

**Efecto de la latrunculina A en la producción de embriones
porcinos partenogénicos y clones producidos por “Hand-made
cloning”**

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Animal*

Flor Katya Castañeda Alfonso

Ing. Zootecnista
Universidad Nacional de Huancavelica – Perú - 2012

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción
Facultad de Agronomía
Universidad de Buenos Aires, Argentina
2017



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Daniel Felipe Salamone

Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires)

Master of Science (Universidad de Saskatchewan)

Doctor en Biotecnología y Biomedicina (Universidad de Massachusetts)

Co-director de Tesis

Dra. Romina Jimena Bevacqua

Licenciatura en Biotecnología (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Producción Animal (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Dr. Pablo D. Cetica

Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Dr. Daniel M. Lombardo

Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Dr. Federico Hozbor

Médico Veterinario (Universidad Nacional de La Plata)

Doctorado en trastornos metabólicos (Universidad Nacional de La Plata)

Dedicatoria

Dedicado a mis padres, Julio y Agripina, como muestra de mi más profundo amor, por todo su apoyo. A mi pequeña hermanita Britney mi razón y mi motivo.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director el Dr. Daniel Felipe Salamone, quien ha sido un guía excepcional durante en todo mi andar por la maestría, por darme la confianza, libertad y nunca me puso límites. Le doy las gracias porque como mi director le debo todo lo que he aprendido, en particular por el desarrollo y culminación de este trabajo. Especialmente por recibirme en su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo.

Agradecer también a mi Co-directora la Dra. Romina Jimena Bevacqua, quien me guío, y por toda la ayuda brindada durante los experimentos, por compartir desinteresadamente la experiencia acumulada durante estos años de trabajo, gracias por tu gran aporte en la realización de este trabajo y por tu amistad.

A mis padres Julio Castañeda Julcamanyan y Agripina Alfonso Quispe, por ser mi soporte emocional a pesar de la distancia, al igual que a mi hermanita Britney quien es una de las razones que me da fuerza para continuar. A toda mi familia, por sus ánimos que me brindaron durante estos años de maestría.

A mi novio José Luis quien siempre me impulsa a buscar algo más, quien, sin importar el tiempo, la distancia, los obstáculos, ha encontrado la forma de seguir juntos, compartiendo cada minuto de esta pequeña historia.

A Adrián De Stéfano por compartir sus conocimientos, por haberme dado pequeñas pautas para poder iniciarme, por todo su apoyo incondicional durante los experimentos.

A Natalia Canel y Geraldina Vans por acompañarme durante el último experimento, gracias a ellas pude seguir adelante y cumplir lo que más quería, hacer el HMC, gracias por su amistad.

A todos y todas, quienes forman un lindo equipo del laboratorio, gracias a cada uno por sus consejos, su compañía y amistad, siempre los tendré presente: Romi, Naty, Gery, Adri, Oli, Belu, Vir, Marian, Euge, Mateo, virgilia, Dr. Rafael Fernandez,

A Norma y Patricia, por sus charlas, compañía y sus consejos.

Al veterinario Dr. San Martín, del Frigorífico la Pompeya, que generosamente me cedió el material biológico con el cual trabajé durante toda la etapa de la maestría,

quien respondía con mucha paciencia cada vez que pedía el material para poder llevar a cabo los experimentos.

Al programa de PRONABEC, quien me dio la posibilidad de salir de mi País para poder realizar la Maestría en uno de los mejores países de Latinoamérica.

A las Gente de veterinaria con quienes algunas veces compartíamos material: Caro, Gabriela, Sole (Histología) y Gabriel (Bioquímica).

A los amigos y amigas que conocí quienes me dieron fuerzas y hacerme compañía durante mi estadía en Argentina.

DECLARACIÓN.

Declaro que el material, incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

Publicaciones derivadas de la tesis

- EVALUACIÓN DE LA LATRUNCULINA EN LOS PROTOCOLOS DE ACTIVACIÓN PATERNOGÉNICA PORCINA. Flor K. Castañeda; Adrián de Stéfano; Romina J. Bevacqua; Daniel F. Salamone. SATE-Argentina-2016.
- ACTIVACIÓN PATERNOGÉNICA DE PORCINOS BASADO EN EL USO DE LATRUNCULINA-A. Castañeda F.; De Stéfano A.; Bevacqua R.; Salamone D. HAMUTAY-Perú- 2017
- EVALUATION OF LATRUNCULIN A FOR THE ACTIVATION OF HAND MADE CLONING (HMC) PORCINE EMBRYOS. Flor Castañeda; Natalia G. Canel; Geraldina Vans Landschoot, Adrián De Stéfano; Romina J. Bevacqua; Daniel F. Salamone. IETS - Bangkok, Thailand - 2018.

ÍNDICE GENERAL

	<i>Pág.</i>
Dedicatoria.....	Iii
Agradecimientos.....	iv
Declaración.....	vi
Publicaciones científicas derivadas de esta Tesis.....	vii
Abreviaturas	xii
Resumem	xvii
Abstract	xix
 1. INTRODUCCIÓN.....	 1
1.1. Maduración de ovocitos.....	4
1.1.1. La maduración citoplasmática.....	8 9
1.1.2. Maduración nuclear.....	10
1.1.3. Competencia del oocito.....	13
1.1.4. Maduración <i>in vitro</i>	15
1.2. Activación del ovocito.....	15
1.2.1. Activación del ovocito en la fecundación.....	18
1.2.2. Partenogénesis.....	31
1.3. Clonación hecha a mano <i>Hand-made clonig</i>	35
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
2.1. Hipótesis.....	36
2.2. Objetivos.....	36
Objetivos Generales.....	36
Objetivos Específicos.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1. Lugar de estudios.....	38
3.2. Medios y drogas.....	
3.3.Experimento 1. <i>Evaluación de latrunculina A durante la activación</i>	38
<i>paternogénica de porcinos</i>	38
3.3.1. Recuperación de los COC.....	40

3.3.2. Maduración <i>in vitro</i> de los COC.....	41
3.3.3. Denudación de los COC.....	41
3.3.4. Activación de los oocitos.....	43
3.3.5. Evaluación de la inhibición de la extrusión de segundo corpusculo polar.....	44
3.3.6. Evaluación de la formación de pronúcleos.....	45
3.3.7. Evaluación de la tasa del desarrollo embrionario.....	45
3.3.8. Conteo del número de células de los embriones partenogénicos.....	
3.3.9. Evaluación de la ploidía de los embriones partenogénicos.....	46
3.4.Experimento 2. Evaluación de LatA durante la activación de la SCNT mediante la técnica de HMC para producir embriones <i>in vitro</i> en porcinos....	46
3.4.1. Recuperación de los COC.....	50
3.4.2. Enucleación de los ovocitos receptores.....	52
3.4.3. Transferencia nuclear de células somáticas y fusión.	52
3.4.4. Activación.....	53
3.4.5. Cultivo <i>in vitro</i>	54
3.5. Análisis Estadístico.....	
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Experimento 1. Evaluación de latrunculina A durante la activación paternogénica de porcinos.....	55
4.1.1. Evaluación de la inhibición de la extrusión de segundo corpusculo polar.....	57
4.1.2. Evaluación de la formación de pronúcleos.....	60
4.1.3. Evaluación la tasa de desarrollo <i>in vitro</i> de embriones partenogénicos porcino.....	64
4.1.4. Evaluación de la ploidía de los embriones partenogénicos.....	
4.2. Experimento 2. Evaluación de latrunculina A durante la activación de la SCNT mediante la técnica de HMC para producir embriones <i>in vitro</i> en porcinos	67
	70
	78
Capítulo 5. Discusión.	80
Capítulo 6. Conclusiones.	
BIBLIOGRAFÍA.....	

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Efecto del tratamiento con inhibidores de la actina a las 3hs post-activación.....	57
Cuadro 2. Evaluación de la tasa de formación de pronúcleos inducida por la activación con pulso eléctrico seguido por CHX combinada con los inhibidores de la actina LatA y CB a las 17h post-activación.....	59
Cuadro 3. Evaluación de la tasa de desarrollo <i>in vitro</i> de los embriones partenogénicos activados con un pulso eléctrico, seguido por incubación en CHX más un inhibidor de actina, LatA o CB. Los grupos controles fueron incubados solo con CHX o 6-DMAP luego del pulso eléctrico.....	61
Cuadro 4. Evaluación del número de células de los blastocistos partenogénicos obtenido al día 7 de cultivo.....	62
Cuadro 5. Determinación de la ploidía de los blastómeros obtenidos por los diferentes tratamientos de activación paternogénica.....	66
Cuadro 6. Evaluación de la tasa de desarrollo <i>in vitro</i> de los embriones clonados mediante la técnica de HMC.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.1. Profase I.	5
Figura 1.2. Ovogénesis y foliculogénesis.	6
Figura 1.3. Esquema de la ovogénesis y proceso de maduración.	7
Figura 1.4. Esquema de las etapas de meiosis.	10
Figura 1.5. Degradación de la ciclina activadora de la Cdk.	11
Figura 1.6. Meiosis y resultado embrionario después de la fertilización normal	16
Figura 1.7. Meiosis y embrión resultante de la Partenogénesis diploide	20
Figura 1.8. Meiosis y embrión resultante de la Partenogénesis haploide	20
Figura 1.9. monómeros y filamentos de actina.	25
Figura 1.10. Anillo contráctil o surco de segmentación.	27
Figura 1.11. Esquema de la transferencia nuclear con Hand-Made Cloning.	32
Figura 1.12. Esquema de la transferencia nuclear con micromanipulador.	33
Figura 3.1. Colección de COC.	39
Figura 3.2. Maduración <i>in vitro</i> de los COC.	40
Figura 3.3. Oocitos antes y después de la IVM.	41
Figura 3.4. Activación partenogénica.	43
Figura 3.5. Cultivo de embriones partenogénicos.	45
Figura 3.6. Proceso de la obtención de oocitos Zona Free.	47
Figura 3.7. Enucleación a mano.	48
Figura 3.8. Evaluación de la enucleación.	49
Figura 3.9. Reconstrucción de los embriones.	52
Figura 4.1. Evaluación de la inhibición de la extrusión del segundo CP	56
Figura 4.2. Evaluación de la extrusión del 2ºCP	57
Figura 4.3. Fotografías de los embriones partenogénicos evaluados a las 17 hs	58
Figura 4.4. Porcentajes de activación de los embriones partenogénicos	60
Figura 4.5. Desarrollo <i>in vitro</i> de los embriones partenogénicos.	61
Figura 4.6. Porcentajes de clivados, mórulas y blastocistos	64
Figura 4.7. Diferencias en el número de células de blastocistos al día 7.	63
Figura 4.8. Conteo de células de los blastocistos.	63
Figura 4.9. Análisis de la ploidía de los embriones partenogénicos	64
Figura 4.10. Fotografías embriones clonados por HMC, en etapa de clivados	68
Figura 4.11. Fotografías los embriones clonados por HMC, en etapa de mórula.	69
Figura 4.12. Fotografías de los blastocistos clonados por HMC	69

ABREVIATURAS

6-DMAP: 6- dimetilaminopurina

%: Porcentaje

°C: Grados Celcius

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µM: Micromolar

µm: Micrómetros

µs: microsegundos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Monofosfato Cíclico de Adenosina

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Mensajeros de ácido ribonucleico

ARP ó PAR: Proteínas relacionadas a la actina

ATB/ATM: Antibiótico

BSA: Albúmina sérica bovina

Ca²⁺: Calcio

CB ó D: Citocalasina B o D

CDC2 o CDK1: Quinasa dependiente de ciclinas

CHX: Cicloheximida

CO₂: Dióxido de carbono

COCs: Complejos cúmulus-oocito

CP: corpúsculo polar

DC: Corriente directa

DAG: Diacilglicerol

ERK: Quinasas Reguladoras de la Señal Extracelular

FH2: Formin 2

PFF: Fluido folicular porcino

FIV: Fecundación in vitro

FSH: Hormona Folículo Estimulante

HMC: clonación hecha a mano

h: horas

Hy: Hialuronidasa

ICSI: Inyección Intracitoplasmática

ITS: Insulina transferrina selenio

IP: Ioduro de propidio

KRB: Medio Krebs Ringer Bicarbonato

LatA: Latrunculina A

LH: Hormona Luteinizante

M: Molar

MI: Metafase I

MII: Metafase II

MIII: Metafase III

MAPK: Proteína Quinasa Activadora de Mitógenos.

miARNs: microARN

mg: Miligramo

ml: Mililitro

mm: milímetros

mM: milimolar

min: Minutos

MIV: Maduración in vitro

MPF: Factor Promotor de la Mitosis o Maduración

n: Número

N: Número total

O₂: oxígeno

Pág: Página

PE: Pulso eléctrico (corriente directa)

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PLC ζ : Fosfolipasa C zeta 1 específica de espermatozoides

PIP₂: Fosfatidil inositol bifosfato

PN: Pronúcleos

p/v: Peso en volumen

RVG: Rotura de la Vesícula Germinal

SCNT: Transferencia nuclear de células somáticas

Seg: Segundos

SFB: Suero fetal bovino

TALP-H: Medio tirode albúmina lactato piruvato con hepes

TCM-199: Tissue Culture Medium 199

USA: Estados Unidos de América

UV: Luz ultravioleta

VG: Vesícula Germinal

ZF: Zona Free

ZP: Zona pelúcida

v/v: Volumen en volumen

Resumen

Título de la tesis: *Efecto de la latrunculina A en la producción de embriones porcinos partenogénicos y clones producidos por “Hand- made cloning.”*

Autor: *Ing. Flor Katya Castañeda Alfonso.*

Comité consejero: *Dr. Daniel F. Salamone, Dra. Romina Jimena Bevacqua.*

Palabras clave: *Latrunculina A, Citocalasina B, embriones porcinos, activación paternogénica, clonación a mano.*

La técnica de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) constituye una importante herramienta biotecnológica, teniendo diversas aplicaciones en la producción animal. Sin embargo, además de requerir gran infraestructura, aún sigue siendo ineficiente. Una de las alternativas a la SCNT tradicional es la clonación a mano (del inglés: hand-made cloning, HMC), que ha sido implementada en la presente tesis. En la técnica de HMC, tanto la enucleación como la transferencia nuclear se realizan con lupa estereoscópica y sin micromanipulador ni microscopio invertido. Por lo tanto, esta técnica requiere menos equipamiento que la técnica tradicional y posibilitaría adaptar la clonación a los laboratorios con menor infraestructura. Una de las causas de las bajas tasas de producción de crías viables por transferencia nuclear, es la ocurrencia de pérdidas cromosómicas durante el proceso de activación. Por este motivo, es importante agregar en los protocolos de activación un inhibidor de actina que evite la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP), con los cromosomas contenidos en él. Con este objetivo, en la presente tesis se evaluó un sistema alternativo para la producción *in vitro* de embriones partenogénicos porcinos diploides, basado en el uso de la latrunculina A (LatA) durante la activación, para luego aplicarlo a los protocolos de clonación. En un primer ensayo, oocitos en metafase II fueron activados mediante un pulso eléctrico, seguido por la incubación en cicloheximida (CHX) combinada con LatA o citocalasina

B (CB). Se evaluaron las tasas de extrusión del segundo corpúsculo polar, la formación de dos pronúcleos, el desarrollo embrionario *in vitro* y la carga cromosómica de cada blastómera del embrión. En base a las elevadas tasas de cigotos que inhibieron el segundo corpúsculo polar y presentaron dos pronúcleos en su interior, y al mayor número de células en los blastocistos partenogénicos producidos empleando LatA, se realizó un segundo experimento en donde se utilizó la LatA para asistir la clonación porcina mediada por la técnica de clonación a mano (HMC). En resumen, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con LatA es eficaz para producir embriones partenogénicos diploides, siendo también capaz de inhibir la extrusión del segundo CP y de promover la formación de dos pronúcleos con mayor eficiencia que la CB. Además, la activación con LatA resultó en la producción de blastocistos con mayor número de células y de mejor calidad que la CB. Podemos decir entonces que el uso de LatA durante la activación mejora la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones partenogénicos porcinos diploides. Por otra parte, esta tesis también demostró que el uso de LatA durante la activación es eficiente para la producción de clones generados por HMC, empleando células somáticas de animales adultos. Por primera vez, esta tesis evaluó la factibilidad de acompañar la activación con LatA en la clonación porcina por la técnica de HMC, produciendo embriones capaces de desarrollar hasta la etapa de blastocisto.

Abstract

Title of thesis: Effect of latrunculin A on the production of porcine parthenogenic and cloned embryos produced by "Hand-made cloning."

Key words: Latrunculin A, Cytochalasin B, porcine embryos, parthenogenic activation, hand-made cloning.

The somatic cell nuclear transfer technique (SCNT) constitutes an important biotechnological tool, showing several applications in animal production. However, also to requiring large infrastructure, it also remains inefficient. One alternative to traditional SCNT is the hand-made cloning (HMC), which has been implemented in this thesis. In the HMC technique, both enucleation and nuclear transfer are performed with stereomicroscope and without micromanipulator or inverted microscope. Therefore, this method requires less equipment than the traditional technique, which might prove useful for the adaptation of cloning to less-equipped laboratories. One of the causes of the low production rates of viable offspring by nuclear transfer is the occurrence of chromosomal losses during the activation process. For this reason, it is important to add in the activation protocols an actin inhibitor that prevents the extrusion of the second polar body (PB), with part of the chromosomes contained in it. To this aim, in the present thesis we evaluated an alternative system for the *in vitro* production of diploid porcine parthenogenetic embryos, based on the use of latrunculin A (LatA) during activation, and then applied to the cloning protocols. In the first experiment, metaphase II oocytes were activated with an electrical pulse, followed by incubation in cycloheximide (CHX) combined with LatA or cytochalasin B (CB). The rates of extrusion of the second PB, the formation of two pronuclei, the *in vitro* embryo development and the chromosomal load of each blastomere of the embryo were

evaluated. Based on the high rates of zygotes that inhibited the second PB and presented two pronuclei within it, and to the largest number of cells in the parthenogenic blastocysts produced using LatA, a second experiment was performed where LatA was used to assist the cloning mediated by the hand cloning technique (HMC). In summary, our results demonstrate that the treatment with LatA is effective to produce diploid parthenogenic embryos, being also able to inhibit the extrusion of the second PB and to promote the formation of two pronuclei with greater efficiency than CB. Also, activation with LatA resulted in the production of blastocysts with higher number of cells and better quality than CB. We can then say that the use of LatA during activation improves the efficiency of the *in vitro* production of diploid porcine parthenogenetic embryos. On the other hand, this thesis also demonstrated that the use of LatA during activation is efficient for the production of clones generated by HMC, using somatic cells of adult animals. For the first time, this thesis evaluated the feasibility of accompanying LatA activation in porcine cloning by the HMC technique, producing embryos capable of developing until the blastocyst stage.

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han producido grandes avances en las biotecnologías reproductivas, y esto ha tenido un gran impacto en la producción animal al permitir mejorar, modificar y/o conservar características de interés zootécnico en animales domésticos. Entre estas biotecnologías reproductivas encontramos a la fecundación *in vitro* (FIV; Zheng, y Sirard, 1992), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, Nakai *et al.*, 2003) y clonación por transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, del inglés somatic cell nuclear transfer; Lee *et al.*, 2005). Todas ellas pueden ser usadas para la preservación de animales de alto valor genético, la conservación de especies en peligro de extinción, o incluso, producir embriones de los cuales se derivan células madres.

Los primeros antecedentes de clonación por transferencia nuclear datan de 1952, año en que Briggs y King logran implantar el núcleo de un embrión de rana en un óvulo de la misma especie. En el año 1970, John Gurdon logró trasplantar el núcleo de una célula adulta de rana en un óvulo enucleado.

En mamíferos, los reportes iniciales de clonación hacían uso de blastómeros de embriones tempranos de bovino y ovinos como células donantes (Willadsen, 1986; Prather *et al.*, 1987). Sin embargo, con el nacimiento de la oveja Dolly (Wilmut *et al.*, 1997), se demostró que las células somáticas adultas también podían ser reprogramadas por los ovocitos, dando lugar a un embrión e incluso a animales nacidos, con una genética idéntica al animal donante de la célula. Incluso antes del nacimiento de la oveja Dolly, en el año 1995, se logró el nacimiento de dos ovejas gemelas idénticas, clonadas a partir de células fetales: Megan y Morag. Este trabajo fue realizado por Ian Wilmut y su colega Campbell, en el Instituto Roslin (Campbell *et al.*, 1996). La oveja Dolly, de raza Finn Dorset, nació el 5 de julio de 1996 en el Instituto Roslin de Edimburgo

(Escosia), y su nacimiento se divulgó siete meses después. El nacimiento de Dolly fue fundamental para la propagación de la técnica de clonación, que al día de hoy es una de las biotecnologías más discutidas y estudiadas por la comunidad científica e industrial. Debido a su aplicación en producción animal, no transcurrió mucho tiempo para que esta tecnología comenzara a aplicarse en otras especies, como: ratones (*Wakayama et al., 1998*), bovinos (*Kato et al., 1998*), caprinos (*Baguisi et al., 1999*), y equinos (*Woods et al., 2003; Galli et al., 2003*). La especie porcina no ha sido ajena a la utilización de esta técnica (*Park et al., 2010; Polejaeva et al., 2000*). Si bien, el primer clon de cerdo fue reportado en el año 1989, producido a partir de embriones de 4 células (*Prather et al., 1989*), hicieron falta 10 años más para obtener cerdos clonados a partir de células somáticas adultas (*Li et al., 2000a; Onishi et al., 2000; Polejaeva et al., 2000*). La SCNT ha sido empleada en diferentes especies con fines diversos, entre los que se cuentan la posibilidad de multiplicar animales con alto valor genético, producir una cría de un animal muerto o incapacitados para reproducirse normalmente, y también la producción de animales transgénicos con diferentes fines (*Wilmut et al., 1997; Salamone et al., 2006*).

En particular, la técnica de SCNT consiste en la introducción de una célula somática, mediante fusión, en un ovocito previamente enucleado, con el fin de reconstituir un embrión con este nuevo núcleo. Para estos fines, generalmente se usan como células donantes, células que derivan de una muestra de tejido conectivo subcutáneo, pero también se puede usar cualquier célula somática sincronizada (*Kato et al., 1998; Wells et al., 1999; Gambini et al., 2012*). La eficiencia de la clonación por SCNT en las especies domésticas y en particular en el cerdo, continúa siendo baja, aun cuando se ha reportado el nacimiento de clones porcinos.

Esta baja eficiencia estaría dada por una incompleta o incorrecta reprogramación epigenética del núcleo somático, lo que conlleva a pérdidas de los embriones y fetos clonados durante la preñez (*Wells et al., 1999*). Para lograr una exitosa producción de clones, es necesario que el núcleo de la célula somática transferida sufra una serie de modificaciones epigenéticas que den lugar a cambios en la estructura y la composición de la cromatina (*Fulka et al., 1996*). Esta “reprogramación epigenética” es impulsada por factores presentes en el citoplasma del ovocito receptor, que permiten la adquisición de una cromatina comparable a la de un embrión indiferenciado (*Pasque et al., 2011*). Además, la producción de clones requiere de la activación química o física de los embriones reconstituidos, para el inicio del desarrollo embrionario (*Walker et al., 2000*). Durante este proceso es muy importante la retención del complemento diploide cromosómico (*Campbell et al., 1996; Wakayama et al., 1999; Salamone et al., 2004*). Por estas razones, en la presente tesis se buscó establecer un sistema para la producción de embriones clonados mediante una técnica de clonación conocida como clonación a mano, del inglés *hand-made cloning* (HMC). Asimismo, será importante entender aspectos básicos de la fisiología de los ovocitos y la activación de los mismos, que se describirán a continuación.

1.1 Maduración de ovocitos

En los mamíferos, el proceso de ovogénesis inicia en la etapa embrio-fetal y determina la cantidad de células germinales que las hembras poseerán en la adultez. En el caso de la especie porcina el número aproximado de folículos primordiales por ovario al momento del nacimiento es de 200.000 (*Moor et al., 1990*). Al igual que en otras especies, esta cantidad va disminuyendo al aumentar edad del animal, como parte de la fisiología normal.

En la etapa fetal, algunos ovocitos comienzan la proliferación meiótica (meiosis I) para dar lugar a un ovocito primario, pasando por las etapas de leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno (figura 1.1). En esta última etapa, el núcleo se conoce como vesícula germinal (VG) (Casas, 1996; Morales *et al.*, 2006). Desde la vida fetal hasta la pubertad, los ovocitos quedan detenidos en profase I, y el reinicio de la meiosis se encuentra inhibido (Voronina y Wessel, 2003).

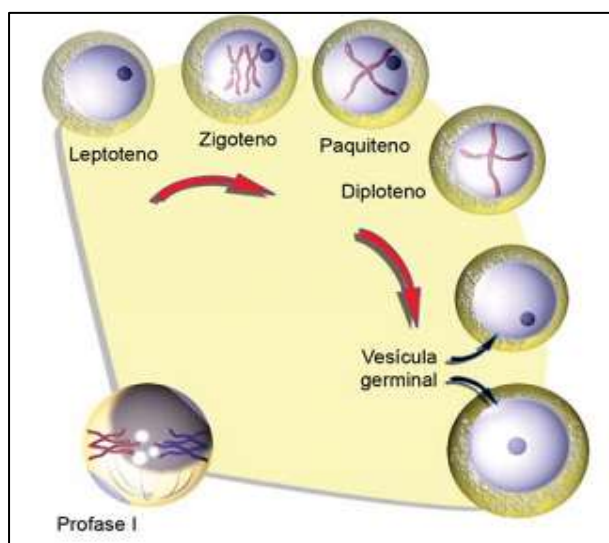


Figura 1.1. Profase I. Etapas del proceso de la profase I, hasta llegar a formar la vesícula germinal.

(Pagues y Aller, 2012).

La detención del ovocito en la etapa de profase I, es lograda a través de la comunicación entre el ovocito y las células somáticas de la granulosa o las células foliculares, que también influyen en su crecimiento (Eppig *et al.*, 1993; Salestri *et al.*, 1993). Los niveles de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) también afectan a la detención meiótica (Mattioli *et al.*, 1994), como se describirá más adelante.

Las células foliculares que rodean al ovocito influyen en su crecimiento. Estas células son estimuladas por los estrógenos y por la hormona folículo estimulante (FSH), para estratificarse y originar a las células de la granulosa. Posteriormente, continúan el crecimiento y originan la capa de células foliculares de la teca, constituyéndose un ovocito de primer orden o secundario (figura 1.2), el cual se encuentra alojado en el

interior de un folículo preantral (secundario). Estos folículos preantrales son sensibles a hormonas gonadotróficas y pueden desarrollar hasta el estadio de folículo antral (terciario), que contiene un ovocito con la capacidad de reanudar la meiosis (Voronina y Wessel, 2003).

Durante su desarrollo, el folículo antral atraviesa las etapas de: crecimiento basal, reclutamiento, selección y dominancia. A partir de la etapa de selección, resulta fundamental la acción de la FSH, la hormona luteinizante (LH) y los estrógenos. La FSH estimula el crecimiento de los folículos y el desarrollo de receptores de LH en células de la granulosa, de los ovocitos dominantes.

