µL/mL de ITS (selenio 0,00067 g/L, 1 g/L de insulina y 0,55 g/L de transferrina; 51300-044 Gibco). Las condiciones de maduración *in vitro* fueron 6.5% de CO₂ en aire humidificado a 39°C. Los ovocitos se incubaron en microgotas de 100 µl de medio de maduración cubiertas con aceite mineral (M8410). Después de 22-24 h de maduración *in vitro* (MIV) se removió las células del cúmulus por pipeteo durante 1 min en solución con 1 mg/ml hialuronidasa (H4272) en TALP-H. La maduración nuclear se evaluó mediante la observación del primer corpúsculo polar (1°CP). Sólo los ovocitos con el 1°CP se utilizaron para todos los experimentos.

8.3.5 *Colecta y congelación de espermatozoides*

Los espermatozoides de Gd se obtuvieron a partir de epidídimos de gatos adultos sometidos a castración. Brevemente, los epidídimos fueron retirados de los testículos, se cortaron en pequeñas partes y se sumergieron en el medio de criopreservación (AndroMed; 13503 hasta 0.200; Minitube, Tiefenbach, Alemania) durante 30 min para permitir que los espermatozoides naden hacia el medio. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 490 g durante 5 min. El pellet obtenido se diluyó con medio de criopreservación y se almacenó en pajuelas de 0.25 ml. Para la criopreservación, se siguieron las instrucciones del medio de criopreservación y se congelaron las pajuelas en vapor de N₂ durante 7 minutos y luego en N₂ líquido. La motilidad espermática fue evaluada antes y después del congelamiento de las muestras, y sólo se usaron las muestras con más del 60% de espermatozoides con motilidad progresiva. Las muestras de chita y de leopardo fueron obtenidas del banco genético del Zoológico de Buenos Aires que habían sido almacenadas en N₂ líquido durante varios años hasta ser utilizadas en este trabajo. Los espermatozoides de chita y leopardo fueron obtenidos por electroeyaculación. La colecta de semen se realizó bajo anestesia quirúrgica utilizando xilacina (Xilacina 100, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina), además de clorhidrato de ketamina (Ketonal 100, Richmond Vet Pharma, Buenos Aires, Argentina). Los efectos de la xilacina fueron contrarrestados por la inyección de clorhidrato de yohimbina 1% (Reverze, Vetcross, Portinco SA, Montevideo, Uruguay). La electroestimulación se llevó a cabo como se describió previamente por Howard (1993) con algunas modificaciones. Se utilizaron dos sondas rectales diferentes, una de 17,5 cm de longitud y 13,25 mm de diámetro (PT Electrónica, Boring, OR, EE.UU.), con tres electrodos longitudinales (36,4 mm) para estimular al chita y otra de 23 cm de longitud y

15 mm de diámetro con dos electrodos circulares (15,0 mm cada una, 20,0 mm de la punta y se separó 18,0 mm entre sí) para estimular al leopardo. Las sondas se colocaron en el recto por encima de la próstata y las glándulas bulbouretrales y se aplicó el voltaje. Un total de 80 estímulos eléctricos fueron entregados utilizando un estimulador de 50/60Hz, 220V (PT Electronics). Se dieron estímulos de 2V a 5V de a 10 estímulos por vez. El semen fue colectado en tubos estériles pre-calentados. Para la criopreservación de espermatozoides se utilizaron dos diluyentes diferentes: (a) TEST, el cual contiene en 4,83% Tes (T-1375), 1,15% Tris (Gibco, 15504-0125), 0,4 % de glucosa (Mallinckrodt, 4912), 200 UI penicilina/ml, estreptomina 200 mg/ml, 20% de yema de huevo y 4% de glicerol. (b) PDV- 62, el cual contiene 11% de lactosa (Mallinckrodt, 5652), 200 UI de penicilina/ml, 200 mg de estreptomina/ml, 20% de yema de huevo y glicerol al 4%. El diluyente “a” se utilizó para congelar los espermatozoides de chita y el diluyente “b” para congelar los espermatozoides de leopardo. Para la refrigeración, la temperatura se redujo de 20°C a 5°C durante un periodo de 120 min. Después del período de refrigeración, las pajuelas se congelaron en N₂ vapor durante 10 minutos antes de guardarlo en N₂ líquido.

8.3.6 Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI)

Para los procedimientos de ICSI, se descongelaron las pajuelas que contenían los espermatozoides por inmersión en baño de agua a 37°C durante 30s. En el caso de las muestras de chita y leopardo se utilizó la misma pajuela para todas las repeticiones, la cual fue cortada y descongelada en cada caso. Los espermatozoides se resuspendieron en medio Brackett-Oliphant (BO, Brackett y Oliphant 1975) suplementado con 5 mM de cafeína (C4144) y 20 UI/ml de heparina (H3149), y se lavaron por centrifugación (490 g durante 5 min) para retirar el crioprotector. Luego de la centrifugación, se resuspendió el pellet con

medio BO suplementado con 10 mg/ml de albúmina bovina libre de ácidos grasos (A6003). Los espermatozoides fueron inyectados en ovocitos maduros utilizando un micromanipulador hidráulico Narishige (Medical Systems, Great Neck, NY, EE.UU.) montado sobre un microscopio Nikon Eclipse E-300 (Nikon, Melville, NY, EE.UU.). Las pipetas de inyección utilizadas fueron de 7 μm de diámetro interior. Para ello, los espermatozoides fueron colocados en una gota de 3 μl de polivinilpirrolidona (PVP, 99219, Irvine Scientific, Irvine, CA, EE.UU.) y los ovocitos desnudos maduros se colocaron en una gota de 100 μl de TALP-H, ambos en una placa de petri de 100x20 mm (Corning, 430167) bajo aceite mineral (M8410). Para realizar la ICSI se seleccionó un espermatozoide con motilidad progresiva y morfología normal, de Gd, chita o leopardo, se inmovilizó al romper la cola y se aspiró cola-primero en la pipeta de inyección. La pipeta de microinyección que contenía al espermatozoide fue introducida a través de la ZP hacia el citoplasma del ovocito de Gd o de leopardo con el 1^oCP ubicado a las 12 o 6 h, se aspiró el citoplasma para romper el oolemma y se depositó el espermatozoide con un volumen mínimo de PVP. Como controles negativos, se realizó la misma inyección, pero sin ningún espermatozoide (SHAM). Para el experimento 2, después de la ICSI o SHAM, un grupo de presuntos cigotos fue inmediatamente cultivado como se describe a continuación y otro grupo se activó mediante incubación con 5 mM de Io en TALP-H durante 4 min antes del cultivo.

8.3.7 Cultivo *in vitro* de embriones

Los presuntos cigotos de ICSI y SHAM se cultivaron en gotas de 50 μl de fluido oviductal sintético (SOF, Tervit y col. 1972; Holm y col. 1999) suplementado con 2,5% v/v de suero fetal bovino (SFB), en una atmósfera humidificada de 21% de O₂ y 5% CO₂ en aire, o 5%

de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂, a 39°C. El medio de cultivo se cambió a día 2 y luego se suplementó con 10% de SFB a día 5. El clivaje de los embriones se evaluó a día 2 y la formación de blastocistos en el día 7 y 8 después de la inyección.

8.3.8 *Análisis de cariotipo*

Con el objetivo de determinar si la Io estaría generando activación partenogénica de los ovocitos en lugar de aumentando la fecundación luego de la ICSI, realizamos un ensayo de cariotipo de los embriones. Para ello, 48 h después de la inyección del espermatozoide, los embriones madurados con ITS, cultivados con baja tensión de oxígeno, activados con Io o no (los grupos ITS-5%O₂ e ITS-Io-5%O₂) se incubaron durante 6 h en colchicina 1,25 mg/ml (C3915). A continuación, se transfirieron a una solución hipotónica de citrato trisódico (F71497; 0,8% p/v en agua destilada) durante 15 min a 37°C. Posteriormente, los embriones se colocaron en un portaobjetos de vidrio limpio en una mezcla de metanol: solución de ácido acético (3:1 v/v). Después de secado al aire, los embriones fijados se tiñeron con solución de Giemsa al 5% v/v (Merk 1.09204.1002, Darmstadt, Alemania) en agua destilada durante 10 min. Las tinciones de los cromosomas fueron examinadas bajo un objetivo de 100X y se determinó la cantidad de cromosomas para cada embrión. Los embriones se clasificaron como haploides (1n), diploide (2n) y aneuploides.

8.3.9 *Sincronización de celo y transferencia de embriones*

El celo de una gata adulta en buena condición corporal fue sincronizado a partir de la inyección diaria de dosis decrecientes de FSH porcina durante 4 días (día 1=1.0-1.5 UI; día 2: 0.75-1.30 UI; día 3: 0.75-1.10 UI; día 4: 0.50-1.10 UI). Luego de 4 días de administración de FSH (Folltropin, Syntex), se indujo la ovulación con una única administración de 250 UI de hCG. Cinco días posteriores a la administración de hCG, se

transfirieron 8 embriones generados por ICSI, en estadio de mórula, del grupo experimental ITS-5%O₂ (Figura 4). La transferencia se realizó por laparotomía. Uno de los cuernos uterinos fue exteriorizado a través de una incisión de 1.5 cm y perforado con una aguja estéril 18 g. Los embriones fueron aspirados con un catéter tomcat en el mínimo volumen de medio posible y depositados en el interior del cuerno uterino a partir de la interiorización de 2-3 cm del catéter en la perforación del útero. Dos semanas después de haber realizado la transferencia se realizó una ecografía abdominal para determinar si la gata se encontraba preñada.

8.3.10 TUNEL y microscopía confocal

La fragmentación del ADN fue detectada por ensayo de TUNEL (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System; Promega G3250, Madison, WI, EE.UU.). Después de la fijación durante 20 min en 4% (v/v) de paraformaldehído (F-1635), los blastocistos se lavaron durante 30 min en 0,4% (v/v) de BSA en PBS y luego se permeabilizaron tras 15 min de incubación en 0,2% (v/v) de Triton X-100 (T-9284) en PBS. El siguiente paso consistió en 15 minutos de incubación en el tampón de equilibrio contenido en el kit, y luego 2 h a 39°C en el tampón de incubación (tampón de equilibrio, mezcla de nucleótidos y la enzima desoxinucleotidil terminal transferasa). Los núcleos se tiñeron con 30 mg/ml de ioduro de propidio (P4170) durante 20 min en la oscuridad. Los blastocistos teñidos se montaron en portaobjetos de vidrio, en 70% (v/v) de glicerol bajo un cubreobjetos y se almacenaron a 4°C durante 24 h antes de la evaluación microscópica de la fluorescencia. Los controles positivos fueron generados por incubación en 50 UI/ml de DNasa (antes de la permeabilización) para inducir la fragmentación de ADN, y los controles negativos fueron generados por omisión de la enzima transferasa de la reacción. Los embriones se analizaron

en un microscopio láser de barrido confocal Nikon C.1. Para detectar fluorescencia verde de núcleos fragmentados (fluoresceína-12-dUTP) se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y para detectar los núcleos teñidos con yoduro de propidio se utilizó una longitud de onda de excitación de 544. Se realizó una serie completa de cada embrión en el eje Z de 13-18 secciones ópticas a 3-4 μm de intervalo, y las imágenes tridimensionales se reconstruyeron utilizando el software EZ-C1 2,20. Con las imágenes obtenidas se contaron el número de células totales de cada embrión y el número de células TUNEL positivas (TUNEL+). Para determinar el índice de células con ADN fragmentado, se dividió el promedio del número de células TUNEL+ por el promedio del número de células totales de los blastocistos.

8.3.11 Análisis estadístico

El desarrollo *in vitro* de los embriones se comparó mediante la prueba no paramétrica de Fisher. Las diferencias en el número de células totales se analizaron utilizando Proc Mixed, teniendo en cuenta la heterogeneidad de varianzas y el establecimiento de grados de libertad por Kenward-Roger. Para estos análisis estadísticos, se utilizó el programa SAS (SAS Institute Inc SAS/STAT 1989). La proporción de núcleos fragmentados sobre el número de células totales fue analizado por "Prueba de diferencia de proporciones", utilizando la versión de software InfoStat 2007. En todos los casos se consideraron diferencias significativas valores de $p < 0.05$.

8.4 Resultados

8.4.1 Observaciones preliminares

Se comparó la eficacia de la maduración nuclear del MM y el MM suplementado con ITS.

No se observaron diferencias en el porcentaje de ovocitos maduros comparando ambos medios, 47.4% en MM (n=348) y 46,1% en MM suplementado con ITS (n=308). Se utilizaron un total de 1727 ovocitos para los experimentos que se detallan a continuación.

8.4.2 Desarrollo in vitro de embriones de gato doméstico generados por ICSI y SHAM con distintos tratamientos

La Tabla 1 muestra el desarrollo de embriones ICSI y SHAM homoespecíficos de GD expuestos a diferentes condiciones durante la maduración de los ovocitos y el cultivo de embriones. Las tasas de división fueron menores ($p < 0.05$) en el grupo ITS-21%O₂ (35.7%) respecto a los otros tres grupos de ICSI (52.2%, 55.6% y 56.8% para los MM-21%O₂, MM-5%O₂ e ITS-5%O₂, respectivamente). Los grupos SHAM, MM-5%O₂^{CT} y ITS-5%O₂^{CT} mostraron tasas de división estadísticamente inferiores (10.5% y 28.4%) que los grupos de ICSI tratados con las mismas condiciones (55.6% y 56.8% para MM-5%O₂ e ITS-5%O₂, respectivamente). Todos los grupos de ICSI mostraron formación de blastocisto, aunque la tasa más alta se observó en el grupo madurado con ITS y cultivado con baja tensión de oxígeno (36.7% respecto a los embriones clivados y 20.9% respecto a los embriones totales). De lo contrario, no hubo desarrollo a blastocisto en ninguno de los grupos SHAM.

8.4.3 Sincronización de celo y transferencia de embriones

A partir del estudio ecográfico realizado 16 días posteriores a la transferencia de los embriones, se observó la presencia de una vesícula de 6.7 mm en el útero. Sin embargo, esta vesícula fue reabsorbida días después ya que no se observó preñez en un análisis ecográfico subsiguiente (Figura 4).

Tabla 1. Desarrollo de embriones de ICSI o SHAM homoespecíficos de gato doméstico tratados con diferentes condiciones de maduración y cultivo

| Inyección | Grupos | n | Clivados (%) | Producción de blastocistos (%) a partir de | |
|-----------|--------------------------------------|-----|-------------------------|--|---------------------|
| | | | | Embriones clivados | Embriones totales |
| ICSI | MM-21% O ₂ | 138 | 72 (52.2) ^{ac} | 12 (16.7) ^a | (8.7) ^a |
| | MM-5% O ₂ | 142 | 79 (55.6) ^a | 10 (12.7) ^a | (7) ^a |
| | ITS-21% O ₂ | 154 | 55 (35.7) ^b | 10 (18.2) ^a | (6.5) ^a |
| | ITS-5% O ₂ | 206 | 117 (56.8) ^a | 43 (36.7) ^b | (20.9) ^b |
| SHAM | MM-21% O ₂ ^{CT} | 60 | 23 (38.3) ^{bc} | 0 ^c | 0 ^c |
| | MM-5% O ₂ ^{CT} | 76 | 8 (10.5) ^d | 0 ^c | 0 ^c |
| | ITS-21% O ₂ ^{CT} | 73 | 25 (34.2) ^b | 0 ^c | 0 ^c |
| | ITS-5% O ₂ ^{CT} | 67 | 19 (28.4) ^b | 0 ^c | 0 ^c |

(a,b,c,d) Los valores con diferentes superíndice en una columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, prueba de Fisher). MM, medio de maduración sin ITS; ITS, medio de maduración con ITS; 21% O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno atmosférica; 5% O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno del 5%.

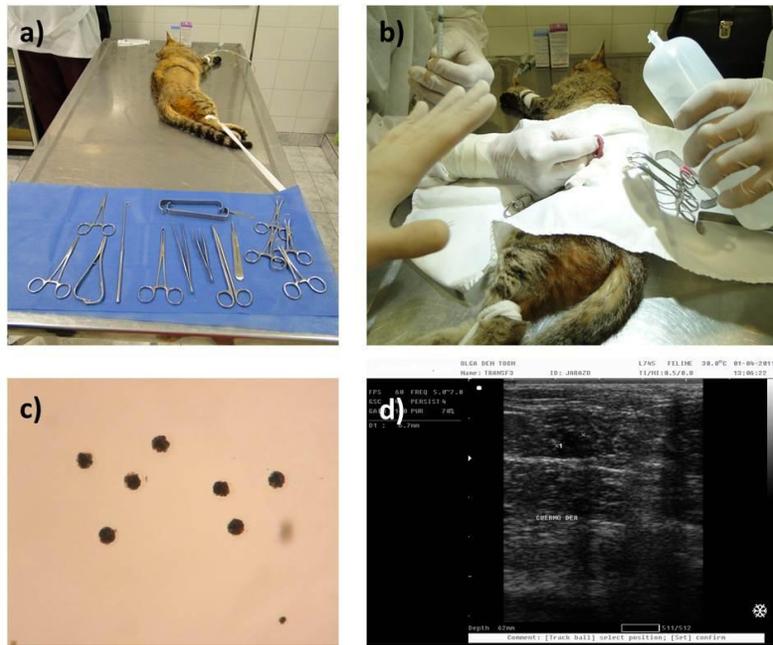


Figura 4. Transferencia de embriones ICSI del grupo experimental ITS-5%O₂. a) Preparación de la gata para la cirugía, b) Exteriorización del cuerno uterino para realizar transferencia embrionaria, c) Embriones en estadio de mórula transferidos, d) Ecografía de vesícula 16 días posteriores a la transferencia embrionaria

8.4.4 Desarrollo *in vitro* de embriones de ICSI interespecíficos asistidos o no con activación química.

Los resultados del desarrollo *in vitro* de los embriones interespecíficos de ICSI utilizando espermatozoides de chita y de leopardo, y asistida o no con activación química, se resume en la Tabla 2. Respecto al grupo control homoespecífico utilizando espermatozoides de Gd sin Io, los embriones generados con espermatozoides de chita mostraron mayor clivaje a diferencia de los embriones generados con espermatozoides de leopardo cuyo clivaje fue similar al control. Hemos observado que la activación con Io aumentó las tasas de división ($p < 0.05$) en Leo-Io (73.7%) y Gd-Io (69.7%) respecto a los grupos Leo (35.3%) y Gd (43.5%). También se vio aumentada la tasa de clivaje en el grupo control SHAM cuando se usó Io, 19.2% vs. 65.3% para Gd^{CT} y Gd-Io^{CT}, respectivamente. Los embriones interespecíficos con espermatozoides de chita mostraron tasas de división similares independientemente de la activación con Io, 66.3% frente a 73.6% para los grupos Ch y Ch-

Io, respectivamente. Respecto a las tasas de blastocisto, los embriones interespecíficos alcanzaron el estadio de blastocisto de manera similar que los embriones de Gd, 32.6%, 9.8% y 20% para Ch, Leo y Gd, respectivamente. A pesar de las diferencias observadas en las tasas de división, la formación de blastocistos no se vio afectada positivamente por la activación con Io en ninguno de los grupos de ICSI, 21%, 21% y 17.4% para el Ch-Io, Leo-Io y Gd-Io, respectivamente. Sin embargo, se observó formación de blastocisto cuando los embriones SHAM fueron asistidos con Io luego de la inyección, 0% frente a 6.9% para el grupo Gd^{CT} y Gd-Io^{CT}, respectivamente. En la figura 5 se observan los embriones generados con espermatozoides de chita, leopardo y gato doméstico.

Tabla 2. Desarrollo *in vitro* de embriones interespecíficos generados por ICSI madurados con ITS, cultivados en 5% O₂ y asistidos o no con ionomicina

| Inyección | Grupos | n | Clivados (%) | Blastocistos (%) |
|------------------|---------------------------|----------|------------------------|-------------------------|
| ICSI | Ch | 98 | 65 (66.3) ^a | 32 (32.6) ^a |
| | Ch-Io | 91 | 67 (73.6) ^a | 19 (21) ^{ab} |
| | Leo | 51 | 18 (35.3) ^b | 5 (9.8) ^{bc} |
| | Leo-Io | 57 | 42 (73.7) ^a | 12 (21) ^{ab} |
| | Gd | 85 | 37 (43.5) ^b | 17 (20) ^{ab} |
| | Gd-Io | 109 | 76 (69.7) ^a | 19 (17.4) ^b |
| SHAM | Gd^{CT} | 52 | 10 (19.2) ^c | 0 ^d |
| | Gd-Io^{CT} | 72 | 47 (65.3) ^a | 5 (6.9) ^{cd} |

(a,b) Los valores con diferentes superíndice en una columna son estadísticamente diferentes (p<0.05, prueba de Fisher). Ch, embriones interespecíficos generados con ovocitos de gata

doméstica y espermatozoides de chita; Leo, embriones interespecíficos generados con ovocitos de gata doméstica y espermatozoides de leopardo; Gd, embriones homoespecíficos generados con ovocitos de gata doméstica y espermatozoides de la misma especie; Io, activación con ionomicina luego de la inyección del espermatozoide.

