

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS  
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



**DESARROLLO DE EMBRIONES BOVINOS CLONADOS POR  
TRANSFERENCIA NUCLEAR A PARTIR DE FIBROBLASTOS FETALES Y  
ADULTOS DE AMBOS GÉNEROS**

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTA:**

**M.C. JUAN JESÚS ROA VIDAL**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. MIGUEL ÁNGEL CARMONA MEDERO**

**DR. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ**

**DR. CARLOS E. IZQUIERDO ESPINAL**

**PH. D. JAVIER PADILLA RAMÍREZ**

**LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JAL. JULIO DE 2006**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO  
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS  
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la **VERSION FINAL DE LA TESIS** que desarrolló el pasante del Doctorado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias, **M en C Juan Jesús Roa Vidal**, cuyo título es:

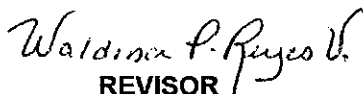
**Desarrollo de embriones bovinos clonados por transferencia nuclear a partir de fibroblastos fetales y adultos de ambos géneros**

Trabajo dirigido por: Dr. Jacinto Bañuelos Pineda

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 25 Julio del 2006

  
REVISOR

Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez

  
REVISOR

Dra. Esther Albarrán Rodríguez

  
REVISOR

Dr. Manuel Rosales Cortes

  
REVISORES

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda

c.c.p. Archivo

# INDICE

CONTENIDO	Página
<b>Indice general.....</b>	<b>i</b>
<b>Indice de figuras.....</b>	<b>ii</b>
<b>Indice de abreviaturas.....</b>	<b>iii</b>
<b>Indice de tablas.....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>v</b>
<b>1.- INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>Primera parte.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Ovogénesis.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2 Desarrollo folicular.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3 Potencial de desarrollo.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.4 Apoptosis.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.5 Maduración del ovocito.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.6 Meiosis.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.7 Maduración nuclear.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.8 Maduración citoplasmática.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1.9 Cambios morfológicos y ultraestructurales del ovocito.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.10 El MPF en la maduración del ovocito.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1.11 Arresto meiótico.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.12 Líquido folicular.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.13 Células de la granulosa.....</b>	<b>30</b>
<b>1.1.14 Células de la teca.....</b>	<b>31</b>
<b>Segunda parte.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.1 Biología del fibroblasto.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.2 Ciclo celular.....</b>	<b>35</b>
<b>1.2.3 Quiescencia.....</b>	<b>35</b>
<b>1.2.4 Telómeros.....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.5 Partenogénesis.....</b>	<b>37</b>
<b>1.2.6 Reprogramación nuclear de células somáticas.....</b>	<b>40</b>

1.2.7 Factores que afectan la reprogramación celular.....	43
1.2.8 Problemas asociados a la clonación animal.....	45
1.2.9 Aplicación de la clonación por transferencia nuclear.....	47
2.- Planteamiento del problema.....	49
3.- Hipótesis.....	50
4.- Objetivos.....	51
5.- Material y Métodos.....	52
5.1 Cultivo de fibroblastos fetales de bovino.....	52
5.2 Cultivo de fibroblastos de adulto bovino.....	53
5.3 Obtención y maduración de ovocitos in vitro de bovino.....	54
5.4 Enucleación y reconstrucción nuclear.....	55
5.5 Activación.....	56
5.6 Desarrollo de embriones clónicos in vitro.....	56
5.7 Diseño experimental.....	57
6.- Resultados.....	58
7.- Discusión.....	64
8.-Conclusiones.....	73
9.- Literatura citada.....	74

<b>Índice de figuras</b>	<b>página</b>
<b>Figura 1. Diagrama del ovario mamífero .....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2. El ciclo de la vida de los folículos ováricos.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 3. Representación esquemática del crecimiento, capacitación y maduración del ovocito bovino a través del desarrollo folicular.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 4. El complejo cúmulus ovocito bovino con capas compactas de células del cúmulus en el inicio de la maduración in vitro.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 5. El complejo cúmulus ovocito con capas expandidas de células del cúmulus después de 24 horas de maduración.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6. Los estados de maduración nuclear de ovocitos de bovino.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 7. Ilustración esquemática de la arquitectura de la epidermis.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 8. Embriones reprogramados nuclearmente de 72 hrs pos activación con una fragmentacion blastomérica y con blastomeos en degeneración así como una desigualdad en el estadio de segmentación.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 9. En el lado izquierdo se muestra embriones reprogramados nuclearmente (8-16 blastómeros) con una fragmentacion blastomérica y una desigualdad en el estadio de segmentación, en el lado derecho tenemos una morula temprana (de 16 a 32 células).....</b>	<b>64</b>