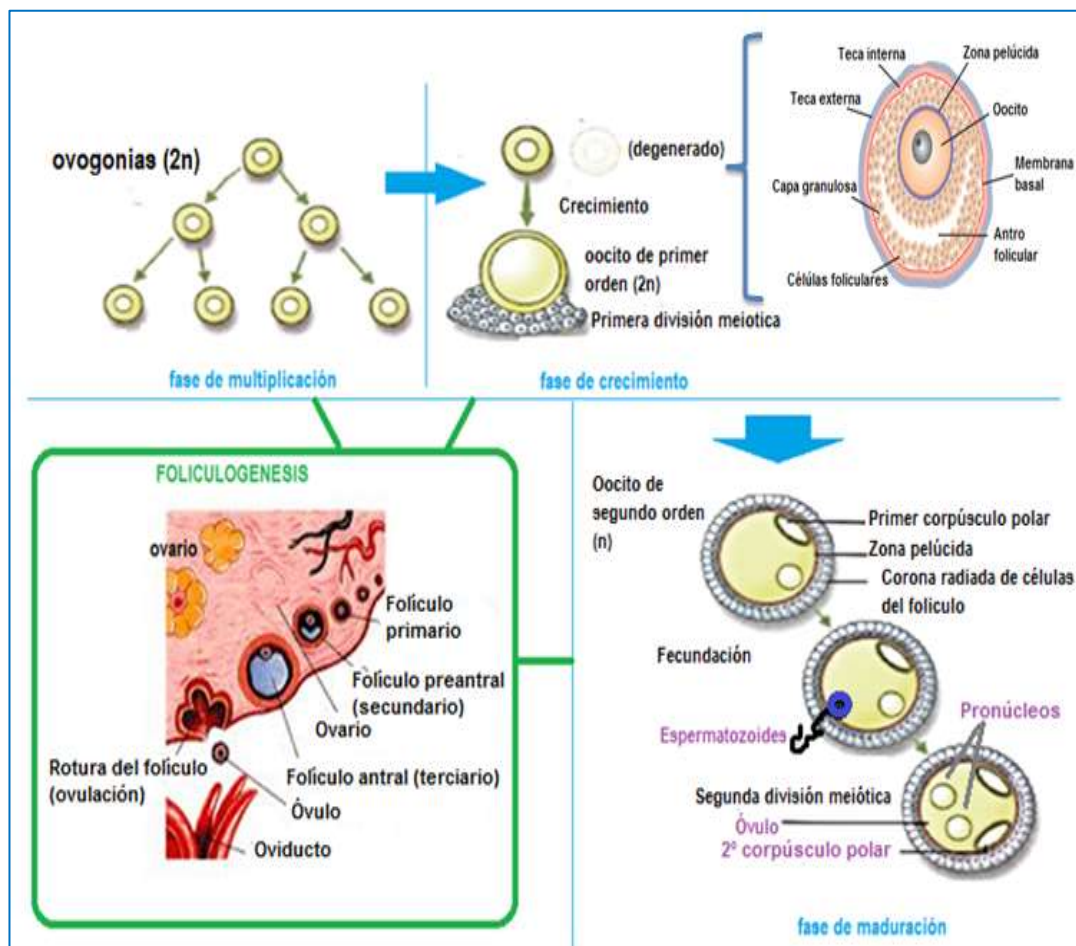


Figura 1.2. Ovogénesis y foliculogénesis. La imagen muestra el proceso de foliculogénesis en sus diferentes estadios. También se muestra la ovogénesis, en fase de multiplicación, crecimiento y maduración del ovocito, con la capacidad de ser fecundado por un espermatozoide (Pagues y Aller, 2012).

Durante el periodo comprendido entre el pico de LH y la ovulación, el ovocito sufre una serie de cambios en su núcleo y citoplasma, a este proceso se le conoce como maduración. La maduración final del ovocito se produce en los folículos ovulatorios después del pico de LH, que actúa sobre las células foliculares liberando al ovocito del arresto en profase I, para reanudar la meiosis, hasta alcanzar la etapa de metafase II (MII) de la segunda división meiótica (figura 1.3) (Voronina y Wessel, 2003).

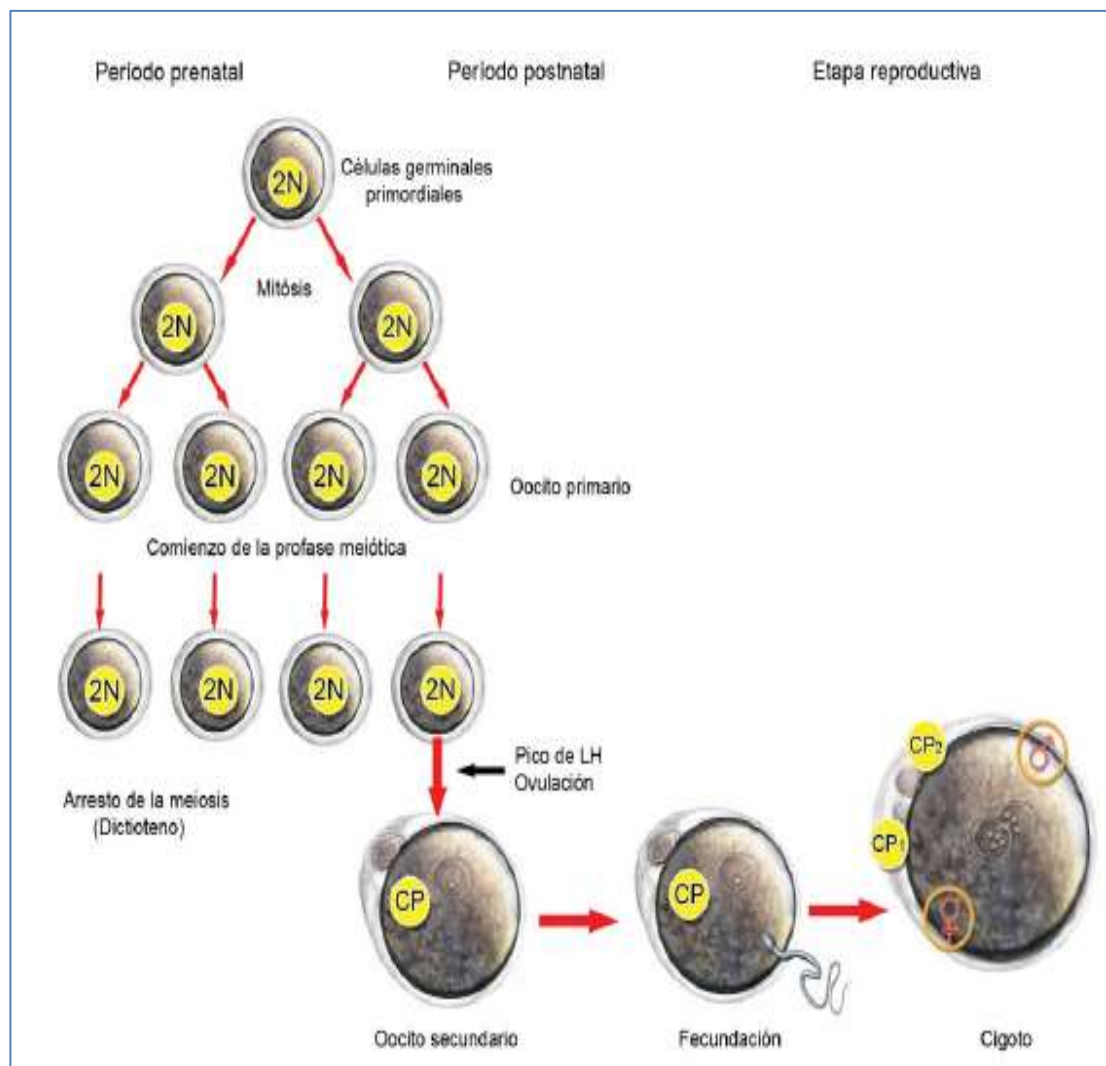


Figura 1.3. Esquema de la ovogénesis y proceso de maduración (Pagues y Aller, 2012).

Este proceso involucra cambios morfológicos y bioquímicos, que incluyen la ruptura de la vesícula germinal (RVG), la condensación de la cromatina en cromosomas bivalentes, la distribución de los orgánulos citoplasmáticos, la segregación de los

cromosomas homólogos y la liberación del primer corpúsculo polar (CP) (Ali y Sirard, 2005).

Para que el ovocito tenga la capacidad de ser fecundado, lograr una correcta formación de pronúcleos y mantener el desarrollo embrionario, debe sufrir una adecuada maduración citoplasmática, y cambios moleculares de la membrana plasmática (Ali y Sirard, 2005; Sirard et al., 2006).

1.1.1 Maduración citoplasmática

Como se menciona en el apartado anterior, la maduración citoplasmática de los ovocitos inicia en los folículos primordiales y comprende los cambios citoplasmáticos que ocurren durante la transición desde el estadio de VG hasta el final de la MII, estos están asociados con la posibilidad de sostener un desarrollo embrionario posterior (Fulka et al., 1998; Salomone et al., 2001).

Durante toda esta etapa ocurren eventos importantes dentro de los folículos primordiales. Los ovocitos reciben las señales de las células somáticas que lo rodean, influyendo en su crecimiento y ciclo celular, mediante la acumulación y suministro de nutrientes (Carabatsos et al., 2000). Los ovocitos que se encuentran dentro de estos folículos son capaces de aumentar su tamaño, pero no de dividirse, a diferencia de las células somáticas acompañantes.

Otro evento que ocurre, es el almacenamiento de gran parte de los productos procedentes de la transcripción y traducción, que no han sido utilizados durante la fase de crecimiento, como: una gran colección de ARNs, gránulos corticales, ribosomas, mitocondrias, proteínas y orgánulos (Wessel et al., 2001). Estos productos almacenados serán utilizados posteriormente en las etapas tempranas de embriogénesis.

También, se produce una serie de modificaciones bioquímicas y morfológicas como respuesta al pico preovulatorio de LH. Los ovocitos pasan de un ambiente estrogénico a

otro donde predomina la progesterona, de tal forma que inicia la producción de ácido hialurónico por parte de las células de la granulosa que permite la expansión de las células del cúmulus.

Por otro lado, las mitocondrias del ovocito en estadio de VG, se distribuyen alrededor del núcleo, coincidentemente al momento de la ruptura de la vesícula germinal. Del mismo modo los gránulos corticales migran hacia la membrana celular, estabilizados por una capa de filamentos de actina que se interponen entre los gránulos corticales y el oolema del ovocito (*Carabatsos et al., 2000*). Estos eventos de migración serán importantes para el bloqueo de la polispermia durante la fecundación. Por su parte, el retículo endoplasmático adquiere posición cortical, preparándose para la liberación de calcio requerida durante la activación del ovocito (*Rodríguez y Farin, 2004*). La activación precisará de la síntesis de proteínas adicionales, importantes para la progresión del ciclo meiótico y formación del pronúcleo femenino (*Sirard et al., 2003*). Por último, la activación del genoma embrionario se desencadenará en consecuencia a la reorganización y utilización de los productos formados durante los eventos anteriores (*Sirard, 2001*).

1.1.2 Maduración nuclear

Durante la maduración nuclear o maduración meiótica, ocurren eventos que permiten la reanudación de la meiosis y su progresión hasta el estadio MII. Este proceso es estimulado por factores de crecimiento y hormonales (*Sirard et al., 1989; Van de Sandt et al., 1990*). Durante la maduración se desencadena la RVG y el ovocito pasa por las etapas de metafase I, anafase I, telofase I, para detenerse en la metafase II (figura 1.4).

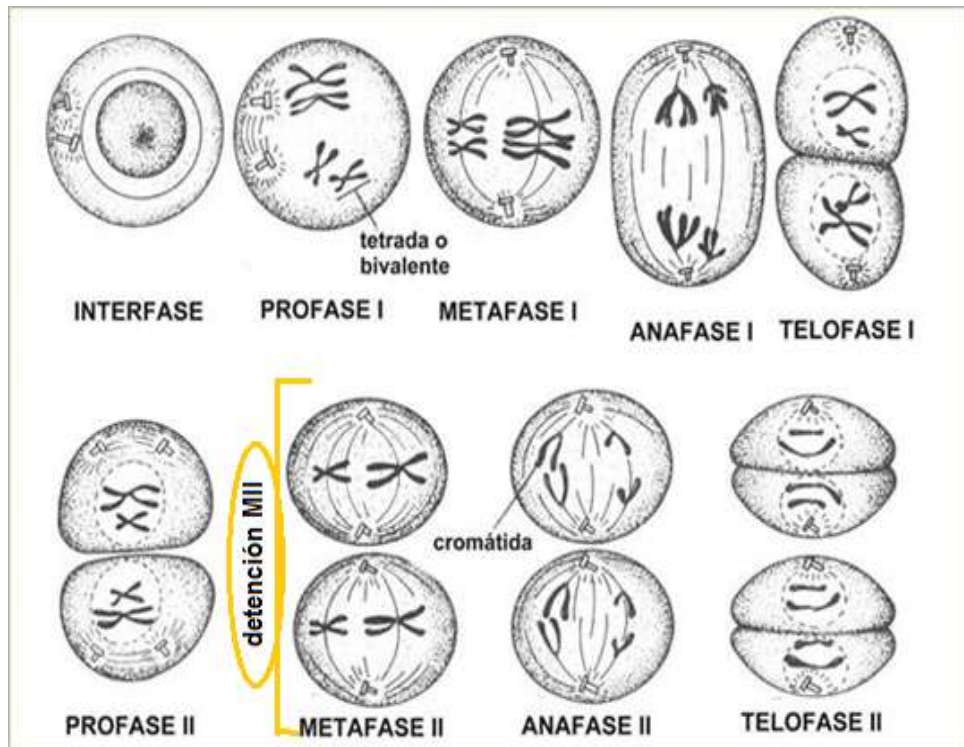


Figura 1.4. Esquema de las etapas de meiosis (división meiótica del ovocito). (Dzul., 2007).

Los cromosomas homólogos se separan y el ciclo del ovocito progresa hasta la extrusión del primer CP. En este punto la meiosis se bloquea, por una disminución en los niveles de AMPc. Al caer los niveles de AMPc, el factor promotor de la mitosis o maduración (MPF) es activado, al igual que otras quinasas y fosfatasa (*Eyers et al., 2005*).

La capacidad para alcanzar el estadio de MII es considerada como la señal de maduración y competencia ovocitaria. El ovocito queda inhibido en este estadio de MII, que solo culminará de ocurrir la fecundación o activación artificial (*Moor et al., 1990*).

1.1.3 Competencia del ovocito

El ovocito adquiere competencia meiótica, cuando es capaz de reanudar la meiosis y llegar a ser fecundado, momento en el cual se liberará el segundo corpúsculo polar, y finalizará la meiosis (*Ali y Sirard, 2005*).

Un factor importante para la adquisición de la competencia, es el tamaño del ovocito, así como también del folículo. Los ovocitos reanudan la meiosis cuando alcanzan su

tamaño adulto, de aproximadamente 120 μm , previo a la ovulación (Moor y Warnes, 1979). En los porcinos, folículos con diámetro menor a 0.7 mm contienen ovocitos incapaces de reanudar la meiosis. Conforme va aumentando el diámetro del folículo, esta capacidad de desarrollo se incrementa (Hunter, 2000). En los ovocitos porcinos es necesario un periodo de síntesis proteica que se da durante la maduración citoplasmática, anterior a la RVG (Fulka et al., 1986).

La capacidad meiótica está asociada a diferentes componentes esenciales del ciclo celular como el MPF, una quinasa que se activa en ovocitos completamente desarrollados. El MPF está constituido por una subunidad reguladora (Ciclina B) y una subunidad catalítica (proteína de 34-kDa) denominada $p34^{\text{cdc2}}$, CDC2 o CDK1, con actividad quinasa de serina y treonina. Esta quinasa es una de los principales reguladores de la transición desde la fase G2 hacia la fase M durante la mitosis. La activación de MPF es inducida por la defosforilación de la tirosina de la subunidad catalítica de $p34^{\text{cdc2}}$ y por la síntesis de ciclina B como muestra la figura 1.5.

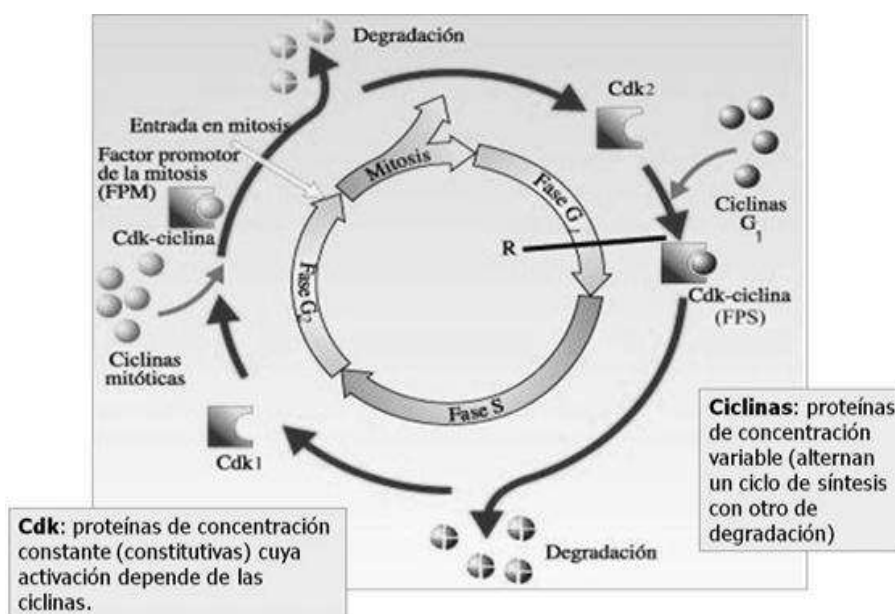


Figura 1.5. Degradación de la ciclina activadora de la Cdk. Cuando las ciclinas alcanzan un nivel suficiente, la quinasa se activa y desencadena la entrada de la célula a la fase correspondiente ya sea S o M, en caso del ovocito alcanza la fase MII (Cerqueira., 2009).

Los ovocitos porcinos $\leq 90 \mu\text{m}$ de diámetro, son incapaces de reanudar la meiosis *in vitro*, porque contienen la forma fosforilada de p34^{cdc2} que no permite la activación de MPF (*Christmann et al., 1994*). Cuando completan su crecimiento son capaces de activar la subunidad catalítica CDC2, pero todavía no han establecido una vía MAP quinasa-activadora (Proteína quinasa activadora de mitógenos, MAPK), que les permita proseguir la maduración hasta el estadio de MII (*Motlik et al., 1984; 1998*). Entonces se puede decir; para que los ovocitos adquieran competencia meiótica, éstos deben tener la capacidad de activar en primer lugar CDC2, que provoque la activación de MPF y una vía MAPK durante la fase de crecimiento.

Otras quinasas reguladoras de la maduración, como la señal extracelular quinasa regulada (ERK), específicas de las células germinales, conjuntamente con MPF intervienen en la maduración del ovocito. ERK tiene dos isoformas no fosforiladas, ERK1 (44kDa) y ERK2 (42kDa).

Mediante fosforilación, estas quinasas se vuelven activas durante la RVG, al igual que MAPK p38 y las quinasas terminales c- JunN (JNK), proteínas que permanecen activas durante la progresión de MI a MII (*Fulka et al., 1998*).

Otro factor clave para la reanudación de meiosis es el AMPc, como se mencionó anteriormente. Bajos niveles de AMPc provocan la desfosforilación de CDC2 en los residuos Thr-14 y Tyr-15, y el complejo MPF se reactiva de tal modo que el ovocito pueda reiniciar la meiosis. Entre las proteínas involucradas más importantes, se encuentra la proteína quinasa A (PKA), quien regula las actividades de la fosfatasa CDC25 y la quinasa WEE1/MYT1. CDC25 desfosforila a CDC2, mientras que WEE1/MYT1 la fosforila (*Izumi y Maller, 1993; Duckworth et al., 2002*).

Los niveles basales de AMPc producidos por las células somáticas de los folículos, mantienen al ovocito bajo arresto meiótico. Al producirse el pico preovulatorio, se

desencadena la producción de grandes cantidades de AMPc en células de la granulosa y del *cumulus* provocando su expansión (Eppig *et al.*, 1997). Bajo estas condiciones, el flujo de AMPc al ovocito, desciende por debajo del umbral requerido para inhibir la activación de MPF. En consecuencia, se producen la activación de MPF y MAPK (Richard, 2007), provocando el reinicio de meiosis del ovocito.

1.1.4 Maduración *in vitro*

Como se ha remarcado en el punto anterior, la calidad del ovocito afecta al desarrollo embrionario temprano, por este motivo es importante mencionar que en la maduración *in vitro* (MIV), se busca imitar lo mejor posible el proceso natural de maduración ovocitaria.

A través de la MIV es posible obtener ovocitos en MII, que han reanudado la primera división meiótica. Los mismos pueden ser fácilmente evaluados mediante visualización del primer CP. Actualmente, la MIV es un paso previo a las técnicas de: fecundación *in vitro*, transferencia nuclear de células somáticas, inyección intracitoplasmática y otras afines. Puede ser aplicada en las diferentes especies, y se aplica de manera relativamente estándar.

Es importante tener en cuenta que la calidad del ovocito influye en el desarrollo temprano de los embriones, la implantación, el desarrollo fetal y su mantenimiento durante la preñez (Krisher, 2004). La maduración citoplasmática *in vitro* de los ovocitos muchas veces resulta insuficiente. Esto puede deberse a características propias de los ovocitos y/o a condiciones sub-óptimas de cultivo (Abeydeera, 2002). Con el fin de resolver estos problemas y lograr tener embriones viables a partir de ovocitos recuperados de matadero, se tiene que realizar una buena selección, manipulación y cultivo en medios suplementados óptimos para el desarrollo del ovocito (Ueno *et al.*, 2005). Luego a la recuperación, es fundamental realizar una buena selección de los

COC (Complejos cúmulus-oocito), para lograr buenas tasas de maduración. Los ovocitos con mayor viabilidad, son aquellos que están rodeados por tres o más capas de células del cúmulus y tienen aspecto homogéneo del citoplasma (*Nagashima et al., 1996*).

Las condiciones físicas del ambiente que influyen en maduración de ovocitos son: tiempo de incubación, temperatura, tensión de CO₂/O₂ de la incubación, la osmolaridad, pH, también es importante el medio de maduración utilizado y el volumen de medio cultivo para obtener un buen resultado final (*Jurema y Nogueira, 2006*).

La duración de cultivo en la MIV de los ovocitos porcino, oscila desde las 36 h hasta las 48 h. *Ka et al., (1997)* manifiestan que 36 h serían suficientes para completar los procesos de maduración nuclear y citoplasmática. Por el contrario, *Yamauchi et al., (1996)* señala que un periodo óptimo de cultivo es de 42-44 h. Este lapso de cultivo se está utilizando actualmente en numerosos estudios. Otros autores describen diferentes intervalos de maduración para los ovocitos porcinos: 36 h (*Yoshida et al., 1993; Ka et al., 1997*), 40 h (*Funahashi y Day, 1993*), 44 h (*Liu et al., 1997*), 46 h (*Kikuchi et al., 1993*), 48 h (*Naito et al., 1988*), o incluso 50 h (*Kim et al., 1998a*).

La temperatura de incubación más utilizada para la MIV, FIV y el cultivo de embriones en las diversas especies domésticas, incluido el porcino es cercana a la temperatura corporal de 38.5°C o 39°C (*Abeydeera, 2001*).

La atmósfera de cultivo empleada como rutina en los protocolos de producción de embriones porcinos y otras especies es en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 5% de O₂. Normalmente, los cultivos *in vitro* utilizan medios ricos en bicarbonato sódico para mantener un pH adecuado.

La selección del medio de cultivo para la maduración *in vitro* de los ovocitos porcinos, depende del propósito de estudio o del grupo de trabajo. Los medios se clasifican en

función de la diversidad de sus componentes, pueden ser sencillos o complejos. Entre los medios de cultivo sencillos que se pueden preparar en el propio laboratorio, se encuentra el medio Whitten's (Ka *et al.*, 1997), el medio Krebs Ringer Bicarbonato (KRB; Naito *et al.*, 1988) y el medio North Carolina State University (NCSU; Abeydeera *et al.*, 1998). Dentro de los medios de MIV complejos podemos destacar el Tissue Culture Medium 199 (TCM199; Zheng y Sirard, 1992; Coy *et al.*, 1999) y el Waymouth (Yoshida, 1993; Coy *et al.*, 1999), a diferencia de los anteriores, se suelen adquirir comercialmente debido a su elevado número de componentes y es más difícil de preparar.

Los suplementos utilizados en los medios de maduración varían de igual forma, dependiendo del objetivo de la investigación y de los laboratorios. Entre estos suplementos encontramos el fluido folicular porcino (PFF), que contiene una sustancia ácida que promueve la maduración ovocitaria (Labadía, 1995), se adquiere de folículos de 3 a 6 mm de diámetro, aporta al medio de cultivo no sólo proteínas sino también cantidades basales de gonadotropinas y estradiol (Yoshida *et al.*, 1992), también es importante para aumentar las tasas de maduración nuclear, la formación del pronúcleo masculino y la expansión de las células del *cumulus*.

Otros suplementos son: el suero fetal bovino (SFB) y la albúmina sérica bovina (BSA), las cuales se utiliza como fuentes proteicas por el efecto surfactante (Palasz *et al.*, 2000). El glutatión, la cisteína, la cisteamina y otros compuestos con grupos tioles, protegen al ovocito contra los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno generadas por las condiciones de cultivo, manteniendo un ambiente de óxido-reducción adecuado (Meister y Anderson, 1983). Las gonadotropinas son uno de los factores decisivos en la MIV (Zheng y Sirard, 1992), porque mejora la maduración nuclear y la expansión del *cumulus*.

1.2 Activación del ovocito

1.2.1 Activación del ovocito en la fecundación

Tras la ovulación, el ovocito se mantiene arrestado en metafase II, esperando a ser fecundado por un espermatozoide capacitado y no reaccionado. Este espermatozoide debe atravesar las barreras presentes en el ovocito, entre las que se encuentran las células del *cumulus*, la zona pelúcida (ZP) y la membrana plasmática (Myles y Primakoff, 1997).

Para que el espermatozoide sea capaz de hidrolizar el ácido hialurónico y penetrar la capa del *cumulus* se debe ayudar con su propio movimiento hiperactivo y por una proteína llamada PH20 que tiene actividad hialuronidasa (Myles y Primakoff, 1997; Töpfer-Petersen et al., 2000). Una vez que el espermatozoide penetra la ZP se encuentra con la membrana del ovocito, produciéndose la fusión y activación del ovocito.

La activación se define como una serie de cambios que se producen en el ovocito, inducidos por el espermatozoide, que a su vez provocan la reanudación y culminación de la segunda división meiótica (MII), para el desarrollo posterior de un embrión (Yanagimachi, 2005). La activación se desencadena por la fusión de las membranas de ambos gametos, los cuales darán lugar a un cigoto diploide como muestra la figura 1.6.

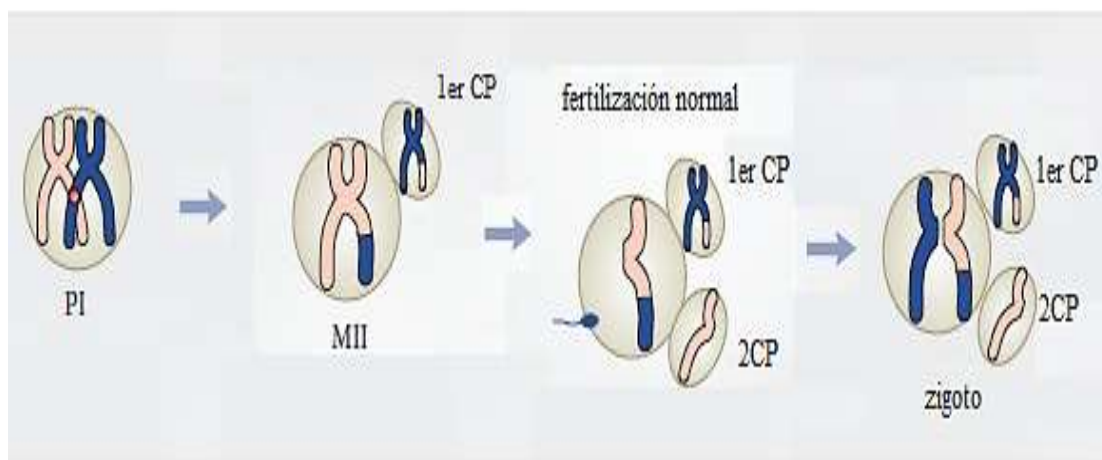


Figura 1.6. Meiosis y resultado embrionario después de la fertilización normal (de Bos-Mikich, 2016).

Uno de los efectos importantes inducidos por la fecundación en todos los ovocitos de mamíferos, es la ocurrencia de las oscilaciones de calcio (Ca^{2+}) intracelular que dura por varias horas. El Ca^{2+} es almacenado en el retículo endoplasmático y luego se libera en el citoplasma, mediante la apertura de canales de calcio (Jones, 2005).

Estos iones de calcio participan como mensajeros, conduciendo a la activación y reanudación de la meiosis, desde su primer incremento, que ocurre luego de los tres primeros minutos post fusión de membranas (Ben-Yosef y Shalgi, 2001).

La liberación de Ca^{2+} durante la activación es inducida por la acción de un segundo mensajero, InsP_3 , sobre sus receptores $\text{InsP}_3\text{-R}$, presentes en los almacenes del retículo endoplasmático (Miyazaki *et al.*, 1993). El InsP_3 se produce por la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP_2) mediante una fosfolipasa C, específica de fosfoinositoles (PLC). Diversos estudios demostraron que a la fosfolipasa C zeta 1 ($\text{PLC}\zeta$), una proteína del espermatozoide, sería responsable de la activación del ovocito, cuando se difunde a nivel del ooplasma (Amdani *et al.*, 2013; Kashir, 2010; Saunders *et al.*, 2002).