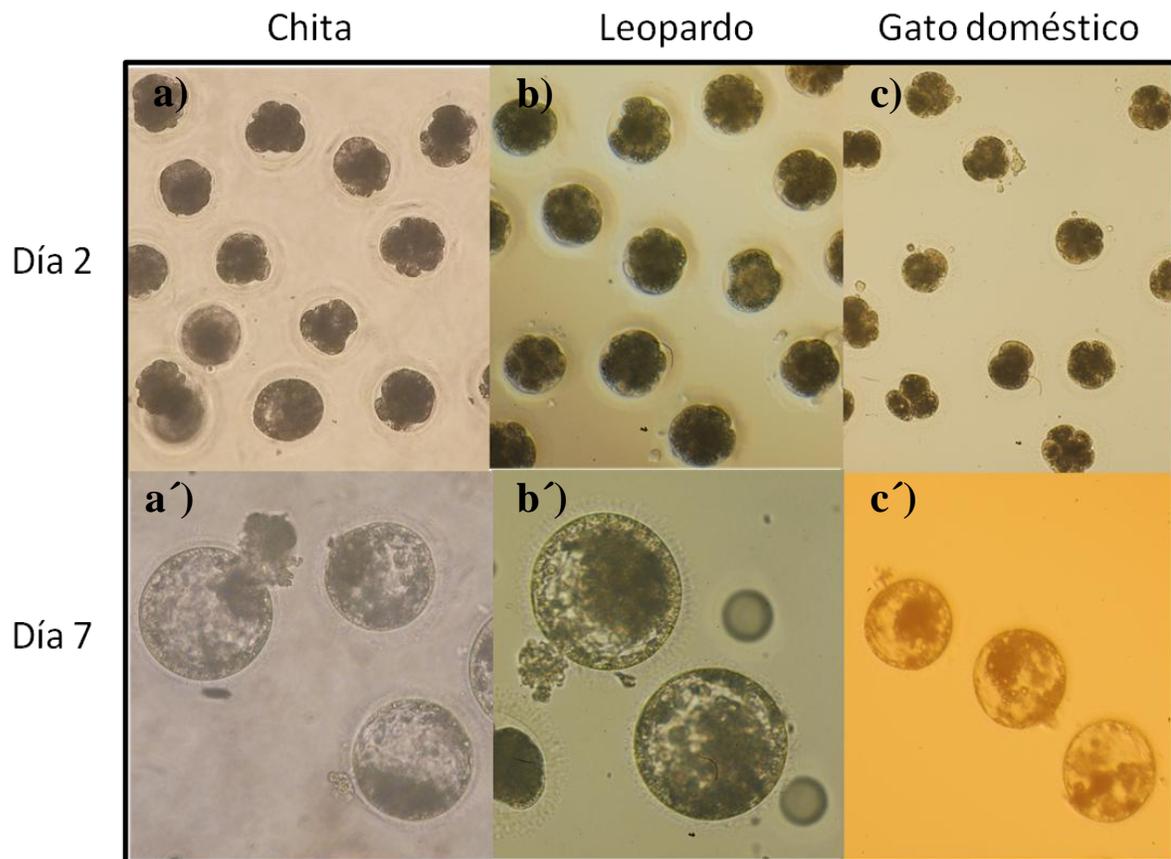


Figura 5. a) Embriones interespecíficos de día 2 generados por ICSI con espermatozoides de chita y ovocitos de gata doméstica, a') Embriones interespecíficos de día 7 generados por ICSI con espermatozoides de chita y ovocitos de gata doméstica, b) Embriones interespecíficos de día 2 generados por ICSI con espermatozoides de leopardo y ovocitos de gata doméstica, b') Embriones interespecíficos de día 7 generados por ICSI con espermatozoides de leopardo y ovocitos de gata doméstica, c) Embriones de día 2 de gato doméstico producidos por ICSI, c') Embriones de día 7 de gato doméstico producidos por ICSI.

8.4.5 Análisis de cariotipo

El análisis de cariotipo de embriones de gato doméstico activados con Io y no activados confirmó que el 72.7% y el 69.2% de ellos eran diploides, 18.2% y 23.1% haploides, y 9.1% y 7.7% aneuploides, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre el grupos (Tabla 3, Figura 6).

Tabla 3. Análisis del cariotipo de embriones clivados de los grupos Gd y Gd-Io.

| Grupos | n | Metafasas | Embriones clivados | | |
|--------------|----|-----------|--------------------|---------------|-----------------|
| | | | Haploides (%) | Diploides (%) | Aneuploides (%) |
| Gd | 11 | 20 | 2 (18.2) | 8 (72.7) | 1 (9.1) |
| Gd-Io | 13 | 21 | 3 (23.1) | 9 (69.2) | 1 (7.7) |

No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$, prueba de Fisher). Gd, gato doméstico; Io, activación con ionomicina luego de la inyección del espermatozoide.

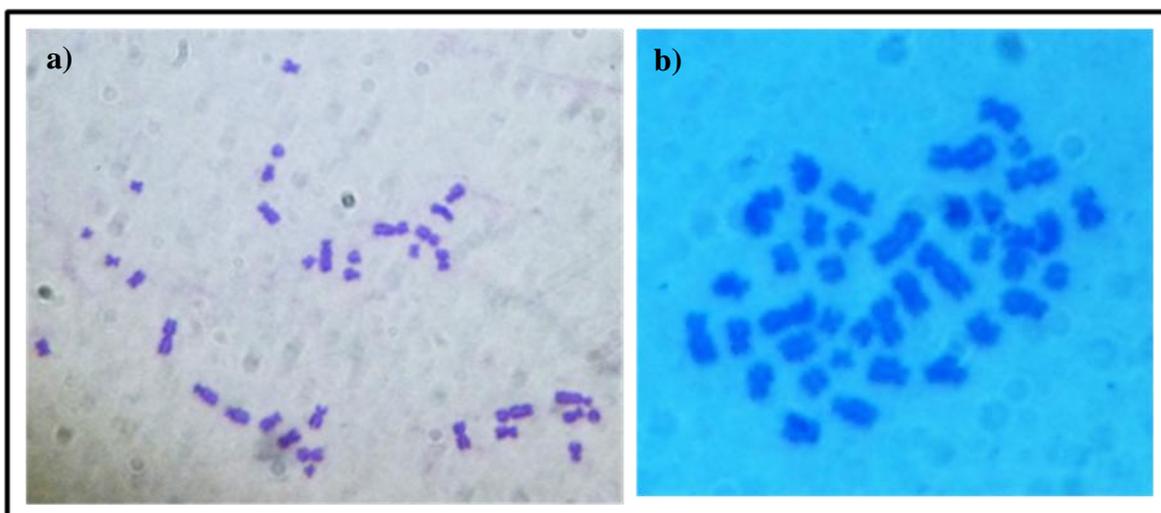


Figura 6. Placas metafásicas de embriones clivados de gato doméstico generados por ICSI 48 h posterior a la inyección del espermatozoide: a) Grupo Gd (2n); b) Grupo Gd-Io (2n).

8.4.6 Obtención de ovocitos de leopardo e ICSI en esta especie

A partir de 10 folículos antrales visibles, se recuperaron un total de 9 COCs (grado 1=5, grado 2=3 y grado 3=1), y 6 más se obtuvieron luego de cortar y raspar los ovarios (grado 1=1, grado 2=1 y grado 3=4, Tabla 4). La tasa de maduración fue muy baja si tenemos en cuenta el total de ovocitos (4/15, 27%), pero fue similar a la del Gd (4/10, 40%) si se considera sólo los ovocitos de grado 1 y 2 (como lo hacemos para el Gd). Los 4 ovocitos maduros fueron inyectados con espermatozoides de leopardo. Luego de la ICSI 2 de los 4 ovocitos inyectados liberaron el segundo corpúsculo polar y uno de ellos se dividió a día 2 (Figura 7). Tras una tinción con Hoëchst 33342 y evaluación bajo microscopio de fluorescencia se observó la cabeza de los espermatozoides condensada dentro de los otros dos ovocitos inyectados que no habían liberado el segundo corpúsculo polar.

Tabla 4. Recuperación y maduración de ovocitos de leopardo

| Folículos | Ovocitos recuperados | Ovocitos recuperados por raspado | Total de ovocitos | Ovocitos con 1°CP | Ovocitos sin CP | Ovocitos degenerados |
|------------------|-----------------------------|---|--------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 10 | 9 | 6 | 15 | 4 | 6 | 5 |

CP, Corpúsculo polar

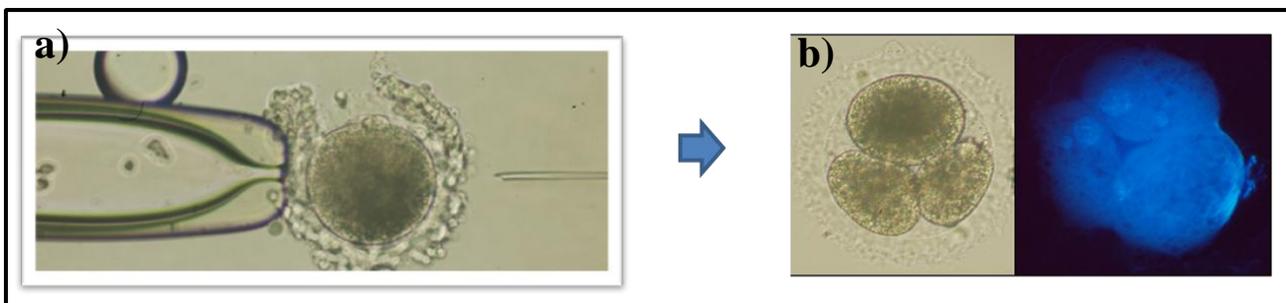


Figura 7. a) Procedimiento de ICSI en leopardo, b) Embrión clivado de leopardo generado por ICSI

8.4.7 Evaluación de los blastocistos de ICSI por ensayo de TUNEL.

Los blastocistos obtenidos por ICSI homoespecífica e interespecífica se evaluaron para determinar el número de células y la presencia de núcleos fragmentados por ensayo de TUNEL (Tabla 5, Figura 8). El número de células de los blastocistos de gato doméstico fueron similares entre los diferentes tratamientos evaluados, aunque el grupo MM-21%O₂ mostró el mayor número de células (177.8 ± 28.7 ; 105.9 ± 16.7 ; 128.6 ± 18.3 y 129.4 ± 17.9 para MM-21%O₂, MM-5%O₂, ITS-21%O₂ e ITS-5%O₂, respectivamente). Por otra parte, los blastocistos interespecíficos no mostraron diferencias respecto a los blastocistos de gato doméstico utilizando las mismas condiciones, 174.6 ± 22.8 y 100.2 ± 12.6 para grupos Ch y Leo, respectivamente. Con respecto a la fragmentación del ADN, ésta fue estadísticamente mayor en los blastocistos de gato doméstico madurados con ITS y cultivados con baja tensión de oxígeno, respecto a los otros tratamientos (43.5%, 36.5%, 34% y 67.6% para MM-21%O₂, MM-5%O₂, ITS-21%O₂ e ITS-5%O₂, respectivamente). Los blastocistos interespecíficos mostraron una fragmentación del ADN menor ($p < 0.05$) a la del gato doméstico a pesar de haber recibido el mismo tratamiento (27% y 29.9% para los grupos Ch y Leo, respectivamente).

Tabla 5. Evaluación del número de células y núcleos con ADN fragmentado por ensayo de TUNEL en blastocistos de ICSI obtenidos por diferentes tratamientos.

| Grupos | n | N° de células de blastocistos Promedio ± SEM | Células TUNEL+ Promedio ± SEM | Índice de fragmentación* |
|-----------------------------|----------|---|--------------------------------------|---------------------------------|
| MM-21%O₂ | 6 | 177.8 ± 28.7 ^a | 77.3 ± 12.2 ^a | 43.5 ^a |
| MM-5%O₂ | 7 | 105.9 ± 16.7 ^b | 38.7 ± 3.1 ^b | 36.5 ^b |
| ITS-21%O₂ | 10 | 128.6 ± 18.3 ^{ab} | 43.7 ± 8.5 ^b | 34 ^{be} |
| ITS-5%O₂ | 9 | 129.4 ± 17.9 ^{ab} | 87.4 ± 11.4 ^a | 67.6 ^c |
| Ch | 9 | 174.6 ± 22.8 ^a | 47.2 ± 5.9 ^b | 27 ^d |
| Leo | 5 | 100.2 ± 12.6 ^b | 30 ± 7 ^b | 29.9 ^{de} |

(a,b,c,d,e) Los valores con diferentes superíndices en una columna son estadísticamente diferentes. Para el número de células de los blastocistos y el número de células TUNEL+ se utilizó Proc Mixed ($p < 0.05$). Para el índice de fragmentación, se utilizó la prueba de diferencias de proporciones ($p < 0.05$). MM, medio de maduración sin ITS; ITS, medio de maduración con ITS; 21%O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno atmosférica; 5%O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno del 5%. Ch, embrión interespecífico generado con ovocitos de gata doméstica y espermatozoides de chita; Leo, embriones interespecíficos generados con ovocitos de gata doméstica y espermatozoides de leopardo. Las condiciones para los embriones interepecíficos fue ITS y 5%O₂.

*Para calcular el índice de fragmentación, el promedio de células TUNEL+ de cada grupo se dividió por el promedio del número de células de los blastocistos.

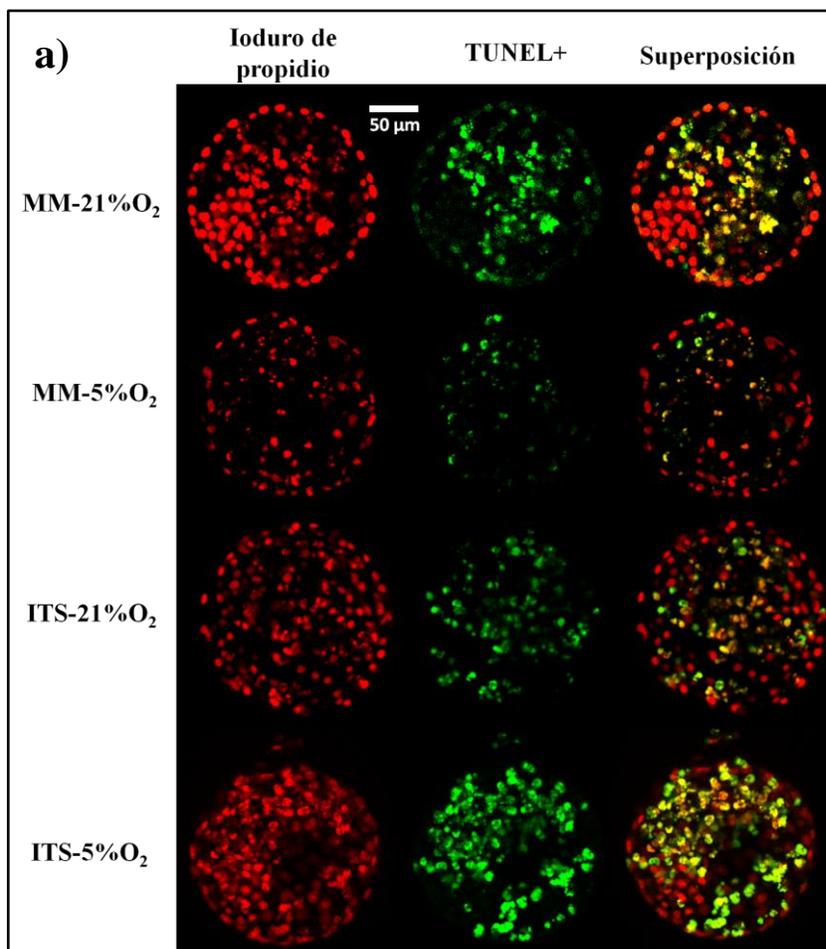
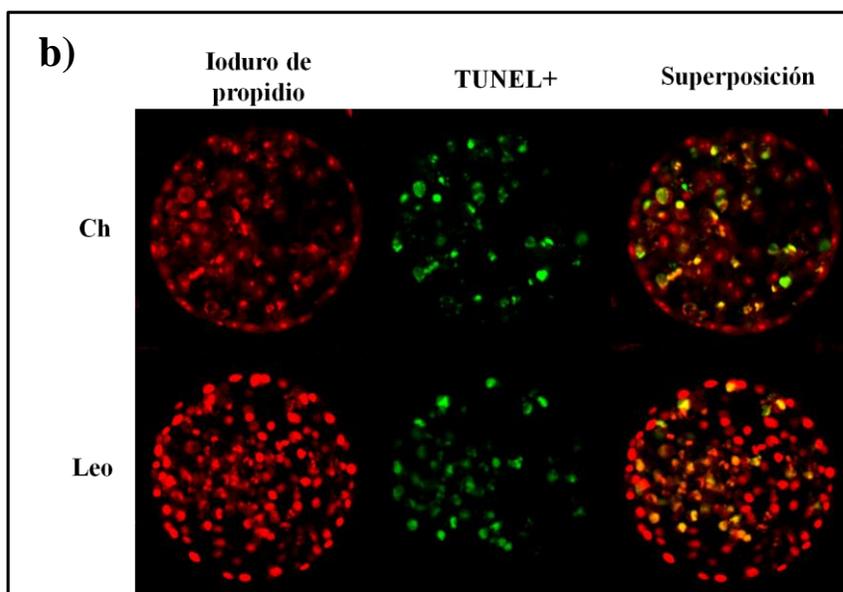


Figura 8. Blastocistos producidos por ICSI homospecifica utilizando diferentes condiciones (a), o ICSI interespecifica (b), analizados por ensayo de TUNEL para determinar la presencia de ADN fragmentado. Las células con marcación TUNEL positivo (TUNEL+) están marcadas con fluoresceina-12-dUTP (verde) y los núcleos están teñidos con ioduro de propidio (rojo).



8.5 *Discusión*

Este trabajo mostró hallazgos significativos para ser considerados en la técnica de ICSI para el gato doméstico y felinos silvestres. En primer lugar, se utilizaron diferentes condiciones para generar embriones de gato doméstico por ICSI con el fin de determinar el mejor protocolo para el desarrollo de los embriones. La suplementación con ITS no se había estudiado en ovocitos de gata hasta el momento y existe un único trabajo en el cual se evalúa la variación en la composición de gases durante el cultivo de embriones de gato doméstico (Johnston y col. 1991). Los estudios realizados en ovocitos de cerdo y búfalo han demostrado que la adición de ITS durante la maduración de los ovocitos mejora la capacidad de desarrollo de los embriones (Jeong y col. 2008; Raghu y col. 2002). Con respecto a la tensión de oxígeno, hay poca información disponible sobre su influencia en el desarrollo *in vitro* de embriones felinos. En nuestros experimentos se mejoró la tasa de blastocistos de ICSI cuando los ovocitos se maduraron con ITS y los embriones se cultivaron en baja tensión de oxígeno (grupo ITS-5%O₂), lo que sugiere un efecto sinérgico entre ambos factores. Más aún, se logró obtener una preñez temprana utilizando estas condiciones. Es importante tener en cuenta que la ausencia de blastocitos en los grupos SHAM nos permitió confirmar que los blastocistos obtenidos por la técnica de ICSI fueron el resultado de la fecundación del espermatozoide y no el resultado de una activación partenogénica. Además de ser un agente antioxidante, el ITS ha demostrado facilitar la decondensación de la cromatina espermática (Jeong y col. 2008). Se observó un aumento en la tasa de formación de pronúcleo masculino tras realizar FIV en cerdos cuando se utilizó ITS. Este resultado se atribuyó a un aumento en la concentración de glutatión (Jeong y col. 2008), que es un agente reductor de los enlaces disulfuro presentes en el núcleo

espermático. En otro trabajo se obtuvieron mayores tasas de blastocisto cuando se aumentó el contenido de glutatión intracelular de los ovocitos durante la maduración (De Matos y Furnus 2000).

En el segundo experimento, se generaron embriones interespecíficos mediante la inyección de espermatozoides de chita y de leopardo en ovocitos de Gd utilizando las mejores condiciones de acuerdo con los resultados obtenidos previamente. El objetivo de este experimento fue demostrar la capacidad de desarrollo de los espermatozoides de chita y de leopardo y el potencial de la técnica de ICSI en felinos silvestres. Por otra parte, se evaluó si la activación con ionomicina post-inyección mejoraba el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto. La ionomicina es un estimulador eficaz de la activación de ovocitos en mamíferos, pero no ha sido utilizada previamente en felinos para asistir a la ICSI, sino que en trabajos previos solamente se ha utilizado etanol o estímulos eléctricos como agentes activadores (Comizzoli y col. 2006; Bogliolo y col. 2001; Waurich y col. 2010; Ringleb y col. 2011). En algunas especies de mamíferos tales como conejos, ratones y seres humanos, la inyección del espermatozoide ha demostrado ser estímulo suficiente para activar a los ovocitos e iniciar el desarrollo del embrión (Keefer 1989; Kimura y Yanagimachi 1995, Van Steirteghem y col. 1993). En otras especies, como bovinos y porcinos, ha sido necesario realizar pre-tratamientos a los espermatozoides, activación artificial o ambos luego de la ICSI para inducir la decondensación del núcleo espermático y el desarrollo embrionario posterior (Chung y col. 2000; Tian y col. 2006). En el gato doméstico, aún se discute si la activación es necesaria para el desarrollo normal del embrión. Algunos autores han informado que el estímulo de la inyección por sí sola no es suficiente para lograr una fecundación consistente luego de la ICSI (Comizzoli y col. 2006), mientras que otros han

obtenido desarrollo embrionario sin ningún tipo de tratamiento adicional (Pope y col. 1998), como se observó en nuestro trabajo. Estos resultados podrían estar influenciados por la maduración citoplasmática, preparación de los espermatozoides, procedimiento de ICSI y condiciones de cultivo (Bogliolo y col. 2001, Booth y col. 2005, Murakami y col. 2005), los cuales afectan la activación y al desarrollo del embrión luego de la ICSI. En el primer experimento habíamos determinado que no era necesario activar a los embriones de gato doméstico luego de la ICSI para obtener blastocistos en nuestras condiciones, pero no sabíamos si los ovocitos de gata necesitarían mayor estimulación para ser activados por espermatozoides de especies diferentes. Sorprendentemente, el desarrollo de los embriones interespecíficos fue similar que el de los embriones de gato doméstico sin necesidad de realizar asistencia química. Luego de este ensayo, llegamos a la conclusión que la activación química no era necesaria ni para la ICSI en el gato doméstico ni para la ICSI interespecífica. Estos resultados son de gran interés, ya que demuestra que sólo la inyección del espermatozoide es suficiente para activar los ovocitos de gata doméstica. Sin embargo, los embriones Ch-Gd tuvieron mayores tasas de blastocistos que los embriones Leo-Gd. Esta observación podría atribuirse a una capacidad fecundante diferente de cada especie, a lo mejor dada por la actividad diferencial de la fosfolipasa Z espermática (PLCZ, Bedford-Guaus y col. 2011), o por la distancia filogenética del chita y del leopardo, respecto al gato doméstico (Johnson y col. 2006).

Los buenos resultados obtenidos tras la ICSI interespecífica con los espermatozoides de leopardo, nos permitió asumir que los índices más bajos de desarrollo utilizando ovocitos de leopardo fueron resultado de un factor materno, el cual pudo deberse a las malas

condiciones clínicas de la hembra. A pesar de esto, fue posible fecundar ovocitos de leopardo por ICSI y obtener clivaje de un embrión.

Con el fin de determinar la calidad de los blastocistos de ICSI homoespecíficos e interespecíficos generados, se evaluaron el número de células totales y la proporción de núcleos fragmentados, el cual está relacionado con el proceso de apoptosis. Todos los blastocistos evaluados mostraron células TUNEL+ en diferentes proporciones. Se ha demostrado que la apoptosis espontánea tiene ciertas funciones durante el desarrollo del embrión antes de la implantación (Hardy 1997; Betts y King 2001) y se produce normalmente en blastocistos producidos *in vitro* (Byrne y col. 1999; Matwee y col. 2000). Sin embargo, una apoptosis inadecuada o exacerbada en las etapas pre-implantatorias podría afectar el potencial de desarrollo post-implantatorio. Entre los grupos de ICSI, el grupo con mayor índice de núcleos con ADN fragmentado fue ITS-5%O₂. Cabe destacar que este grupo mostró las tasas más altas de formación de blastocistos. Estos resultados indican que las condiciones antioxidantes utilizadas promueven la formación de blastocistos, pero inducen mayor fragmentación del ADN. Sin embargo, los embriones interespecíficos que fueron tratados de igual manera con estas condiciones mostraron el menor índice de núcleo fragmentado entre todos los grupos. Esta fue una observación inesperada. Aunque la fragmentación del ADN no es determinante para la competencia del desarrollo embrionario, es un indicativo de estrés celular. Creemos que el estudio del desarrollo embrionario *in vivo* del gato doméstico podría contribuir a una comprensión del patrón normal de la fragmentación del ADN en los blastocistos de esta especie, y las razones que conducen a un aumento de este parámetro.

8.6 Conclusión

En resumen, la suplementación con ITS y la baja tensión de oxígeno mejoraron la capacidad de desarrollo *in vitro* de embriones de ICSI de gato doméstico, aunque acompañado con un aumento en la fragmentación del ADN. Lo más importante de este trabajo fue que los espermatozoides de chita y de leopardo fueron capaces de fecundar ovocitos de gata doméstica, y se obtuvieron buenas tasas de blastocistos sin asistencia química. Este estudio muestra que la capacidad fecundante de los espermatozoides de felinos silvestres puede ser evaluada utilizando la técnica de ICSI con ovocitos de gata doméstica madurados *in vitro*.

9. Capítulo II

Transferencia nuclear de células somáticas en felinos y reprogramación nuclear

*Los resultados de este capítulo forman parte de un trabajo titulado “Cheetah Embryo aggregation in interspecific SCNT improves development but not gene expression”, publicado en la revista *Reproduction* (Moro y col. 2015).*

9.1 Resumen

La SCNT en felinos es una técnica con gran potencial para ser utilizada en conservación de especies, pero aún continúa siendo ineficiente. El objetivo de este estudio fue desarrollar nuevas estrategias para mejorar la clonación en el gato doméstico y en felinos silvestres. En primer lugar, evaluamos tres técnicas de SCNT diferentes en el gato doméstico: I) Enucleación de ovocitos con ZP seguido de la fusión de un fibroblasto (grupo “Fusión con ZP”), II) el mismo procedimiento de enucleación seguido por la inyección intracitoplasmática de un fibroblasto (grupo “Inyección con ZP”), y III) Enucleación de ovocitos libres de ZP seguido por la fusión de un fibroblasto (grupo “Fusión sin ZP”). La técnica más eficiente fue la fusión sin ZP por lo que se decidió continuar con esta técnica para el siguiente experimento. En el experimento 2, se realizó SCNTi con ovocitos de gata doméstica y células de chita, tigre y gato bengal, siendo este último un animal híbrido derivado del gato doméstico y el leopardo asiático. Además se evaluó el efecto de la agregación embrionaria comparando los embriones reconstruidos libres de ZP cultivados en micropozos de manera individual (1X) o de a 2 estructuras (2X, embriones agregados). Fue posible obtener embriones hasta el estadio de blastocisto en todos los grupos, y la agregación de embriones mejoró la tasa de desarrollo en todas las especies. No sólo aumentó la tasa de desarrollo sino que además la agregación mejoró la calidad de los blastocistos de gato doméstico y de tigre. El estudio de la expresión génica de blastocistos clones de gato doméstico reveló que los genes *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *CDX2* estaban sobre-expresados en los blastocistos de Gd1X respecto al grupo control de FIV. Sin embargo, los niveles relativos de expresión de los cuatro genes disminuyeron en los blastocistos de Gd2X respecto a los blastocistos de Gd1X, alcanzando niveles relativos

similares de *NANOG* y *SOX2* que los blastocistos de FIV. Los embriones de bengal mostraron niveles relativos de expresión de *OCT4* menores que los del control y los embriones de chita mostraron menor expresión relativa de *OCT4*, *CDX2* y *NANOG* que los grupos Gd1X, Gd2X y FIV. Además determinamos que la proteína OCT4 estaba distribuida de manera heterogénea en los blastocistos de todos los grupos y no estaba localizada en el MCI. En conclusión, los ovocitos de gata doméstica fueron capaces de reprogramar células de otras especies de felinos silvestres para generar embriones hasta el estadio de blastocisto. Además, la agregación de clones ha demostrado mejorar el desarrollo embrionario y normalizar la expresión de genes sólo en el gato doméstico, no así en los embriones interespecíficos.

9.2 Introducción

Desde que la SCNT ha demostrado generar descendencia viable (Wilmot y col. 1997), se han desarrollado diferentes aplicaciones para esta técnica, tales como la propagación de animales de granja, la producción de animales transgénicos (Cibelli y col. 1998; Salamone y col. 2006; Gómez y col. 2009), la generación de células madre pluripotentes y la conservación de especies (Chen y col. 2002, Gómez y col. 2004). Por otra parte, se ha modificado la metodología para realizar SCNT con el fin de mejorar el proceso, para reducir el costo o facilitar el procedimiento. Estos nuevos métodos incluyen la inyección intracitoplasmática de la célula donante (Ideta y col. 2005), la clonación libre de ZP, la clonación sin utilizar un micromanipulador (Vajta y col. 2001) y la agregación embrionaria (Boiani y col. 2003). Casi todas estas técnicas se han desarrollado y utilizado en las especies murina, bovina y porcina.

El interés por la SCNT en felinos se presenta como una estrategia para contribuir a la conservación de especies. La mayoría de las 36 especies de felinos silvestres se encuentran con algún grado de amenaza, y la posibilidad de restaurar la variabilidad genética utilizando como herramienta esta técnica hace que sea importante su estudio. Debido a la dificultad de obtener ovocitos de felinos silvestres, el gato doméstico se ha utilizado como modelo para el desarrollo de las biotecnologías reproductivas y para comprender los aspectos celulares y moleculares de la reprogramación nuclear. Shin y col. (2002) reportaron el primer nacimiento de un gato producido por SCNT. Desde entonces, los intentos por mejorar la técnica en el Gd llevaron a estudiar diferentes etapas del procedimiento de clonación, tales como varios tipos de células donantes de núcleo (Yin 2005, Tomii y col. 2011), diferentes estrategias de sincronización celular (De Barros y col. 2010) y diferentes protocolos de

activación de los embriones reconstituidos (Wang y col. 2009). Sin embargo, ninguno de estos estudios reveló mejoras significativas ni en el desarrollo de los embriones, ni en las tasas de preñez.

Además de los estudios en el gato doméstico, también se reportó SCNTi en felinos para contribuir a la conservación de especies. Esta técnica consiste en la generación de embriones por SCNT, usando el ovocito enucleado de una especie y la célula donante de otra. Este enfoque se vuelve relevante en las especies que los ovocitos son muy difíciles de obtener, como es el caso de los felinos silvestres. La aplicación exitosa de SCNTi en felinos se demostró tras el nacimiento de gatos silvestres africanos (*Felis silvestris lybica*; Gómez y col. 2004) y gatos del desierto (*Felis margarita arena*; Gómez y col. 2008). Además, se obtuvieron preñeces de embriones generados por la fusión de células de gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*) con ovocitos enucleados de gato doméstico (Yin y col. 2006). A pesar de estos logros, todavía es muy difícil obtener preñeces y nacimientos utilizando SCNTi como se ha demostrado en varias publicaciones (Thongphakdee y col. 2010, Gómez y col. 2011, Imsoonthornruksa y col. 2012).

El fracaso en la producción de embriones por SCNT o SCNTi se asocia generalmente con problemas epigenéticos o inadecuada reprogramación celular. Se ha informado que cada embrión reconstituido es único en términos de marcas epigenéticas y expresión génica (Park y col. 2002), como consecuencia del estado del núcleo donante y la calidad del ovoplasto receptor. Esta característica afecta la calidad del embrión y, como consecuencia, el éxito de la clonación. Teniendo en cuenta esto, se sugirió que embriones clones genéticamente iguales pero epigenéticamente diferentes se podrían agregar y formar un embrión epigenéticamente quimérico. En consecuencia, este quimerismo compensaría parte

de los problemas epigenéticos asociados a la clonación. Esta estrategia resultó en un mayor número de células en los blastocisto y mayores tasas de preñez cuando los embriones eran generados por agregación en el ratón (Boiani y col. 2003) y el caballo (Gambini y col. 2012). También se obtuvieron mayores tasas de blastocistos, número de células y tasas de preñez en el bovino utilizando esta estrategia (Pedersen y col. 2005, Zhou y col. 2008, Ribeiro y col. 2009). A pesar de estos resultados prometedores, la agregación embrionaria no ha sido evaluada en felinos, ni en ensayos de SCNTi en otras especies.

En este capítulo se desarrollarán tres técnicas diferentes de transferencia nuclear y se determinará si la agregación embrionaria mejora la eficiencia de la clonación en el gato doméstico y en los embriones SCNTi usando células de gato bengal, chita y tigre, dos de las especies que se encuentran en la lista roja de especies amenazadas, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, Durant y col. 2010).

9.3 Materiales y métodos

9.3.1 Diseño experimental

Previamente a la realización de la SCNT, evaluamos como pre-ensayo las mismas condiciones de maduración y de cultivo que para los embriones de ICSI (descrito en el capítulo anterior), pero en este caso utilizamos embriones partenogénéticos. Los grupos experimentales fueron: “pMM-21%O₂” (medio de maduración sin ITS y 21%O₂ durante el cultivo), “pMM-5%O₂” (medio de maduración sin ITS y 5%O₂ durante el cultivo), “pITS-21%O₂” (medio de maduración con ITS y 21%O₂ durante el cultivo), y “pITS-5%O₂” (medio de maduración con ITS y 5%O₂ durante el cultivo). Las mejores condiciones, según los resultados obtenidos en este pre-ensayo, fueron utilizadas para los experimentos de

SCNT. Se evaluaron diferentes estrategias de SCNT en el gato doméstico, las cuales fueron: I) Enucleación del ovocito con zona pelúcida (ZP) seguido por la fusión de un fibroblasto previamente inyectado en el espacio perivitelino (grupo “Fusión con ZP”), II) Igual procedimiento de enucleación seguido por la inyección intracitoplasmática de un fibroblasto (grupo “Inyección con ZP”) y III) Enucleación del ovocito sin ZP seguido de la adhesión y fusión de un fibroblasto (grupo “Fusión sin ZP”). Se realizaron también controles de activación partenogenética con y sin ZP (grupos “AP con ZP” y “AP sin ZP”). La estrategia libre de ZP fue elegida para realizar el siguiente experimento. Se realizó SCNT libre de ZP en el gato doméstico y SCNTi utilizando ovoplastos de gata doméstica y células de chita, bengal y tigre. Además, los embriones generados fueron cultivados en micropozos de a 1 clon (1X) o de a 2 clones juntos (2X), a los que denominamos embriones agregados. Los grupos experimentales fueron, “Gd1X” y “Gd2X” (cuando se utilizaron células de gato doméstico), “Ch1X” y “Ch2X” (cuando se utilizaron células de chita), “Be1X” y “Be2X” (cuando se utilizaron células de bengal) y “Ti1X” y “Ti2X” (cuando se utilizaron células de tigre). Un grupo control de FIV fue incluido en este ensayo. Evaluamos el desarrollo embrionario de los clones de gato doméstico e interespecíficos, el número de células de los blastocistos generados, la expresión de la proteína OCT4 y la expresión de 4 genes asociados a pluripotencia y diferenciación temprana, *OCT4*, *NANOG*, *CDX2* y *SOX2*. Con estos ensayos determinamos el efecto de la agregación y de la clonación interespecífica en el desarrollo embrionario y la reprogramación nuclear de los clones.

9.3.2 *Colecta de ovocitos y maduración in vitro*

La colecta de los ovocitos se realizó como fue descrito en el capítulo anterior, inciso 8.3.4. Para el pre-ensayo se utilizaron el medio de maduración suplementado con ITS y no suplementado como fue descrito anteriormente, inciso 8.3.4. Para la maduración de los ovocitos de los procedimientos de transferencia nuclear el medio no fue suplementado con ITS.

9.3.3 *Activación partenogénica*

Los ovocitos maduros fueron activados con 5 μ M de ionomicina (Io; I24222; Invitrogen, CA, EEUU) en TALP-H por 4 min e inmediatamente tratados con 1.9 mM 6-DMAP (D2629) en SOF por 3 h. Luego del tratamiento con 6-DMAP los ovocitos activados se lavaron con TALP-H y fueron cultivados como se describe luego.

9.3.4 *TUNEL y microscopía confocal*

El ensayo fue realizado como se describió en el capítulo anterior, inciso 8.3.10.

9.3.5 *Cultivo de células somáticas*

Los fibroblastos utilizados para realizar la SCNT fueron obtenidos del cultivo de una muestra de piel de aproximadamente 1cm³ de la ingle de un gato doméstico y de un gato bengal. Las muestras de tigre fueron obtenidas del cartílago de la oreja de animales muertos al nacer y las de chita de biopsias de piel. En todos los casos, se realizó un cultivo primario que consistió en cortar la muestra varias veces y cultivar los pequeños pedacitos en placas de Petri para permitir que las células comiencen a crecer sobre el plástico. El medio de cultivo utilizado para las muestras de gato doméstico y de gato bengal fue DMEM (11885, Gibco), suplementado con 10% v/v SFB y 1% v/v de antibiótico (penicilina-estreptomicina,

Gibco 15140-122). Para las biopsias de tigre y chita el medio de cultivo consistió en DMEM suplementado con 10% SFB, 0,292 mg/ml L-Glutamina (25030-149, Gibco), 2,5 µg/ml fungizona amfotericina B (15290-018, Gibco) y penicilina-estreptomina 100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente. Para todas las muestras las condiciones de cultivo fueron 5%CO₂, 90% de humedad y 39°C. Luego de establecer el cultivo primario, los fibroblastos fueron sub-cultivados cada 4-6 días, congelados en medio DMEM con 10% SFB y 10% DMSO, y conservados en nitrógeno líquido. Para el procedimiento de clonación, se indujo la quiescencia de las células dejando el cultivo en confluencia por entre 2 a 5 días. Las células fueron levantadas con tripsina 30 min antes de la SCNT o SCNTi, luego fueron lavadas y resuspendidas con el mismo medio de cultivo.

9.3.6 Preparación de los ovocitos

Luego de 22 h de MIV, los COCs fueron desnudados de las células del cúmulus como se describió anteriormente, inciso 8.3.4.

Enucleación de ovocitos con ZP: Antes de la enucleación, los ovocitos maduros fueron incubados en microgotas de 100 µl con 4 µM Demecolcina (D1925) por 1 h, con el objetivo de generar una protrusión en la zona donde se encuentra el núcleo. Luego fueron teñidos con Hoëchst 33342 (H33342) por 15 min. La enucleación fue realizada por micromanipulación mediante la utilización de una aguja con bisel con un diámetro interno de 20 µm y una aguja sostenedora de 120 µm con punta redonda para mantener inmóvil al ovocito durante el procedimiento.

Enucleación de ovocitos libres de ZP: Antes de la enucleación los ovocitos maduros fueron incubados en 1,5 mg/ml pronasa (P-8811) en TALP-H por 3-8 min a 35°C con el objetivo

de remover la ZP. Luego, fueron cultivados individualmente en demecolcina y Hoëchst 33342 como se describió anteriormente. A diferencia de la enucleación de los ovocitos con ZP, el núcleo fue aspirado por micromanipulación utilizando una aguja sin bisel con un diámetro interno de 20 μm y una aguja de 120 μm con punta redonda cerrada como soporte.

En ambos procedimientos la enucleación fue realizada aspirando la protrusión formada por la demecolcina y luego se confirmó la remoción total del núcleo mediante la observación de la metafase en la aguja con luz UV.