El Ca^{2+} incrementa desde niveles basales de 50-100/nmol/l hasta 600-1000/nmol/l dependiendo de la especie animal (Miyazaki *et al.*, 1993). La amplitud y frecuencia de los influjos de Ca^{2+} varían según avanza el proceso de fecundación, durante la interface y la formación pronuclear. En los cerdos, las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular van aumentando con intervalos de aproximadamente 20 min y continúan durante varias horas después de la fusión de los gametos (Machaty *et al.*, 1997).

El incremento intracelular de Ca^{2+} induce la reacción cortical del ovocito y la liberación de gránulos corticales al espacio perivitelino, modificando las glicoproteínas de la ZP, lo cual establece el bloqueo a la polispermia (Yanagimachi, 2005). Por otro lado, las

enzimas que se activan mediante las oscilaciones de Ca^{2+} necesitan un ambiente elevado de pH para poder actuar (*Ben-Yosef y Shalgi, 2001*).

Otro factor que causa la activación de la proteína quinasa C (PKC) dependiente del Ca^{2+} , es el diacilglicerol (DAG) provocado por la hidrólisis del PIP2 (*Newton, 2003; Halet, 2004*). El DAG estaría involucrado en la extrusión del segundo CP, la liberación de los gránulos corticales y el reordenamiento del citoesqueleto interno del ovocito.

Como se explicó anteriormente, los ovocitos de mamíferos arrestados en MII, presentan elevadas cantidades de MPF, responsable del ensamblaje del huso mitótico, condensación de la cromatina y ruptura de la envoltura nuclear. Este MPF permanece activo por la presencia del factor citostático, que previene la degradación de la ciclina B. El espermatozoide induce el incremento de Ca^{2+} intracelular, desencadena la degradación de la ciclina B (*Lorca et al., 1993*), permitiendo la reanudación de la meiosis y la entrada en anafase II de la cromatina del ovocito. Por otro lado, MAPK decrece durante la activación del ovocito, causando la reaparición de la envoltura nuclear (*Moos et al., 1995*). También se producen cambios en el patrón de síntesis proteica durante la activación, a causa de las modificaciones post-traduccionales en las proteínas existentes. El ovocito sufre una serie eventos biológicos: a) la liberación de los gránulos corticales que evitará la poliespermia, b) la extrusión del segundo corpúsculo polar, c) el reordenamiento del citoesqueleto y d) la formación de los pronúcleos (PN) femenino y masculino (*Amdani et al., 2015; Swann y Lai, 2013; Yoon et al., 2008*).

Este proceso continúa con la síntesis de ADN, condensación y unión de ambos juegos cromosómicos en un huso mitótico. Finalmente, tras completarse la primera división mitótica, se obtienen las dos primeras blastómeras, cada una con el complemento cromosómico diploide correspondiente.

1.2.2 Partenogénesis.

La partenogénesis, no es una forma de reproducción natural en los mamíferos. Sin embargo, permite producir embriones *in vitro*, a partir de un gameto femenino en MII, sin la contribución del material genético del gameto masculino.

La activación paternogénica constituye una herramienta para el estudio de los eventos que ocurren durante la activación del ovocito y el desarrollo embrionario temprano. También se utiliza para evaluar la calidad y la maduración citoplasmática de los ovocitos (*Ranjan et al., 2013*). Además, puede aplicarse para asistir protocolos de ICSI y de SCNT (*Méo et al., 2004*).

Los primeros estudios de partenogénesis en mamíferos se realizaron en conejos y permitieron demostrar que no solo es posible inducir la extrusión del segundo CP por la activación del espermatozoide, sino también artificialmente, de forma *in vitro* mediante tratamiento térmico o exposición al ácido butírico y soluciones hipertónicas (*Pincus y Enzman, 1936*). También se demostró que sustancias oxidantes (*Li et al., 2000b*) y antioxidantes (*Yu et al., 1997*) son capaces de activar las cascadas de MAPK, en respuesta a las oscilaciones de Ca^{2+} .

Como se mencionó anteriormente, la activación del ovocito requiere la ocurrencia de las oscilaciones de calcio para inactivar MPF, y que el ovocito pueda retomar la meiosis, con la consecuente extrusión del segundo CP y formación de los pronúcleos (*Kikuchi et al., 2000*).

En la partenogénesis, este evento se produce mediante el uso de diferentes agentes, tales como estímulos físicos (mecánicos y eléctricos; etc.) o químicos (*Paffoni et al., 2008*), capaces de inducir el desarrollo embrionario *in vitro*.

Los procesos que tienen lugar en el interior de los ovocitos activados artificialmente parecen ser similares a los que ocurren tras la activación inducida por el

espermatozoide. Sin embargo, en lugar de desencadenarse una serie de oscilaciones de Ca^{2+} , la mayoría de estos estímulos partenogénicos inducen la formación de un solo pico de Ca^{2+} . Dependiendo del estímulo puede o no producirse la emisión del segundo CP. La exocitosis de gránulos corticales también ocurre en menor proporción y la membrana nuclear se reconstruye alrededor de unos pocos cromosomas.

Dependiendo del agente activador usado, se pueden producir embriones partenogénicos haploides o diploides, según se produzca la extrusión o no el segundo CP (Bos-Mikich *et al.*, 2016).

a) Partenogénesis diploide: implica el tratamiento con un agente de activación seguido por otro producto químico, que se encarga de bloquear la extrusión del segundo CP. El resultado es un embrión "diploide", que contiene las dos cromátidas hermanas del cromosoma materno presente en el ovocito MII (figura 1.7).

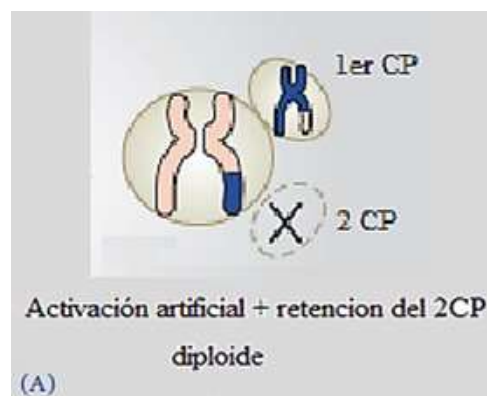


Figura 1.7. Meiosis y embrión resultante de la Partenogénesis diploide (de Bos-Mikich, 2016).

b) Partenogénesis haploide: el agente de activación induce el reinicio de la meiosis y la extrusión del segundo CP. Como resultado se obtiene un embrión con un número haploide de cromosomas (figura 1.8).

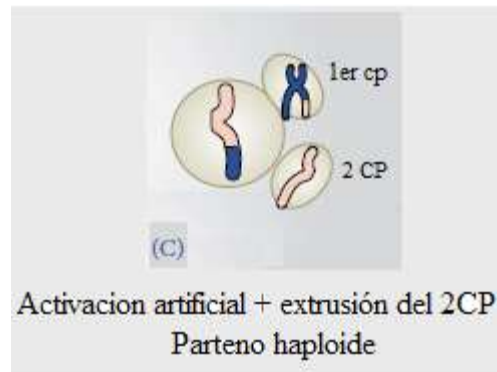


Figura 1.8. Meiosis y embrión resultante de la Partenogénesis haploide (de Bos-Mikich, 2016).

En la actualidad contamos con una amplia gama de protocolos de activación; sin embargo, aún es necesario establecer protocolos específicos y más eficientes para las diferentes especies.

Para la inducción del aumento de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, generalmente se utilizan productos químicos tales como cloruro de estroncio (SrCl_2) en el ratón, ionomicina/ionóforo de calcio en bovinos y ovinos, la estimulación eléctrica en porcinos (Kragh *et. al.*, 2005).

Para la posterior inactivación de MPF, luego del estímulo inicial, se realiza tratamiento con otros agentes, tales como: cicloheximida (CHX), 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) o roscovitina (ROS), que reducen la actividad de MPF, actuando sobre la ciclina B y la fosforilación de las proteínas quinasas. Para mantener la ploidía, se usan inhibidores de actina, que evitan la polimerización de los filamentos de actina, por ende, impiden la extrusión del segundo CP. Entre estos agentes encontramos a la citocalasina B o D (CB, CD), y desde hace relativamente poco, la latrunculina A (LatA), como se describe a continuación.

1.2.2.1 Activación eléctrica en los ovocitos porcino

Como se mencionó en el apartado anterior, en la especie porcina la activación mediante pulso eléctrico (PE) ha demostrado ser capaz de inducir el incremento de los niveles de Ca^{2+} de modo más eficiente que la ionomicina. La activación eléctrica ha sido usada

también en otras especies como el ratón (*Onodera y Tsunoda, 1989*); conejo (*Özil, 1990*); y bovino (*Collas et al., 1993*). La activación mediante pulso eléctrico, induce la formación de poros a nivel de la membrana plasmática, que facilita el paso de Ca^{2+} extracelular hacia el interior del ooplasma (*Liu et al., 2015*).

Esto provoca la inactivación transitoria de MPF, a través de un solo pico de Ca^{2+} (*Zhu et al., 2002; Hosseini et al., 2008; Hai et al., 2014*). Para prevenir la reactivación de MPF es necesario usar un inhibidor de síntesis de proteínas o inhibidores más específicos de la fosforilación de proteínas kinasas. La inhibición de la síntesis de proteína conduce a una significativa disminución del MPF activo (*Martinez Diaz et al., 2003*).

Para una eficiente activación de los ovocitos, es importante lograr el ingreso de una cantidad óptima de Ca^{2+} . Esta cantidad de Ca^{2+} es proporcional al número y tamaño de los poros inducidos por la estimulación eléctrica. El número de impulsos, la intensidad de campo de pulso y la duración de los mismos, afectarán el influjo de Ca^{2+} al interior del ovocito, y tendrán un efecto en el desarrollo posterior del embrión (*Zhu et al., 2002*). Se observó una relación inversa entre la intensidad de campo eléctrico y el número de impulsos en los conejos, ratones y cerdos (*Collas y Robl, 1990; Collas et al., 1989; Özil, 1990; Zhu et al., 2002*). Con una baja intensidad de campo y un mínimo pulso, se induce bajas afluencias de Ca^{2+} , que son insuficiente para la activación del ovocito. Por el contrario, múltiples pulsos con un alto campo de fuerza perjudican al desarrollo de los ovocitos al provocar la formación excesiva de poros y daños en la integridad de la membrana (*Lee et al., 2004*).

1.2.2.2 Agentes químicos que actúan sobre la actividad de MPF durante la activación

Como ya se mencionó, la activación paternogénica requiere de un estímulo que incremente los niveles de Ca^{2+} , seguido por inhibidores de síntesis de proteínas o inhibidores más específicos de la fosforilación de proteínas kinasas (*Cheng et al., 2007*).

Entre las drogas que se utilizan posteriormente a la inducción de la liberación de calcio, para bajar la actividad de MPF, encontramos:

a) Cicloheximida (CHX): esta droga es producida por la bacteria *Streptomyces griseus*. Es un inhibidor de la síntesis de proteínas, de la ciclina B y de otras proteínas de vida corta. Baja la actividad de MPF y los cromosomas decondensan para formar un pronúcleo (*Mori et al., 2008*).

Esta droga se utiliza durante 3 a 5 horas después de inducir la liberación de calcio. El uso de la CHX después de la inducción de los picos de Ca^{+2} , provoca una dinámica de inactivación del MPF similar a la inducida por la fecundación (*Liu y Yan, 1999*). Los intervalos de MPF y MAPK también son similares. Sin embargo, algunos estudios demostraron que el uso de la CHX provoca anormalidades en la dinámica del desarrollo embrionario temprano, por la deficiencia en el transporte de proteínas citoplasmáticas (*Soloy et al., 1997*). Para la especie porcina, *Ock et al., (2011)* reportaron que el uso de la CHX puede inducir la formación de un PN irregular y un bajo desarrollo pre-implantatorio. Por otra parte, los ovocitos tratados con CHX, sufren la extrusión del segundo CP, resultando en embriones haploides.

Por tal motivo, si se quiere obtener embriones partenogénicos diploides es necesario además el tratamiento con otras drogas, como la CB o LatA (*Kragh et al., 2005; Himaki et al., 2010*).

b) 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP): esta droga actúa como inhibidor de la fosforilación de proteínas quinasas (*Szöllosi et al., 1993*). Indirectamente, evita la reactivación de MPF, inhibiendo la fosforilación de MAPK y bloqueando a la fosfatasa CDC25, que son los encargados de llevar a cabo la activación del MPF (*Alberio et al., 2001*). El 6-DMAP además presenta una acción directa sobre CDK1 (uno de los

componente de MPF), provocando fosforilación en uno de sus sitios inhibidores (*Liu y Yang, 1999*).

Al usar 6-DMAP, la actividad de MPF declina media hora después de haber inducido el pico de Ca^{2+} ; por el contrario, MAPK disminuye 3 - 4 horas post activación. El periodo de incubación en 6-DMAP es de 3 a 4 horas, y se realiza luego de inducir los picos de Ca^{2+} , logrando elevados porcentajes de activación y formación de pronúcleos. Esta droga fue ampliamente aplicada en diversas especies: ratón (*Oliveira et al., 2015*), conejo (*Collas y Robl, 1990*), ovino (*Smith y Wilmut, 1989*), bovino (*Bevacqua, 2007*) y porcinos (*Buemo et al., 2016*).

A diferencia de la CHX, el tratamiento con 6-DMAP genera embriones diploides, por lo cual no es necesario adicionar drogas para evitar la extrusión del segundo CP (*Moses y Masui, 1995; Cha et al., 1997*).

A pesar de las altas tasas de desarrollo embrionarios inducidas por 6-DMAP, esta sustancia química provoca anormalidades cromosómicas y síntesis prematura del ADN (*De la fuente y king, 1998*). También induce tempranamente la desfosforilación de MAPK provocando un desarrollo pro-nuclear más temprano (*Liu y Yang., 1999*).

1.2.2.3 Los filamentos de actina y su actividad durante la activación del ovocito.

En la presente tesis, hicimos uso de drogas con acción a nivel de los filamentos de actina, una de las proteínas más importantes del citoesqueleto de una célula (*Tim, 2010*). En las células eucariotas, el citoesqueleto constituye una red de filamentos de proteínas extendidas por el citoplasma, que determinan la forma de la célula. La organización del citoplasma es responsable del movimiento de la célula, del transporte de los orgánulos y de los cromosomas a través del citoplasma. El citoesqueleto se reorganiza continuamente durante el proceso de división celular (*Cooper, 1987*) y está constituido por tres tipos de filamentos proteicos: los microtúbulos, los filamentos intermedios y los

filamentos de actina (actina filamentosa F o microfilamento). Estos últimos se forman a partir de la polimerización de moléculas de actina o actina monomérica (actina globular G), que resultan en una hélice de doble cadena (*kabsh et al., 1990*).

Los filamentos de actina están localizados principalmente debajo de la membrana plasmática, formando redes para el soporte mecánico y proporcionan forma a la célula, permitiendo su movimiento migratorio y división celular (*Tim, 2010; Paniagua et al., 2007*).

Los filamentos de actina se diferencian de las actinas musculares porque no son estructuras permanentes, sino capaces de polimerizarse y despolimerizarse según las necesidades funcionales de la célula.

Estos filamentos de actina presentan dos extremos, el extremo “mas” o “+” y el extremo “menos” o “-“, como se puede observar en la figura 1.9. Esta polaridad es importante para su ensamblaje.

Por ambos extremos puede ocurrir la polimerización, pero desde el extremo “+” es hasta 10 veces más rápido que desde el extremo “-” (*Paniagua et al., 2007*). Un aparente equilibrio de los monómeros de actina y los filamentos, se debe a la polimerización reversible, en ambos extremos (*Tim, 2010*).

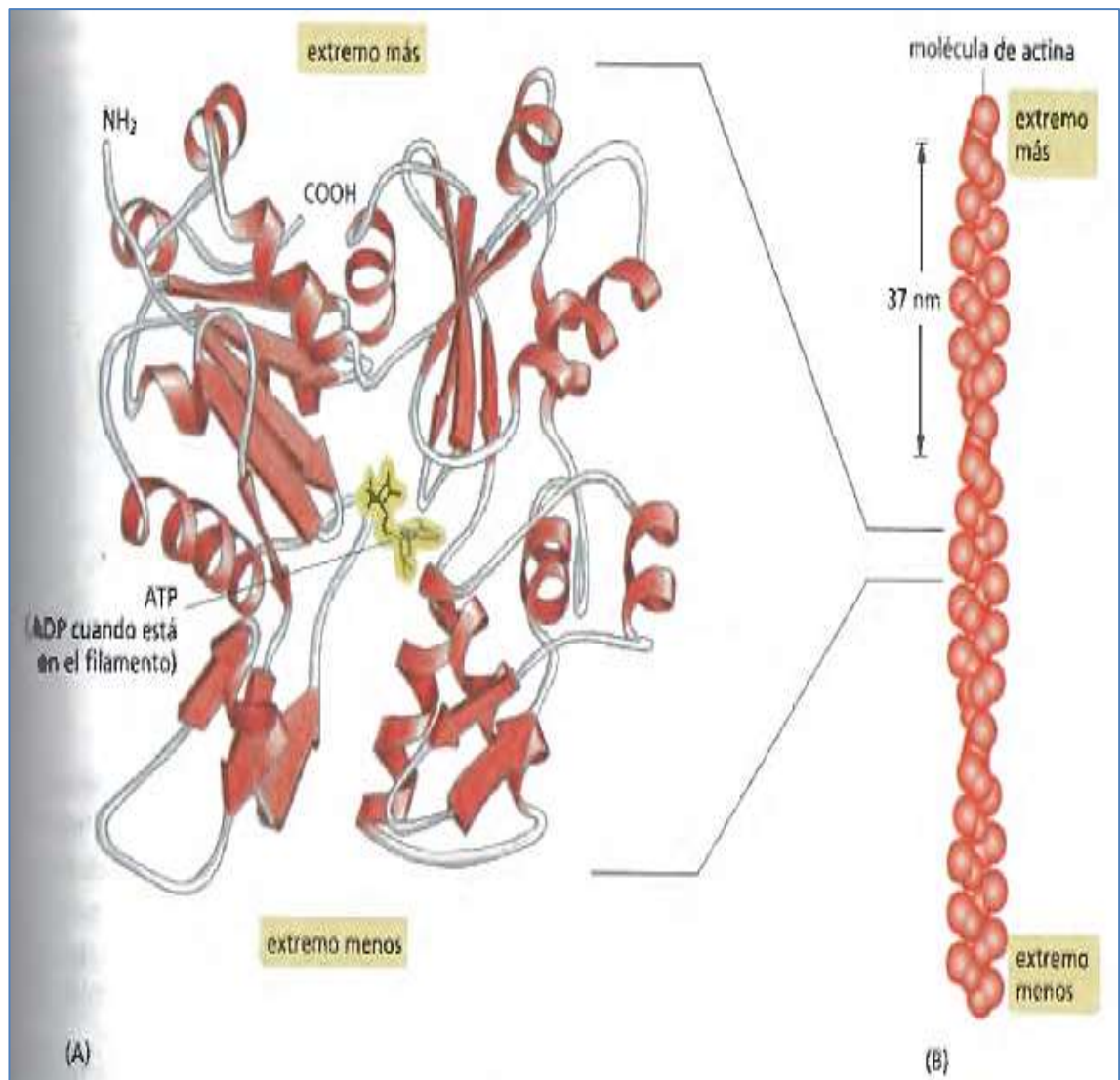


Figura 1.9. monómeros y filamentos de actina: A. Monómero de actina unido a un nucleótido (ATP o ADP). B) los filamentos de actina con sus subunidades con una misma orientación, con sus extremos “+” y “-”, (de Paniagua et al., 2007).

La polimerización de los monómeros de actina también está regulada por la unión al ADP o ATP. Aquellos monómeros que se encuentran unidos al ATP deben hidrolizarse en ADP tras su ensamblaje al filamento, éstos se polimerizan más rápido que aquellos monómeros libres que tienen unidos ADP (*Paniagua et al., 2007*).

El inicio de la polimerización o nucleación de la actina, ocurre a partir de un centro de organización: el complejo de proteínas relacionadas a la actina (ARP ó PAR; actin related proteins), al que se unen tres monómeros de actina. El PAR tiene un rol

importante en los procesos celulares, incluyendo la adhesión celular, citocinesis, polarización celular y migración. En los ovocitos de ratón, las proteínas PAR se hallan en el huso meiótico previo al estadio MII; concentrados en la capa de actina polarizada (Duncan y Moss, 2005; Moore y Zernicka-Goetz, 2005).

Durante la división celular, se produce una red de filamentos de actina en la región nuclear de los ovocitos, que se encargan del transporte de los cromosomas hacia el huso mitótico (Lènard *et al.*, 2005). Cuando los cromosomas están duplicados y repartidos en la etapa de telofase, formando los núcleos hijos, tanto microfilamentos como microtúbulos (filamentos de actina, miosina II y la actina α) forman un anillo contráctil llamado cuerpo de *flemming*, anillo ecuatorial o surco de segmentación (figura 1.10). Al centro de este anillo se encuentran restos de filamentos de actina que formaban parte del huso mitótico.

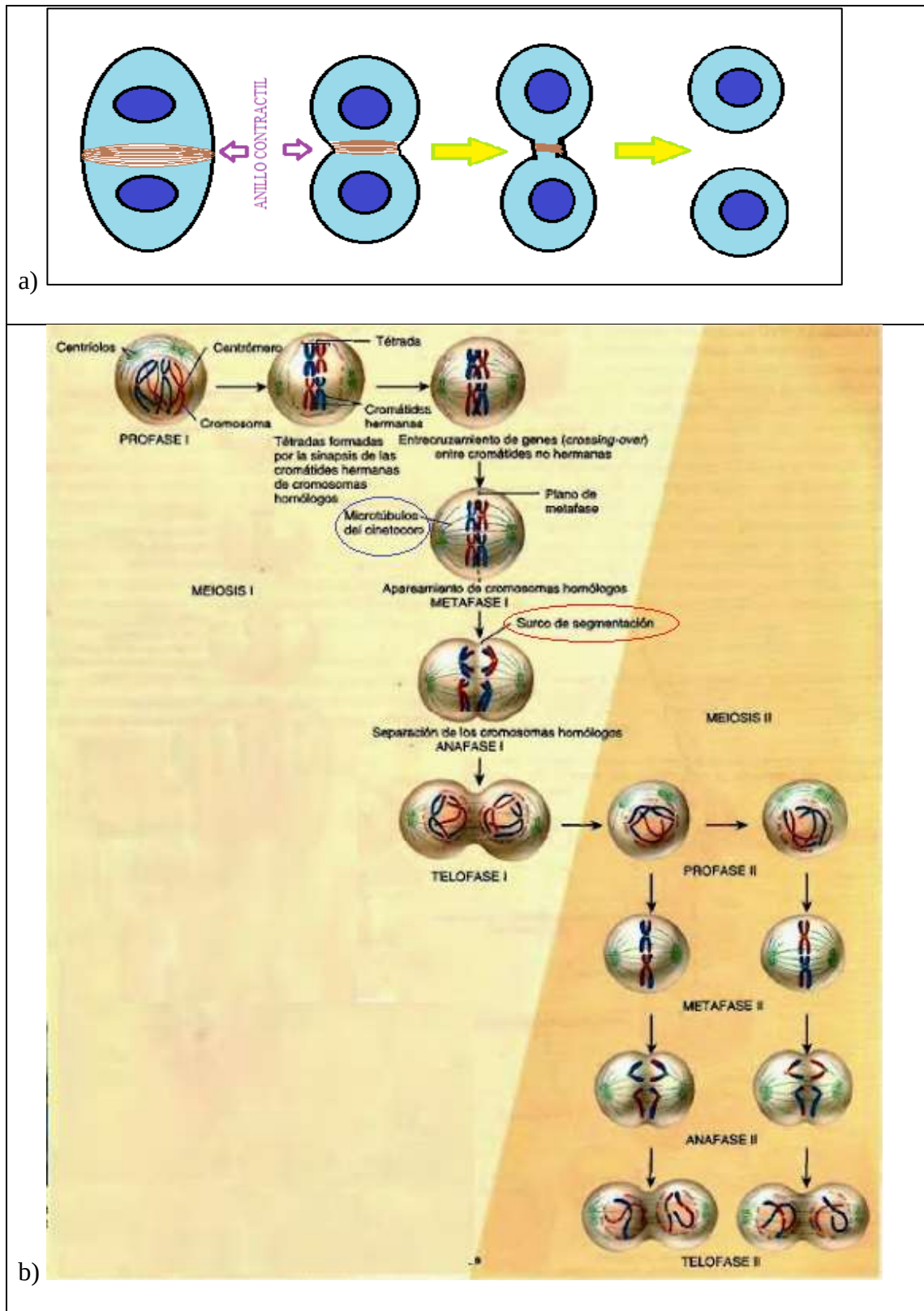


Figura 1.10. Anillo contráctil o surco de segmentación. A) División de la célula por la contracción de los filamentos (anillo contráctil); B. Progreso de la meiosis de un ovocito, en la que muestra la ubicación de los microtúbulos (azul) y la formación del surco de segmentación (rojo).

El anillo se contrae progresivamente hacia adentro, estrangulando a la célula en el lugar que se encontraban los cromosomas metafásicos, causando su división. Durante su contracción, se mantiene el grosor, y los filamentos de actina se desensamblan a medida que avanza este proceso. Después de la división celular, el anillo se disgrega completamente (Tim, 2010; Paniagua et al., 2007).

La maduración meiótica de los ovocitos de los mamíferos se caracteriza por una división asimétrica, que genera una célula hija más pequeña llamada corpúsculo polar con la mitad de cromosomas. Cuando el ovocito es activado, sufre un segundo proceso de división, que resulta en un segundo CP (Azoury et al., 2009; Brunet y Verlhac, 2011). Uno de los factores que causa esta división meiótica asimétrica, es la posición del huso.

Durante el proceso de maduración y fecundación, los filamentos de actina se ensamblan para liberar el primer y/o segundo CP. Chaigne et al., 2016, reportaron que después de la penetración del espermatozoide el huso mitótico, controlado por los filamentos de actina, gira de forma vertical a 90° para permitir la extrusión del segundo CP. De producirse la despolimerización de los filamentos de actina, se bloquea la emisión del primer o segundo CP (Maro y Flach, 1984).

Al usar inhibidores de filamentos de actina durante la maduración *in vitro* se puede bloquear el progreso de la meiosis (Kim et al., 1998b). Algo similar ocurre en los embriones partenogénicos o producidos por SCNT cuando se trata con estos inhibidores al momento de la activación. Dado que no hay rotación del huso ni división celular, el ovocito forma un pronúcleo femenino adicional, al estar impedida la extrusión del segundo CP (Kim et al., 1998b; Zhu et al., 2003).

Entre los inhibidores de filamentos de actina encontramos:

a) Citocalasina B (CB): es una mitotoxina que inhibe las divisiones citoplasmáticas y el movimiento celular, interviniendo a nivel de los filamentos de actina (Cooper, 1987). Provoca que los monómeros de actina libres no se adicionen a los filamentos en el extremo positivo (Theodoropoulos et al., 1994), de este modo inhibe la extrusión del segundo CP y mantiene todos los cromosomas dentro del ooplasma.

La CB adicionada durante la maduración bloquea la citocinesis e inhibe la liberación del primer CP (Verlhac et al., 2000). Algo similar ocurre durante la activación partenogénica diploide y la clonación, donde se bloquea la liberación del segundo CP o el speudo-corpúsculo polar, según sea el caso.

La CB no afecta la separación de las cromátidas hermanas y permite la formación de dos pronúcleos (Cooper, 1987; Zhu, 2003), resultando en embriones partenogénicos diploides (Lènard et al., 2005).

Los resultados de Lee et al., (2004), muestran que más del 70% de ovocitos tratados con un solo pulso eléctrico (PE), seguido por incubación en CB presentan dos pronúcleos, siendo presumiblemente diploides en mayores tasas que los tratados solo con PE (40% de retención del segundo CP). Cha et al., (1997), también demostraron que el tratamiento con CB posterior a la estimulación partenogénica desencadena un mejor desarrollo de embriones porcinos.