9.3.7 *Transferencia nuclear de células somáticas*

La reconstitución del embrión por transferencia nuclear fue realizada de tres maneras diferentes. Los ovocitos con ZP enucleados fueron reconstituidos a partir de la inyección intracitoplasmática de la célula, o de la inyección de la célula en el espacio perivitelino seguido por la fusión de la misma. Los ovocitos sin ZP en cambio, fueron reconstituidos luego de fusionar la célula al ovoplasto. A continuación se describen las tres técnicas mencionadas:

Fusión con ZP: Para fusionar una célula en un ovocito enucleado con ZP, ésta fue introducida en el espacio perivitelino utilizando la misma aguja que para el procedimiento de enucleación. Luego, las duplas fueron sumergidas en medio de fusión [0.3M mannitol (M9546), 0.1 mM MgSO₄ (A665286 525, Merck, Darmstadt, Alemania), 0.05 mM CaCl₂ (C7902), y 1 mg/ml polyvinyl alcohol (P8136)] por 30 s y luego se colocaron en la cámara de fusión con 2 ml de medio a 30°C. La fusión de las membranas se consiguió mediante 2 pulsos eléctricos de CD de 2.4 KV/cm por 30 μs , separados por 0,1 s entre ellos. Luego de la administración de los pulsos, las duplas fueron colocadas en medio SOF.

Inyección con ZP: Este procedimiento fue realizado en ovoplastos enucleados con ZP. En primer lugar se aspiró un fibroblasto de Gd con la aguja de inyección (10 μm de diámetro) y fue introducido y expulsado de la pipeta varias veces para permitir la ruptura de la membrana plasmática. Luego de atravesar la ZP, se aspiró la membrana del ovoplasto hasta lograr su ruptura y se depositó la célula dentro del mismo. Una vez realizada la inyección, los embriones reconstituidos fueron colocados en medio SOF.

Fusión sin ZP: Los ovocitos sin ZP enucleados se transfirieron individualmente a una microgota de 50 μl de 1 mg/ml fitohemaglutinina (PHA; L8754) disuelta en medio TCM-199. Luego de 3-5 s, fueron colocados sobre un fibroblasto (de Gd, Be, Ch o Ti); como consecuencia ambas estructuras se mantuvieron unidas. La fusión se indujo de manera similar que en los ovocitos con ZP descrita anteriormente, pero con 2 pulsos de 1,4 kV/cm por 30 μs , separados por 0,1 s. Luego de suministrar el pulso eléctrico, las duplas fueron colocadas individualmente en microgotas de 5 μl de medio SOF.

Tanto en el grupo “Fusión con ZP” como en el grupo “Fusión sin ZP”, la fusión de la célula fue confirmada 20 min después de suministrar el pulso eléctrico, tras confirmar la presencia o ausencia del fibroblasto en el espacio perivitelino o unido al ovocito enucleado libre de ZP. Cuando fue necesario se realizó una segunda fusión de las duplas.

Dos horas después de la inyección o la fusión, los embriones reconstituidos se activaron con 5 μM ionomicina (I24222; Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) en TALP-H por 4 min y luego fueron tratados con 1.9 mM 6-DMAP por 3 h. Como control de la activación y del cultivo, algunos ovocitos maduros con ZP o sin ZP se activaron partenogenéticamente utilizando el mismo protocolo que para los embriones de SCNT.

9.3.8 Fecundación *in vitro*

Para los ensayos de FIV se utilizaron espermatozoides epididimarios de gato doméstico que fueron congelados y descongelados como se describió en el capítulo anterior, incisos 8.3.5 y 8.3.6. Como medio de fecundación se utilizó el medio Talp-fert (Parrish y col. 1988). Los espermatozoides fueron diluidos a una concentración final de $1.5-2.5 \times 10^6/\text{ml}$ y co-incubados con los COCs maduros en microgotas de 50 μl , por 20 h a 39°C en atmósfera húmeda de 5% CO_2 en aire. Transcurrido el tiempo de co-incubación, los presuntos cigotos se lavaron tres veces con TALP-H y se cultivaron como se describe a continuación.

9.3.9 Cultivo de embriones

Los embriones reconstituidos con ZP, los embriones partenogénéticos con ZP y los embriones de FIV se cultivaron en microgotas de 100 μl de medio SOF suplementado con 2,5% v/v SFB. Los embriones reconstituidos sin ZP y los embriones partenogénéticos sin ZP fueron cultivados utilizando el mismo medio, pero de manera individual, en un sistema de micropozos descrito anteriormente por nuestro grupo (Gambini y col. 2012). Para el experimento de SCNTi, los embriones reconstituidos se cultivaron de a 1 embrión por micropozo o de a 2 embriones por micropozo (embriones agregados). En todos los casos se utilizó una mezcla de gases de 5% CO_2 , 5% O_2 y 90% N_2 y una temperatura de 39°C para el cultivo de los embriones. El medio fue cambiado el 100% a día 2 y luego suplementado con 10% SFB a día 5. El clivaje fue observado a las 48 h de la activación, la formación de mórulas a día 5 y la formación de blastocistos a día 8. El porcentaje de blastocistos fue calculado por embrión y por ovocito para determinar la eficiencia de nuestro método. Los blastocistos obtenidos se fijaron y conservaron a 4°C para realizar los ensayos de

inmunocitoquímica descriptos a continuación o se guardaron en 30 μ l de ARNlater (AM7020, Ambion, Austin, TX, USA) a -20°C hasta los análisis de expresión génica.

9.3.10 Inmunicitoquímica

Los blastocistos generados por SCNT, SCNTi, y FIV se analizaron por inmunocitoquímica para determinar la expresión de la proteína OCT4. Brevemente, los embriones fueron fijados por 20 min en 4% v/v de paraformaldehído (F1635) en solución tampón fosfato y permeabilizados por 15 min con 0,2% v/v Tritón X-100 (T9284). Las uniones no específicas se bloquearon tras una incubación por 30 min con 3% v/v SFB y 0,1% v/v Tween-20 (Promega, H5152) en DPBS (solución de bloqueo). Se realizó la incubación por 1 h con el anticuerpo primario contra OCT4 (anticuerpo policlonal con IgG cabra, SC-8628 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) diluido 1:100 en solución de bloqueo. Los embriones fueron luego enjuagados en solución de bloqueo por 15 min. La incubación con el anticuerpo secundario diluido 1:1000 (Alexa 488-burro anti IgG de cabra, A11055, Molecular Probes Inc. Eugene, OR, EEUU) se realizó por 45 min a temperatura ambiente en oscuridad. Los núcleos celulares fueron teñidos con 30 $\mu\text{g/ml}$ ioduro de propidio (P4170) por 20 min en oscuridad. Los blastocistos marcados se montaron en portaobjetos con 70% v/v glicerol-solución de bloqueo y se conservaron a 4°C hasta la evaluación por microscopio de fluorescencia. Se realizaron controles negativos que consistieron en incubar a los blastocistos sólo con el anticuerpo secundario.

9.3.11 Microscopía de escaneo confocal láser

El análisis de los embriones sometidos a inmunocitoquímica se realizó en un microscopio de escaneo confocal láser Nikon C.1. Una longitud de onda de excitación de 488 nm fue

seleccionada usando un láser de argón-ión para excitar al anticuerpo secundario conjugado con Alexa y una longitud de onda de 544 nm, para excitar al yoduro de propidio. Las imágenes de secciones ópticas seriadas se registraron cada 1.5 a 2 μm de paso vertical a lo largo del eje Z de cada embrión. Las imágenes tridimensionales se construyeron utilizando el software EZ-C1 2.20. Estas imágenes fueron utilizadas para contar el número total de células de los blastocistos y las células OCT4 con marcación positiva (OCT4+).

9.3.12 Análisis de expresión génica

Para el análisis de expresión génica, los blastocistos de gato doméstico, chita y bengal se agruparon de la siguiente manera: Gd1X, Gd2X, Ch2X, Be1X y Be2X, cuatro réplicas de tres blastocistos cada una; Ch1X, dos réplicas de dos blastocistos cada una y una réplica de un blastocisto; FIV, tres réplicas de tres blastocistos cada una. No se realizó análisis de blastocistos de tigre debido a la poca disponibilidad de embriones de esta especie. Los embriones se trataron con una solución tampón de lisis, utilizando el kit Cells-to-cDNATM II (Ambion Co., Austin, TX, EEUU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y fueron lavados 2 veces en DPBS para eliminar el ARN later. Luego se adicionó 100 μl de solución tampón de lisis y se incubaron 10 min a 75°C. Todas las muestras se trataron con DNasa I (0.04 U/ μl) para la digestión genómica del ADN. Para la conversión a ADNc, se utilizó 10 μl del ARN total en 20- μl de la reacción final la cual estaba conformada por 5 μM de cebadores, 10 mM de cada dNTP, 2 μl de solución tampón (10 \times), 10 U de inhibidor de RNasa, y 200 U/ml M-MuLV (Ambión). Los parámetros del ciclado fueron: 70°C por 3 min, 42°C por 60 min, y 92°C por 10 min. Los ADNc producidos fueron mantenidos a -20°C hasta ser utilizados para la PCR.

El análisis de expresión génica se realizó por qPCR en tiempo real utilizando el método de curva estándar. La curva estándar para cada gen fue realizada con los productos de PCR, eluidos desde el gel de agarosa utilizando un kit de extracción (Omega Biotek, Santiago, Chile) y cuantificados por Epoch. Se realizaron luego diluciones seriadas de los productos de PCR. Se incluyeron al menos 8 puntos en cada curva estándar para asegurar que la eficiencia de la reacción se encuentre entre el 90 y 110 %. Los cebadores para cada gen utilizados en la PCR se enumeran en la tabla 6. El punto de cruzamiento (CP, por Crossing Point) y la eficiencia de la amplificación fueron calculados por el programa built-in. En todas las qPCRs, se utilizó el gen *GAPDH* como control interno.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores y condiciones para realizar la qRT-PCR

| Genes | Secuencia de los cebadores | T° de apareamiento (°C) | Longitud del producto (pb) | N° de acceso |
|--------------|---|-------------------------|----------------------------|----------------|
| <i>OCT4</i> | F: 5'- CCGAAAGAGAAAGCGAACAAG 3' R: 5'- GACCACATCCTTCTCCAGC 3' | 58°C | 136 | NM_001173441.1 |
| <i>NANOG</i> | F: 5'- CAGCCCCAGATACAGTTACAG 3' R: 5'- GCTGGGCACTAAAATACTTGG 3' | 58°C | 115 | NM_001173442.1 |
| <i>SOX2</i> | F: 5'- ATGCACAACCTCGGAGATCAG 3' R: 5'- TTTATAATCCGGGTGCTCCTTC 3' | 58°C | 132 | NM_001173447.1 |
| <i>CDX2</i> | F: 5'- CAGTGAAAACCAGGACGAAAG 3' R: 5'- CCGGATGGTGATGTAACGAC 3' | 55°C | 104 | XM_003980306.1 |
| <i>GAPDH</i> | F: 5'- AAGGCTGAGAACGGGAAAC 3' R: 5'- CATTGATGTTGGCGGGATC 3' | 58°C | 80 | NM_001009307.1 |

9.3.13 Sincronización de celo y transferencia de embriones

Las gatas fueron confinadas en un cuarto en el que se las mantenía con 14 h de luz diaria para permitir que ciclen todo el año. Se evaluaron diferentes protocolos de sincronización de celo en 5 gatas adultas diferentes de buena condición corporal. Dos gatas se trataron con 2 mg de FSH durante 3 días para inducir el crecimiento folicular y luego 100 UI de hCG para inducir la ovulación. Las tres gatas restantes no se sincronizaron hormonalmente sino que se esperó el celo natural. Tras un seguimiento del comportamiento y ecográfico (ecógrafo modelo My Lab 30 Gold, marca Esaote) de los folículos ováricos, se indujo ovulación cuando estos alcanzaron los 2.5-3 mm de diámetro. Para estimular la ovulación, una de las gatas fue tratada con 100UI de hCG+estimulación mecánica (estimulación vaginal simulando el coito con un hisopo), y las otras dos gatas se estimularon sólo mecánicamente sin administración de hCG. Las transferencias embrionarias se realizaron como se describió en el inciso 8.3.10, en un quirófano de la Universidad Maimónides. Las gatas fueron anestesiadas con xilacina 0.5 m/kg y ketamina de 4 mg/kg intramuscular para realizar el procedimiento. Sólo se transfirieron las gatas que presentaban cuerpo lúteo en el momento de la transferencia, sin ningún folículo ovárico (Figura 9). Los embriones transferidos correspondieron al grupo Gd2X.

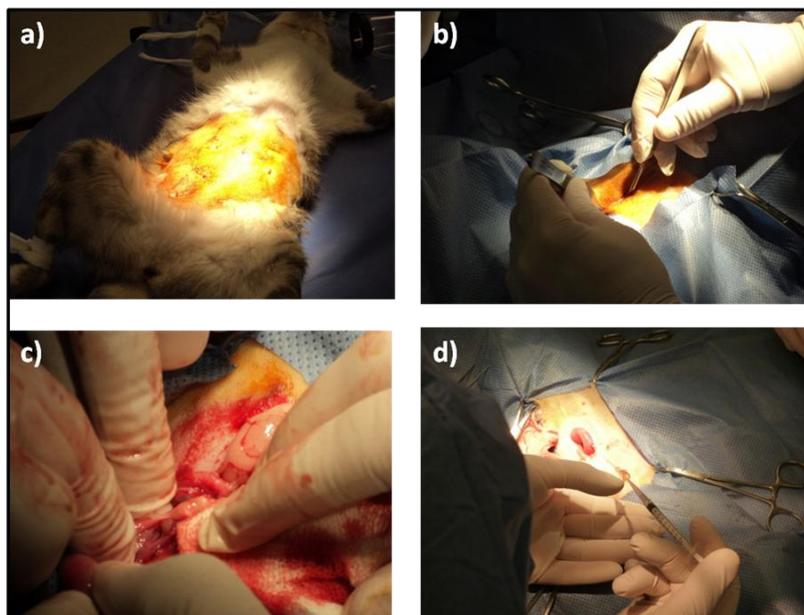


Figura 9. Transferencia de embriones de gato doméstico obtenidos por SCNT y agregación embrionaria. a,b) Preparación de la gata para la exteriorización del cuerno uterino y transferencia de los embriones, c) Ovario con cuerpo lúteo, d) Deposición de los embriones en el cuerno uterino.

9.3.14 Análisis estadístico

El desarrollo *in vitro* de los embriones se comparó mediante la prueba de Fisher. Las diferencias en el número total de células y en el número de células OCT4+ se analizaron mediante Proc Mixed, considerando la heterogeneidad de varianzas y adaptando los grados de libertad por Kenward-Royer. Para este análisis estadístico se utilizó el programa SAS. La proporción de células OCT4+ respecto al total de células se analizó mediante la prueba de diferencia de proporciones utilizando el programa InfoStat versión 2007. El análisis de los datos de expresión génica fue realizado utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron significativas cuando presentaron un nivel de significación inferior al 0.05 ($p < 0.05$).

9.4 Resultados

9.4.1 Desarrollo *in vitro* de embriones partenogénéticos de gato doméstico utilizando diferentes condiciones, y ensayo de TUNEL

Los resultados de desarrollo *in vitro* de embriones de gato doméstico activado partenogénicamente con diferentes condiciones durante la maduración de los ovocitos y el cultivo embrionario están resumidos en la Tabla 7. La tasa de clivaje más alta se observó en el grupo pITS-21%O₂ (85% vs. 66.2%, 75% y 68.9% para los grupos pMM-21%O₂, pMM-5%O₂ y pITS-5%O₂, respectivamente). Sin embargo, las tasas de blastocisto fueron mayores ($p < 0.05$) en ambos grupos cultivados con 5% O₂, independientemente de la suplementación con ITS (34.6% y 38.7% para los grupos pMM-5%O₂ y pITS-5%O₂, respectivamente).

Además determinamos la presencia de núcleos fragmentados en blastocistos partenogénéticos de gato utilizando el ensayo de TUNEL (Tabla 8, Figura 10). El número de células de los blastocistos fue mayor en el grupo pITS-5%O₂ comparado al grupo pMM-21%O₂ (161.7 ± 34.4 y 86.7 ± 11.4 , respectivamente). Con respecto a la fragmentación del ADN, observamos los mismos resultados que para los grupos de ICSI en el capítulo anterior, el tratamiento con mayor cantidad de células TUNEL+ y con mayor índice de fragmentación nuclear fue la suplementación con ITS en el medio de maduración y baja tensión de oxígeno durante el cultivo embrionario (grupo pITS-5%O₂).

Tabla 7. Desarrollo de embriones de gato doméstico obtenidos por activación partenogenética utilizando diferentes medios de maduración y cultivo.

| | Grupos | n | Clivados (%) | Blastocistos (%) |
|----------------|------------------------|-----|------------------------|------------------------|
| Partenogénesis | pMM-21%O ₂ | 121 | 80 (66.2) ^a | 21 (17.4) ^a |
| | pMM-5%O ₂ | 104 | 78 (75) ^{ab} | 36 (34.6) ^b |
| | pITS-21%O ₂ | 113 | 96 (85) ^b | 25 (22) ^a |
| | pITS-5%O ₂ | 119 | 82 (68.9) ^a | 46 (38.7) ^b |

(a,b) Los valores con diferentes superíndices en una columna son estadísticamente diferentes (P<0.05, prueba de Fisher). MM, medio de maduración sin ITS; ITS, medio de maduración con ITS; 21%O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno atmosférica; 5%O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno del 5%.

Tabla 8. Evaluación del número de células y fragmentación de ADN por ensayo de TUNEL en blastocistos partenogenéticos obtenidos por diferentes tratamientos.

| Grupos | n | N° de células de los blastocistos | Células TUNEL+ | Índice de |
|------------------------|----|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|
| | | Promedio ± SEM | Pomedio ± SEM | fragmentación* |
| pMM-21%O ₂ | 11 | 86.7 ± 11.4 ^a | 34.7 ± 4.6 ^a | 40 ^a |
| pMM-5%O ₂ | 5 | 77.4 ± 14.3 ^{ab} | 30.2 ± 4 ^a | 39 ^a |
| pITS-21%O ₂ | 5 | 110.6 ± 21.6 ^{ab} | 48 ± 11.2 ^a | 44 ^a |
| pITS-5%O ₂ | 6 | 161.7 ± 34.4 ^b | 118 ± 21.2 ^b | 73 ^b |

(a,b) Los valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes. Para el número de células de los blastocistos y el número de células TUNEL+ se utilizó Proc Mixed (p<0.05). Para el índice de fragmentación, se utilizó la prueba de diferencias de proporciones (p<0.05). MM, medio de maduración sin ITS; ITS, medio de maduración con ITS; 21%O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno atmosférica; 5%O₂, cultivo embrionario en presión de oxígeno del 5%. * Para calcular el índice de fragmentación, el promedio de células TUNEL+ de cada grupo se dividió por el promedio del número de células de los blastocistos.

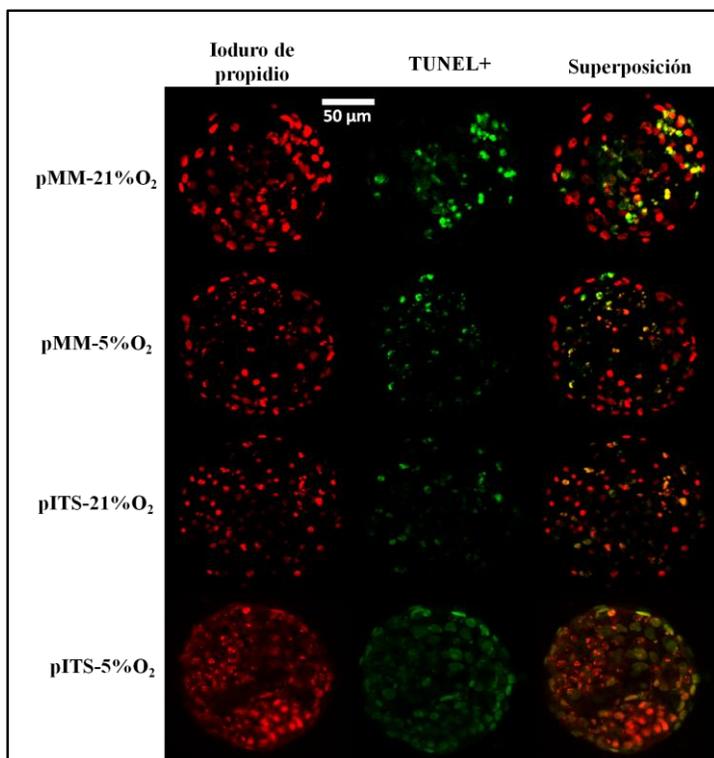


Figura 10. Blastocistos producidos por activación partenogenética utilizando diferentes condiciones, analizados por ensayo de TUNEL para determinar la presencia de ADN fragmentado. Las células con marcación TUNEL positivo (TUNEL+) están marcadas con fluoresceína-12-dUTP (verde) y los núcleos están teñidos con ioduro de propidio (rojo).

9.4.2 Desarrollo *in vitro* de embriones de gato doméstico reconstituidos por tres técnicas de clonación homoespecífica diferentes

Los resultados relacionados con el desarrollo de embriones de gato doméstico reconstituidos utilizando diferentes estrategias de transferencia nuclear se muestran en la Tabla 9. Se observó que la fusión y el total de embriones cultivados fueron mayores cuando se utilizaron embriones libres de ZP. Las tasas de clivaje fueron menores en el grupo de inyección pero las tasas de mórulas y de blastocisto fueron similares entre los tres grupos de clonación. A pesar de haber alcanzado una tasa similar de blastocistos, los embriones clones libres de ZP expandieron en mayor proporción y mostraron el mayor número de células (Tabla 9, Figura 11). Respecto al control de embriones partenogenéticos, ambos grupos mostraron tasas similares de desarrollo y número de células a pesar de las diferentes condiciones de cultivo utilizadas. Con estos resultados, decidimos realizar clonación libre de ZP para los siguientes experimentos y para la SCNTi.

Tabla 9. Desarrollo *in vitro* de embriones de gato doméstico reconstituido utilizando tres técnicas de SCNT diferentes.

| Groups | n | Fusionados (%) | Cultivados (%) | Clivados* (%) | Morulas* (%) | Blastocistos* (%) | Bl. expandidos** (%) | Nº células Bl. |
|------------------|----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Fusión con ZP | 71 | 18 (25.4) ^a | 18 (25.4) ^a | 17 (94.4) ^a | 4 (22.2) ^a | 2 (11.1) ^a | 0 ^a | 89 ^{ab} |
| Inyección con ZP | 75 | - | 45 (60) ^b | 26 (57.8) ^b | 10 (22.2) ^a | 5 (11.1) ^a | 1 (16.2) ^b | 77.2±6 ^a |
| Fusión sin ZP | 98 | 81 (82.7) ^b | 71 (72.5) ^c | 55 (77.5) ^a | 23 (32.4) ^a | 9 (12.7) ^a | 7 (77.8) ^c | 177.9±52.6 ^b |
| AP con ZP | 88 | - | 88 (100) ^d | 72 (81.8) ^a | 54 (61.4) ^b | 42 (47.7) ^b | 22 (52.4) ^c | 221±57 ^b |
| AP sin ZP | 77 | - | 77 (100) ^d | 60 (77.9) ^a | 46 (59.7) ^b | 38 (49.4) ^b | 26 (68.4) ^c | 240±77 ^b |

(a,b,c) Los valores con diferentes superíndices en una columna son estadísticamente diferentes (P<0.05, prueba de Fisher). AP, embriones activados partenogénicamente; ZP, zona pelúcida.

* Calculado respecto a embriones cultivados.

** Calculado respecto a blastocistos totales.

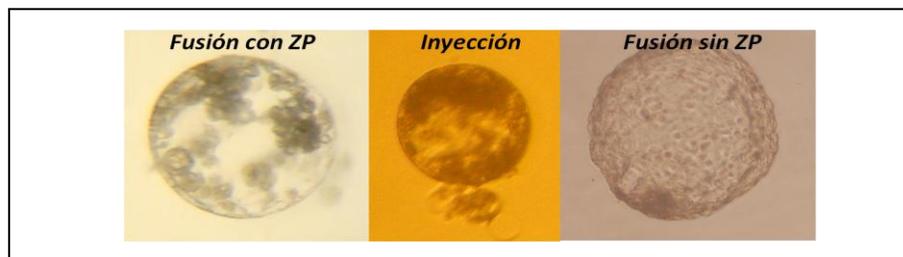


Figura 11. Blastocistos de gato doméstico generados por tres técnicas de clonación diferentes

9.4.3 Efecto de la agregación embrionaria en el desarrollo in vitro y la calidad de los blastocistos en embriones de gato doméstico, bengal, tigre y chita producidos por clonación

Los resultados de desarrollo incluyendo clivaje, mórula y blastocistos se muestran en la Tabla 10. Las tasas de clivaje fueron aumentadas en los embriones agregados respecto a los embriones no agregados. Por otra parte, los embriones generados por SCNTi clivaron de manera similar que los embriones de gato doméstico tanto para los grupos 1X como 2X. También observamos que la mayoría de los embriones clivados no agregados se habían dividido 3 veces a día 2 en todas las especies, alcanzando entre 5 y 8 blastómeras. Este patrón de desarrollo tan marcado no se observó en los embriones agregados, sino que hubo menos embriones con una sola división (o sea embriones con 4 blastómeras), y la cantidad de divisiones a día 2 fue propia de cada especie (Figura 12).

Respecto a la formación de blastocistos, se observó un aumento en las tasas de blastocisto en todos los grupos experimentales utilizando agregación. Además, la agregación no implicó el uso de ovocito adicionales para obtener la misma proporción de blastocistos en gato doméstico, chita y tigre (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de la agregación de embriones clones sin ZP en el desarrollo *in vitro* de embriones de gato doméstico, gato bengal, tigre y chita

| Grupos | Embriones reconstituidos (E.R.) | Embriones en cultivo (pozos) | Clivaje (%) | Morulas (%) | Blastocistos (%) | Blastocistos/E.R (%) |
|--------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| Gd1X | 113 | 113 | 99 (87.6) ^{ac} | 43 (38) ^{ab} | 31 (27.4) ^{ad} | 27.4 ^{ac} |
| Gd2X | 218 | 109 | 107 (98.2) ^{bd} | 54 (49.5) ^a | 52 (47.7) ^b | 23.8 ^{ac} |
| Ch1X | 102 | 102 | 89 (87.2) ^{ac} | 39 (38.2) ^{ab} | 17 (16.7) ^c | 16.7 ^b |
| Ch2X | 182 | 91 | 88 (96.7) ^d | 34 (37.4) ^{ab} | 26 (28.6) ^d | 14.3 ^b |
| Be1X | 154 | 154 | 129 (83.8) ^a | 49 (31.8) ^b | 48 (33.3) ^a | 33.3 ^c |
| Be2X | 210 | 105 | 98 (93.3) ^{cbd} | 52 (49.5) ^a | 46 (43.8) ^b | 21.9 ^{ab} |
| Ti1X | 63 | 63 | 59 (93.7) ^{ad} | 11 (17.5) ^c | 2 (3.2) ^e | 3.2 ^d |
| Ti2X | 132 | 66 | 63 (95.9) ^{cd} | 16 (24.2) ^{cb} | 8 (12.1) ^{ce} | 6.1 ^d |
| FIV | - | 121 | 42 (34.7) ^e | 34 (28.1) ^{bc} | 34 (28.1) ^{ad} | - |

(a,b,c,d,e) Los valores con superíndices diferentes en una columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$, prueba de Fisher).

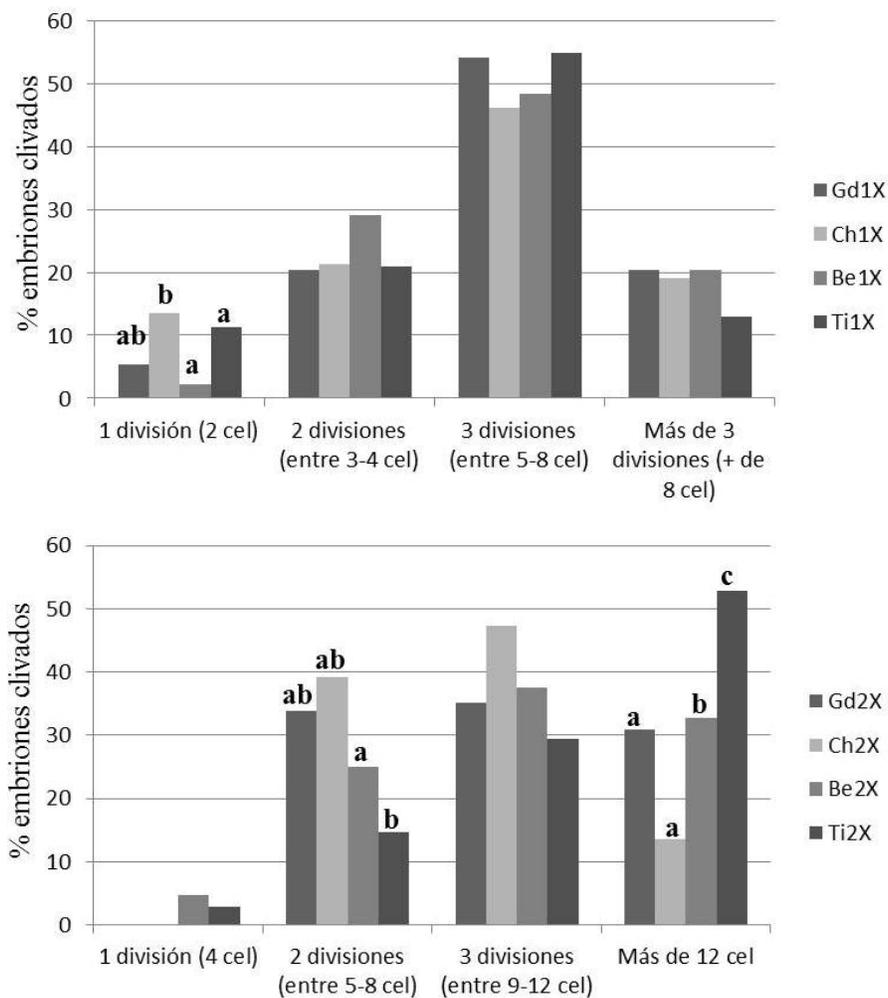


Figura 12. Cantidad de divisiones celulares de los embriones clivados luego de 43 h de cultivo. (a,b) Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes entre embriones de diferente especie con igual cantidad de divisiones ($P < 0.05$, prueba de Fisher).

El número total de células y la expresión de OCT4 de blastocistos clones de día 7 de todas las especies se muestra en la tabla 12. No se observaron diferencias entre los grupos respecto al número total de células y las células OCT4+. Sin embargo, el promedio del número de células de los embriones agregados de cada especie duplica el promedio de número de células de los embriones no agregados en todos los grupos. El porcentaje de células OCT4+ fue marcadamente mayor en los embriones interespecíficos clonados respecto a los embriones clonados de gato doméstico y de bengal (Figura 13).

Tabla 12. Número de células y células OCT4+ en blastocistos de gato doméstico, bengal, tigre y chita producidos por SCNT libres de zona pelúcida.

| | n | N° de células promedio±SEM | Células OCT-4+ promedio±SEM | Células OCT-4+/n° de células |
|-------------|----------|---------------------------------------|--|---|
| Gd1X | 10 | 385.1±127.4 ^{ab} | 216.1±103.3 | 51 ^a |
| Gd2X | 12 | 625.7±182.8 ^a | 296.8±118.3 | 47.4 ^b |
| Be1X | 12 | 278.3±61.9 ^{ab} | 129±22.6 | 46.3 ^{bc} |
| Be2X | 12 | 516.8±103.6 ^a | 234.4±59.6 | 45.4 ^c |
| Ti1X | 1 | 41 ^{ab} | 40 | 97.6 ^d |
| Ti2X | 2 | 220±60 ^{ab} | 190±63 | 86.4 ^e |
| Ch1X | 6 | 119.3±58.4 ^b | 144.3±66.6 | 82.7 ^{ef} |
| Ch2X | 5 | 400.8±274.2 ^{ab} | 321.4±96.6 | 80.2 ^f |
| FIV | 8 | 140.7±14.5 ^b | 105±15.8 | 74.6 ^g |

(a,b,c,d) Los valores con diferentes superíndices en una columna son significativamente diferentes. Para el número de células de los blastocistos y células OCT4+ se utilizó Proc Mixed (p<0.05). Para células OCT4+/n° de células se utilizó la prueba de diferencia de proporciones (p<0.05).

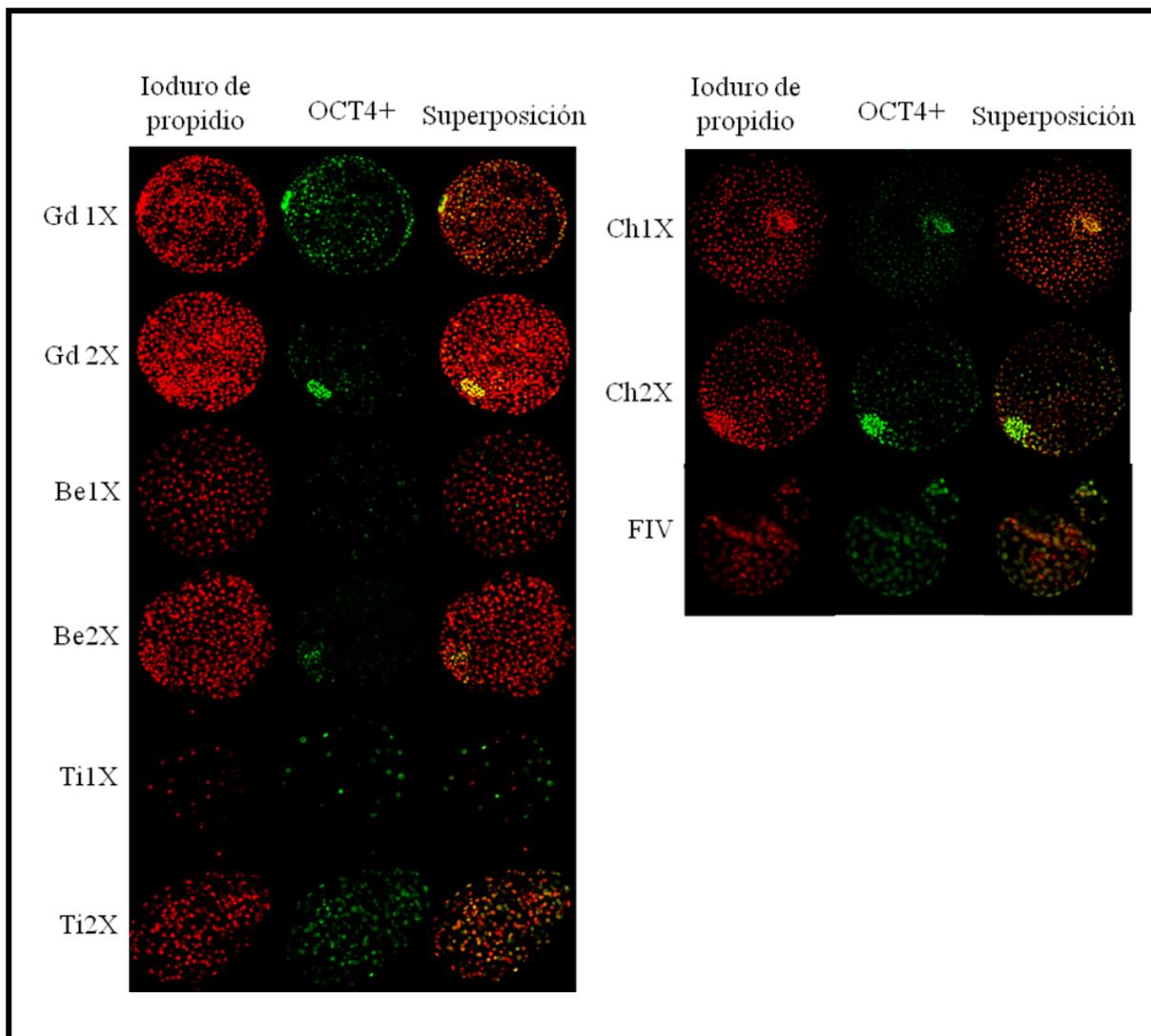


Figura 13. Número de células y expresión de OCT4 en blastocistos de gato doméstico (Gd), Bengal (Be), Tigre (Ti) y chita (Ch) generados por clonación (con o sin agregación) y blastocistos de fecundación *in vitro* (FIV). Los núcleos se muestran en rojo y la marcación de OCT4 en verde (alexa fluor 488).

Los blastocistos fueron clasificados de acuerdo a su morfología en grado 1, grado 2 y grado 3. Esta clasificación mostró un incremento en blastocistos de grado 1 en el gato doméstico y disminución en blastocistos de grado 3 de tigre, cuando se realizó agregación embrionaria (Tabla 13).

Tabla 13. Clasificación morfológica de los blastocistos generados por agregación y sin agregación de todas las especies

| Clasificación morfológica | | | | | Diámetro de los blastocistos | | | | | |
|---------------------------|-----|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| Grupos | n | Grado 1 (%) | Grado 2 (%) | Grado 3 (%) | n | 80–150 μm (%) | 151–190 μm (%) | 191–230 μm (%) | 231–270 μm (%) | +270 μm (%) |
| Gd1X | 31 | 5 (16.1) ^a | 11 (34.5) ^a | 15 (48.4) ^{ad} | 19 | 2 (10.5) ^{ac} | 3 (15.8) ^a | 4 (21) ^a | 6 (31.6) ^a | 4 (21) ^a |
| Gd2X | 49 | 18 (36.7) ^{bc} | 16 (32.6) ^a | 15 (30.6) ^{ac} | 38 | 1 (2.6) ^c | 7 (18.4) ^a | 8 (21) ^a | 9 (23.7) ^a | 13 (34.2) ^a |
| Be1X | 19 | 9 (47.4) ^c | 9 (47.4) ^a | 1 (5.2) ^b | 15 | 2 (13.3) ^{abc} | 0 ^a | 1 (6.7) ^a | 2 (13.3) ^a | 10 (66.7) ^b |
| Be 2X | 39 | 17 (43.6) ^c | 12 (30.8) ^a | 10 (25.6) ^{bc} | 35 | 5 (14.3) ^{ac} | 7 (20) ^a | 6 (17.1) ^a | 5 (14.3) ^a | 12 (34.3) ^a |
| Ti1X* | 2 | 0 | 0 | 2 (100) | 2 | 2 (100) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ti2X | 8 | 0 ^d | 3 (37.5) ^a | 5 (62.5) ^{ad} | 8 | 3 (37.5) ^{ab} | 1 (12.5) ^a | 2 (25) ^a | 0 ^a | 2 (25) ^a |
| Ch1X | 17 | 2 (11.8) ^{ad} | 4 (23.5) ^{ab} | 11 (64.7) ^d | 14 | 6 (42.9) ^b | 3 (21.4) ^a | 2 (14.3) ^a | 2 (14.3) ^a | 1 (7.1) ^a |
| Ch2X | 25 | 4 (16) ^{abd} | 6 (24) ^{ab} | 15 (60) ^d | 25 | 10 (40) ^b | 5 (20) ^a | 1 (4) ^a | 5 (20) ^a | 4 (16) ^a |
| Total | 190 | 55 (28.9) | 61 (32.1) | 74 (38.9) | 156 | 31 | 26 | 24 | 29 | 46 |

(a,b,c,d) Los valores con diferentes superíndices en una columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, prueba de Fisher). *No se pudo realizar análisis estadístico sobre este grupo debido al bajo número de la muestra.

9.4.4 Efecto de la agregación y SCNTi en la expresión génica de OCT4, SOX2, CDX2 y NANOG de blastocistos de gato doméstico, bengal y chita generados por clonación

Con el objetivo de evaluar el efecto de la transferencia nuclear interespecífica y la agregación en la reprogramación celular de los clones, medimos la cantidad de ARNm de los genes asociados a pluripotencia y diferenciación temprana *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *CDX2*. Con este ensayo observamos que la expresión relativa de los cuatro genes era mayor en el grupo Gd1X respecto a los blastocistos FIV control. En cambio la expresión relativa de estos genes en el grupo Ch1X era menor que la del control. La expresión relativa de los genes en los embriones de bengal fue similar a la de los embriones de Gd1X para *SOX2*, similar a la de los embriones de Ch1X para *OCT4* y con niveles relativos de expresión intermedios para *NANOG* y *CDX2*.

Por otra parte, la agregación embrionaria afectó la expresión relativa de los genes evaluados. La expresión relativa de los cuatro genes se redujo significativamente en los blastocistos del grupo Gd2X respecto a los blastocistos Gd1X. Llamativamente, la expresión relativa de *SOX2* y de *NANOG* en los embriones agregados fue similar que la de los embriones control de FIV.