La incubación en CB aumenta la producción de blastocistos *in vitro* (Zhu, 2003). Sin embargo, también se demostró que la CB posee citotoxicidad (Gabbiani et al., 1975) y que podría tener un efecto perjudicial en el desarrollo posterior de los embriones de SCNT.

b) Latrunculina A (LatA): es una toxina purificada a partir de la esponja del Mar Rojo *Latrunculia magnífico*, que inhibe la polimerización de la actina. La LatA influye en la polimerización de actina formando un complejo molar 1:1 entre LatA y G-actina (Coué

et al., 1987). Se une específicamente al monómero de actina (G-actina) y no tiene actividad para bloquear el extremo positivo de la F-actina (*Yarmola et al.*, 2000).

En la clonación por SCNT, se utiliza ampliamente la CB como inhibidor de la extrusión del pseudo-CP. Sin embargo, la citotoxicidad presentada por la CB genera la necesidad de encontrar nuevas drogas para reemplazarla. En el caso de esta tesis se decidió evaluar la LatA.

La mayoría de los trabajos actualmente disponibles, que describen el uso de LatA, han sido realizados en ratones. *Mallol et al.*, (2015) reportaron un aumento significativo en la tasa de blastocitos producidos por SCNT. Además, *Terashita et al.*, (2012; 2013), compararon la CB con LatA, encontrando en los ovocitos tratados con LatA que todos los cromosomas se mantuvieron dentro del ooplasma sin efectos adversos para la F-actina, similar a lo que sucede en la fecundación. Además, reportaron un incremento en la tasa de nacimientos de ratones clonados. Por el contrario, la localización de la F-actina en embriones clonados tratados con CB mostró ser diferente respecto a la de embriones fecundados.

En el año 2012, *Himaki et al.*, demostraron que el tratamiento con LatA en embriones producidos por SCNT en porcinos de la variedad “*minipigs*” a partir de células fetales, era eficaz para inhibir la extrusión del pseudo corpúsculo polar. Este mismo grupo, demostró que la LatA mejora la capacidad de desarrollo de embriones clonados de cerdo “*minipigs*” (*Himaki et al.*, 2010).

A pesar de estos avances, aún no existen reportes respecto al uso de LatA durante la activación en especies domésticas de producción. Tampoco se ha evaluado el potencial de esta droga para la activación de embriones reconstituidos por clonación sin zona pelúcida (HMC). Por tal motivo, en la presente tesis se propone usar LatA durante la

activación para producir embriones clonados mediante la técnica de HMC, usando células somáticas de un animal adulto.

1.3 Clonación hecha a mano (*Hand-Made Cloning*)

En los últimos años, comenzaron a desarrollarse alternativas para mejorar la eficiencia de la técnica de SCNT, y poder aplicarla de forma más masiva. Una de ellas es la clonación sin usar micromanipuladores o clonación hecha a mano (HMC “*Hand-Made Cloning*”; Vajta *et al.*, 2001, 2003). El método de HMC es considerablemente más sencillo que los métodos tradicionales. El HMC presenta la ventaja de no requerir micropipetas ni micromanipuladores sofisticados, altamente costosos (Vajta *et al.*, 2001).

Hoy en día, el HMC es utilizado por diversos grupos de investigación, con buenas tasas de éxito. Se aplica en diferentes especies, como bovinos (Tecirlioglu *et al.*, 2003, Vajta *et al.*, 2004; Rodríguez, 2009), equinos (Lagutina *et al.*, 2005; 2007), porcinos (Du *et al.*, 2005), caprinos (Akshey *et al.*, 2008) y búfalos (Shah *et al.*, 2008). También se ha reportado, la producción de blastocistos porcinos transgénicos con esta metodología (Kragh *et al.*, 2004).

La técnica de SCNT tiene tres pasos fundamentales: la enucleación del ovocito receptor, la transferencia de la célula donante y la activación del ovocito reconstituido. Posteriormente, los cigotos generados son cultivarlos *in vitro* hasta alcanzar el estadio de blastocisto y poder ser transferidos a una hembra receptora.

El proceso de enucleación involucra la remoción del núcleo del ovocito que recibirá a la célula donante. La enucleación mediante HMC, es realizada de forma manual con ayuda de una microcuchilla (figura 1.11), sobre ovocitos maduros a los que previamente se eliminó de forma parcial la zona pelúcida (Li *et al.*, 2013).

El corte que se realiza permite eliminar la porción del citoplasma que contiene la placa metafásica. Para poder localizarla, se realiza una incubación en demecolcina, que provoca la formación de un cono o protrusión a nivel de la membrana citoplasmática en la posición de la placa metafásica (Rodríguez, 2009). De este modo, se alcanzan eficiencias de enucleación del 98-100% sin la necesidad de visualizar la metafase a través de la tinción y exposición a UV. Otro método químico alterativo, que se usa para visualizar la metafase sin tener que exponer al ovocito a UV es el tratamiento de sucrosa, que ayuda a ver el material genético utilizando un microscopio con luz blanca (Liu *et al.*, 2002a y b). La sucrosa, al igual que la demecolcina promueve la formación de un cono o vesícula a nivel de la membrana plasmática, conteniendo la placa metafásica, que se puede visualizar fácilmente y aspirar con ayuda de la pipeta de enucleación (Yin *et al.*, 2002).

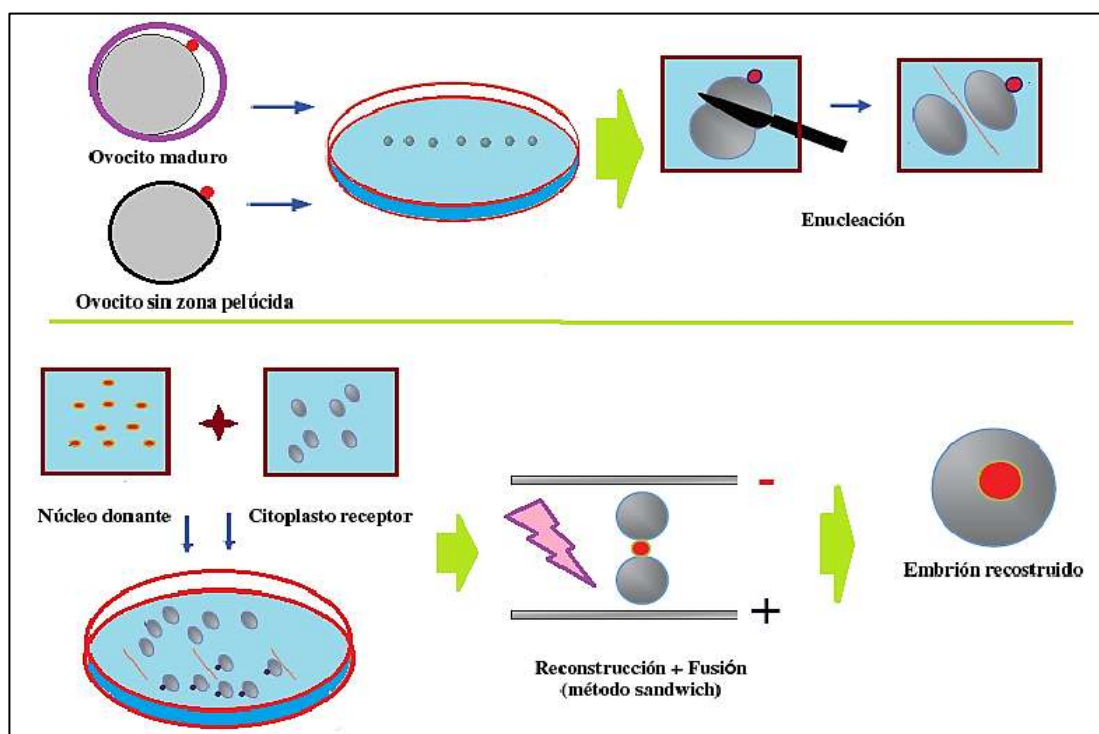


Figura 1.11. Esquema de la transferencia nuclear con *Hand-Made Cloning* (Rodríguez, 2009).

El HMC se diferencia de la técnica de enucleación tradicional, porque esta última requiere el uso de micromanipuladores acoplados a un microscopio invertido. La

visualización la placa metafásica adyacente al primer CP es mediante tinción y exposición a luz UV (Figura 1.12).

Diversos trabajos demostraron que la exposición a UV por periodo inferior a 15 segundos, no afecta el desarrollo embrionario de ovocitos bovino, conejo y xenopus (Westhusin *et al.*, 1992); por el contrario, la exposición por más de 30 segundos, altera los patrones de síntesis de proteínas, afecta la incorporación de metionina y provoca pérdida de integridad de membrana en ovocitos bovinos (Smith, 1993). En los conejos provoca una disminución en la viabilidad de los embriones (Yang *et al.*, 1990) y en los ovocitos de xenopus resulta en desarrollo anormal del embrión en el 30% de los casos (Gurdon, 1960).

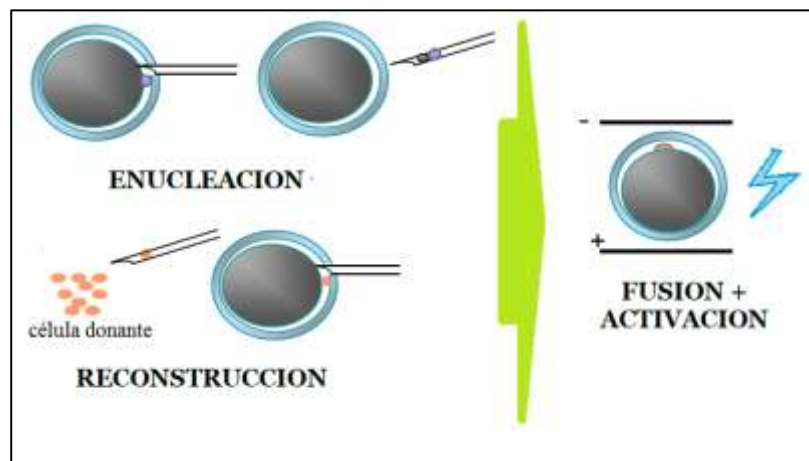


Figura 1.12. Esquema de la transferencia nuclear con micromanipulador (Rodríguez, 2009).

Durante el proceso de la enucleación con micromanipulador, el ovocito pierde 5-50% del volumen citoplasmático (Westhusin *et al.*, 1996). Esto provoca pérdida del contenido citoplasmático (proteínas y ARNm maternos) necesario para la reprogramación del núcleo donante y el correcto desarrollo embrionario (Westhusin *et al.*, 1996; Zakhartchenko *et al.*, 1997).

A través de la técnica de HMC es posible recuperar el volumen citoplasmático y el contenido de ARNm y proteínas maternas, entre un 90 a 100% (Vajta *et al.*, 2001). Durante la fusión, se utilizan dos mitades de citoplasma unidas a una célula somática

donante, para lograr la reconstrucción del embrión. A pesar de las ventajas que ofrece esta técnica, la presencia de mitocondrias y miARNs (microARN) de diferentes orígenes, podría tener efectos sobre el éxito de la clonación mediante HMC.

Para el cultivo de los embriones producidos por HMC, se implementa el sistema “*Well on the Well*” (WOW; Vajta et al., 2000). El sistema WOW, consiste en hacer pequeñas perforaciones o pozos en el fondo de una placa de cultivo, donde los embriones libres de zona pelúcida (ZF; Zona free) serán cultivados de manera individual (Lagutina et al., 2007).

Finalmente, como ya se mencionó, una de las mayores ventajas de la clonación mediante el HMC son el bajo costo y complejidad asociados a la técnica. No es necesario un sistema sofisticado para la micromanipulación, micromanipuladores o microscopio invertido con sistema de fluorescencia. Además, no son necesarios los instrumentos auxiliares para la fabricación de las pipetas de enucleación, reconstrucción y sujeción. Todo esto equivale a un ahorro significativo en los costos asociados a equipamiento.

Capítulo 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El desarrollo embrionario y la eficiencia de la clonación porcina mejoran con la técnica de HMC y la utilización de latrunculina A durante la activación.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos Generales

Mejorar la producción de embriones y la eficiencia de la clonación a mano “HMC”, mediante el uso de nuevos compuestos durante la activación de ovocitos porcinos.

2.2.2 Objetivos Específicos

- a) Establecer un sistema eficiente para la producción *in vitro* de embriones partenogénicos porcinos diploides mediante el uso de LatA y compararlo con CB, durante la activación. A este fin, se evaluará la ploidia de los blastocitos y la tasa embriones producidos.
- b) Mejorar la eficiencia de producción de embriones porcinos clonados mediante las técnicas de la clonación a mano (*Hand-made cloning*).

Capítulo 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudios

El presente proyecto de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, ubicado en el barrio de Agronomía en la Ciudad de Buenos Aires– Argentina (altura aproximada de 20 m.s.n.m, 34° 00' Latitud Sur y 64° 00' Longitud Oeste).

3.2 Medios y drogas

Excepto que se especifique lo contrario, los medios y drogas utilizados en la presente tesis fueron obtenidos de la Compañía de Reactivos Sigma (St. Louis MO, USA).

3.3 Experimento 1. Evaluación de latrunculina A durante la activación paternogénica de porcinos

3.3.1 Recuperación de los COC

Los ovarios de cerda utilizados para la recuperación de los COC, se obtuvieron a partir de hembras faenadas en un matadero local llamado “La Pompeya”, ubicado en Marcos Paz, provincia de Buenos Aires - Argentina. Los ovarios se transportaron al laboratorio en un termo a 25-29 °C de temperatura dentro de las 3 h posteriores a la colección.

La aspiración o punción de los COC se realizó utilizando una aguja de calibre 18 G, unida a una jeringa desechable de 10 mL con un contenido mínimo de medio Tyrode Albumina lactato piruvato con Hepes, (TALP-H) (*Bavister et al., 1977*) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina/ Fungizone® (ATB/ATM, 15240-096; Gibco, NY, USA).

Solo se punzaron folículos con un tamaño entre 3 a 6 mm de diámetro. Aquellos folículos de diámetro superiores a 6 mm fueron descartados por su contenido de

fibrinógeno, el cual, al coagular el fluido folicular podría llevar a pérdidas de los COC. Asimismo, aquellos folículos de diámetro inferior a 3 mm fueron descartados, por contener ovocitos con baja capacidad de desarrollo.

El fluido folicular colectado luego de la punción de los folículos, se descargó a un tubo falcón de 50 mL. Se dejó decantar por 5 min, para permitir la formación de pellet en la base del tubo. Este pellet se diluyó en medio TALP-H para facilitar la visión de los COC y se colocó en una placa de Petri cuadriculada, para proceder a la búsqueda.

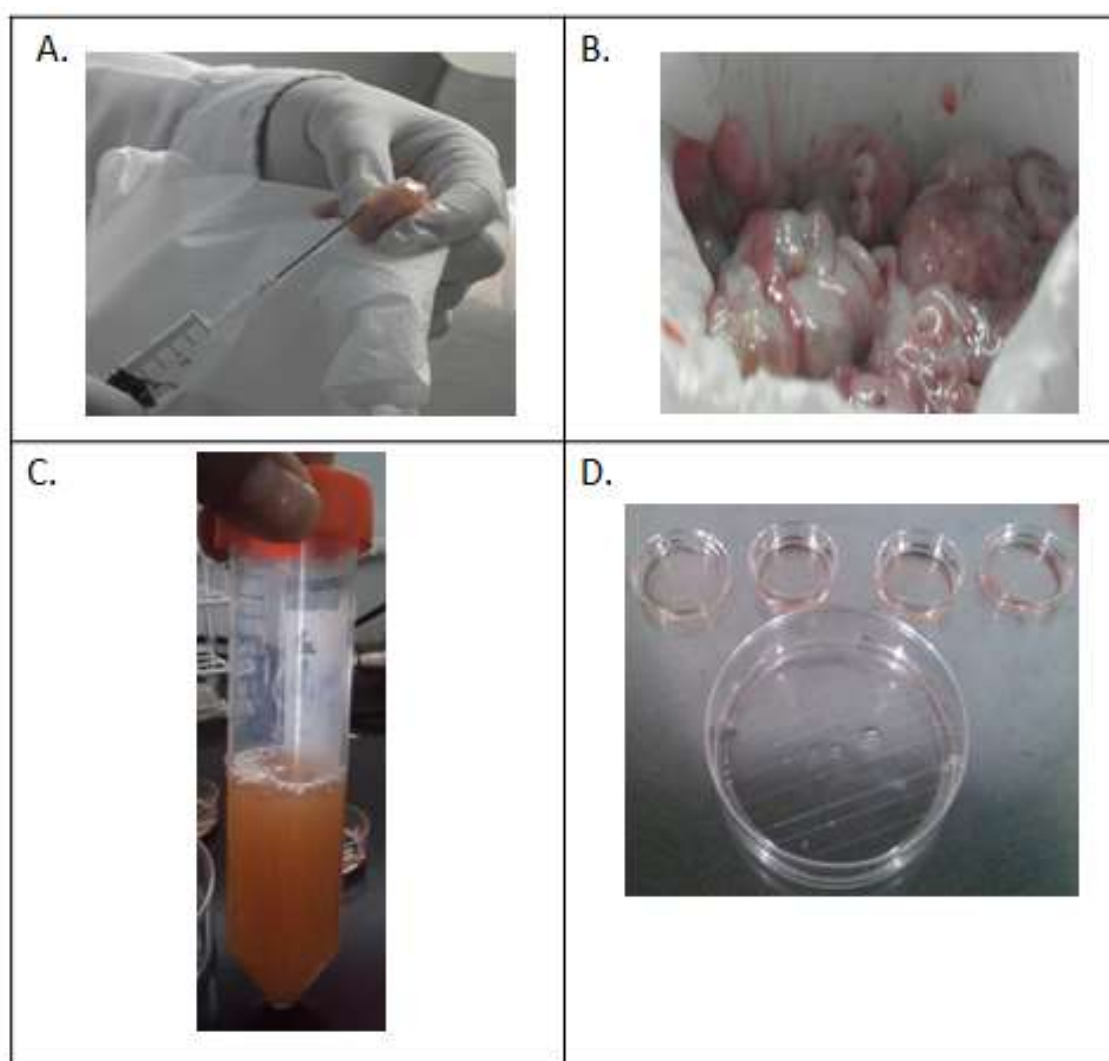


Figura 3.1. Colección de COC. A) Ovarios de matadero; B) Punción de los folículos; C) Tubos falcón con el contenido folicular y D) Placa de búsqueda

El proceso de búsqueda y selección de los COC se realizó a una temperatura constante a 25°C, bajo una lupa estereoscópica y en medio de TALP-H. Solo se seleccionaron COC

de categoría 1–2: ovocitos con citoplasma homogéneo y rodeado completamente de 2 a 3 capas de células de cúmulos compacto.

3.3.2 Maduración *in vitro* de los COC

Posteriormente a la selección, se llevó a cabo la maduración *in vitro* en gotas de 100 μ L del medio de maduración (TCM-199; 31100-035; Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado con 0,3 mM piruvato de sodio (P2256), 100 μ M cisteamina (M9768), 5 μ g/mg mioinositol, 1 μ g/mL insulina transferrina selenio (ITS, 51300-044, Gibco), 1% antibiótico-antimicótico, 10% (v/v) fluido folicular porcino y 10 mg/mL de hormona foliculoestimulante (FSH, NIH-FSH-P1Folltropin, Bioniche, Caufield Norte, Victoria, Australia), bajo aceite mineral (M8410). Se colocaron aproximadamente 20-25 COC por gota. La maduración se realizó por un periodo de 42-44 h a 39 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ y en 95% de N₂.

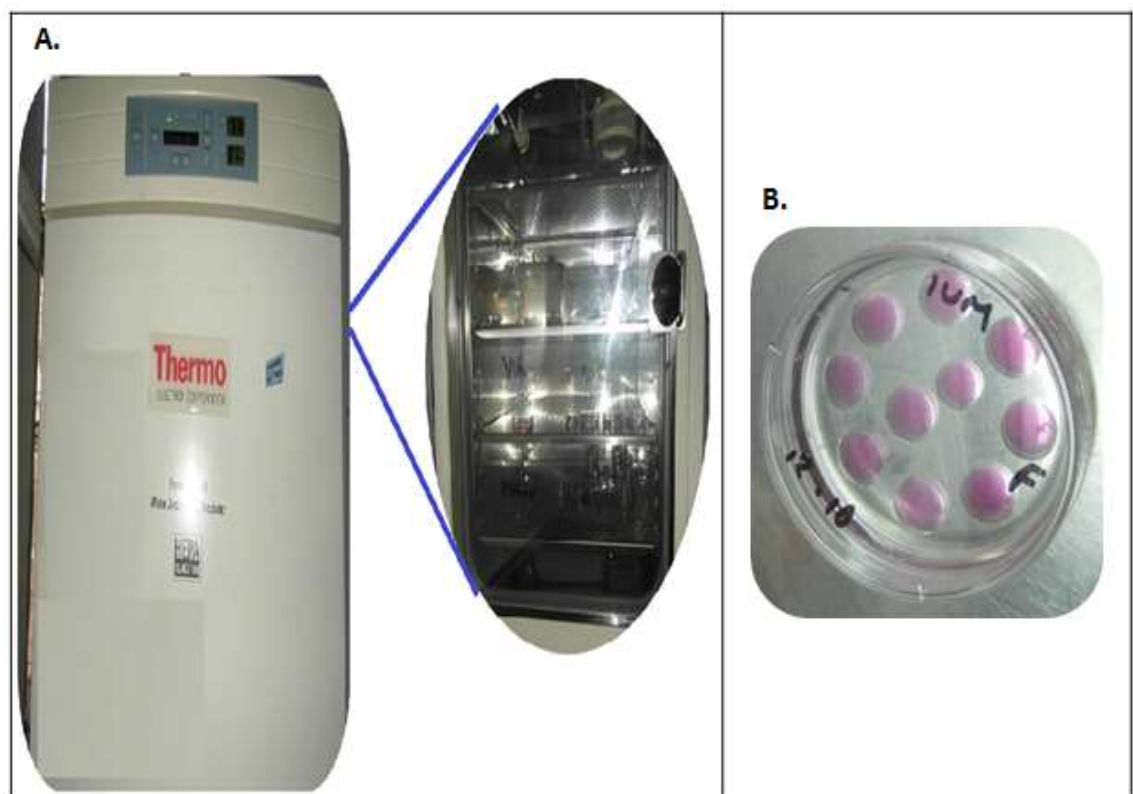


Figura 3.2. Maduración *in vitro* de los COC. A. estufa de cultivo donde los ovocitos permanecen para su maduración por 42-44 h. B. Placas con gotas de maduración *in vitro*.

3.3.3 Denudación de los COC

Transcurrido el tiempo de maduración, los COC fueron removidos de sus células del *cumulus*. Para esto, se los colocó en un tubo eppendorf conteniendo 100µL de Hialuronidasa 1mg/mL (Hy; H-4272, DCPS) diluida en solución Tyrode Albumina lactato piruvato con Hepes (TALP-H) (Bavister *et al.*, 1977). Se los sometió a agitación mecánica (vortexeo) durante 3 min. Inmediatamente después, se diluyó en medio de lavado TALP-H, para frenar la acción de la Hy. Para este experimento se seleccionaron aquellos ovocitos que presentaron un corpúsculo polar y sin daños a nivel de la membrana citoplasmática.

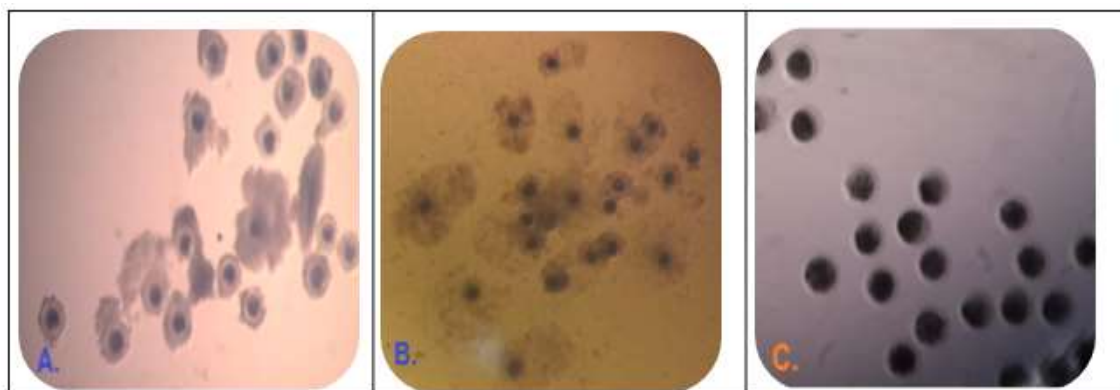


Figura 3.3. Ovocitos antes y después de la MIV. A. COC en gotas de maduración in vitro (200X); B. COC expandidos después de 42-44 h de maduración; C. ovocitos denudados.

3.3.4 Activación de los ovocitos

Los ovocitos usados para producir embriones partenogénéticos, fueron activados eléctricamente usando una cámara de fusión adicionada a un Electro-Manipulador-Cell 830 (BTX, Inc., San Diego, CA) mediante un pulso de corriente directa de 1.2 kV/cm por 80 µs, de duración, en medio de activación [0,3 M manitol (M9546), 0,05 mM CaCl₂ (C7902), 0,1mM MgSO₄ (M7506), y 1mg/mL de alcohol polivinílico (PVA-P8136)]. Brevemente, los ovocitos fueron colocados en placas cubiertas por medio de fusión durante 1 min, para luego ser depositados entre dos electrodos de alambre (separados entre sí por 1 mm), conteniendo medio de fusión, en la placa de micromanipulación.

Después del pulso eléctrico, los presuntos cigotos, fueron distribuidos de forma aleatoria en los diferentes tratamientos, como se muestra en la figura 3.4.

Los ovocitos activados mediante el pulso eléctrico (PE), se incubaron en medio SOFaa más Cicloheximida (CHX, 10µg/mL), y según al tratamiento, fueron sometidos a uno de los inhibidores de actina. Se incluyó un grupo control sin inhibidor de actina. Los grupos evaluados fueron:

- Tratamiento I:

PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + LatA (2µM). A este grupo lo llamaremos a partir de ahora (LatA).

- Tratamiento II:

PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + CB (2.5µg/mL). A este grupo lo llamaremos a partir de ahora (CB).

- Grupo control:

PE+ Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) (sin el uso del inhibidor de actina). A este grupo lo llamaremos a partir de ahora (CHX).

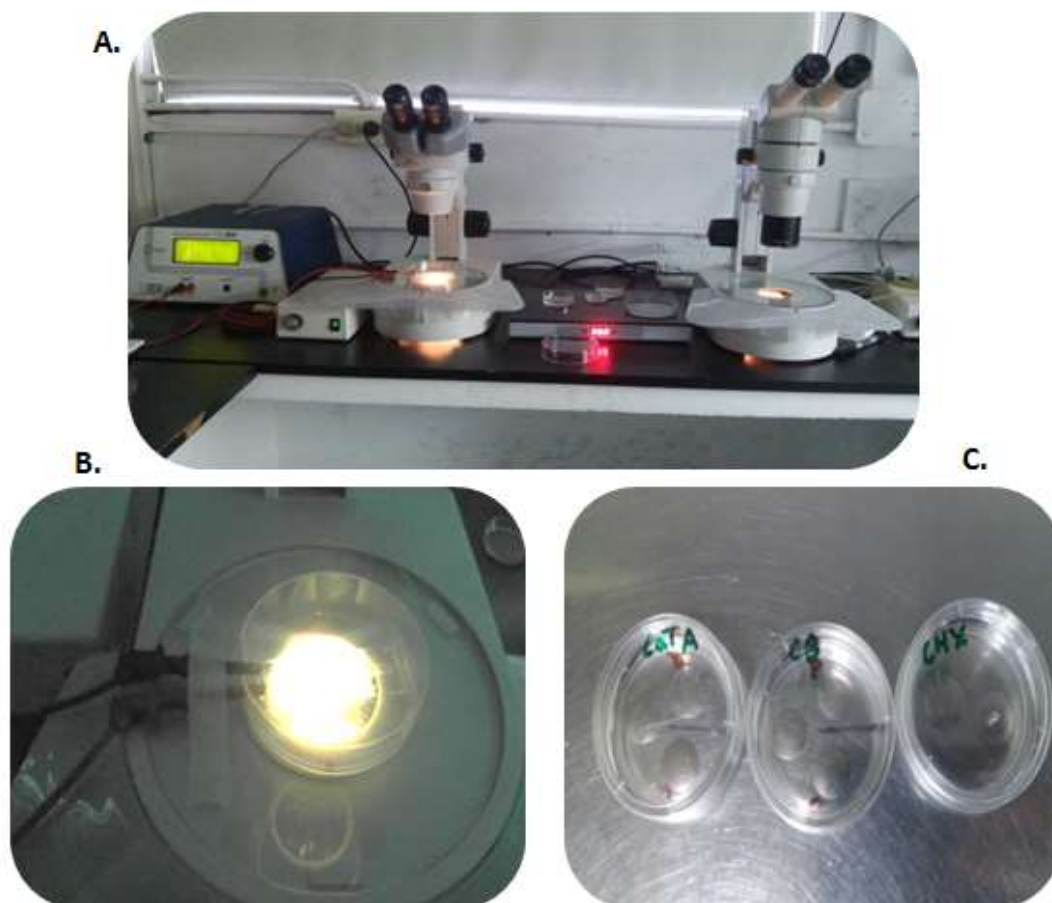


Figura 3.4. Activación paternogénica. A. Lupas estereoscopias conectadas al Electro-Manipulador-Cell 830 (activación eléctrica); B. placa de activación unida a los electrodos del electro manipulador; C. placas de incubación de los tratamientos.