Con respecto a los embriones de chita, la cantidad relativa de RNA mensajero de *OCT4* y *CDX2* se vio significativamente reducida en los blastocistos Ch2X respecto a blastocistos Ch1X. La expresión de *NANOG* no se vio afectada por la agregación embrionaria y la expresión de *SOX2* se vio aumentada por la agregación embrionaria.

La comparación entre los blastocistos de los grupos Gd1X y Ch1X reveló que los embriones de chita tenían los cuatro genes sub-expresados respecto a los embriones clones de gato doméstico. Sin embargo, cuando comparamos Gd2X vs. Ch2X no observamos este patrón para la expresión de *SOX2*, ya que la expresión relativa de este gen era mayor en

blastocistos de chita agregados respecto a blastocistos de gato agregados. Todos estos resultados están resumidos en la Figura 14.

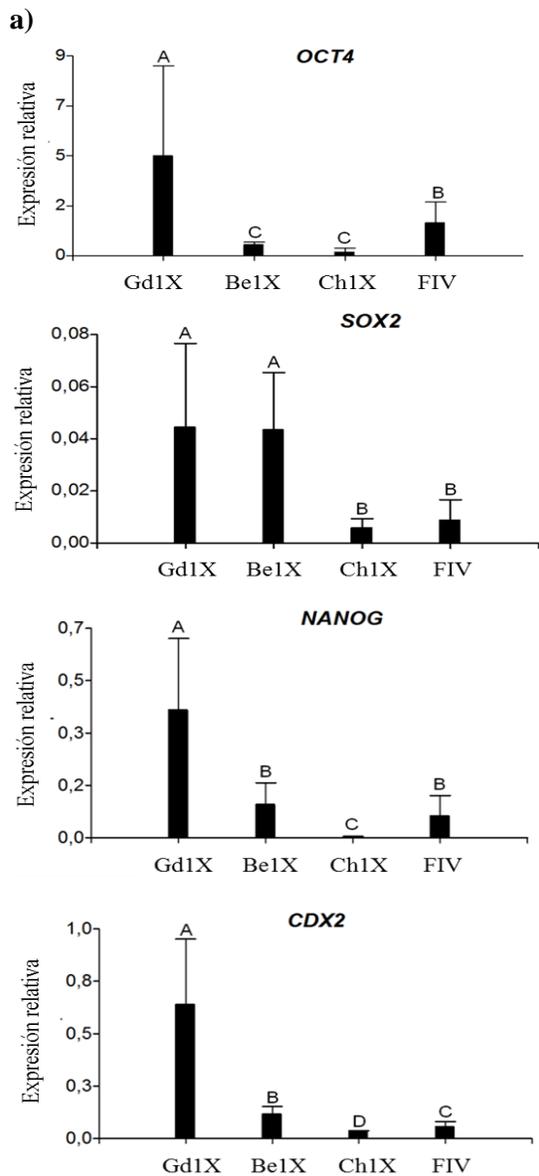
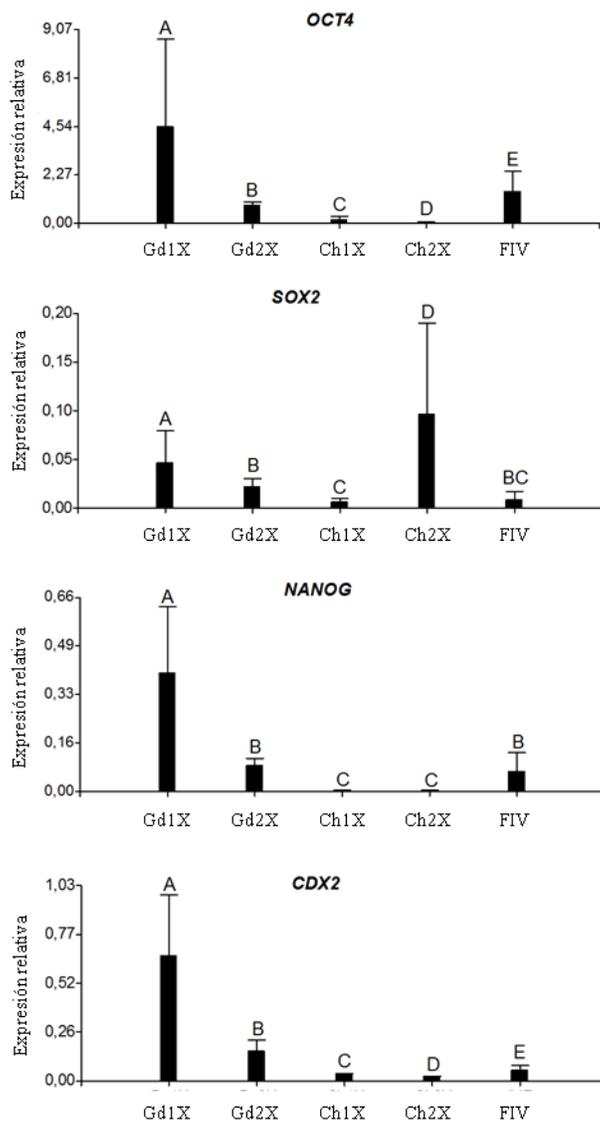


Figura 14. Abundancia relativa de los transcritos de los genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *CDX2* en a) blastocistos no agregados de gato doméstico, bengal y chita generados por SCNT, SCNTi y FIV (sólo gato doméstico), b) blastocistos de gato doméstico y de chita, agregados (2X) y no agregados (1X), generados por FIV (sólo gato doméstico), SCNT y SCNTi. Todos los transcritos fueron normalizados con el transcrito del gen *GAPDH*. (A,B) Diferentes letras corresponden a diferencias estadísticas entre cada expresión génica relativa ($p < 0.05$).

b)



9.4.5 Sincronización de celo y transferencia de embriones

Las dos gatas tratadas con FSH y hCG respondieron de manera diferente. Una de ellas alcanzó la ovulación y la otra no. Ambas presentaron folículos en el momento de la transferencia por lo que no se realizó el procedimiento en estas gatas. Las gatas a las que no se les administró FSH y se utilizó el celo natural ovularon las tres, pero sólo se transfirieron las dos a las que se les indujo ovulación mecánicamente, ya que la gata a la que también se

le administró hCG presentaba folículos en el momento de la transferencia. En una de las gatas se transfirieron 19 mórulas y en la otra 4 blastocistos y 2 mórulas, en ambos casos fueron embriones de gato doméstico del grupo Gd2X. La ecografía realizada 20 días después de la inducción de la ovulación no mostró presencia preñez en ninguna de las gatas.

9.5 Discusión

En este segundo capítulo nos focalizamos en la SCNT de gato doméstico y felinos silvestres. En primer lugar, se evaluaron diferentes condiciones de maduración y cultivo para embriones partenogénicos de gato doméstico y luego se realizaron técnicas de clonación alternativas en esta especie. El objetivo de ambos experimentos fue determinar las condiciones más eficientes para posteriormente realizar SCNTi con células de felinos silvestres. En la bibliografía relacionada a clonación en gato doméstico sólo se ha reportado la utilización de la técnica de fusión de la célula donante en ovocitos con ZP, por lo que las metodologías planteadas en la presente tesis doctoral profundizan el conocimiento en el área de clonación de felinos.

Con los resultados obtenidos en el ensayo con embriones partenogénicos, decidimos continuar los siguientes experimentos utilizando medio de maduración sin suplementación con ITS y realizando el cultivo de embriones en baja tensión de oxígeno, condiciones en las cuales la fragmentación del ADN era menor.

Con respecto al ensayo donde se evalúan tres técnicas de clonación diferente, en la Tabla 9 se puede observar que las tasas de fusión aumentaron significativamente en ausencia de ZP. Este aumento posiblemente esté relacionado a un mayor contacto de las membranas

plasmáticas dado por la utilización de fitohemaglutinina en la unión de la célula donante y el ovocito enucleado. Por otra parte, se dio especial importancia a la cantidad de cigotos reconstituidos que ingresaron a cultivo luego del proceso de clonación, independientemente de la capacidad de los mismos para desarrollar. Teniendo en cuenta este aspecto, los grupos “Fusión con ZP” e “Inyección con ZP” mostraron un menor número de embriones cultivados respecto al grupo “Fusión sin ZP”. Las causas fueron, bajas tasas de fusión y el daño mecánico ocasionado al ovocito tras inyectar la célula donante.

Con respecto al desarrollo embrionario, no se evidenciaron diferencias significativas en las tasas de mórulas compactas y blastocistos entre los tres grupos. Los controles fueron importantes para corroborar que la diferencia en el sistema de cultivo entre los embriones sin ZP y con ZP no se refleja en el desarrollo de los mismos. A pesar de obtener iguales tasas de blastocistos, el porcentaje de blastocistos expandidos fue mayor en los embriones que habían sido enucleados y fusionados sin ZP, y luego cultivados en un sistema de micropozos, lo que puede estar asociado con una mejor calidad de los mismos.

Con estos resultados concluimos que el método más eficiente de clonación en gato doméstico fue la fusión sin ZP y decidimos realizar esta técnica para la SCNTi con células de felinos silvestres. Con este estudio evaluamos la capacidad del ovoplasto de gata doméstica para reprogramar células de felinos silvestres y generar embriones hasta el estadio pre-implantatorio. Además de realizar SCNTi estudiamos el efecto de la agregación embrionaria para determinar si esta estrategia mejora la calidad de los embriones y aumenta la eficiencia de la técnica.

La SCNTi se ha evaluado en diferentes especies pero continua siendo ineficiente (Thongphakdee y col. 2006; Thongphakdee y col. 2010; Imsoonthornruksa y col. 2011). De

acuerdo a nuestros conocimientos, este trabajo es el primero que reporta la agregación como estrategia para analizar el desarrollo embrionario y la reprogramación nuclear en felinos y en embriones interespecíficos. Además, no se han producido anteriormente embriones de tigre o chita por clonación y son especies que se encuentran en la lista roja de especies amenazadas, de acuerdo a la IUCN (Durant y col. 2010). Este trabajo fue un desafío importante considerando que la capacidad de desarrollo de un embrión generado por SCNTi desciende a medida que aumenta la distancia taxonómica entre la célula y el ovocito (Beyhan y col. 2007). En este caso todas las especies pertenecen a la familia *Felidae*, pero el tigre y el chita están alejados filogenéticamente del gato doméstico ya que pertenecen a géneros diferentes (Johnson y col. 2006).

Efecto de la agregación y la interespecificidad en el desarrollo in vitro de embriones de gato doméstico, bengal, tigre y chita generados por clonación

En este trabajo alcanzamos altas tasas de desarrollo *in vitro* de embriones de gato doméstico, bengal, tigre y chita generados por clonación, especialmente cuando se utilizó agregación embrionaria. El clivaje no se vio afectado por el origen de la célula donante y fue comparable a resultados publicados previamente en otras especies de felinos (Hwang y col. 2001; Gómez y col. 2004a; Lorthongpanich y col. 2004; Gómez y col. 2004b; Gómez y col. 2006; Thongphakdee y col. 2010). Además, el clivaje se vio incrementado cerca de un 10% en los grupos agregados con respecto a los no agregados en cada especie. En el ratón fue reportado que en embriones de ICSI y clonación el clivaje es un mecanismo colectivo entre las blastómeras de un mismo embrión, lo que significa que si una célula se divide, la célula hermana también lo hace, con igual duración del ciclo celular (Balbach y col. 2012).

Por lo tanto, un mayor número de embriones cultivados juntos podría aumentar las probabilidades de que uno de ellos se divida y promueva la división del otro embrión cultivado a su lado. Esta interacción podría estar explicando también por qué las tasas de división difieren entre los embriones 1X y 2X. Los embriones 1X mostraron un patrón de división similar alcanzando la mayoría de los embriones entre 5-8 células a día 2, en cambio los embriones agregados no tuvieron este comportamiento y, en cambio, la cantidad de divisiones de los embriones fue variable. En el Gd2X y en el Ch2X, parecería que existiese un mecanismo compensatorio por el cual aumenta la cantidad de embriones con entre 5-8 blastómeras pero alcanzando este número con 2 divisiones celulares en lugar de 3. Sin embargo esto no se observa para los demás grupos y, al contrario, se obtuvieron más embriones con más de 12 blastómeras en los grupos Be2X y Ti2X. De esta manera, sólo podemos concluir que la agregación de alguna manera está afectando la velocidad de división de los embriones ya sea aumentándola como disminuyéndola.

Comparado con otros reportes, obtuvimos tasas mayores o iguales de formación de mórulas en embriones de gato doméstico clones (Gómez y col. 2003; Imsoonthronraksa y col. 2012; Thongphakdee y col. 2006). A pesar de estos resultados, solo el 40-50% de los embriones clivados fueron capaces de alcanzar este estadio. Este arresto antes de la formación de la mórula ha sido reportado previamente para embriones de gato cultivados *in vitro* (Kanda y col. 1995), sin embargo en nuestras condiciones no observamos este arresto para los embriones de FIV. En el gato doméstico, el arresto ha sido atribuido a una falla en las condiciones de cultivo o a la transición del control materno al control embrionario (Kanda y col. 1995). En otras especies ha sido demostrado que otra causa del arresto embrionario es la heteroplasma mitocondrial generada por la SCNT o la SCNTi, la cual podría causar

respiración mitocondrial insuficiente (Thongphakdee y col. 2008). Estas organelas están involucradas en el metabolismo celular con la producción de ATP, la regulación de la apoptosis, de la concentración del calcio y del envejecimiento celular (Wang y col. 2009). Una comunicación núcleo-citoplasma ineficiente para la regulación de la transcripción y la replicación del ADNmt puede llevar a una falla en el desarrollo embrionario. La herencia materna de las mitocondrias que ocurre en una fecundación y desarrollo embrionario normal no se aplica para la SCNT, y se observa heteroplasmia en la mayoría de los embriones reconstituidos (Hiendleder y col. 2003; Burgstaller y col. 2007; Yang y col. 2004).

Con respecto a las tasas de blastocistos, este parámetro fue beneficiado por la agregación embrionaria como fue previamente demostrado para otras especies (Pedersen y col. 2005, Zhou y col. 2008, Ribeiro y col. 2009, Gambini y col. 2012). Hubo un incremento de la capacidad de los embriones para transitar de mórula a blastocisto del 24% en el grupo Gd2X, del 34% en el grupo Ch2X y del 38% en el grupo Ti2X, respecto a sus respectivos grupos 1X. Por lo tanto, la agregación embrionaria redujo el arresto embrionario en este estadio. La calidad de los blastocistos también se vio incrementada con esta estrategia ya que obtuvimos más cantidad de blastocistos de grado 1 en el Gd2X y menos cantidad de blastocistos grado 3 en el Ti2X. Con todos estos resultados, podemos decir que la agregación embrionaria tiene un efecto positivo en el desarrollo *in vitro* de los embriones felinos generados por SCNT y SCNTi. Los efectos positivos de la agregación pueden deberse a un mayor número de células desde el inicio del cultivo embrionario, a una combinación epigenética dentro de cada embrión que compensa la reprogramación ineficiente de un embrión individual, o a un efecto de ambas hipótesis. La combinación

epigenética obtenida por la agregación de 2 embriones reconstituidos genéticamente idénticos pero que fueron reprogramados de manera diferente (Boiani y col. 2002; Park y col. 2002), podría compensar embriones individuales defectuosos aumentando la competencia de desarrollo de los agregados (Eckardt y Mc. Laughlin 2004; Balbach y col. 2012). De esta manera, la agregación podría hacer posible el desarrollo de un embrión completo aun si uno de los 2 embriones no fuera competente por sí solo.

Efecto de la clonación interespecífica y la agregación en la reprogramación nuclear

Para comprender mejor el efecto de la SCNTi y la agregación embrionaria, analizamos la expresión de *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *CDX2* en los blastocistos de gato doméstico generados por FIV y clonación y en los blastocistos de bengal y chita generados por SCNTi.

En este trabajo observamos que los embriones de Gd agregados disminuyeron los niveles relativos de expresión de los 4 genes evaluados en comparación con los no agregados, obteniéndose niveles relativos de expresión de *NANOG* y *SOX2* similares a los embriones control de FIV. Por lo tanto, utilizando agregación embrionaria pudimos normalizar la expresión relativa de ambos genes (*NANOG* y *SOX2*). Además, los niveles relativos de expresión de *OCT4* y *CDX2* de los embriones de Gd agregados no se normalizaron pero se acercaron a los niveles relativos de expresión de los embriones de FIV. Por otra parte, tanto el grupo Ch1X como el grupo Ch2X mostraron menores niveles relativos de expresión de *OCT4*, *CDX2* y *NANOG* que ambos grupos de Gd, lo que sugiere que el ovocito de gata doméstica no fue capaz de reprogramar el núcleo de la célula de chita de manera tan eficiente como el núcleo de la célula de la misma especie. Con respecto a esto, nosotros

observamos que más embriones de chita que de gato doméstico se arrestaba en el estadio de mórula, lo que significa que la primera diferenciación celular que ocurre en la formación del blastocisto no estaba ocurriendo de manera eficiente. Esta observación puede estar relacionada con los bajos niveles de expresión de los genes evaluados. Con respecto al gato bengal, sólo el gen de *OCT4* se encontró sub-expresado en relación a los embriones control de FIV, lo que no tuvo efecto alguno en la capacidad de estos embriones para la formación de blastocistos. A pesar de haber mejorado la calidad de los embriones de gato doméstico, no logramos obtener preñeces del grupo Gd2X lo cual lo atribuimos a las dificultades derivadas de la sincronización de las gatas y a las pocas transferencias realizadas.

Para tener éxito en la clonación la célula dadora tiene que borrar su estado diferenciado y establecer la expresión génica específica de un embrión. En felinos, se han evaluado diferentes estrategias para mejorar la SCNT pero ninguna de ellas ha demostrado tener considerable efecto positivo (Yin y col. 2005; Yin y col. 2007; Imsoonthornrukxa y col. 2011; Gómez y col. 2011; Gómez y col. 2012). Hasta el momento, la mayoría de los embriones clonados mostraron reprogramación nuclear ineficiente lo que lleva a fallas en el desarrollo a término (Tamada y Kikyo 2004; Sawai y col. 2009). Se reportaron anomalías fetales en clones de gatos silvestres africanos y gatos del desierto (Gómez y col. 2006; Gómez y col. 2008) que pueden estar relacionadas con alteraciones en la expresión de varios genes, potencialmente ocasionadas por desordenes epigenéticos de la célula dadora (Gómez y col. 2008). Además, embriones de gato jaspeado generados por clonación no fueron capaces de alcanzar el estadio de blastocisto probablemente debido a alteraciones en la expresión de los genes (Imsoonthronraksa y col. 2010).

La aplicación de la agregación embrionaria es una estrategia fácil de aplicar que podría resolver algunos de los problemas asociados a una reprogramación nuclear ineficiente. Balbach y col. (2012) reportaron que la agregación de embriones clonados de ratón normalizaban los niveles de expresión de la proteína CDX2 y este efecto fue atribuido a un mayor número de células. En cerdos, la agregación embrionaria aumentó la expresión de *OCT4* y *CDX2* (Terashita et al. 2011), a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo.

El interés en aumento de la aplicación de las técnicas de reproducción asistida en felinos requiere que se comprendan los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del desarrollo embrionario preimplantatorio. En ratón, fue demostrado que *oct4* en asociación con *sox2* y *nanog* forman un complejo que mantiene la pluripotencia del macizo celular interno de los blastocistos (Masui y col. 2007; Rodda y col. 2005; Mitsui y col. 2003; Nichols y col. 1998). Además, la expresión de *sox2* es esencial durante la embriogénesis para facilitar el establecimiento del linaje del trofoectodermo (Keramari y col. 2010), una deficiencia de este gen provoca el arresto en el estadio de mórula (Keramari y col. 2010) o los embriones mueren luego de la implantación (Avilion y col. 2003). En el modelo murino, la diferenciación del MCI y del trofoectodermo está dirigida por una expresión antagonista de *oct4* y *cdx2*. Fallas en la expresión de estos genes lleva a formaciones aberrantes del MCI y del trofoectodermo, lo cual es común en embriones de clonación (Amano y col. 2002). En otras especies, la regulación de la pluripotencia y la diferenciación temprana es diferente, lo cual lleva a diferencias en el desarrollo embrionario (Kirchhof y col. 2000; Kuijk y col. 2008). Entonces, cada especie debe ser estudiada con el objetivo de comprender el mecanismo involucrado en el mantenimiento de la pluripotencia y

diferenciación de embriones preimplantatorios, lo cual puede ser útil para mejorar el desarrollo embrionario o establecer líneas estables de células madre embrionarias en diferentes especies (Kirchhof y col. 2000; Kuijk y col. 2008).

En nuestro trabajo observamos que la interespecificidad también afectó la expresión de *OCT4*, *NANOG*, *CDX2* y *SOX2*. Los blastocistos de chita disminuyeron la expresión relativa de estos genes cuando comparamos los grupos Ch1X vs. Gd1X, obteniéndose muy bajos niveles de expresión. En varios estudios se han reportado anomalías en la transcripción de genes relacionados con la reprogramación nuclear cuando se realizó SCNTi (Loi y col. 2011), incluyendo estudios en felinos como el gato jaspeado (Imsoonthornruksa y col. 2010) y el gato patinegro (Gómez y col. 2011). La expresión génica ineficiente puede estar relacionada con las menores tasas de blastocisto y menor calidad de los embriones de chita comparados con los de gato doméstico.

Además de estudiar la expresión génica, evaluamos la distribución de la proteína OCT4 en los blastocistos de todos los grupos. En el modelo de ratón, OCT4 está negativamente regulada en el trofoblasto de los blastocistos y se expresa principalmente en el MCI. Por otra parte, los blastocistos bovinos, porcino y de primates no poseen este patrón de expresión y OCT4 también se encuentra expresada en el trofoblasto (Kirchhof y col. 2000; Harvey y col. 2009). Estas diferencias en la distribución de OCT4 puede estar relacionada con diferencias en el desarrollo y placentación entre las especies. Nosotros observamos que OCT4 no está restringido al MCI en ninguno de los blastocistos analizados y obtuvimos marcación también en el trofoblasto, tal como fue descrito previamente para blastocistos de gato doméstico (Gómez y col. 2010).

9.6 Conclusión

El trabajo descrito en este capítulo demuestra que es posible generar embriones hasta estadios pre-implantatorios utilizando 3 técnicas diferentes de transferencia nuclear, siendo la más eficiente la transferencia nuclear sin ZP, por primera vez evaluada en esta especie. Además, observamos que la agregación mejora el desarrollo embrionario, la calidad de los blastocistos y normaliza la expresión génica en embriones clonados de gato doméstico. El desarrollo de los embriones de chita también se vio beneficiado cuando se realizó agregación, pero nuestros resultados de expresión génica mostraron que la reprogramación nuclear no fue tan eficiente como la de los embriones homoespecíficos. Además de ser una herramienta para la conservación de especies, la SCNTi puede ser potencialmente utilizada para estudios básicos de reprogramación nuclear y para el aislamiento de células madre embrionarias.

10. Conclusiones generales

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue desarrollar biotecnologías reproductivas de alta complejidad en felinos, con el propósito de estudiar, reproducir y conservar felinos en peligro de extinción. Nosotros hipotetizamos que es posible utilizar ovocitos u ovoplastos de gata doméstica para evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides de otros felinos y generar embriones de felinos silvestres por transferencia nuclear de células somáticas.

Al momento de comenzar la presente tesis doctoral, el Laboratorio de Biotecnología Animal contaba con vasta experiencia en biotecnologías reproductivas de bovinos y ovinos principalmente, habiendo realizado sólo algunos ensayos en felinos. Por ende, el primer objetivo fue desarrollar las diferentes técnicas en gato doméstico para luego aplicarlas a especies silvestres de las cuales el material biológico es limitado.

En el capítulo I realizamos la técnica de ICSI. En primer lugar nos focalizamos en la evaluación de diferentes condiciones de maduración y de cultivo de los embriones y determinamos que la suplementación del medio de maduración con ITS y el cultivo de los embriones con bajo nivel de oxígeno mejoraban el desarrollo embrionario. Más aún, determinamos que la ICSI en gato doméstico es más eficiente que en los animales de granja ya que no es necesario tratar químicamente a los ovocitos inyectados para inducir el desarrollo embrionario tal como sucede en estas especies. La posibilidad de generar embriones por esta técnica y la limitante de conseguir ovocitos de felinos silvestres, nos condujo a evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides de chita y de leopardo en ovocitos de gata doméstica. Al realizar este ensayo y observar que los embriones se

desarrollaban de igual manera que los controles de ICSI en gato doméstico determinamos que la capacidad fecundante de los espermatozoides de felinos silvestres puede ser evaluada utilizando la técnica de ICSI con ovocitos de gata doméstica madurados *in vitro*.

El potencial del trabajo descrito en este primer capítulo fue puesto en evidencia cuando fue necesario castrar a una hembra de leopardo y nosotros contábamos con la tecnología desarrollada para recuperar los ovocitos de los ovarios, madurarlos y generar embriones *in vitro* con los mismos. Esta experiencia revela la importancia de contar con este tipo de técnicas para no perder material biológico valioso en términos de biodiversidad. Vale destacar también la importancia de los bancos genéticos ya que gracias al banco genético del Zoológico de Buenos Aires contamos de manera inmediata con semen de leopardo para generar los embriones homoespecíficos en esta especie por ICSI. En esta experiencia logramos obtener ovocitos fecundados y clivados habiéndose arrestado en los primeros estadios. Debido a que la capacidad fecundante de los espermatozoides utilizados ya había sido demostrada con los ovocitos de gata doméstica, concluimos que los ovocitos de leopardo eran incompetentes ya sea como consecuencia de la gran infección que presentaba la hembra en el momento de la castración o por el tratamiento con antibióticos que recibió. Hasta el momento no hay reportados nacidos de felinos silvestres generados por ICSI y nuestros resultados sugieren que es una técnica prometedora para contribuir a la reproducción en estas especies, especialmente aplicable cuando las muestras seminales son de baja calidad.

Una vez desarrollada la técnica de ICSI en felinos, nos avocamos a estudiar la transferencia nuclear en estas especies. Hasta el momento se había reportado la SCNT utilizando ovocitos con zona pelúcida y fusionando un fibroblasto al ovoplasto. Además, había sido

demostrada la capacidad del ovocito de gata doméstica de reprogramar células de felinos silvestres de especies filogenéticamente cercanas y permitir el nacimiento de gatos salvajes africanos. Con estos antecedentes, decidimos evaluar otras alternativas de SCNT en el gato doméstico para utilizar la más eficiente en la SCNTi con células de felinos filogenéticamente distantes como el tigre y el chita. El objetivo de este experimento fue profundizar el conocimiento en el área de clonación de felinos. Este trabajo demostró que independientemente de la técnica utilizada es posible generar embriones de gato doméstico hasta estadios pre-implantatorios, siendo la más eficiente la transferencia nuclear sin ZP, por primera vez evaluada en esta especie. Se ha reportado previamente que el hecho de quitarle la ZP a embriones aumenta significativamente la cantidad de células (Freistedt y col. 2001), tal como vimos en este trabajo. Al obtener los mejores resultados con la SCNT sin ZP, decidimos evaluar el efecto de la agregación embrionaria sobre el desarrollo *in vitro*, la calidad de los embriones y la reprogramación nuclear, utilizando células de bengal, tigre y chita con ovocitos de gata doméstica. Esta estrategia había sido anteriormente evaluada en otras especies como el murino, bovino y equino, habiéndose aumentado la eficiencia de la técnica con la agregación de los embriones en estas especies. En felinos observamos el mismo efecto, ya que aumentamos las tasas de blastocisto, la cantidad de células de los mismos, la calidad de los blastocistos en el gato doméstico y en el tigre. Queda por discernir si este efecto beneficioso se dio por un aumento del número de células de los embriones desde el inicio del cultivo, por una compensación epigenética dada por el quimerismo celular con diferencias a nivel de reprogramación nuclear, o por una combinación de ambos efectos. Además de las mejoras observadas en el desarrollo embrionario, el análisis de la expresión de los genes *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* y *CDX2* reveló

que la agregación en los clones de gato doméstico disminuye los niveles relativos de expresión de estos genes alcanzando niveles relativos de expresión similares a los de controles de FIV. En cuanto a los clones agregados de chita, a pesar de aumentar la eficiencia en el desarrollo de los embriones con esta estrategia, nuestros resultados de expresión génica mostraron que la reprogramación nuclear no fue tan eficiente como la de los embriones homoespecíficos, obteniendo muy bajos niveles relativos de expresión de los 4 genes analizados. El efecto de la transferencia interespecífica también se observó en los embriones de bengal, donde los niveles relativos de expresión de *OCT4* fueron similares a los niveles de expresión de los embriones de chita, los niveles de expresión de *SOX2* fueron similares a los de gato doméstico y los niveles de expresión de *NANOG* y *CDX2* fueron intermedios y diferentes a los de chita y a los de gato doméstico. Como se explicó anteriormente, el análisis de la expresión génica es una herramienta muy importante para tener nuevas perspectivas en la regulación molecular del desarrollo embrionario. Es necesaria una correcta reprogramación nuclear para que el desarrollo embrionario y fetal sea eficiente. Las alteraciones en la expresión génica son comunes en los embriones generados por transferencia nuclear, más aún cuando la transferencia nuclear es interespecífica. Es por este motivo que es necesario buscar estrategias que permitan mejorar la reprogramación nuclear de los clones y así aumentar la eficiencia de la técnica. Hasta el momento se habían evaluado diferentes protocolos de sincronización de la célula donante, de activación de los embriones reconstituidos y tratamientos con drogas que modifican la epigenética de la células, sin embargo no se había logrado una mejora significativa para la técnica. Con la agregación embrionaria descrita en la presente tesis doctoral obtuvimos evidencias de aumento en la eficiencia de la SCNT, las cuales deberían ser confirmadas

mediante más transferencias de embriones en hembras receptoras y tasas de nacimientos viables.

Sumado al análisis de la expresión génica, evaluamos la presencia de la proteína de OCT4 en los embriones de clonación y de FIV. El gen de *OCT4* se ha encontrado sólo en especies de mamíferos (Ovitt y Schöler, 1998) y ha conservado tanto su función como su secuencia en las diferentes especies. La función de este gen es regular el desarrollo embrionario temprano y diferenciación celular temprana (Van Eijk y col. 1999). En el ratón la expresión de este gen está restringida a las células del MCI del blastocisto, a diferencia de los blastocistos de otras especies como los del humano (Cauffman y col. 2005) y de los animales de granja, los cuales presentan expresión de OCT4 también en el trofoblasto (Kirchhof y col. 2000; Harvey y col. 2009). Nosotros hemos observado que OCT4 se encuentra presente tanto en las células del MCI como en las células del trofoblasto de los blastocistos analizados, tal como había sido previamente reportado para embriones de FIV (Gómez y col. 2010).

Por lo expuesto anteriormente, la SCNTi puede ser una herramienta para la conservación de especies y también puede ser utilizada para el estudio de la reprogramación nuclear y el aislamiento de células madre embrionarias de estas especies.

En esta tesis doctoral hemos alcanzado los objetivos propuesto y aceptamos la hipótesis planteada: “Es posible utilizar ovocitos u ovoplastos de gata doméstica para evaluar respectivamente: la capacidad fecundante de espermatozoides por ICSI y generar embriones por transferencia nuclear de células somáticas, en ambos casos utilizando material genético de otros felinos silvestres”.

11. Referencias bibliográficas

1. Amano T, Kato Y, Tsunoda Y. The developmental potential of the inner cell mass of blastocysts that were derived from mouse ES cells using nuclear transfer technology. *Cell Tissue Res.* 2002; 307:367–370.
2. Avilion, AA., Nicolis, SK, Pevny, LH, et al.. Multi- potent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 2003; 17:126–140
3. Balbach ST, Esteves TC, Houghton FD, Siatkowski M, Pfeiffer MJ, Tsurumi C, Kanzler B, Fuellen G, Boiani M. Nuclear reprogramming: kinetics of cell cycle and metabolic progression as determinants of success. *PLoS One.* 2012; 7:e35322.
4. Bavister B, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod.* 1977; 16: 228–237.
5. Bedford-Guaus S, McPartlin L, Xie J, Westmiller S, Buffone M, Roberson M. Molecular cloning and characterization of phospholipase C zeta in equine sperm and testis r reveals species-specific differences in expression of catalytically active protein. *Biol Reprod.* 2011; 85:78-88.
6. Betts D, King W. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology.* 2001; 55:171-191.
7. Beyhan Z, Iager AE, Cibelli JB. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell.* 2007;1:502.

8. Bogliolo L, Leoni G, Ledda S, Naitana S, Zedda M, Carluccio A, Pau S. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 2001; 56:955–967.
9. Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Scholer HR, McLaughlin KJ. Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J* 2003; 22:5304–5312.
10. Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*. 2002; 16:1209-1219.
11. Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 461:91-4.
12. Booth P, Holm P, Callesen H. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology*. 2005; 63:2040–2052.
13. Brackett B, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*. 1975; 12: 260–274.
14. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*. 2006; 66:5-13.
15. Brown J. Female reproductive cycles of wild female felids. *Animal Reproduction Science*. 2011; 124:155-162.
16. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*. 2008; 135:1287-1298.

17. Burgstaller JP, Schinogl P, Dinnyes A, Müller M, Steinborn R. Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev Biol.* 2007; 7:141.
18. Byrne A, Southgate J, Brison D, Leese H. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil.* 1999; 117:97–105.
19. Catt JW. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. *Anim Reprod Science.* 1996; 42:239-250.
20. Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. DAZL expression in human oocytes, preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Mol Hum Reprod.* 2005; 11: 405-411.
21. Chakraborty PK, Wildt DE, Seager SWJ. Serum luteinizing hormone and ovulatory response to luteinizing hormone-releasing hormone in the estrous and anestrous domestic cat. *Lab Anim Sci.* 1979; 29:338–44.
22. Chen D, Wen D, Zhang Y, Sun Q, Han Z, Liu Z, Shi P, Li J, Xiangyu J, Lian L, Kou Z, Wu Y, Chen, Y, Wang P, Zhang H, Al C. Interspecies Implantation and Mitochondria Fate of Panda-Rabbit Cloned Embryos. *Biology of Reproduction.* 2002; 67:637–642.
23. Cherny RA, Merein J. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. *Reprod.Fertil.Dev.* 1994; 569:75-76.
24. Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20:366-369.

25. Chung J, Keefer C, Downey B. Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology*. 2000; 53:1273-1284.
26. Chung YG, Mann MR, Bartolomei MS, Latham KE. Nuclear-cytoplasmic 'tug of war' during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 2002; 66:1178-1184.
27. Ciani F, Cocchia N, Rizzo M, Ponzio P, Tortora G, Avallone L, Lorizio R. Sex determining of cat embryo and some feline species. *Zygote*. 2008; 16:169-177.
28. Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS. *Principles of Cloning* (Academic Press, San Diego). 2002.
29. Comizzoli P, Wildt D, Pukazhenthil B. *In vitro* development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology*. 2006; 66:1659–1663.
30. Conforti VA, Bateman HL, Vick MM, Lyons LA, Grahn RA, Deddens JA, Swanson WF. Improved fertilization success using laparoscopic oviductal artificial insemination with low sperm numbers in domestic cats. *Proc Soc Study Reprod.* 2011:40.
31. Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. *Theriogenology*. 2010; 74:1341–1348.

32. Cueva-Rólon R, Muñoz-Martínez EJ, Delgado-Lezama R, Raia JG. The cat pudendal nerve: afferent fibers responding to mechanical stimulation of the perineal skin, the vagina or the uterine cervix. *Brain Research*. 1994; 29:1-6.
33. De Barros FRO, Goissis MD, Caetano HVA, Paula-Lopes FF, Peres MA, Assumpcao MEOA, Visintin JA. Serum Starvation and Full Confluency for Cell Cycle Synchronization of Domestic Cat (*Felis catus*) Foetal Fibroblasts. *Reprod Dom Anim*. 2010; 45:38–41.
34. De Matos D, Furnus C. The importance of having glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*. 2000; 53:761-771.
35. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, Neal L. Bovine Oocyte Cytoplasm Supports Development of Embryos Produced by Nuclear Transfer of Somatic Cell Nuclei from Various Mammalian Species. *Biology and Reproduction*. 1999; 60:1496-1502.
36. Donoghue AM, Johnston LA, Seal US, Armstrong DL, Tilson RL, Wolf P, Petrini K, Simmons LG, Gross T, Wildt DE. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod*. 1990; 43:733-744.
37. Donoghue A, Howard J, Byers A, Goodrowe K, Bush M, Blumer E, Lukas J, Stover J, Snodgrass K, Wildt DE. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah(*Acinonyx jubatus*). *Biol Reprod*. 1992; 46:1047-1056.

38. Durant S, Marker L, Purchase N, Belbachir F, Hunter L, Packer C, Breitenmoser-Wursten C, Sogbohossou E, Bauer H. «*Acinonyx jubatus*». *Lista Roja de especies amenazadas de la UICN 2010*
39. Ebert R, Ulmer M, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Stopper H, Schupp N, Kassem M, Jakob F. Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells *In vitro*. *Stem Cells*. 2006; 24:1226–1235.
40. Eckardt S, McLaughlin KJ. Interpretation of reprogramming to predict the success of somatic cell cloning. *Anim Reprod Sci*. 2004; 82-83:97-108.
41. Eckardt S, McLaughlin KJ, Willenbring H. Mouse chimeras as a system to investigate development, cell and tissue function, disease mechanisms and organ regeneration *Cell Cycle*. 2011; 10-13:2091-2099.
42. Ellinwood NM, Vite CH, Haskins ME. Gene therapy for lysosomal storage diseases: the lessons and promise of animal models. *J Gene Med*. 2004; 6:481-506.
43. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292:154-156.
44. Farstad W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci*. 2000; 60-61:375-387.
45. Freistedt P, Stojkovic P, Wolf E, Stojkovic M. Energy status of non-matured and in vitro-matured domestic cat oocytes and of different stages of in vitro-produced embryos:

enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. *Biol Reprod.* 2001; 65:793–798.

46. Gambini A, Jarazo J, Olivera R, Salamone DF. Equine cloning: in vitro and in vivo development of aggregated embryos. *Biol Reprod.* 2012; 15:1-9.

47. Gao S, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev Biol.* 2004; 266:62–75.

48. Glover TE, Watson PF, Bonney RC. Observations on variability in the LH release and fertility during oestrus in the domestic cat (*Felis catus*). *Journal of Reproduction and Fertility.* 1985; 75:145-152.

49. Gómez MC, Serrano MA, Pope CE, Jenkins JA, Biancardi MN, López M, Dumas C, Galiguis J, Dresser BL. Derivation of cat embryonic stem-like cells from in vitro-produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells. *Theriogenology.* 2010; 74:498–515

50. Gomez MC, Pope CE, Biancardi MN, Dumas C, Galiguis J, Morris AC, Wang G, Dresser BL. Trichostatin A modified histone covalent pattern and enhanced expression of pluripotent genes in interspecies black-footed cat cloned embryos but did not improve In Vitro and In Vivo Viability. *Cellular Reprogramming.* 2011; 13.

51. Gómez MA, Serrano C, Earle Pope, Jenkinsc JA, Biancardia MN, López M, Dumasa C, Galiguisa J, Dresser BL. Derivation of cat embryonic stem-like cells from *in vitro*-

produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells M.C. *Theriogenology*. 2010; 74: 498–515.

52. Gómez MC, Pope CE, Dresser BL. Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology*. 2006; 66:72–81.

53. Gómez MC, Pope CE, Giraldo AM, Lyons L, Harris RF, King A. Birth of African Wild cat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*. 2004a; 6:217–228.

54. Gómez MC, Pope CE, Cole A, Dresser BL. Production of rusty spotted cat embryos by inter-generic nuclear transfer and another pregnancy in a domestic cat after transfer of African wild cat embryos produced by inter-species nuclear transfer. In: *Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction*. *Anim Reprod Sci*. 2004b; 82–3:562.

55. Gómez MC, Pope CE, Harris RF, Davis A, Mikota S, Dresser BL. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2000; 12:423–433

56. Gómez MC, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lyons LA, Ruhe M, Dumas C, Lyons J, López M, Dresser BL, Reiser J. Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells*. 2008; 4:469-83.

57. Gómez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser BL, Pope CE. Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol Reprod*. 2003; 69:1032-1041.