Luego de las 3 h de activación, se procedió al enjuague en 3 placas pequeñas conteniendo TALP-H, por diez minutos. Luego, los presuntos cigotos fueron fijados para evaluar la extrusión del segundo CP o cultivados *in vitro* como se describe más adelante.

3.3.5 Evaluación de la inhibición de la extrusión de segundo corpúsculo polar

La evaluación de la extrusión del segundo CP, se realizó mediante tinción con ioduro de propidio (IP), tres horas después de la activación, previamente descrita. Para esto, los ovocitos fueron retirados de la placa de activación y se trasladaron a una placa pequeña de enjuague conteniendo TALP- H.

Una vez realizados los enjuagues, se traspasaron a otra placa conteniendo una gota de 100 μ L de tritón al 0.2% durante 15 min. Se enjuago en PBS/BSA. Posteriormente, se co-incubaron en 100 μ L de PBS/BSA más 1 μ L de IP a resguardo de la luz, durante 15 min. La visualización de los corpúsculos polares se realizó en un microscopio de epifluorescencia invertido Nikon modelo Eclipse Diaphot TE-300 (Nikon, NY, USA).

3.3.6 Evaluación de la formación de pronúcleos

Para este caso se realizó la misma distribución de grupos que en el estudio anterior. Luego de la activación, los ovocitos fueron enjuagados en medio TALP-H, y cultivados en gotas de 50 μ L de medio de cultivo de fluido oviductal sintético (SOFaa, del inglés Synthetic Oviductal Fluid), en atmósfera humidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ y en 95% de N₂, durante 17 h, con el fin de evaluar la formación de los pronúcleos (PN). Pasado este tiempo, los ovocitos fueron centrifugados (centrifuga: Arcano, China) durante 15 min a 6000 rpm para remover el exceso de lípidos. Seguidamente se pasaron a una placa pequeña de enjuague con TALP-H. Se realizó tinción con IP y observación microscópica, tal como está descripto en el punto 3.3.5.

3.3.7 Evaluación de la tasa del desarrollo embrionario

Luego de la activación descripta en el inciso 3.3.4, los presuntos cigotos se colocaron en placas de cultivo e incubaron en estufa gaseada por 7 días. Se evaluó el número de embriones clivados, mórulas y blastocistos, al día 2, 5 y 7, respectivamente. Los embriones se traspasaron a una gota diferente de SOFaa, al segundo y quinto día. Al día 5 también se los suplementado con SFB.

Para evaluar de desarrollo embrionario *in vitro*, se realizaron dos tratamientos con inhibidores de actina, al igual que en el experimento anterior. Como grupo control se usó la CHX sin inhibidores de actina, también se incluyó un nuevo grupo control positivo (figura 3.5).

Los grupos quedaron contruidos de la siguiente manera:

- Tratamiento I: PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + LatA (2µM).
- Tratamiento II: PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + CB (2.5µg/mL).
- Grupo control I: PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL).
- Grupo control II, PE + 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP, 2 mM), que genera embriones partenogénicos diploide y fue probada anteriormente en nuestro laboratorio.

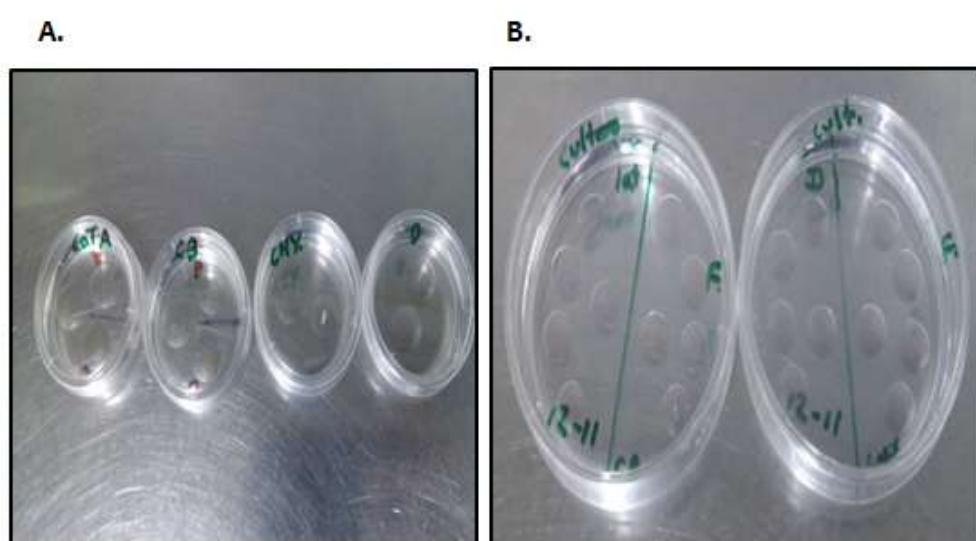


Figura 3.5. Cultivo de embriones partenogénicos. A. Placas de tratamientos para la incubación durante 3h; B. Placas de cultivo hasta la etapa de blastocistos.

3.3.8 Conteo del número de células de los embriones partenogénicos

Los blastocistos obtenidos al día 7 de cultivo, fueron incubados durante 15 minutos en una gota de medio SOFaa conteniendo 1 µg/mL de Hoechst 33342 Bisbenzimidide (B2261). El conteo del número de células se realizó en microscopio invertido de fluorescencia, mediante la observación bajo luz ultravioleta.

3.3.9 Evaluación de la ploidía de los embriones partenogénicos

Para evaluar la ploidía de las blastómeras se realizó una tinción cromosómica con Giemsa (Lowens, BA, Arg., 5% v/v en agua bidestilada).

Para este fin, 4 días post-activación, los embriones partenogénicos, fueron incubados en gotas de 50 μ L de medio SOF suplementadas con 2 μ L de colchicina (C3915) (stock: 25 μ g/mL), durante 12 horas. La colchicina arresta el ciclo celular en el estadio de metafase cuando es usada en bajas concentraciones, como se ha reportado previamente en nuestro laboratorio (*Canel, 2009*).

Posteriormente a la sincronización del ciclo celular, los embriones fueron incubados en una placa con 3 mL de medio hipotónico (citrate de sodio 0,9% p/v en agua bidestilada), a 37°C, durante 13-15 min. Cada embrión fue colocado sobre un portaobjetos, en un mínimo volumen (1 μ L) y el sitio de depósito fue marcado con un lápiz con punta de vidrio. Antes de secado completo del medio, se adicionó una gota de solución Carnoy, conteniendo 3:1 Etanol 100% (1.00983.1000; Merck, Darmst, Alemania) - Ácido Acético Glacial (401422; Carlo Erba, BA, Arg), como solución fijadora y se esperó hasta el secado completo a temperatura ambiente aproximadamente 10 min.

Finalmente, la tinción se realizó con una solución de Giemsa por 10 min. Los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y secados a temperatura ambiente, hasta el momento de su evaluación.

Una vez seca la muestra, se analizaron digitalmente las imágenes fotografiadas. Se determinó la ploidía celular de las metafases teñidas bajo aumento de 400x y 1000x.

3.4 Experimento 2. Evaluación de latrunculina A durante la activación de la SCNT mediante la técnica de HMC para producir embriones in vitro en porcinos

3.4.1 Recuperación de los COC

La transferencia nuclear de células somáticas se realizó según el protocolo descrito por *Vajta et al., (2001)* y *Rodríguez, (2009)*.

La colecta de los COC, maduración *in vitro* y desnudación de los ovocitos, se realizaron en idénticas condiciones a las descritas para los experimentos de activación paternogénica, en los apartados 3.3.1; 3.3.2 y 3.3.3, respectivamente.

Para el experimento, se eligieron los ovocitos que presentaban extrusión del primer CP y no mostraban daños a nivel de la membrana citoplasmática.

4.4.2 Enucleación de los ovocitos receptores

Para la enucleación fue necesario eliminar la zona pelúcida (zona Free; ZF), mediante incubación de los ovocitos en gotas de 100 μ L de TALP-H suplementadas con 10% de pronasa (previamente calentada) a 35°C. La placa se agitó constantemente para ayudar a la digestión de la zona. Con ayuda de una pipeta de vidrio, se retiraron los ovocitos desnudos carentes de zona, y se traspasaron a gotas de 50 μ L y posteriormente a placas conteniendo 2 mL de medio de manipulación TALP-H suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, 10499 - 444, Gibco, NY, USA). Se ejemplifica en la figura 3.6.

En un paso anterior, estos ovocitos se pasaron a gotas de descanso (SOFaa con el 10% de SFB) hasta terminar de eliminar la zona.

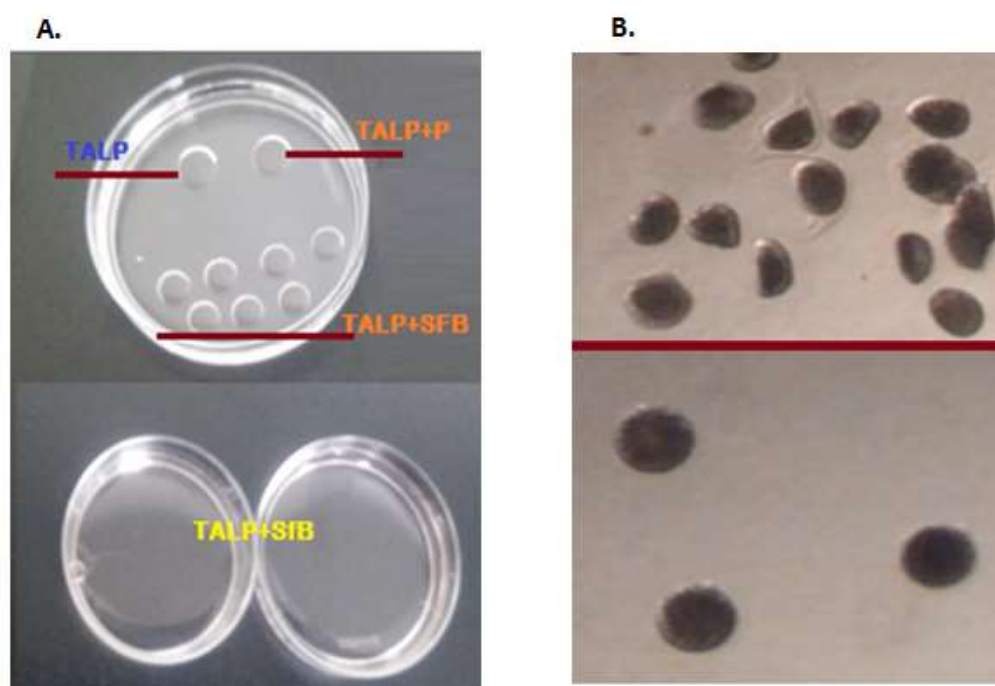


Figura 3.6. Proceso de la obtención de ovocitos Zona Free. A) Placas empleadas para eliminar la zona pelúcida de los ovocitos, los ovocitos originalmente se traspasan a una gota de TALP, luego se le traspasa a una segunda gota de 100 μL TALP conteniendo el 10% de pronasa (TALP-H+P). Luego de la remoción total de la zona (ejemplificado en B), los ovocitos son transferidos a gotas de 50 μL con TALP-H + 10% de SFB y, finalmente, a placas pequeñas con TALP-H y 10% de SFB para terminar de diluir cualquier resto de pronasa; B) proceso de obtención de ovocitos libres de zona pelúcida.

Una vez eliminada la zona pelúcida, los ovocitos se incubaron en demecolcina (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluidas en medio de SOFaa, durante 30 min previo a la enucleación. Este método fue empleado para promover la formación de un cono conteniendo la placa metafásica, que sirvió como guía para la enucleación. Posteriormente, los ovocitos ZF se incubaron durante 15 min en gotas individuales (figura 3.7.A) de medio SOFaa suplementado con 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de citocalasina B (*Mezzalana et al., 2011*) bajo aceite mineral. La enucleación consistió en la eliminación del citoplasma conteniendo la placa metafásica con la ayuda de una microcuchilla, como se muestra en la figura 3.7.B (Bisturí 15° Surgistar Código: 961501, USA). La manipulación se realizó bajo una lupa estereoscópica en aumento máximo utilizando contraste para la visualización de la placa metafásica (Nikon SMZ 800, USA).

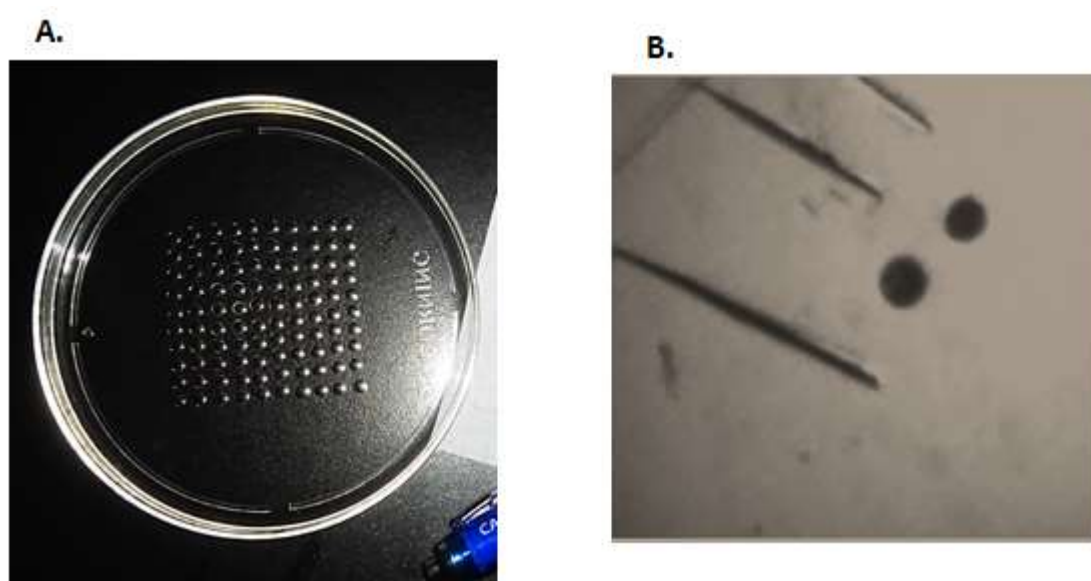


Figura 3.7. Enucleación a mano. A. Placa de enucleación; B. Ovocitos enucleados.

La ocurrencia de una enucleación exitosa fue evaluada mediante tinción con el colorante fluorescente Hoechst 33342 (Hoechst) y visualización bajo luz UV con aumento de 200x, por un periodo no mayor a 10 seg (figura 3.8). De este modo se confirmó la ausencia de metafase en los citoplastos a usar como donantes de clonación (*Mezzalira et al., 2011*).

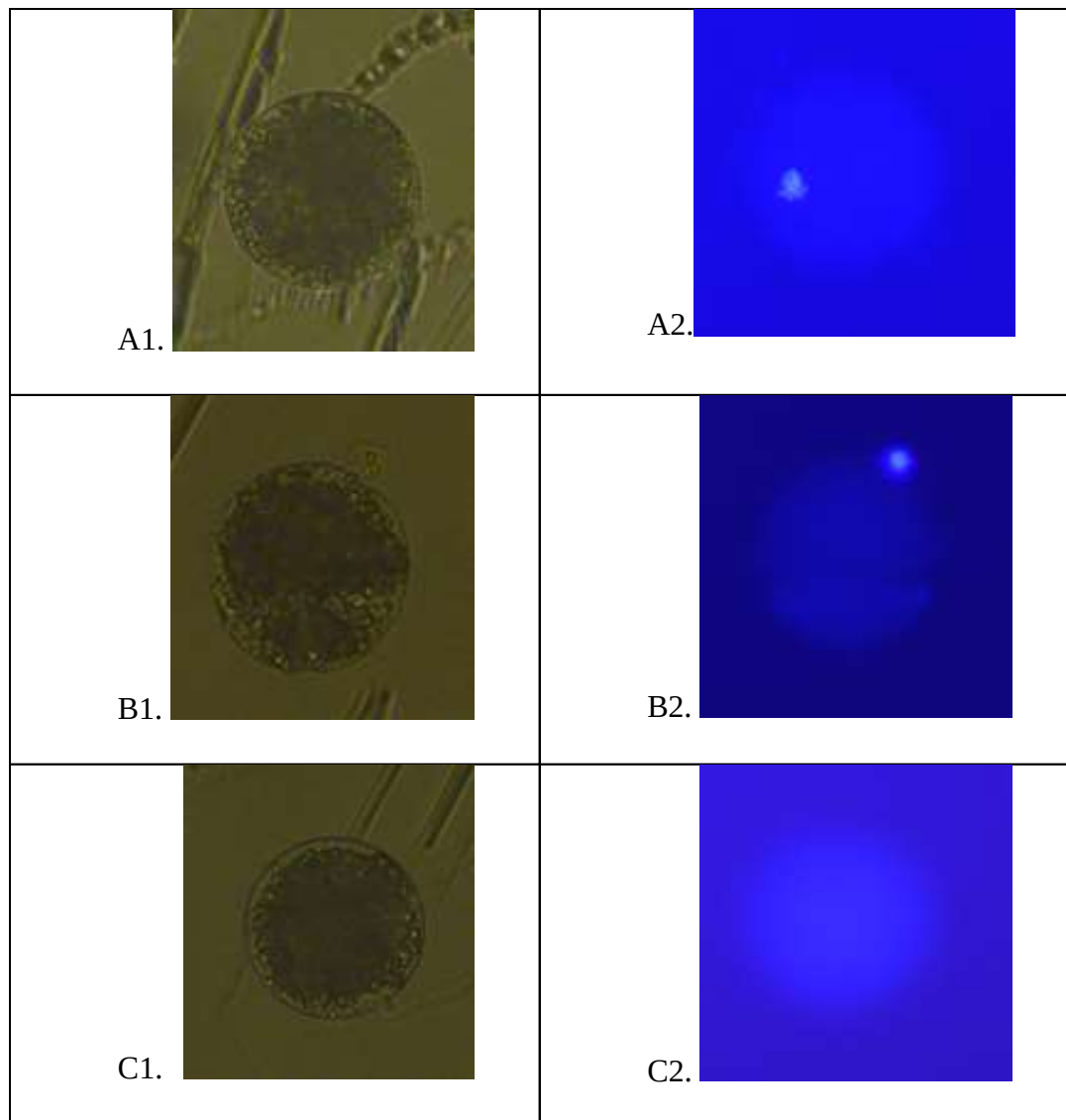


Figura 3.8. Evaluación de la enucleación. A1. Hemi- citoplasto con presencia de la metafase visto a luz blanca; A2. Hemi- citoplasto con presencia de la metafase visto a luz UV. B1. Hemi- citoplasto con presencia de la metafase previamente incubado en demecolcina, visto a luz blanca; B2. Hemi- citoplasto con presencia de la metafase previamente incubado en demecolcina, visto a luz UV; C1. Hemi- citoplasto sin presencia de la metafase visto a luz blanca; C2. Hemi- citoplasto sin presencia de la metafase visto a

luz UV. Fotografías tomadas bajo microscopio de fluorescencia, luego de la tinción de los hemi-ovocitos con Hoechst 33342 (200X).

Se seleccionaron los hemi-citoplastos conteniendo al menos el 50% del volumen citoplasmático original para la reconstrucción de los embriones. Estos hemi-citoplastos fueron cultivadas en gotas de medio SOFaa suplementado con 10% de SFB, para su descanso hasta terminar de enuclear todos los ovocitos y hasta la transferencia nuclear.

3.4.3 Transferencia nuclear de células somáticas y fusión.

Como donante de núcleo, se utilizó una línea celular obtenida a partir de un cerdo adulto, en pasaje 5 y 6. Cinco días antes de la SCNT, las células fueron descongeladas a 39°C y cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado con 10% SFB y antibiótico-antimicótico al 1% (15240-966, Gibco, NY, USA), hasta que alcanzaron la confluencia (Buemo *et al.*, 2016). Se utilizaron aquellas células que presentaron membrana citoplasmática intacta, sin citoplasma granulado ni signos de desprendimiento de la superficie de la placa de cultivo.

Aproximadamente una hora antes de la transferencia nuclear, las células fueron desprendidas de la placa de cultivo mediante tratamiento con 1 mL de tripsina por 5 min. Para detener la acción de la tripsina, se utilizaron 2 mL de DMEM suplementado con 10% SFB. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min. Luego de descartar el sobrenadante, se trató con 45 µL de pronasa durante 50 seg. Pasado este tiempo, se realizaron dos enjuagues con TALP-H mediante centrifugación a 1200 rpm a 37°C por 5 min. Posteriormente se re-suspendió para tener aproximadamente 1.500.000 de células/mL, con la que se trabajó.

La reconstrucción y la fusión se realizaron por el método “sándwich”, el cual consistió en la transferencia de pares de hemi-citoplastos a una gota de 50µL conteniendo 1mg/mL de fitohemaglutinina (PHA; L8754) disuelta en TCM-199. Después de unos segundos, uno de los hemi-citoplastos se dejó caer rápidamente sobre una única célula

donante descansando sobre el fondo de una gota de 100 μ L de TALP-H. Luego, un segundo hemi-citoplasto se uni3 al hemi-citoplasto adherido a la c3lula donante (figura 3.9A).

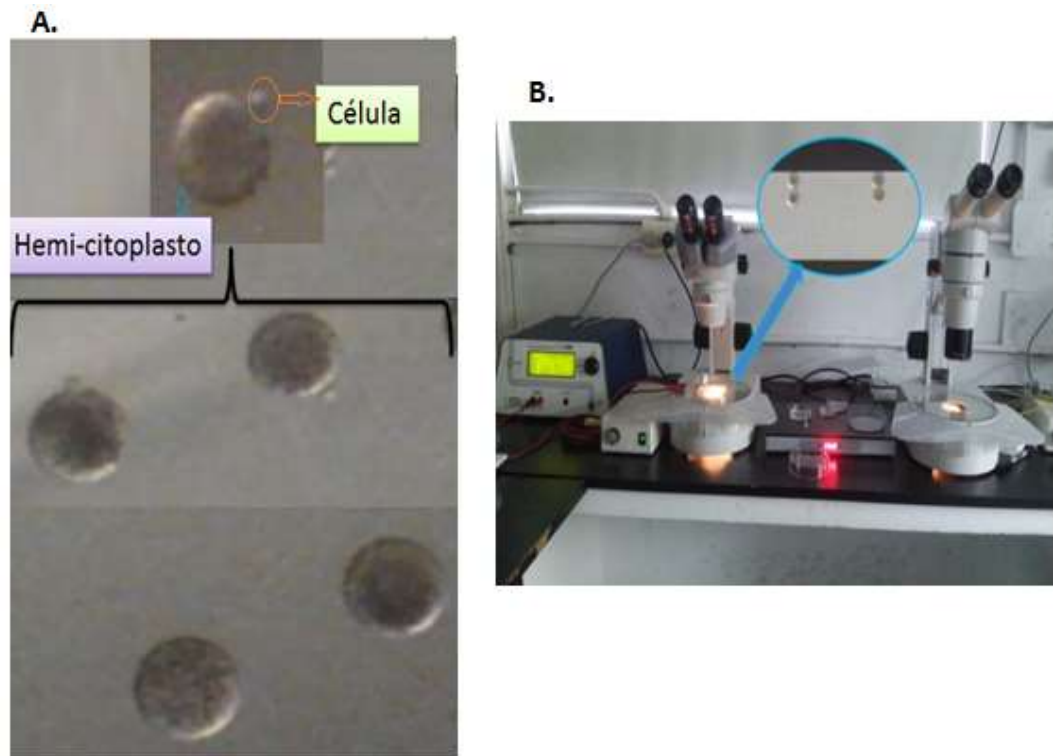


Figura 3.9. Reconstrucci3n de los embriones. A) hemi-citoplastos; B) fusi3n de los hemi-citoplastos. Seguidamente, los pares (hemi-citoplastos y c3lula donante) se colocaron en una placa peque1a con medio de fusi3n compuesta por manitol 0,3 M, MgSO 0,1 mM, CaCl 0,05 mM y 1mg/mL PVA, durante 1 minuto. Despu3s se transfirieron a una c3mara de fusi3n conteniendo 2 mL del medio. La electrofusi3n se realiz3 utilizando un manipulador de Electro-C3lulas BTX 830 con un pulso de corriente doble directo de 1,42 kV/cm, de 30 μ S (Buemo *et al.*, 2016; figura 3.9.B). Todos los pares se colocaron de manera individual en micro-gotas conteniendo 5 μ L de medio SOFaa, bajo aceite mineral, para ser incubados a 39 $^{\circ}$ C en una atm3sfera humidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ y en 95% de N₂.

Veinte a treinta minutos despu3s del pulso, se evalu3 la eficiencia de fusi3n, en funci3n de la ausencia de la c3lula donante separada y con ambas mitades de citoplasma

completamente unidas. Todos aquellos pares que no llegaron a fusionar en ese tiempo fueron re-fusionados. Se esperó unas dos horas para la reprogramación del ovocito. Pasado este tiempo, las mitades que no fusionaron se descartaron.

3.4.4 Activación

Luego de las dos horas de reprogramación, los pares fusionados fueron activados eléctricamente mediante un único pulso de corriente continua de 1,2 kV/cm durante 80µS, seguido por los tratamientos previamente especificados en el inciso 3.3.7:

a) Tratamiento I: PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + LatA (2µM).

b) Tratamiento II: PE+ Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + CB (2.5µg/mL).

- Se incluyeron además dos grupos control partenogénicos:

c) Control I: PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + LatA (2µM).

d) Control II: PE + Cicloheximida (CHX, 10µg/mL) + CB (2.5µg/mL).

3.4.5 Cultivo in vitro

Una vez finalizada la activación, los embriones reconstruidos se cultivaron de forma individual en el sistema WOW, anteriormente descrito (*Vajta et al., 2003*). Los pocillos se produjeron usando un capilar de vidrio ligeramente caliente en su punta, haciendo micropozos mediante una ligera perforación en la parte inferior de la placa de petri de 35 mm x 10 mm. Un total de 15 a 20 micropozos fue cubierto con 100 µL de medio de SOFaa. Los embriones fueron cultivados en una mezcla de gas humidificado (5% de CO₂, 5% de O₂, y 95% de aire) a 38.5 °C. El medio se renovó al día 2 con SOFaa fresco y al día 5 se renovó por segunda vez con medio SOFaa suplementado con 10% de SFB.

El clivaje embrionario se evaluó 48 h después de la activación, el estadio de mórulas fue evaluado al día 5 y la formación de blastocistos entre los días 7/8 de cultivo.

3.5 Análisis Estadístico

El análisis estadístico empleado fue no paramétrico de Fisher (test exacto de Fisher), con un intervalo de confianza del 95%, utilizando el programa Graph Pad PRISM® versión 5.01. Para todos los análisis una diferencia de $p \leq 0,05$ fue considerada significativa.

Capítulo 4. RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1 Experimento 1. Evaluación de latrunculina A durante la activación paternogénica de porcinos

4.1.1 Evaluación de la inhibición de la extrusión de segundo corpúsculo polar

Los primeros experimentos de esta tesis, persiguieron determinar la eficiencia de la LatA en los protocolos de activación, para inducir la producción de embriones porcinos partenogénicos diploides, en comparación con el inhibidor de actina más comúnmente usado, la CB.

Con este fin, en un primer ensayo se evaluó la eficiencia de inhibición de la extrusión del segundo CP, tres horas después de iniciada la activación de los ovocitos, como se representa en la figura 4.1. En las fotografías es posible observar presuntos cigotos con uno o dos corpúsculos polares. En algunos casos no fue posible una visualización clara del CP, motivo por el cual dichos cigotos fueron descartados.

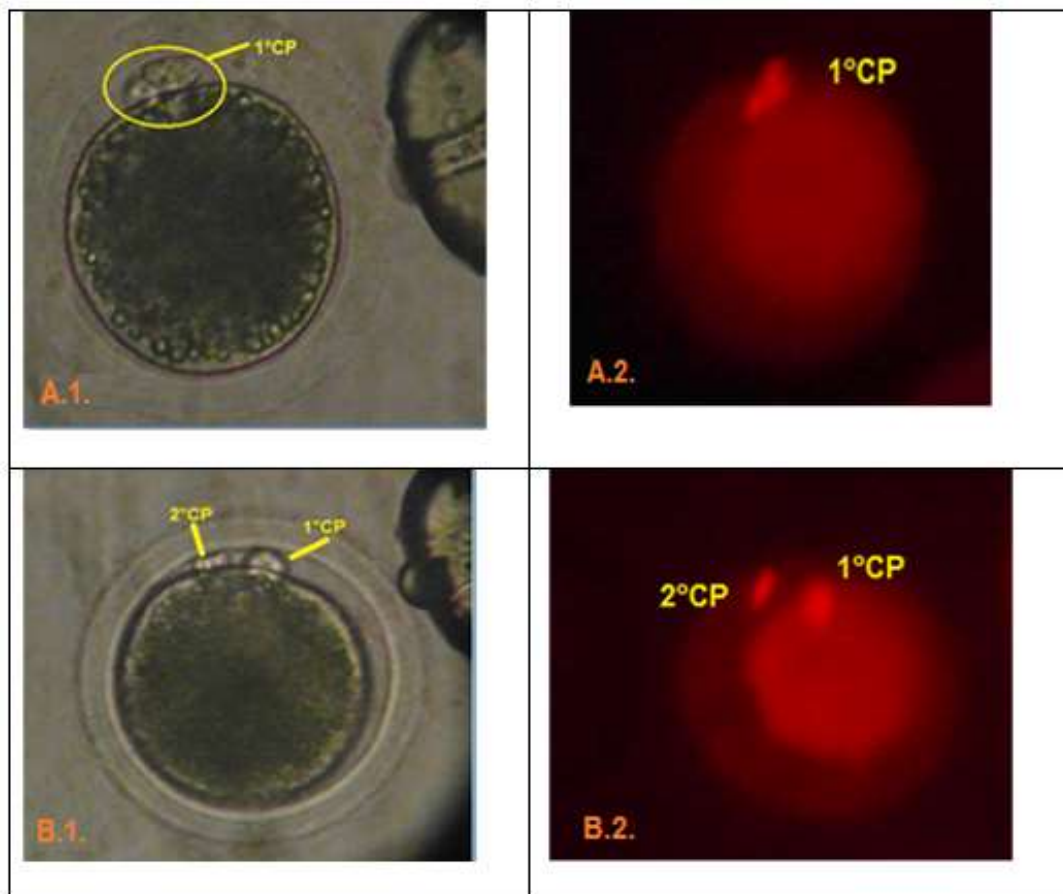


Figura 4.1. Evaluación de la inhibición de la extrusión del segundo CP. Luego de las 3 h de iniciada la activación, mediante PE de 1.2kV/cm por 80μS seguido por CHX combinada con LatA o CB, se evaluó la inhibición de la liberación del segundo CP por tinción con ioduro de propidio (rojo fluorescente) de los embriones partenogénicos, aumento de 200X. A.1. ovocito activado con un solo CP, vista en luz blanca; A.2. Ovocito activado con un solo CP, vista con IP; B.1. Ovocito activado con el primer y segundo CP, vista en luz blanca y B.2. Ovocito activado con el primer y segundo CP, vista con IP.

Se evaluó el porcentaje de inhibición del segundo CP en un total de 370 ovocitos, datos incluidos en el cuadro 1. Estos resultados no muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$), entre los tratamientos consistentes en pulso eléctrico seguido por CHX combinada con LatA o CB, por lo que se puede decir que la LatA fue capaz de inhibir la extrusión del segundo CP al igual que la CB. Ambos tratamientos presentaron diferencias estadísticas con el grupo control sin inhibidores de actina. Se debe mencionar que este es el primer estudio en evaluar la inhibición de la extrusión del

segundo CP en un periodo corto posterior a la activación con LatA o CB. Además se puede observar gráficamente estos resultados en la figura 4.2.

Cuadro 1: Efecto del tratamiento con inhibidores de la actina a las 3 h post-activación.

Tratamientos	Ovocitos Activados (N)	3 Horas		
		1erCP n (%)	2°CP n(%)	Otros n (%)
CHX+LatA	190	153(80,5) ^a	19(10,0) ^a	18(9,5)
CHX+ CB	176	136(77,3) ^a	23(13,1) ^a	17(9,7)
CHX (control)	194	133(68,6) ^b	44(22,7) ^b	17(8,8)

(a,b): Los valores con letras distintas en la misma columna indican las diferencias significativas (Test de Fisher, $P \leq 0,05$). LatA: Latrunculina A; CB: Citocalasina B; CHX: Cicloheximida; 1erCP: primer corpúsculo polar; 2°CP: segundo corpúsculo polar; otros: incluye datos de los ovocitos que no se observó claramente o perdidos.

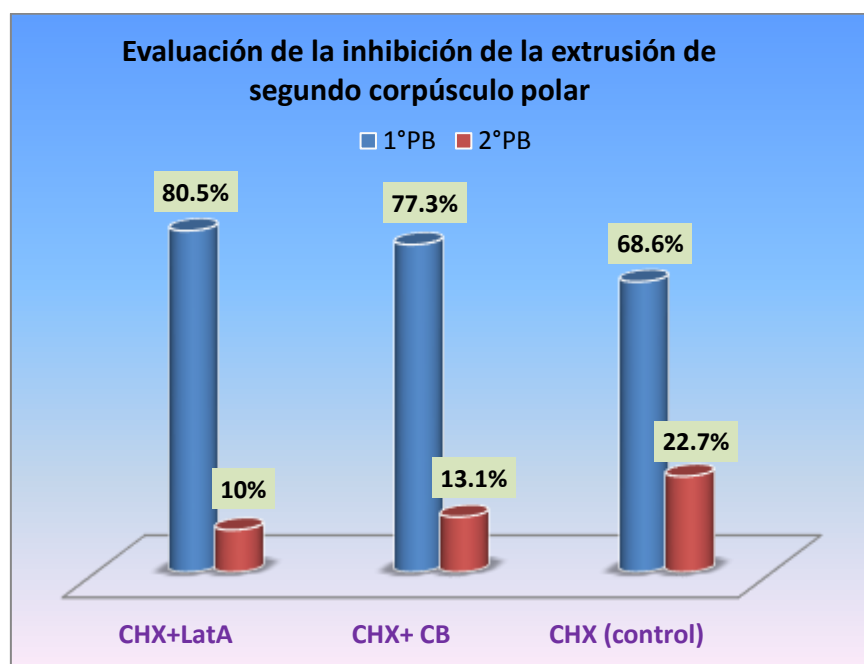


Figura 4.2. Evaluación de la extrusión del 2°CP, posterior a la activación eléctrica e incubados en CHX+ LatA; CHX+CB; CHX (control).

4.1.2 Evaluación de la formación de pronúcleos

En un segundo estudio, se evaluó la formación de pronúcleos a las 17 h post-activación, mediante tinción con ioduro de propidio y visualización bajo microscopio de epifluorescencia. La clasificación de los cigotos se muestra en la figura 4.3, que

ejemplifica el tipo de resultados obtenidos: A) 1 CP más 1PN; B) 1 CP más 2 PN; C) 2 CP más 1PN; y D) 1 CP y sin PN (ovocitos no activados).

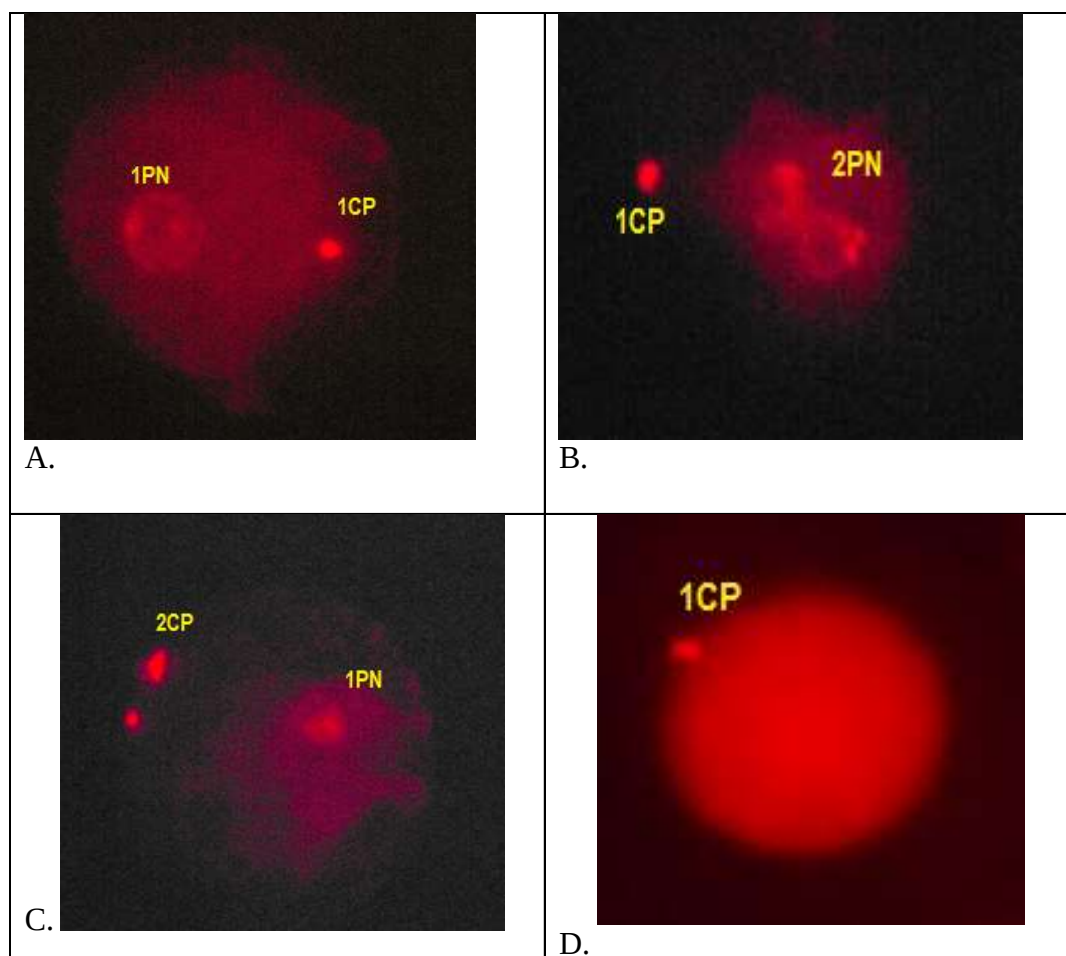


Figura 4.3. Fotografías de los embriones partenogénicos evaluados a las 17 horas. A) Embrión partenogénico con un solo corpúsculo polar y un pronúcleo; B) Embriones partenogénicos con dos pronúcleos y un solo corpúsculo polar. C) Embriones partenogénicos con dos corpúsculos polares y un pronúcleo; D) ovocitos con un solo corpúsculo polar. Los ovocitos fueron activados con un pulso eléctrico DC de 1.2kV/cm por 80µs en un medio de activación seguido por uno de los tratamientos durante 3 h de incubación y posterior se cambió al medio de cultivo SOF hasta las 17 h posteriores a la activación. Para la observación de los pronúcleos se realizó mediante la tinción con IP.

En el cuadro 2, se representa las tasas de formación de pronúcleos, inducidas por activación con pulso eléctrico seguido por CHX combinada con los inhibidores de actina LatA o CB a las 17h post-activación. Los ovocitos activados con LatA, resultaron en una tasa de inhibición de la extrusión del segundo CP y de formación de dos

pronúcleos significativamente ($p<0.05$) superior a aquellos tratados con CB, y también respecto al grupo control. Los resultados de este ensayo también demostraron que al usar LatA, disminuye significativamente la producción de cigotos con un solo pronúcleo sin la retención del segundo CP, mejorando la eficiencia de producción de cigotos presumiblemente diploides.

Cuadro 2: Evaluación de la tasa de formación de pronúcleos inducida por la activación con pulso eléctrico seguido por CHX combinada con los inhibidores de la actina LatA y CB a las 17h post-activación.

Tratamientos	Ovocitos activados	17 HORAS				
		1CP		2CP		no activados
		1PN	2PN	1PN	2PN	
CHX+LatA	156	36(23.1)	90(57,7) ^a	9(5,8) ^a	0	21(13.5)
CHX+ CB	152	41(27)	68(44,7) ^b	20(13,2) ^b	2(0,01)	21(13,8)
CHX (control)	158	43(27,2)	16(10,1) ^c	78(49.4) ^c	0	21(13,3)

^(a,b): Los valores con letras distintas en la misma columna indican las diferencias significativas (Test de Fisher, $P \leq 0,05$). **LatA**: Latrunculina A; **CB**: Citocalasina B; **CHX**: Cicloheximida; **1CP**: Un corpúsculo polar; **2CP**: Dos corpúsculos polares; **1PN**: un pronúcleo; **2PN**: Dos pronúcleos; **No activados**: aquellos ovocitos con un solo corpúsculo polar, lo cual indicaría que no fueron activados y sin pronúcleo.

Estos resultados se presentan en la figura 4.4, donde se observa que no existen diferencias significativas ($p<0.05$), en la capacidad de activación de los tres grupos en estudio. Además, en todos los casos el porcentaje de activación fue superior al 80%.

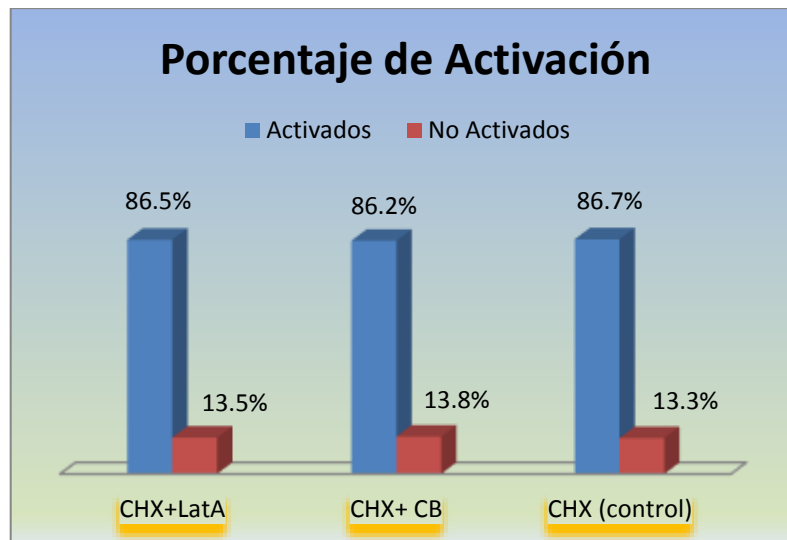


Figura 4.4. Porcentajes de activación de los embriones partenogénicos generados con el tratamiento de un pulso eléctrico por corriente directa, seguida de CHX+ LatA; CHX+CB; CHX (control).

4.1.3 Evaluación de la tasa de desarrollo *in vitro* en embriones partenogénicos porcino.

A continuación, se evaluó la tasa de desarrollo *in vitro* de los embriones partenogénicos, activados mediante pulso eléctrico seguido de CHX combinados con LatA o CB. Los grupos controles fueron activados con CHX o 6-DMAP. A día 2 se midió la tasa de clivaje (figura 4.5.A), a día 5 la tasa de mórulas (figura 4.5.B) y a día 7, la tasa de blastocitos (figura 4.5.C).

Se utilizaron un total de 716 ovocitos, a los que se activó y dividió aleatoriamente en los diferentes tratamientos, tal como se presenta en el cuadro 3 y la figura 4.6. No se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes tratamientos respecto a los porcentajes de embriones clivados, mórulas y blastocistos.

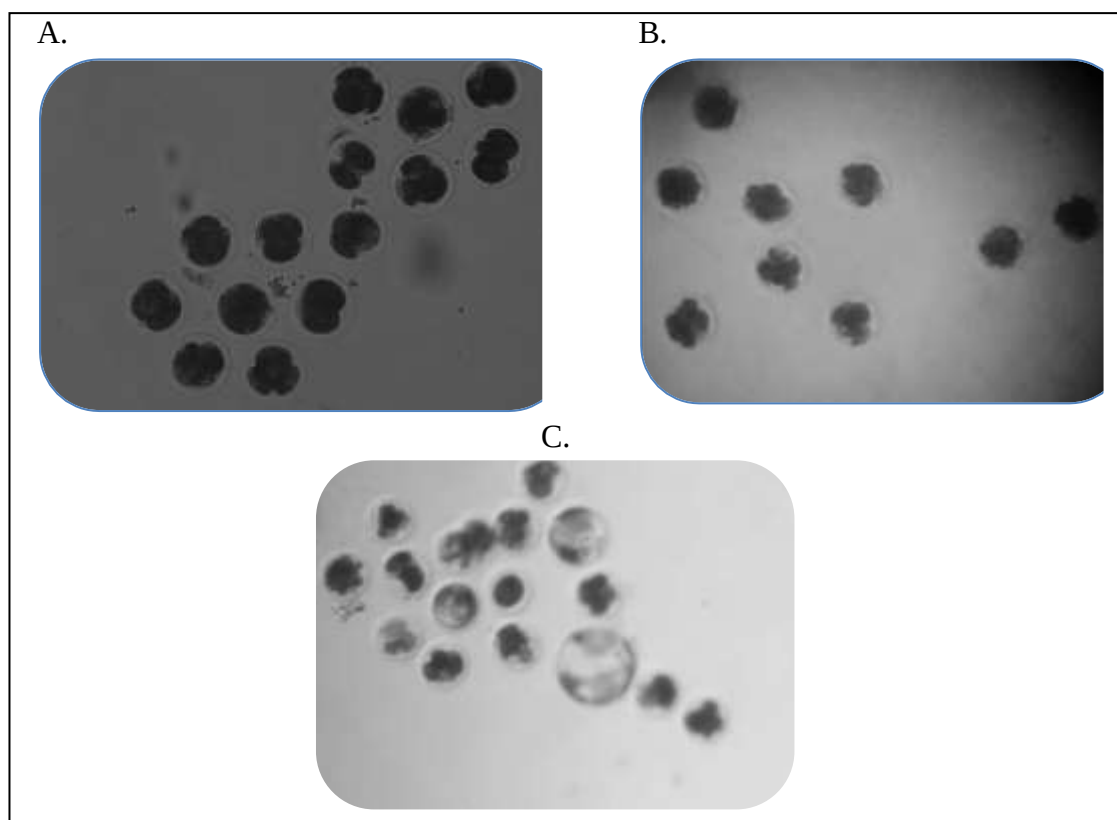


Figura 4.5. Desarrollo *in vitro* de los embriones partenogénicos. A) Embriones partenogénicos en la etapa de clivados (día 2); B) Embriones partenogénicos en etapa de mórula (día 5); C) Embriones partenogénicos en etapa de blastocitos (día 7).

Cuadro 3. Evaluación de la tasa de desarrollo *in vitro* de los embriones partenogénicos activados con un pulso eléctrico, seguido por incubación en CHX más un inhibidor de actina, LatA o CB. Los grupos controles fueron incubados solo con CHX o 6-DMAP luego del pulso eléctrico.

Tratamientos	Ovocitos Activados	Clivados N° (%)	Mórula N° (%)	Blastocitos N° (%)
CHX+LatA	208	127(61.1)	39(18.8)	25(12)
CHX+ CB	206	113(54.9)	36(17.5)	22(10.7)
CHX (control)	201	110(54.7)	45(22.4)	22(10.9)
6-DMAP	101	53(52.5)	19(18.8)	12(11.9)

LatA: Latrunculina A; **CB:** Citocalasina B; **CHX:** Cicloheximida; **DMAP:** 6-Dimetilaminopurina.

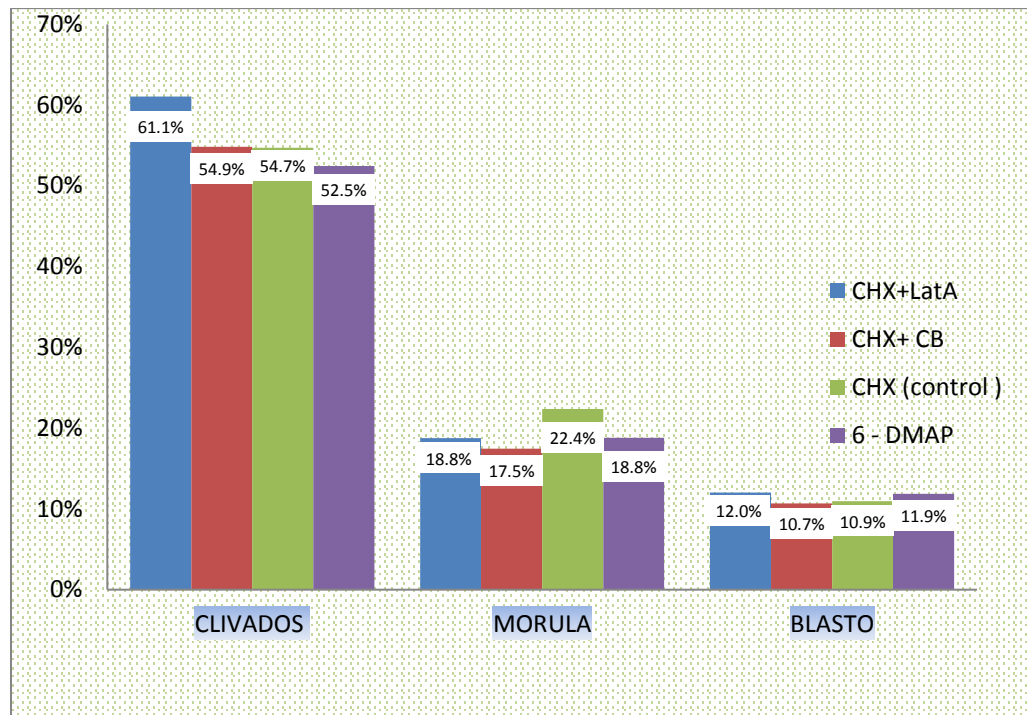


Figura 4.6. Porcentajes de clivados, mórulas y blastocistos, de los embriones partenogénicos activados mediante un pulso eléctrico por corriente directa seguido por la incubación de 3h en CHX+ LatA; CHX+CB; CHX (control -) y 6-DMAP (control +).

Se evaluó el número de células de los blastocistos obtenidos, como indicador de calidad embrionaria (figura 4.7). Para este análisis se utilizó el ANOVA, $P \leq 0,05$.

Los resultados se muestran en el Cuadro 4 y figura 4.8. Se encontraron diferencias estadísticas significativa ($p < 0,05$) entre el grupo tratado con LatA respecto al grupo tratado con CB y los grupos controles.

Cuadro 4. Evaluación del número de células de los blastocistos partenogénicos obtenido al día 7 de cultivo.

	TRATAMIENTOS			
	CHX + LatA	CHX+ CB	CHX (control)	6-DMAP
Media	55.64 ^a	41.95 ^b	26.41 ^c	43.33 ^b
Desvío Estándar	3.499	7.306	3.05	8.51
N	25	22	22	12

(a,b): Los valores con letras distintas en la misma fila indican las diferencias significativas (ANOVA, $P \leq 0,05$). **LatA:** Latrunculina A; **CB:** Citocalasina B; **CHX:** Cicloheximida; **6-MAP:** 6-Dimetilaminopurina.

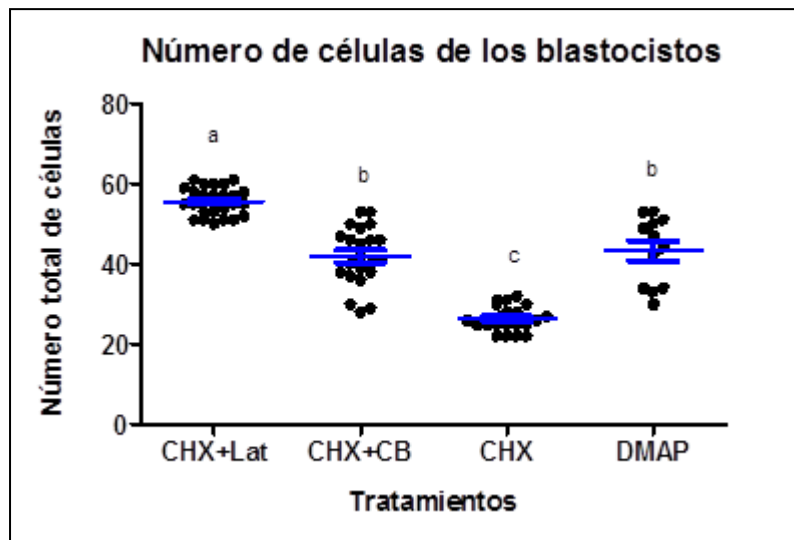


Figura 4.7. Diferencias en el número de células de blastocistos al día 7 de desarrollo. Datos obtenidos de los embriones partenogénicos activados mediante un pulso eléctrico por corriente directa seguido por la incubación de 3h en CHX+ LatA; CHX+CB; CHX (control -) y 6-DMAP (control +).

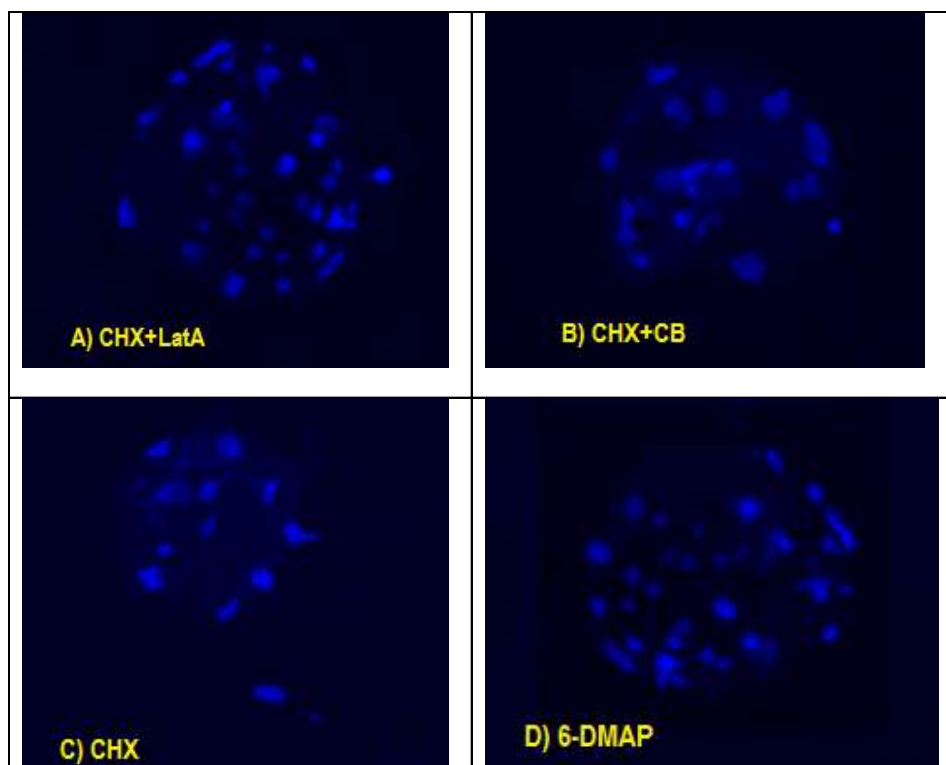


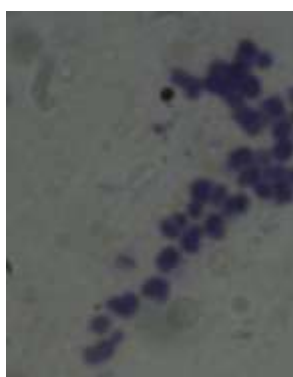
Figura 4.8. Conteo de células de los blastocistos. a) Embriones partenogénicos tratados con CHX+ LatA; b) Embriones partenogénicos tratados con CHX+ CB; c) Embriones partenogénicos tratados con CHX; d) Embriones partenogénicos tratados con 6-DMAP. Los ovocitos fueron activados con un pulso eléctrico DC de 1.2kV/cm por 80μs en un medio de activación seguido por uno de los tratamientos durante 3h de incubación y cultivados en medio de cultivo SOF, hasta el día 7. Para el conteo de las células, se realizó tinción con Hoechst 33342.