58. Gómez MC, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lyons LA, Ruhe M, Dumas C, Lyons J, López M, Dresser BL, Reiser J. Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells*. 2008; 10: 469-483.
59. Gómez M, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lyons LA, Ruhe MT, Dumas C, Lyons J, Dresser B, Reiser J. Generation of Domestic Transgenic Cloned Kittens Using Lentivirus Vectors. *Cloning and Stem Cells*. 2009; 11.
60. Gómez MC, Biancardi MN, Jenkins JA, Dumas C, Galiguis J, Wang G, Earle Pope C. Scriptaid and 5-aza-2'deoxyctidine enhanced expression of pluripotent genes and in vitro developmental competence in interspecies black-footed cat cloned embryos. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47:130-135.
61. Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1988; 39:355-372.
62. Goto K, Kinoshita, Takuma, Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Rec*. 1990; 127:517-520.
63. Grondahl C, Hansen TH, Hossaini A, Heinze I, Greve T, Hyttel P. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro-matured equine oocytes. *Biol Reprod*. 1997; 1495:1501-1557.
64. Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod*. 1997; 3:919-925.

65. Harvey AJ, Armant DR, Bavister BD, Nichols SM, Brenner CA. Inner cell mass localization of NANOG precedes OCT3/4 in rhesus monkey blastocysts. *Stem Cells Dev.* 2009; 18:1451-1458.
66. Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech.Dev.* 2005; 67:79-122.
67. Hedrick PW, Fredrickson R. Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation Genetics.* 2010; 11:615-626.
68. Herrick JR, Bond JB, Magarey GM, Bateman HL, Krisher RL, Dunford SA, Swanson WF. Toward a feline-optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown in vivo. *Biol Reprod.* 2007; 76: 858-70.
69. Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Bruggerhoff 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; 68:159–166.
70. Hoffert KA, Anderson GB, Wildt DE, Roth TL. Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryo. *Mol Reprod Dev.* 1997; 48: 208-15.

71. Holm P, Booth P, Schmidt M, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serumproteins. *Theriogenology*. 1999; 52:683–700.
72. Howard J. Semen collection and analysis in carnivores. In *Zoo and wildlife medicine*. 1993; 3:390-398.
73. Howard JG, Byers AP, Brown JL, Schwartz RJ, Evans MZ, Barrett SJ, et al. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Zoo Biol*. 1996; 15:55-69.
74. Howard JG, Roth TL, Byers AP, Swanson WF, Buff JL, Bush M, Grisham J, Marker-Kraus L, Wildt DE. Successful intercontinental genome resource banking and artificial insemination with cryopreserved semen in cheetahs (Abstract). *J Androl*. 1997; 55:123.
75. Hwang W, Kim K, Jin Y, Kim Y, Chung H, Yoon T, et al. Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger (*Panthera tigris altaica*) [abstract]. *Theriogenology*. 2001; 55:271.
76. Ideta A, Urakawa M, Aoyagi Y. Early Morphological Nuclear Events and Developmental Capacity of Embryos Reconstructed with Fetal Fibroblasts at the M or G1 Phase after Intracytoplasmic Nuclear Injection in cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 2005; 51
77. Imsoonthornruksa S, Lorthongpanich C, Sangmalee A, Srirattana K, Laowtammathron C, Tunwattana W, Somsa W, Ketudat-Cairns M, Parnpai R. Abnormalities in the

transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2010; 22:613-24.

78. Imsoonthornruksa S, Lorthongpanich C, Sangmalee A, Srirattana K, Laowtammathron C, Tunwattana W, Somsa W, Ketudat-Cairns M, Nagai T, Parnpai R. The effects of manipulation medium, culture system and recipient cytoplasm on in vitro development of intraspecies and intergeneric felid embryos. *J Reprod Dev.* 2011; 57:385-392.

79. Imsoonthornruksa S, Sangmalee A, Srirattana K, Parnpai R, Ketudat-Cairns M. Development of Intergeneric and Intrageneric Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) Cat Embryos and the Determination of Telomere Length in Cloned Offspring. *Cellular Reprogramming.* 2012; 14:79-87.

80. Jeong Y, Hossein M, Bhandari D, Kim Y, Kim J, Park S, Lee E, Park S, Jeong Y, Lee J, Kim S, Hwang W. Effects of insulin–transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *An Reprod Sci.* 2008; 106:13–24.

81. Johnson LM, Gay VL. Luteinizing hormone in the cat. II. Mating-induced secretion. *Endocrinology.* 1981; 109:247-252.

82. Johnson M, Nasr-Esfahani M. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays.* 1994; 16:31–38.

83. Johnson W, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy W, Antunes A, Teeling E, O'Brien S. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science*. 2006; 311:73-77.
84. Johnson WE, Onorato DP, Roelke ME, Land ED, Cunningham M, Belden RC, McBride R, Jansen D, Lotz M, Shindle D, Howard J, Wildt DE, Penfold LM, Hostetler JA, Oli MK, O'Brien SJ. Genetic Restoration of the Florida Panther. *Science*. 2010; 49:329.
85. Johnston L, Donoghue A, O'Brien S, Wildt D. Influence of temperature and gas atmosphere on *in vitro* fertilization and embryo development in domestic cats. *J Reprod Fertil*. 1991; 92:377-382.
86. Kanda M, Oikawa H, Nakao H, Tsutsui T. Early embryonic development *in vitro* and embryo transfer in the cat. *J Vet Med Sci*. 1995; 57:641-646.
87. Karja NW, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. *In vitro* maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*. 2002; 57:2289-2298.
88. Karja N, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology*. 2004; 62:1585-1595.
89. Keefer C. Fertilisation by sperm injection in the rabbit. *Gamete Res*. 1989; 22:59-69.
90. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*. 1995; 709:720-752.

91. Keramari M, Razavi J, Ingman KA, Patsch C, Edenhofer F, Ward CM, Kimber SJ. Sox2 is essential for formation of trophoctoderm in the preimplantation embryo. PLoS One. 2010; 12:e13952.
92. Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Schöler H, Niemann H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. Biol Reprod. 2000; 63: 1698-1705.
93. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and anti-oxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology. 2004; 62:1186–1197.
94. Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Han SK, Park IY, Kim SU, Lee KK, Son DS, Chang WK, Han YM. In vitro development of reconstructed porcine oocytes after somatic cell nuclear transfer. Biol. Reprod. 2000; 63:986-992.
95. Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM. Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. Biol. Reprod. 2002; 67:487-492.
96. Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HT, Oei CH, Haagsman HP, Colenbrander B, Roelen BA. Differences in early lineage segregation between mammals. Dev Dyn. 2008; 237:918-927.
97. Kutzler MA. Estrus induction and synchronization in canids and felids. Theriogenology. 2007; 68:354-374.

98. Lacy RC. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*. 1997; 78:320-335.
99. Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*. 2000; 2:79-90.
100. Lee M, Kang S, Lee B, Hwang W. The beneficial effects of insulin and metformin on *In vitro* developmental potential of porcine oocytes and embryos. *Biol Reprod*. 2005; 73: 1264–1268.
101. Loi P, Modlinski JA, Ptak G. Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. *Theriogenology*. 2011; 76:217-228.
102. Lorthongpanich C, Laowtammathorn C, Muenthaisong S, Vetchayan T, Ketudat-Cairns M, Likitdecharote B, Parnpai R. *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cat [abstract]. *Reprod Fert Dev*. 2004; 16:149–150.
103. Luvoni GC. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. *Reprod Nutr Dev*. 2000; 40:505-512.
104. Magarey GM, Bond JB, Herrick JR, Stoops MA, Swanson WF. Improved recipient synchronization protocol for embryo transfer in the domestic cat (*Felis silvestris catus*) using equine chorionic gonadotropin (eCG) and porcine luteinizing hormone (pLH). *Proc Soc Study Reprod*. 2005:91.

105. 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; 9:625–635.
106. Matwee C, Betts D, King W. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote.* 2000; 8:57–68.
107. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of zygotic paternal genome. *Nature.* 2000; 403:501–502.
108. Menotti-Raymond M, O'Brien SJ. The domestic cat, *Felis catus*, as a model for hereditary and infectious disease. In: *Sourcebook of models for biomedical research.* 2008: 221-32.
109. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003; 113:631–642.
110. Murakami M, Karja N, Wongsrikeao P, Agung B, Taniguchi M, Naoi H, Otoi T. Development of Cat Embryos Produced by Intracytoplasmic Injection of Spermatozoa Stored in Alcohol. *Reproduction in Domestic Animals.* 2005; 40:511-515.
111. Murphy WJ, Sun S, Chen Z, Yuhki N, Hirschmann D, Menotti-Raymond M, O'Brien SJ. A radiation hybrid map of the cat genome: implications for comparative mapping. *Genome Res.* 2000; 10:691-702.

112. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998; 95:379–391.
113. Nowell K, Jackson P. Status survey and Conservation Action Plan: Wild Cats. IUCN. 1996; 149-179.
114. O'Brien SJ, Mortenson JS, Miththapala S, Janczewski D, Pecon-Slattery J, Johnson W, Gilbert DA, Roelke M, Packer C, Bush M, Wildt DE. Conservation genetics of the felidae. In: *Conservation Genetics. Case Histories from Nature*. 1996; 50-74.
115. O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, Colly L, Evermann JF, Bush M, Wildt, DE. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*. 1985; 227:1428-1434.
116. Ovitt CE, Schöler HR. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Mol Hum Reprod*. 1998; 4:1021-1031.
117. Palermo G, Joris H, Devroey P. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992; 340:17-18.
118. Park KW, Lai L, Cheong HT, Cabot R, Sun QY, Wu G, Rucker EB, Durtschi D, Bonk A, Samuel M, Rieke A, Day BN, Murphy CN, et al. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol Reprod*. 2002; 66:1001–1005.

119. Parrish I, Susko-Parrish IL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod.* 1988; 38:1171-1180.
120. Pedersen HG, Schmidt M, Sangild PT, Strobecch L, Vajta G, Callesen H, Greve T. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 234:137–143.
121. Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenthil B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology.* 2006; 66:37–48.
122. Penfold L, Jost L, Evenson D, Wildt D. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod.* 2003; 69:1730–1735.
123. Pereyra-Bonnet F, Fernández-Martín R, Olivera R, Jarazo J, Vichera G, Gibbons A, Salamone D. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction Fertility and Development.* 2008; 20:741-749.
124. Pope C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology.* 2000; 53:163-174.
125. Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser B.L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Science.* 1998; 53:221–236.

126. Pope CE, Crichton EG, Gómez MC, Dumas C, Dresser BL. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow sorted sperm. *Theriogenology*. 2009; 71:864–871.
127. Pope CE, Gómez MC, Cole A, Dumas C, Dresser BL. Oocyte recovery, in vitro fertilization and embryo transfer in the serval (*Leptailurus serval*). *Reprod Fertil Dev*. 2006; 18:223 (a)
128. Pope CE, Gómez MC, Dresser BL. In vitro embryo production in domestic and non-domestic cats. *Theriogenology*. 2006; 66:1518–24. (b)
129. Pope CE, Johnson CA, Mcrae MA, Keller GI, Dresser BI. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci*. 1998; 53:221-236.
130. Pope CE, McRae MA, Blair BL, Keller GL, Dresser BL. In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J Reprod Fertil Suppl*. 1997; 51:69–82.
131. Pope CE. Aspects of in vivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology*. 2014; 81:126-137.
132. Pope CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000, 53:163–174.

133. Raghu HM, Nandi S, Reddy SM. Effect of insulin, transferring and selenium and epidermal growth factor on development of buffalo oocytes to the blastocyst stage in vitro in serum-free, semidefined media. *Vet Rec.* 2002; 151:260–265.
134. Ribeiro Ede S, Gerger RP, Ohlweiler LU, Ortigari I Jr, Mezzalira JC, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambro´sio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning Stem Cells.* 2009; 11:377–386.
135. Ringleb J, Waurich R, Wibbelt G, Streich W, Jewgenow K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise *in vitro*-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reprod Fert Dev.* 2011; 23:818–825.
136. Robison BL, Sawyer CH. Hypothalamic control of ovulation and behavioral estrus in the cat. *Brain Research.* 1987; 418:41-51.
137. Robledo MAM, Carneiro MP, Raratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J. Avaliação do fotoperíodo na indução do estro em gatas domésticas. *Rev Bras Reprod Anim.* 2003; 27:274-275.
138. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 2005; 280:24731–24737.
139. Roth TL, Swanson WF, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. *Biology of Reproduction.* 1994; 51:441–451.
140. 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 y col. High level

expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *Journal of Biotechnology*. 2006; 124:469–472.

141. Sawai K. Studies on gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Dev*. 2009; 55:11–16.

142. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarrides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 2002; 419:407–411.

143. SAS Institute 1989 SAS / STAT: User's Guide. Version 6, Vol 1. 4th Edn,. (SAS Institute, Cary, NC, USA.)

144. Shille VM, Sojka NJ. Feline Reproduction. In. Ettinger, S.J.; Feldman, E.C. (eds) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, Philadelphia: Saunders Co, 1995. p.2332-2343.

145. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 2002; 415:859.

146. Spinaci M, Merlo B, Zannoni A, Iacono E, De Ambrogi M, Turba ME, Zambelli D. In vitro production of cat blastocysts of predetermined sex using flow cytometrically sorted semen. *Theriogenology*. 2007; 67: 872-877.

147. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction*. 2000; 63:582–590.

148. Swanson WF. Laparoscopic Oviductal Embryo Transfer and Artificial Insemination in Felids –Challenges, Strategies and Successes. *Reprod Dom Anim.*2012; 47:136–140.
149. Swanson WF, Brown JL. Reproductive biotechnology and international training programs for the conservation of Brazilian felids. In: Proceedings of the meeting of the American Association of Zoo Veterinarians. 2002; 205-207.
150. Swanson WF, Howard JG, Roth TL, Brown JL, Alvarado T, Burton M, et al. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen–thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *J Reprod Fertil.* 1996; 106:87-94.
151. Swanson WF, Paz RCR, Morais RN, Gomes MLF, Moraes W, Adania CH. Influence of species and diet on efficiency of in vitro fertilization in two endangered Brazilian felids—the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*) (Abstract). *Theriogenology.* 2002; 57:593.
152. Swanson WF, Roth TL, Wildt DE. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol Reprod.* 1994, 51: 452-64.
153. Swanson WF, Stoops MA, Magarey GM, Herrick JR. Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of in situ-ex situ populations. In: Roldan ERS, Gomendio M (eds.), *Spermatology.* 2007:417–432.
154. Swanson WF, Wolfe BA, Bowen JL, Roth TL, Wildt DE. Pharmacokinetics and ovarian stimulatory effects of exogenous gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biol Reprod.* 1996; 189 [abstract].

155. Swanson WF. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*. 2006; 66:49–58.
156. Tamada H, Kikyo N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear Cloning *Cytogenet Genome Res*. 2004; 105:285–291.
157. Terashita Y, Sugimura S, Kudo Y, Amano R, Hiradate Y, Sato E. Improving the quality of miniature pig somatic cell nuclear transfer blastocysts: aggregation of SCNT embryos at the four-cell stage. *Reprod Domest Anim*. 2011; 46:189-196.
158. Tervit H, Whittingham D, Rowson L. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod Fertil*. 1972; 30:493–497.
159. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-1147.
160. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:7844-8.
161. Thompson J, Simpson A, Pugh P, Donnelly P, Tervit H. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil*. 1990; 89:573–578.

162. Thongphakdee A, Numchaisrika P, Omsongkram S, Chatdarong K, Kamolnorrnanath S, Dumnuai S; Techakumphu M. In Vitro Development of Marbled Cat Embryos Derived from Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer. *Reprod Dom Anim.* 2006; 41:219–226.
163. 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; 54:142–147.
164. Thongphakdee A, Siriaroonrat B, Manee-in S, Klincumhom N, Kamolnorrnanath S, Chatdarong K, Techakumphu M. Intergeneric somatic cell nucleus transfer in marbled cat and flat-headed cat. *Theriogenology.* 2010; 73:120–128.
165. Tian J, Wu Z, Liu L, Cai Y, Zeng S, Zhu S, Liu G, Li Y, Wu C. Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology.* 2006; 66:439-448.
166. Tomii R, Ogawa B, Imai N, Handa Y, Sasayama N, Shirasu A, Nagashima H. In vitro development and postvitrification survival of cloned feline embryos derived from preadipocytes *J Reprod Dev.* 2011; 57:273-279.
167. Tsutsui T, Stabenfeldt GHJ. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *Reprod Fertil Suppl.* 1993; 47:29-35.
168. Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod.* 1976; 15:467- 470.

169. Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 2001; 3:89–95.
170. 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.
171. Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1992; 8:1061–1066
172. Vite CH, McGowan JC, Niogi SN, Passini MA, Drobatz KJ, Haskins ME, Wolfe JH. Effective gene therapy for an inherited CNS disease in a large animal model. *Ann Neurol* 2005; 57:355-364.
173. Wang C, Swanson WF, Herrick JR, Lee K and Machaty Z. Analysis of cat oocyte activation methods for the generation of feline disease models by nuclear transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009; 7:148.
174. Waurich R, Ringleb J, Braun BC, Jewgenow K. Embryonic gene activation in in vitro produced embryos of the domestic cat (*Felis catus*). *Reproduction*. 2010; 140:531–540.
175. Wildt DE, Rall WF, Critser JK, Monfort SL, Seal US. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. *Bioscience*. 1997; 47:689–698.

176. Wildt DE, Roth TL. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *Int Zoo Yrbk.* 1997; 35:164-172.
177. Wildt, DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature.* 1987; 329:328-331.
178. Wildt DE, Chan SYW, Seager SWJ, Chakraborty, P.K. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus³¹ induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biology of Reproduction.* 1981; 25:15-28.
179. Wildt D, Bush M, Howard G, Obrien S, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand D. Unique seminal quality in the south african cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod.* 1983; 29:1019-1025.
180. Wildt D, Philips L, Simmons L, Chakraborty P, Brown J, Howard J, Teare A. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biol Reprod.* 1988; 38:245-255.
181. Wildt D, Monfort S, Donoghue A, Johnston L, Howard J. Embryogenesis in conservation biology or how to make an endangered species embryo. *Theriogenology.* 1992; 37:161-184.
182. Wildt DE, Seager SWJ, Chakraborty PK. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology.* 1980; 107:1212-1217.

183. Wildt D, Philips L, Simmons L, Chakraborty P, Brown J, Howard J, Teare A. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biol Reprod.* 1988; 38:245-255.
184. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997; 385:810–813.
185. Yang CX, Kou ZH, Wang K, Jiang Y, Mao WW, Sun QY, Sheng HZ, Chen DY. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes. *Reproduction.* 2004; 127:201-205.
186. Yin XJ, Lee HS, Lee YH, Seo YI, Jeon SJ, Choi EG, Kong IK. Cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction.* 2005; 129:245–249.
187. Yin XJ, Lee HS, Kim LH, Shin HD, Kim NH, Kong IK. Effect of serum starvation on the efficiency of nuclear transfer using odd-eyed white cat fibroblasts. *Theriogenology.* 2007; 67:816–823.
188. Yu X, Jin G, Yin X, Cho S, Jeon J, Lee S, Kong I. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from in vivo-produced cat blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 2008; 75:1426-1432.
189. Zhou W, Xiang T, Walker S, Abruzzese RV, Hwang E, Farrar V, Findeisen B, Sadeghieh S, Arenivas F, Chen SH, Polejaeva I. Aggregation of bovine cloned embryos at the four-cell stage stimulated gene expression and in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev.* 2008; 75:1281–1289.

Agradecimientos

- A mis papas por haberme apoyado y guiado en cada decisión, además de haberme dado el ejemplo y los valores de la dedicación y el trabajo.
- A mis hermanos por haberme acompañado y apoyado en cada etapa de mi vida.
- A Gaby por ser mi sostén emocional, mi compañero, mi maestro y por brindarme su amor cada día.
- A Daniel por haberme permitido conocer y disfrutar de la ciencia y haberme dado un lugar, brindado su conocimiento y guiado durante el doctorado.
- A mis compañeros del LaBA, Car, Ine, Romi, Naty, Andres, Rafa, Vir, Marian, Euge, Gery, Javi, Adri, Caro, Belu, Patri y Normis, por haber hecho que estos 5 años formen parte de una etapa inolvidable, en la cual el trabajo y la risa eran complementarias.
- A mis amigos de la vida por estar siempre.
- A cada persona e institución que hizo posible esta tesis doctoral.
- A la educación pública y gratuita.