4.1.4 Evaluación de la ploidía de los embriones partenogénicos.

Se analizó el número de cromosomas de las blastómeras para determinar la ploidía de los embriones. Para este estudio, la activación se realizó en idénticas condiciones a las previamente descritas en la evaluación de desarrollo. El conteo del número de cromosomas fue mediante la tinción con Giemsa y visualización con una magnificación total de 400 (figura 4.9).



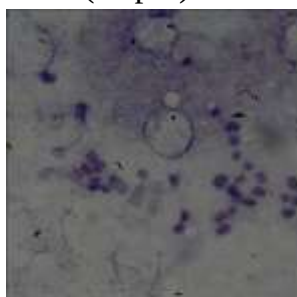
CHX+LatA
(Haplo)



CHX+ LatA
(Diplo)



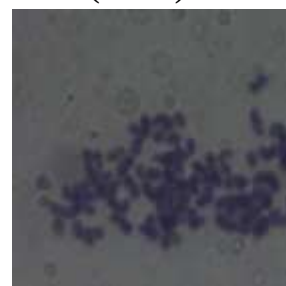
CHX+ LatA
(Aneu)



CHX+CB (Haplo)



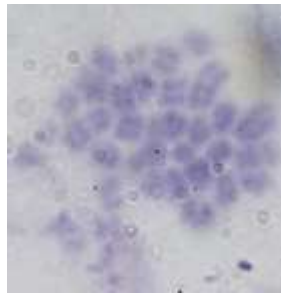
CHX+CB (Diplo)



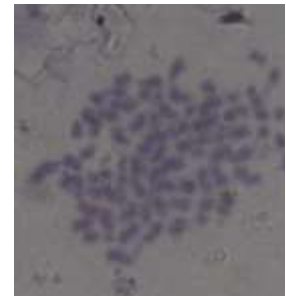
CHX+CB (Aneu)



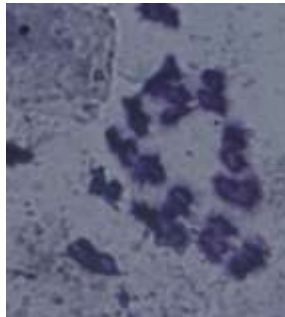
CHX (Haplo)



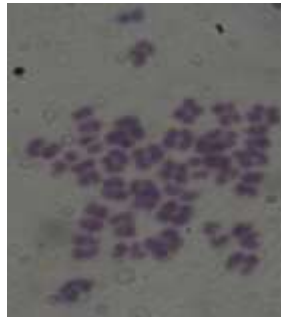
CHX (Diplo)



CHX (Aneu)



6-DMAP (Haplo)



6-DMAP (Diplo)



6-DMAP (Aneu)

Figura 4.9. Análisis de la ploidía de los embriones partenogénicos. Extendidos más representativos de embriones partenogénicos activados con diferentes tratamientos y teñidas con Giemsa (magnificación final x 400).

Cuadro 5. Determinación de la ploidía de los blastómeros obtenidos por los diferentes tratamientos de activación paternogénica.

Tratamientos	Ovocitos madurados	Ovocitos activados	Ovocitos para cariotipo	Embriones analizados	Metafas es analizadas	Ploidía			
						Haplo n(%)	Diplo n(%)	Poli n(%)	Aneu n(%)
CHX+LatA	2406	675	202	11	30	3 (27.3)	4 (36.4)	0	4 (36.4)
CHX+ CB		679	216	9	19	2 (22.2)	0	0	7 (77.8)
CHX (control)		552	196	10	18	3 (30)	3 (30)	0	4 (40)
DMAP		516	144	12	23	3 (25)	4 (33.33)	1 (8.33)	4 (33.33)

(Test de Fisher, $p < 0.05$). Haplo: haploide (1n). Diplo: diploide (2n). Poli: poliploide ($> 2n$). Aneu: Aneuploide ($Xn \pm 3$ cromosomas).

El cuadro 5, muestra que no hubo diferencias estadísticas significativas en la tasa de producción de embriones diploides, haploides u aneuploides entre los tratamientos con LatA, CB o grupos control.

4.2 Experimento 2. Evaluación de latrunculina A durante la activación de la SCNT mediante la técnica de HMC para producir embriones *in vitro* en porcinos

En este segundo experimento, se intentó mejorar la producción de embriones clonados porcinos, mediante la técnica de HMC. Basándonos en los resultados del experimento 1, que mostraron que la LatA es capaz de inhibir la extrusión del segundo CP. De acuerdo con esto, hipotetizamos que LatA también sería capaz de inhibir la extrusión del pseudo corpúsculo polar, evitando la pérdida de parte de la información genética de los embriones clonados.

Para corroborar esta hipótesis, se evaluó la tasa de desarrollo *in vitro* de los embriones clonados mediante HMC, comparando la activación mediante PE seguido de CHX combinado con LatA o CB. Se evaluó la tasa de embriones clivados (figura 4.10), mórulas (figura 4.11) y blastocistos (figura 4.12).

Con la técnica de HMC fue posible obtener un total de 83.6% (168/201) de ovocitos reconstituidos. Luego de las tres horas de activación, la sobrevida de los embriones activados con LatA 93.9% (77/83), significativamente superior a lo observado para el grupo activado con CB ($p \leq 0.05$), que presento una sobrevida del 82.4% (70/85).

Los registros de desarrollo *in vitro* de los embriones clonados por HMC se muestran en el cuadro 6. Se observó que, la tasa de clivaje del grupo activado con LatA no fue diferente estadísticamente respecto al grupo tratado con CB. A pesar de observarse diferencias significativas en la tasa de mórulas, la tasa de blastocistos no difirió entre ambos tratamientos.

Cuadro 6. Evaluación de la tasa de desarrollo *in vitro* de los embriones clonados mediante la técnica de HMC.

Tratamiento	N	Clivados N° (%)	Mórula N° (%)	Blastocitos N° (%)
CHX+LatA	77	61(79,2)	22(28,6) ^{ab}	11(14,3)
CHX+ CB	70	48(68,6)	13(18,6) ^b	5(7,1)
control P. (CHX+LatA)	69	51(73,9)	24(34,8) ^a	6(8,7)
control P. (CHX+CB)	69	55(79,7)	18(26,1) ^{ab}	5(7,2)

^(a,b): Los valores con letras distintas en la misma columna indican las diferencias significativas (Test de Fisher, $P \leq 0,05$). **LatA**: Latrunculina A; **CB**: Citocalasina B; **CHX**: Cicloheximida. Los datos obtenidos de 5 repeticiones. N: ovocitos reconstruidos fusionados o activados partenogénicamente.

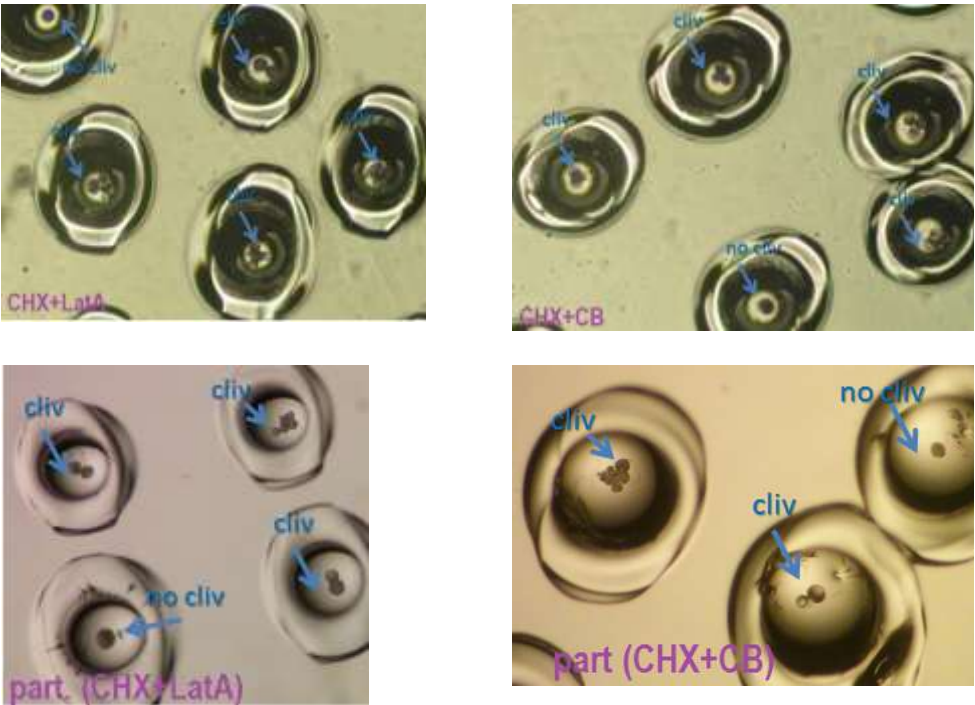


Figura 4.10. Fotografías embriones clonados por HMC, en etapa de clivados. Se observaron dos días de cultivo en medio SOFaa, se visualizó bajo luz blanca con una magnificación fina de 400.



Figura 4.11. Fotografías los embriones clonados por HMC, en etapa de mórula. Se observaron al día 5 de cultivo, la visualización se realizó bajo luz blanca con una magnificación fina de 400.

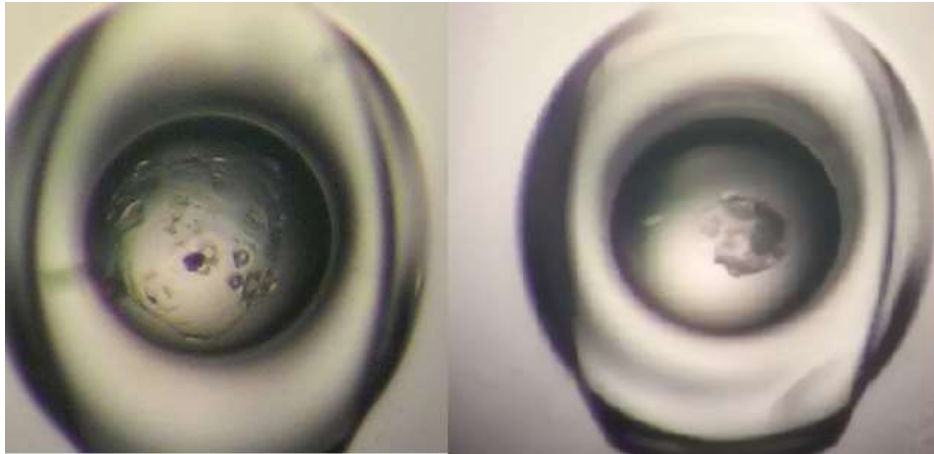


Figura 4.12. Fotografías de los blastocistos clonados por HMC. Se observaron al día siete u ocho de cultivo, la visualización bajo luz blanca con una magnificación fina de 400.

Capítulo 5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En esta tesis nos propusimos establecer un sistema eficiente para la producción *in vitro* de embriones partenogénicos porcinos diploides, basado en el uso de la latrunculina A, para su posterior aplicación en clonación.

Tradicionalmente, la producción de embriones partenogénicos diploides porcinos se ha logrado mediante el tratamiento con CB durante la activación. Si bien, tanto la LatA como la CB inhiben la polimerización de los filamentos de actina, los mecanismos de acción involucrados son diferentes. La LatA actúa a nivel de los monómeros de actina (Spector *et al.*, 1983; Coué *et al.*, 1987), mientras que la CB inhibe el extremo “+” de los filamentos de actina (Cooper, 1987; Theodoropoulos *et al.*, 1994). Esta inhibición de la polimerización de los filamentos de actina, sucede durante el progreso meiótico del ovocito, provocando la retención del segundo CP. De este modo, al impedirse la liberación del segundo CP, las cromátidas hermanas persisten dentro del citoplasto, generándose dos pronúcleos (o uno con el doble de carga cromosómica) y un cigoto diploide.

En la primera etapa de esta tesis, se determinó la eficiencia de la LatA para producir embriones partenogénicos diploides. Para ello, los embriones se generaron mediante activación con un pulso eléctrico, seguido por incubación en CHX combinada con LatA o CB. Se evaluaron parámetros clave, tales como la tasa de extrusión del segundo CP, formación de dos pronúcleos, desarrollo embrionario *in vitro* y carga cromosómica de cada blastómera del embrión. Para el grupo control haploide, se utilizaron ovocitos activados con pulso eléctrico e incubado solo en CHX. El uso de LatA, resultó en tasas de inhibición de la extrusión del segundo CP no mostrando diferencias significativas respecto a la CB ($p < 0.05$). Este es el primer estudio en evaluar la inhibición de la extrusión del segundo CP en un periodo corto posterior a la activación con LatA o CB.

El segundo parámetro evaluado fue la tasa de formación de pronúcleos a las diecisiete horas posteriores a la activación. Se observó que LatA induce la formación de dos pronúcleos, a la vez que inhibe la liberación del segundo CP en una alta proporción de los cigotos (57,7%, 156/90). Esto fue significativamente diferente a lo observado en el grupo activado con CB, que presentó dos pronúcleos e inhibición de la liberación del segundo CP en 44,7% (152/68) de los cigotos estudiados. Ambos tratamientos difirieron del grupo control, que resultó en 10,1% (158/16) de cigotos con 2 PN y 1CP. En línea con la observación anterior, LatA resultó en menores porcentajes de embriones con un solo pronúcleo y dos CP que la CB.

En la fecundación normal, el ovocito es activado por el ingreso del espermatozoide, que provoca la extrusión de la mitad de los cromosomas en forma de segundo CP y la formación de dos pronúcleos. La producción de embriones partenogénicos diploides generalmente se logra mediante inhibición de la extrusión del segundo CP, empleando inhibidores del citoesqueleto tales como CB (*Kim et al., 1997*), o utilizando agentes como el 6-DAMP (*Szöllosi et al., 1993; Liu y Yang., 1999*), que evitan la reactivación de MPF, bloquean la extrusión del segundo CP e inducen la formación de uno o dos pronúcleos después de la activación de los ovocitos en metafase II. En este estudio, demostramos que LatA fue eficaz para inhibir la liberación del segundo CP, a la vez que permitió la posterior formación de dos pronúcleos. Estos resultados son alentadores, ya que demuestra que la LatA ejerce su acción sobre la formación pronuclear, similar a lo que ocurre en la fecundación natural (*Terashita et al., 2012*). Nuestros resultados concuerdan con observaciones previas. *Himaki et al., (2012)* emplearon LatA en diferentes concentraciones, y obtuvo tasas de formación de dos pronúcleos y presencia de un solo CP en el 56 a 58% de los cigotos de cerdo “*minipig*”. Datos similares fueron obtenidos por *Terashita et al., 2012* en ratones, quienes también demostraron la

capacidad de LatA para retener el segundo CP y permitir la formación de dos pronúcleos. Estos autores también obtuvieron porcentajes de activación mayores al 75% al emplear CB o LatA durante la activación, similar a lo observado en la presente tesis.

Teniendo en cuenta los alentadores resultados de formación de pronúcleos inducidos por LatA, se procedió a evaluar su efecto sobre el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocistos. Se reiteró la activación en idénticas condiciones a lo previamente descrito, y se incluyeron dos grupos controles: incubación solo en CHX (control haploide) e incubación solo en 6-DMAP (control diploide). Este último grupo fue incluido como control positivo, dado que el 6-DMAP resulta en tasas elevadas en producción de embriones clonados en la especie porcina (*Buemo et al., 2016*). No se observaron diferencias estadísticas en la tasa de blastocistos inducida por LatA o CB ($p \leq 0,05$), que tampoco difirieron a los grupos controles.

A pesar de no observarse diferencias estadísticas en la tasa de blastocistos inducida por los diferentes tratamientos, LatA produjo blastocistos con mayor número de células ($p \leq 0,05$) que CB y los grupos controles. El número de células de los blastocistos es indicativo de calidad embrionaria (*Hardy et al., 2001 y 2003*). Por tal motivo, esta observación indica que los embriones partenogénicos producidos por tratamiento con LatA serían de mejor calidad.

Finalmente, en una última etapa de evaluación de los embriones porcinos partenogénicos producidos por tratamiento con LatA, se determinó la carga cromosómica de las blastómeras de los embriones, tomando como referencia que el complemento cromosómico normal de cerdos es $2N=38$ cromosomas. No se detectaron diferencias entre LatA, CB y los controles en el número de blastómeras diploides y haploides. Es importante resaltar que la técnica de análisis de cariotipos es poco eficiente. Se presentan numerosas dificultades, entre las que se incluyen: dificultades

para sincronizar las blastómeras en metafase y poca visibilidad de cromosomas, debido a la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma de los ovocitos porcinos, que los torna más opacos que otras especies (Yong *et al.*, 2005; Somfai *et al.*, 2008). No hay reportes previos evaluando la ploidía de embriones producidos con LatA contra los cuales podamos comparar nuestros resultados.

En suma, nuestros resultados de activación paternogénica empleando LatA o CB, demuestran que la LatA es eficiente para producir embriones partenogénicos diploides; la LatA es capaz de inhibir la extrusión del segundo CP, formar dos pronúcleos y producir blastocistos con mayor proporción de células. Si bien los resultados de ploidía no fueron muy alentadores, creemos que podría deberse a problemas técnicos.

Por tal motivo, en una segunda etapa de la tesis, se evaluó la activación basada en CHX combinada con LatA para asistir la clonación porcina mediada por la técnica de clonación a mano (*Hand-made cloning*). En el caso de la clonación, nuestra hipótesis fue que la activación con LatA inhibe la extrusión del pseudo-CP y evita la pérdida de parte de la información genética contenida en la célula donante, uno de los causales del pobre desarrollo embrionario de los clones (Wakayama y Yamagimachi, 1999). Estudios previos han mostrado que el uso de inhibidores del citoesqueleto, tales como la CB, permiten conservar la ploidía de los clones mediante la inhibición de la extrusión del pseudo CP (Rohrer *et al.*, 1996). Sin embargo, la CB tendría un efecto tóxico para los embriones (Gabbiani *et al.*, 1975; Himaki *et al.*, 2010; Himaki *et al.*, 2012; Terashita *et al.*, 2012), que afectaría la localización de la actina - F, evento importante durante la activación de los ovocitos, la formación de pronúcleos, reprogramación nuclear y el desarrollo posterior de los embriones. Por tal motivo, propusimos remplazar la CB con la LatA. Reportes previos demostraron que la LatA corregiría la localización anormal de la actina - F (Terashita *et al.*, 2012 y 2013). Además, no sería necesario usar altas

concentraciones de LatA para producir un embrión diploide como es el caso de la CB (Wakatsuki *et al.*, 2001; Himaki *et al.*, 2012). La LatA tendría menor citotoxicidad que la CB; esta última puede provocar una segregación anormal de los cromosomas en embriones antes de la etapa de 8 células, reduciendo la capacidad de que estos desarrollen a blastocistos (Mizutani *et al.*, 2012).

El interés en realizar HMC reside en que esta técnica requiere menos equipamiento que la técnica tradicional, lo cual presenta ventajas económicas, dado que posibilitaría adaptar la clonación para los laboratorios con menor infraestructura (Vajta *et al.*, 2001; Rodríguez, 2009).

Por estos motivos en el último experimento de esta tesis, evaluamos la activación con LatA para asistir a la clonación por HMC. No observamos diferencias significativas en el desarrollo embrionario de los clones activados con LatA o CB ($p \leq 0.05$). Las tasas de blastocistos obtenidas en esta tesis mediante HMC fueron inferiores a las previamente reportadas, empleando LatA para inducir desarrollo de embriones partenogénicos (Himaki *et al.*, 2012), y clones en cerdos *minipig* (Himaki *et al.*, 2010). En estos reportes se utilizaron, LatA o CB solas para acompañar la activación de los clones generados por la técnica de SCNT tradicional, empleando como donantes a células fetales.

Las menores tasas de desarrollo observadas en esta tesis podrían atribuirse a la técnica de enucleación por HMC empleada en esta tesis. La enucleación por HMC involucra el corte a mano de los ovocitos, que elimina la mitad del citoplasma de los mismos (Vajta *et al.*, 2001). Por tal motivo, posteriormente son requeridos dos citoplastos de ovocitos enucleados para la reconstrucción y recuperación del volumen citoplasmático del embrión (Rodríguez, 2009). La necesidad de cultivo individual de los clones de HMC, en un sistema similar al de “well on the well” (WOW) (Vajta *et al.*, 2003), también

podría ser el causal de menor desarrollo de los clones, en comparación con la técnica de SCNT tradicional.

Otro aspecto, que podría estar afectando la producción de blastocistos clonados mediante HMC en nuestro trabajo, es el tipo de células donantes empleadas, que se sabe, puede influir en la eficiencia de la clonación (*Oback y Wells, 2002*). En la presente tesis se utilizaron células somáticas de tejido de un animal adulto, más difíciles de reprogramar que los fibroblastos fetales (*Saini et al., 2015; Li et al., 2008*). En este sentido, *Akshey et al., (2010)*, demostró en cabras que los fibroblastos fetales resultan en mayores tasas de blastocistos que las células de *cumulus* frescas y cultivadas. Asimismo, otros autores manifiestan que células somáticas son menos eficientes que células fetales, esto se ha estudiado en diferentes especies como el ratón, vacuno, búfalos silvestres y domésticos, ovinos y porcinos, cuando se compararon células fetales y células de animal adulto (*Wakayama et al., 1999; Wakayama et al., 2005; Mizutani et al., 2008; Bernstein et al., 1996; Kato et al., 2000; Saini et al., 2015; Li et al., 2006; Zhao y Zheng, 2010*). El número de pasajes del cultivo celular también tiene un efecto sobre la tasa de blastocisto. *Mezzalina et al., 2011 y De Sousa et al., 2002*, obtuvieron las mayores tasas de blastocistos, cuando emplearon células de vaca adulta con un pasaje máximo de cuatro. En esta tesis, se utilizaron células con más de 5 pasajes, lo cual podría explicar el menor desarrollo de los blastocistos.

A la fecha, no se cuenta con demasiada información respecto al uso de LatA en clonación, especialmente en animales domésticos. La mayor parte de los trabajos se han realizado en ratones, y compararon LatA con CB, obteniendo mejores resultados con LatA (*Terashita et al., 2012 y 2013; Mallol et al., 2015*).

La presente tesis ayuda a confirmar el potencial de la LatA tanto para acompañar activación partenogénica, del mismo modo para acompañar la activación de los clones producidos por HMC, empleando células somáticas de un animal adulto como donantes.

Capítulo 6. CONCLUSIONES.

6. CONCLUSIONES.

1. La presente tesis evaluó la eficiencia de la LatA durante el proceso de activación partenogénica, con el fin de mejorar la producción de blastocistos de la clonación a mano (HMC).
 - El tratamiento con LatA fue eficaz para la producción *in vitro* embriones partenogénicos porcinos diploides. Siendo este capaz de inhibir la extrusión del segundo CP, y de promover la formación de dos pronúcleos con mejor eficiencia que el tratamiento con CB. Además, el uso de la LatA durante la activación favoreció la producción de blastocistos partenogénicos con un mayor número de células, por lo tanto, con una mejor calidad que los embriones tratados con CB.
2. Se demostró también que LatA puede utilizarse de forma eficiente durante la activación de embriones generados por clonación a mano (HMC), empleando células somáticas de animales adultos.

En esta Tesis se abarcaron varios aspectos del proceso de activación en dos tipos de embriones: partenogénicos y clones, usando el tratamiento con LatA. La latrunculina A produjo embriones porcinos diploides, con mayor número de células, pudiendo ser un tratamiento que promueva un aumento en la producción de clones viables.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeydeera, L.R. (2002). In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*. 57: 257- 273.
- Abeydeera, L.R. (2001). In vitro fertilization and embryo development in the pig. *Reprod Fertil*. 58:159-173.
- Abeydeera, L.R., Wang, WH., Cantley, TC., Rieke, A. y Day, BN. (1998) Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol Reprod*, 58: 213-218.
- Akshey, Y.S., Malakar, D., De, A.K., Jena, M.K., Garg, S., Dutta, R., Pawar, S.K., Mukesh, M. (2010). Hand-made cloned goat (*Capra hircus*) embryos—a comparison of different donor cells and culture systems. *Cell Reprogram*. 12(5):581-8.
- Akshey, Y.S., Malakar, D., De, A.K. (2008). Production of handmade cloned goat blastocysts using fibroblast cells. *Reprod Fertil Dev*. 2:91–92.
- Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J., Wolf, E. (2001). Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer, *Int. J. Dev. Biol*. 45(7):797-809.
- Ali, A., Sirard, M.A. (2005). Protein Kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. *Reproduction*. Cambridge. 130: 303-310.
- Amdani, S.N., Yeste, M., Jones, C., Coward, K. (2015). Sperm factors and oocyte activation: current controversies and considerations. *Biol Reprod*. 93;50: 1–8.
- Amdani, S.N., Jones, C., Coward, K. (2013). Phospholipase C zeta (PLC ζ): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Adv Biol Regul*. 53(3):292–308.
- Azoury, J., Verlhac, M.H., Dumont, J. (2009). Actin filaments: key players in the control of asymmetric divisions in mouse oocytes. *Biol Cell*. 101:69–76.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollocks, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hayes, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overström, E.W., Echelard, Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech*. 17:456- 461.

- Bavister, B.D. y Yanagimachi. (1977). The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro, *Biol Reprod.*, 16(2):228-237.
- Ben-Yosef, D. y Shalgi, R. (2001). Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med.* 7(4):163-9.
- Berstein, E.F., Chen, Y.Q., Kopp, J.B., Fisher, L., Brown, D.B., Hahn, P.J., Robey, F.A., Lakkakorpi, J., Uitto, J. (1996). Long term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. *J Am Acad Dermatol* 34:209–218.
- Bevacqua, R. 2007. Embriones de bovino diploides por parthenogenesis. Universidad Nacional de Quilmes. Tesis.
- Bos-Mikich, A., Bressan, F.F., Ruggeri, R.R., Watanabe, Y., Meirelles, F.V. (2016) Parthenogenesis and Human Assisted Reproduction. *Stem Cells Int.* 2016:1970843.
- Briggs, R., King, T.G. (1952). Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 38:455-463.
- Brunet, S. y Verlhac, M.H. (2011). Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum Reprod Update.* 17:68–75.
- Buemo, C., Gambini, A., Moro, L.N., Hiriart, M.I., Fernández-Martín, R., Collas, P., Salamone, D.F. (2016). Embryo Aggregation in Pig Improves Cloning Efficiency and Embryo Quality. *Plos One.* 19:11(2).
- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.* 7,380(6569):64-6.
- Canel, N. (2009). Activación química de dehidroleucodina en partenogénesis y clonación bovina. Tesis licenciatura. Universidad Maimonides.
- Carabatsos, M.J., Sellitto, C., Goodenough, D.A., Albertini, D.F. (2000). Oocyte granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol.* 226:167–179.
- Casas, E. (1996). Participación de la ciclina B en la maduración de ovocitos de cerdo in vitro. *Reprod. Fertil Dev* 9: 441–446.
- Cha, S.K., Kim, N.H., Lee, S.M., Baik, C.S., Lee, H.T., Chung, K.S. (1997). Effect of cytochalasin B and cycloheximide on the activation rate, chromosome constituent and in vitro development of porcine oocytes following parthenogenetic stimulation. *Reprod Fertil Dev.* 9(4):441-6.

- Chaigne, A., Campillo, C., Voituriez, R., Gov, N.S., Sykes, C., Verlhac, M.H., Terret, M.E. (2016). F-actin mechanics control spindle centring in the mouse zygote. *Nat Commun.* 7:10253.
- Cheng, W.M., Sun, X.L., An, L., Zhu, S.E., Li, X.H., Li, Y., Tian, J.H. (2007). Effect of Different parthenogenetic activation methods on the developmental competence of in vitro matured porcine oocytes. *Anim Biotechnol.* 18(2):131-41.
- Christmann, L., Jung, T., Moor, R.M. (1994). MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol Reprod Dev.* 38(1):85-90.
- Collas, P., Fissore, R., Robl, J.M., Sullivan, E.J., Barnes, F.L. (1993). Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 34:212–223.
- Collas, P. y Robl, J.M. (1990). Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryo. *Biol Reprod.* 43(5):877-84.
- Collas, P., Balise, J.J., Hofmann, G.A., Robl, J.M. (1989). Electrical activation of mouse oocytes. *Theriogenology.* 32(5):835-44.
- Cooper J.A. (1987). Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J Cell Biol.* 105(4):1473-8.
- Coué, M., Brenner, S.L., Spector, I., Korn, E.D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* 213(2):316-8.
- Coy, P., Ruiz, S., Romar, R., Campos, I. y Gadea, J. (1999). Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. *Theriogenology.* 51: 799-812.
- De La Fuente R. y King, W.A. (1998). Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod.* 58(4):952-62.
- De Sousa, P.A., Dobrinsky, J.R., Zhu, J., Archibald, A.L., Ainslie, A., Bosma, W., Bowering, B.J, Ferrier, P.M., Fletcher, J., Gasparrini, B., Harkness, L., Johnston, P., Ritchie, W.A., Travers, A., Albertini, D., Dinnyes, A., King, T.J., Wilmut, I. (2002). Somatic cell nuclear transfer in the pig: Control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod.* 66: 642–650.
- Du, Y., Kragh, P.M., Zhang, X., Purup, S., Yang, H., Bolund, L., Vajta, G., (2005). High overall in vitro efficiency of porcine handmade cloning (HMC) combining

- partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. *Cloning Stem Cells*. 7:199–205.
- Duckworth, B.C., Weaver, J.S. y Ruderman, J.V. (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(26):16794-9.
- Duncan, M.F., Moss, S.B. (2005). PAR-3 defines a central subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Developmental Biolgy*. 280:38-47.
- Eppig, J.J., Wigglesworth, K., Pendola, F.; Hirao, Y. (1997). Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reprod*. 56: 976-984.
- Eppig, J.J. (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation. In: *The ovary* (E.Y. Adashi y P.C.K. Leung. Raven Press. New York:185-208.
- Eyers, P.A., Liu, J., Hayashi, N.R., Lewellyn, A.L., Gautier, J., Maller, J.L. (2005). Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 1,280(26):24339-46.
- Fulka, J.Jr., First, N.L., Moor, R.M. (1998). Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*. 4(1):41–49.
- Fulka, J.Jr., First, N.L., y Moor, R.M. (1996). Nuclear transplantation in mammals: remodeling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. *BioEssays* 18:835–840.
- Fulka, J.Jr., Motlík, J., Fulka, J., Crozet, N. (1986). Activity of maturation promoting factor in mammalian oocytes after its dilution by single and multiple fusions. *Dev Biol*. 118(1):176-81.
- Funahashi, H. y Day, B.N. (1993). Effects of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology*. 39: 965-973.
- Gabbiani, G., Montesano, R., Tuchweber, B., Salas, M., Orci, L. (1975). Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in hepatocytes. *Lab Invest*. 33(5):562-9.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., Lazzari, G. (2003). Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*. 7,424(6949):635.

- Gambini, A., Jarazo, J., Olivera, R., y Salamone, D.F. (2012). Equine Cloning: In Vitro and In Vivo Development of Aggregated Embryos. *Biology of Reproduction*. 87(1):15–15.
- Gurdon, J.B., Laskey, R.A. (1970). Methods of transplanting nuclei from single cultured cells to unfertilized frogs' eggs. *J Embryol Exp Morphol*. 24(2):249-55.
- Gurdon, J.B. (1960). The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. *Q J Microsc Sci*. 101:299-311.
- Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., Zhou, Q. (2014). One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*. 24(3):372-5.
- Halet, G. (2004). PKC signaling at fertilization in mammalian eggs. *Biochim Biophys Acta*. 1742(1-3):185-9.
- Hardy, K., Stark, J., Winston, R.M. (2003). Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol Reprod*. 68(4):1165-9.
- Hardy, K., Spanos, S., Becker, D., Iannelli, P., Winston, R.M., Stark, J. (2001). From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(4):1655-60.
- Himaki, T., Mizobe, Y., Tsuda, K., Suetomo, M., Yamakuchi, H., Miyoshi, K., Takao, S., Yoshida, M. (2012). Effect of Postactivation Treatment with Latrunculin A on In Vitro and In Vivo Development of Cloned Embryos Derived from Kidney Fibroblasts of an Aged Clawed Miniature Boar. *J Reprod Dev*. 58(4):398-403.
- Himaki, T., Mori, H., Mizobe, Y., Miyoshi, K., Masahiro, S., Takao, S., Yoshida, M. (2010). Latrunculin A Dramatically Improves the Developmental Capacity of Nuclear Transfer Embryos Derived from Gene-Modified Clawed Miniature Pig Cells *Cell Reprogram*. 12(2):127-31.
- Hosseini, S., Hajian, M., Moulavi, F., Shahverdi, A., Nasr-Esfahani, M. (2008). Optimized combined electrical–chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. *Anim Reprod Sci*. 108:122–133.
- Hunter M.G. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5:122–130.
- Izumi T. y Maller J.L. (1993). Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell*. 4(12):1337-50.
- Jones, K.T. (2005). Mammalian egg activation: from Ca^{2+} spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130:813–823.

- Jurema, M.W. y Nogueira, D. (2006). In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril*. 86(5):1277-1291.
- Ka, H.H., Sawai, K., Wang, W.H., Im, K.S. y Niwa, K. (1997). Amino acids in maturation media and presence of *cumulus* cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol Reprod*. 57:1478-1483.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C. (1990), Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature*. 347(6288):37-44.
- Kashir, J., Heindryckx, B., Jones, C., De Sutter, P., Parrington, J., Coward, K. (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum. Reprod. Update*. 16:690–703.
- Kato, Y., Tani, T., Tsunoda, Y., (2000). Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*. 120:231-7.
- Kato, Y. Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., Tsunoda, Y. (1998). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult *Science*. 282:2095-2098.
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, H., Yamashita, M., Aoki, F., Tojo, H., Toyoda, Y. (2000). Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod*. 63: 715–722.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Motlik, J., Shioya, Y. y Izaike, Y. (1993). Effect of follicle cells on in vitro fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*. 39: 593-599.
- Kim, NH., Lee, JW., Jun, SH., Lee, HT., Chung, KS. (1998a) Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol. Rerod dev*. 51(4): 436-44.
- Kim, NH., Chung, HM., Cha, KY. (1998b). Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Human Reprod*. 13:2217-2222.
- Kim, N.H., Chung, K.S., Day, B.N. (1997). The distribution and requirements of microtubules and microfilaments during fertilization and parthenogenesis in pig oocytes. *J Reprod Ferti*. 111:143–149.
- Kragh, P.M., Dua, Y., Corydon, T.J., Purup, S., Bolund, L., Vajta, G. (2005). Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology*. 64: 1536–1545.

- Kragh, P.M., Vajta, G., Corydon, T.J., Purup, S., Bolund, L., Callesen, H. (2004). Production of transgenic porcine blastocysts by *hand-made cloning*. *Reprod Fertil Dev.* 16:315- 318.
- Krisher R.L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci.*,82:14-23.
- Labadía, A. (1995). Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra. En: *Fisiología Veterinaria*. Ed: García, A., de la Cruz, LF., González, J., Murillo, MD. Y Salido, G. Mc Graw-Hill. Interamericana, Madrid, España: 840-860.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Colleoni, S., Crotti, G., Galli, C. (2007). Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*. 67(1):90-8. Review.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Colleoni, S., Ponderato, N., Turini, P., Crotti, G., Galli, C. (2005). Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*. 130:559–567.
- Lee, G.S., Kim, H.S., Hyun, S.H., Lee, S.H., Jeon, H.Y., Nam, D.H., Jeong, Y.W., Kim, S., Kim, J.H., Han, J.Y., Ahn, C., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. (2005). Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*. 63:973–991.
- Lee, J.W., Tian, X.C., Yang, X. (2004). Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol Reprod Dev.* 68(1):51-57.
- Lènat, P., Bacher, C.P., Daigle, N., Hand, A.R., Ellenberg, J. (2005). A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature*. 436:812-818.
- Li, R., Liu, Y., Pedersen, H.S., Kragh, P.M., Callesen, H. (2013). Development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos after removal of zona pellucida. *Theriogenology*. 80(1):58-64.
- Li, J., Svarcova, O., Villemoes, K., Kragh, P.M., Schmidt, M., Bøgh, I.B., Zhang, Y., Du, Y., Lin, L., Purup, S., Xue, Q., Bolund, L., Yang, H., Maddox-Hyttel, P., Vajta, G. (2008). High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*. 70(5):800-8.

- Li, J., Du, Y., Zhang, Y.H., Kragh, P.M., Purup, S., Bolund, L., Yang, H., Xue, Q.Z., Vajta, G. (2006). Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes. *Cloning Stem Cells*. 8:241-50.
- Li, G.P., Tan, J.H, Sun, Q.Y., Meng, Q.G., Yue, K.Z., Sun, X.S., Li, Z.Y., Wang, H.B., Xu, L.B. (2000a). Cloned piglets born after nuclear transplantation of embryonic blastomeres into porcine oocytes matured in vitro. *Cloning*. 2:45–52.
- Li, W.Q., Dehnade, F., Zafarullah, M. (2000b). Thiol Antioxidant, N-Acetylcysteine, Activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 275: 789-794.
- Liu, S., Cui, K., Li, H.L., Sun, J.M., Lu, X.R., Shen, K.Y., Liu, Q.Y., Shi, de S. (2015). Comparison of chemical, electrical, and combined activation methods for in vitro matured porcine oocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 51(2):103-12.
- Liu, J.L., Sung, L.Y., Barber, M., Yang, X. (2002a). Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovinemetaphase II oocytes. *Biol Reprod*. 66:1342-9.
- Liu, J.L., Sung, L.Y., Tian, X.C., Yang, X. (2002b). Hypertonicity-induced projections reflect cell polarity in mouse metaphase II oocytes: involvement of microtubules, microfilaments, and chromosomes. *Biol Reprod*. 67:1853-63.
- Liu, L., Yang, X. (1999). Interplay of Maturation- Promoting Factor and Mitogen-Activated Protein Kinase Inactivation during Metaphase- to- Interphase Transition of Activated Bovine Oocytes. *Biology of Reprod*. 61:1-7.
- Liu, L., Dai, Y. y Moor, RM. (1997). Role of secreted proteins and gonadotropins in promoting full maturation of porcine oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev*. 47:191-199.
- Lorca, T., Cruzalegui, F.H., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Méry, J., Means, A., Dorée, M. (1993). Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 18,366(6452):270-3.
- Machaty, Z., Funahashi, H., Day, B.N., Prather, R.S, (1997). Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes. *Biol Reprod* 56:921–930.
- Mallol, A., Santaló, J., Ibáñez, E. (2015). Improved Development of Somatic Cell Cloned Mouse Embryos by Vitamin C and Latrunculin A. *PLoS One*. 10(3):0120033.

- Mattioli, M., Galeati, G., Barboni, B., Seren, E. (1994). Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod fertil.* 100(2):403-9
- Martinez Diaz, M.A., Suzuki, M., Kagawa, M., Ikeda, K., Takahashi, Y. (2003). Effects of cycloheximide treatment on in-vitro development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos. *Jpn J Vet Res.* 50(4):147-55.
- Maro, B. y Flach, G. (1984). Changes in actin distribution during fertilization of the mouse oocyte. *Jour of Embr and Exp Morphol.* 81:211-237.
- Meister, A. y Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *An Rev Bioch.* 52: 711-760
- Méo, S.C., Leal, C.L.V., Garcia, J.M. (2004). Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. *Animal Reproduction Science.* Amsterdam. 81:35-46.
- Mezzalira, J., Lain, U.O., Pereira, R., Casali, R., Koerich, F., Ambrósio, C.E., Miglino, M.A. Rodrigues, J.L. Mezzalira, A., Bertolini, M. (2011). Production of Bovine Hand-Made Cloned Embryos by Zygote–Oocyte Cytoplasmic Hemi-complementation. *Cellular Reprogramming.* 13:1.
- Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y. (1993). Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol.* 158(1):62-78.
- Mizutani, E., Yamagata, K., Ono, T., Akagi, S., Geshi, M. (2012). Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. *Dev Biol.* 364: 56-65.
- Mizutani, E., Ono, T., Li, C., Maki-Suetsugu, R., Wakayama, T. (2008) Propagation of senescent mice using nuclear transfer embryonic stem cell lines. *Genesis.* 46:478–483.
- Motlik, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. (1998). Interplay between cdc2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49:461–469.
- Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J. (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil.* 72(2):323-8.
- Moor, M.R., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T. (1990). Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil.* 40: 197-210.
- Moor, M.R. y Warnes, G.M., (1979). Regulation of meiosis in mammalian oocytes. *Br Med Bull.* 35(2):99-103.

- Moore, C.A. y Zernicka-Goetz, M. (2005). PAR-1 and the microtubule associated proteins CLASP2 and dynactin-p50 have specific localization on mouse meiotic and first mitotic spindles. *Reproduction*. 130:311-320.
- Moos, J., Visconti, P.E., Moore, G.D., Schultz, R.M., Kopf, G.S. (1995). Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biol Reprod*. 53(3):692-9.
- Morales, M., Merchant, H., de la Garza, C. y López, N. (2006). Gametogenesis I: revision de la literatura, con enfoque en la ovogenesis. *Med Univer*. 8(32):183-189.
- Mori H., Mizobe, Y., Inoue, S., Uenohara, A., Takeda, M., Yoshida, M., Miyoshi, K. (2008). Effects of cycloheximide on parthenogenetic development of pig oocytes activated by ultrasound treatment. *J Reprod Dev*. 54(5):364-9.
- Moses, R.M. y Masui, Y. (1995). Metaphase arrest in newly matured or microtubuledepleted mouse eggs after calcium stimulation. *Zigote*, 3(1) :1-8.
- Myles, D.G. y Primakoff, P. (1997). Why did the sperm cross the *cumulus*? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod*. 56: 320-327.
- Nagashima, H., Grupen, CG., Ashman, RJ. y Nottle, MB. (1996). Developmental competence of in vivo and in vitro matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. *Mol Reprod Dev*. 45:359-363.
- Naito, K., Fukuda, Y. y Toyoda, Y. (1988). Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res*. 21: 289-295.
- Nakai, M., Kashiwazaski, N., Takizawa, A., Hayashi, Y., Nakatsukasa, E., Fuchimoto, D.I., Noguchi, J., Kaneko, H., Shino, M., Kikuchi, K. (2003). Viable piglets generated from porcine oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod*. 68:1003–1008.
- Newton, A.C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J*. 2:361-71.
- Oback, B. y Wells, D. (2002). Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. *Cloning Stem Cells*. 4:147–68.
- Ock, S.A., Kwack, D.O., Mohana, K.B., Han, J., Kim, S.W, Rho, G.J. (2011). Effects of Activation Methods on DNA Synthesis and Development of Parthenogenetic Porcine Embryos. *Reprod Dom Anim*. 46:1082–1089.

- Oliveira, R.,J., Mantovani, M.S., Pesarini, J.R., Mauro, M.O., da Silva, A.F., Souza, T.R., Ribeiro, L.R. (2015). 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo, *Genet. Mol. Res.* 14 (1): 834-849.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., Perry, A.C.F. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*. 289:1188–1190.
- Onodera, M. y Tsunoda, Y. (1989). Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation in vitro. *Gamete Res.* 22:277–283.
- Özil, J.P. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development*. 109:117–127.
- Paffoni, A., Brevini, T.A.L., Gandolfi, F.R.G. (2008). Parthenogenetic activation: Biology and applications in the ART laboratory. *Placenta*. 29:121-125.
- Palasz, A.T., Thundathil, J., Verrall, R.E., Mapletoft, R.J. (2000). The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Anim Reprod Sci.* 58(3-4):229-40.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Alvarez- Uría, M., Fraile, B., Anadon, R., Sáez F.J. (2007). *Citología e Histología Vegetal y Animal*. Interamericana de España, S.A.U. 2(4):239-289.
- Park, H.J., Koo, O.J., Kwon, D.K., Kang, J.T., Jang, G., Lee, B.C. (2010). Effect of roscovitine-treated donor cells on development of porcine cloned embryos. *Reprod Domest Anim.* 45(6):1082-8.
- Pasque, V., Jullien, J., Miyamoto, K., Halley-Stott, R.P., Gurdon, J.B. (2011). Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. *Trends Genet.* 27(12):516-25.
- Pincus, G. and Enzman, E.V. (1936) The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. II. The activation of tubal eggs in the rabbit. *Journal of Experimental Zoology*. 73:195-208.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A., Campbell, K.H. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 407:86-90.

- Prather, R.S., Sims, M.M., First, N.L. (1989). Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod.* 41(3):414-8.
- Prather, R., Barnes, F., Sims, M., Robl, J., Eyestone, W., First, N. (1987). Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 4: 859-66.
- Ranjan, R., Singh, R., Yasotha, K., Kumar, T.M., Puri, G., Kumar, K., Singh, R., Bhure, S., Malakar, D., Bhanja, S.K., Sarkar, M., Das, B.C., Bag, S. (2013). Effect of Actin Polymerization Inhibitor During Oocyte Maturation on Parthenogenetic Embryo Development and Ploidy in *Capra hircus*. *Biochem Genet* 51:944–953.
- Richard, F.J. (2007). Regulation of meiotic maturation. *J Anim Sci.* 13: 4-6.
- Rodríguez, K.F. y Farin, C.E. (2004). Developmental capacity of bovine *cumulus* oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. *therigenology* 61(7-8): 1499–1511.
- Rodríguez, L. (2009). Generación de embriones bovinos por transferencia nuclear somática: Evaluación de la capacidad de desarrollo in vivo e in vitro y de la expresión génica en las etapas pre y peri-implantatorias. Py de tesis. Pg. 8-28.
- Rohrer, G.A., Alexander, L.J., Hu, Z., Smith, T.P.L., Keele, J.W., Beattie, C.W. (1996). Comprehensive map of the 23 porcine genome. *Genome Res* 6: 371–391.
- Saini, M., Selokar, N.L., Raja, A.K., Sahare, A.A., Singla, S.K., Chauhan, M.S., Manik, R.S., Palta, P. (2015). Effect of donor cell type on developmental competence, quality, gene expression, and epigenetic status of interspecies cloned embryos produced using cells from wild buffalo and oocytes from domestic buffalo. *Theriogenology.* 84(1):101-8.
- Salamone, D., Baraño, L., Santos, C., Bussmann, L., Artuso, J., Werning, C., Prync, A., Carbonetto, C., Dabsys, S., Munar, C., Salaberry, R., Berra, G., Berra, I., Fernández, N., Papouchado, M., Foti, M., Judewicz, N., Mujica, I., Muñoz, L., Alvarez, S.F., González, E., Zimmermann, J., Criscuolo, M., Melo, C. (2006). High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol.* 124(2):469-72.
- Salamone, D.F., Santos, C.B., Baraño, J.L., Bussmann, L., Artuso, J., Mujica, I., Munar, C., Berra, G., Melo, C. (2004). Effect of Calf Recloning on Embryo and Fetal Survival. *Reprod Fert and Develop.* 16(2):158-158.

- Salamone, D., Damiani, P., Fissore, R.A., Robl, J.M., Duby, R.T. (2001). Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod.* 64:1761–1768.
- Salestri, A., Hascall, V.C., Camaioni, A., Yanagishita, M. (1993). Oocyte-granulosa cell interactions. In: *The ovary* (E.Y. Adashi y P.C.K. Leung, eds.) Raven Press, New York: 209-225.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K. Lai, F.A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca (2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129:3533–3544.
- Shah, R.A., George, A., Singh, M.K., Kumar, D., Chauhan, M.S., Manik, R., Palta, P., Singla, S.K. (2008). Hand-made cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: comparison of different media and culture systems. *Cloning Stem Cells.* 10:435–442.
- Sirard M.A, Rochard F., Blondin P., robert C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 7;65(1):126-36.
- Sirard, M.A., Dufort, I., Coenen, K., Tremblay, K., Massicotte, L. y Robert, C. (2003). The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reprod Suppl.* 61:117-29.
- Sirard, M.A. (2001). Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology.* 55(6):1241-54.
- Sirard, M.A., Florman, H.M., Leibfried-Rutledge, M.L., Barnes, F.L., Sims, M.L. y First, N.L. (1989). Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod.* 40: 1257- 1263.
- Smith, L.C. (1993). Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J Reprod fert.* 99:39-44.
- Smith, L.C. y Wilmut, I. (1989). Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod.* 40(5):1027-35.
- Soloy, E. Kanka, J., Viuff, D., Smith, S.D., Callesen, H., Greve, T. (1997). Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biology of Reproduction, Champaign.* 57(1):.27-35.

- Somfai, T., Kashiwazaki, N., Ozawa, M., Nakai, M., Maedomari, N., Noguchi, J., Kaneko, H., Nagai, T., Kikuchi, K. (2008). Effect of centrifugation treatment before vitrification on the viability of porcine mature oocytes and zygotes produced in vitro. *J Reprod Dev.* 54(3):149-55.
- Spector, I., Shochet, N.R., Kashman, Y., Groweiss, A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science.* 219:493–495.
- Swann, K. y Lai, F.A. (2013). PLC ζ and the initiation of Ca²⁺ oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell Calcium* 53:55–62.
- Szöllösi, M.S., Kubiak, J.Z., Debey, P., de Pennart, H., Szöllösi, D., Maro, B. (1993). Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J Cell Sci.* 104 (3):861-72.
- Tecirlioglu, R.T., French, A.J., Lewis, I.M., Vajta, G., Korfiatis, N.A., Hall, V.J., Ruddock, N.T., Cooney, M.A., Trounson, A.O. (2003). Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod. Fertil. Dev.* 15:361–366.
- Terashita, Y., Yamagata, K., Tokoro, M., Itoi, F., Wakayama, S., Li, C., Sato, E., Tanemura, K., Wakayama, T. (2013). Latrunculin A treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One.* 8(10):78380.
- Terashita, Y., Wakayama, S., Yamagata, K., Li, C., Sato, E. et al. (2012) Latrunculin a can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. *Biol Reprod.* 86(6):180.
- Theodoropoulos, P.A., Gravanis, A., Tsapara, A., Margioris, A.N., Papadogiorgaki, E., Galanopoulos, V., Stournaras, C. (1994). Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping. *Biochem. Pharmacol.* 47:1875-1881.
- Tim J. 2010. *Biología molecular de la célula*. Ed. Omega,S.A. 5:617-1115.
- Töpfer-Petersen, E., Petrounina, A.M., Ekhlasi-Hundrieser, M. (2000). Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci.* 60-61:653-62.
- Ueno, S., Kurome, M., Ueda, H., Tomii, R., Hiruma, K., Nagashima, H. (2005). Effects of maturation conditions on spindle morphology in porcine MII oocytes. *J Reprod Dev.* 51(3):405-10.

- Van de Sandt, J.M., Schroeder, A.C. y Eppig, J.J. (1990). Culture media for mouse oocyte maturation affect subsequent embryonic development. *Mol Reprod Develop.* 25:164-171.
- Vajta, G., Peura, T.T., Lai, L., et al. (2004). Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning (HMC) in cattle and pig. *Reprod. Fertil. Dev.* 16:159.
- Vajta, G., Lewis, I.M., Trounson, A.O., Purup, S., Maddox-Hyttel, P., Schmidt, M., Pedersen, H.G., Greve, T., Callesen, H. (2003). Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod.* 68:571-8.
- Vajta, G., Lewis, I.M., Hyttel, P., Thouas, G.A., Trounson, A.O. (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning.* 3:89–95.
- Vajta, G., Peura, T.T., Holm, P., Páldi, A., Greve, T., Trounson, A.O., Callesen, H. (2000). New method for culture of zona-included or zonafree embryos: the well-of-the-well (WOW) system. *Mol. Reprod. Dev.* 55:256–264.
- Verlhac, M.H., Lefebvre, C., Guillaud, P. (2000). Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Current Biology.* 19:1303-1306.
- Voronina, E. y Wessel, G.M. (2003). The Regulation of Oocyte Maturation. *Current Topics in Developmental Biology.* 58:55-99.
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C., Elson, E.L. (2001). Effects of cytochalasin D and latrunculina B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci.* 114:1025–1036.
- Wakayama, S., Mizutani, E., Kishigami, S., Thuan, N.V., Ohta, H., Hikichi, T., Bui, H.T., Miyake, M., Wakayama, T. (2005). Mice cloned by nuclear transfer from somatic and ntES cells derived from the same individuals. *J Reprod Dev.* 51:765–772.
- Wakayama, T., y Yamagimachi, R. (1999). Cloning of male mice from adult tail tip cells. *Nat Genet.* 22: 127–128.
- Wakayama, T., Rodriguez, I., Perry, A.C., Yanagimachi, R., Mombaerts, P. (1999). Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14984–14989.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with *cumulus* cell nuclei. *Nature.* 394: 369–374.

- Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A., Campbell, K.H.S. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*. 407:86–90.
- Wells, D.N., Misica, P.M., Tervit, H.R. (1999). Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*. 60:996–1005.
- Westhusin, M., Collas, P., Marek, D., Sullivan, E., Stepp, P., Pryor, J., Barnes, F. (1996). Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation. *Theriogenology*. 46:243–252.
- Westhusin, M., Levanduski, M., Scarborough, R., Loony, C., Bondioli, K. (1992). Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J Reprod Fertil*. 95:475–480.
- Wessel, G.M., Brooks, J.M., Green, E., Haley, S., Voronina, E., Wong, J., Zaydfudim, V. y Conner, S. (2001). The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol*. 209:117–206.
- Willadsen, S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*. 320:63–65.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385:810–813.
- Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N., Pate, B.J. (2003). A Mule Cloned from Fetal Cells by Nuclear Transfer. *Science*. 301:1063.
- Yang, X., Zhang, L., Kovacs, A., Tobback, C., Foote, R.H. (1990). Potential of hypertonic medium treatment for embryos micromanipulation: II assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, sub-zona insertion and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated in rabbit. *Mol Reprod Dev*. 27:118–129.
- Yarmola, E.G., Somasundaram, T., Boring, T.A., Spector, I., Bubb, M.R. (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J. Biol. Chem*. 275:28120–28127.
- Yamauchi, N., Sasada, H., Sugawara, S. y Nagai, T. (1996). Effect of culture conditions on artificial activation of porcine oocytes matured in vitro. *Reprod Fertil Dev*, 8:1153–1156.
- Yanagimachi, R. (2005). Male gamete contributions to the embryo. *Ann N Y Acad Sci*. 1061:203–7.

- Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y., Tsunoda, Y. (2002). Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod.* 67:442-446.
- Yong, H.Y., Hong, J.Y., Pak, S.I., Kang, S.K., Lee, B.C., Lee, E.S., Hwang, W.S. (2005). Effect of centrifugation and electrical activation on male pronucleus formation and embryonic development of porcine oocytes reconstructed with intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev.* 17(5):557-63.
- Yoon, S.Y., Jellerette, T., Salicioni, A.M., Lee, H.C., Yoo, M.S., Coward, K., Parrington, J., Grow, D., Cibelli, J.B., Visconti, P.E., Mager, J., Fissore, R.A. (2008). Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest.* 118,: 3671–3681.
- Yoshida, M., Ishigaki, Y., Nagai, T., Chikyu, M. y Pursel, VG. (1993). Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod.* 49: 89-94.
- Yoshida, M. (1993). Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev.* 35: 76-81.
- Yoshida, M., Ishigaki, Y., Kawagishi, H., Bamba, K. y Kojima, Y. (1992). Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro on subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fertil*, 95: 481-488.
- Yu, R., Tan, T., Kong, A-NT. (1997) Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 272: 28962-28970.
- Zakhartchenko, V., Stojkovic M, Palma G, Wolf E, Brem G. (1997). Enucleation of bovine oocytes with minimal cytoplasmic volume: Effect on development of nuclear transfer embryos. *Theriogenology.* 47:238.
- Zhao, X.E. y Zheng, Y.M. (2010). Development of cloned embryos from porcine neural stem cells and amniotic fluid-derived stem cells. *Animal* 4:921–929.
- Zheng, Y.S. y Sirard, M.A. (1992). The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology.* 37: 779-790.
- Zhu, Z.Y., Chen, D.Y., Li, J.S. (2003). Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biology of Reproduction.* 68:943-946.

Zhu, J., Telfer, E.E., Fletcher, J., Springbett, A., Dobrinsky, J.R., De Sousa, P.A., Wilmut, I. (2002). Improvement of an electrical activation protocol for porcine oocytes. *Biol Reprod.* 66:635–641.