## Indice de abreviaturas

AC	adenilato ciclasa
AI	anafase I
ANOVA	Análisis de varianza
BFF	Fluido folicular bovino
BSA	albúmina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>	calcio, magnesio
Cdk1	ciclina dependiente de quinaza 1
CM	medio condicionado
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CCO	complejo cúmulus ovocito
CCOG	CCO conectado a la membrana granulosa
cAMP	monofosfato adenosin cíclico
cGMP	monofosfato guanosin cíclico
CSF	factor citostático
DAG	diacilglicerol
DNA	acido desoxirribonucleico
DNase	dexosiribonucleasa
OD	ovocito desnudo
EDTA	Acido ethylenediaminetetraacético
FCS	suero fetal bovino
FSH	hormona folículo estimulante
GV	vesícula germinal
GVBD	vesícula germinal fragmentada
h	hora(s)
I U	unidades internacionales
IVM	maduración in vitro
IVF	fertilización in vitro
IVC	cultivo in vitro
IVMFC	Maduración, fertilización y cocultivo embrionario
IGF-I	Factor de crecimiento ligado a Insulina
CEIV	cultivo de embriones in vitro
kDa	kilo daltons
LH	hormona luteinizante
MI, MII	metafase I, metafase II
MAPK	Mitógeno activado de proteína quinaza
min	minuto(s)
MIS	substancia inhibidora de Müller

ml, $\mu$ l, l	mililitro, microlitro, litro
mM, $\mu$ M, M	milimolar, micromolar, Molar
mg, $\mu$ g, ng, g	miligramo, microgramo, nanogramo, gramo
mm, $\mu$ m, nm, m	Milímetro, micrómetro, nanómetro, metro
MPF	factor promotor de la maduración
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
Mr	peso molecular relativo
n	número de observaciones
OA	Ácido okadaico
OMI	inhibidor de la maduración del ovocito
p34 <sup>cdc2</sup>	subunidad catalítica de MPF de 34 kDa
PBS	solución salina buferiada
PCM	medio pre-condicionado
PGC	célula germinal primordial
pH	potencial de hidrogeniones
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
RT	temperatura del cuarto (21°C)
SE	error estándar
sec	segundos
TCM-199	medio para cultivo de tejido 199
TLH	medio hepes buferiada de tiroides
TI	telofase I
w/v	peso/volumen
6-DMAP	6-dimethylaminopurina
°C	grados centígrados
%	porcentaje
SCNT	Transferencia nuclear de células somáticas
IL-6	Interleucina 6
FGF4	Factor de crecimiento de fibroblastos 4
FGFr2	Factor de crecimiento de fibroblastos r2
Xist	gen de inactivación del segundo cromosoma X
Oct4	gen que regula la metilación del DNA

<b>Indice de cuadros</b>	<b>página</b>
<b>Cuadro 1. El tiempo promedio por estadio del ovocito en maduración.....</b>	<b>2</b>
<b>Cuadro 2. Baja eficiencia de la transferencia nuclear de células somáticas.....</b>	<b>24</b>
<b>Cuadro 3. Relación de la actividad ovárica con la calidad de CCO colectado.....</b>	<b>59</b>
<b>Cuadro 4. Maduración de ovocitos in vitro suplementados con o sin insulina.....</b>	<b>60</b>
<b>Cuadro 5. Efecto de la concentración de la sacarosa sobre el desarrollo de embriones partenogenicos.....</b>	<b>61</b>
<b>Cuadro 6. Desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos fetales de ambos géneros.....</b>	<b>62</b>
<b>Cuadro 7. Desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos de adulto de ambos géneros.....</b>	<b>63</b>



## Resumen:

Uno de los mayores beneficios de la clonación animal será sin duda el poder manipular células somáticas de animales con un potencial genético deseable para el desarrollo de ganaderías superiores. La baja eficiencia en las técnicas de clonación por transferencia nuclear de células somáticas es una limitante para su uso en la industria animal y farmacéutica. La incompleta reprogramación nuclear, el origen y tipo de las células donantes, los medios químicos, la manipulación de los ovocitos receptores además de la transferencia de los embriones a hembras nodrizas, se han señalado como los factores de baja eficiencia en los procedimientos de clonación. En el presente trabajo se propuso determinar diferencias en la reprogramación nuclear de fibroblastos fetales y adulto de ambos géneros en ovocitos enucleados a través del desarrollo embrionario bovino. Se establecieron los protocolos de obtención, cultivo y evaluación de fibroblastos fetales y adulto de ambos generos, así mismo la obtención y maduración de ovocitos *in vitro*, enucleación, reconstitución, activación desarrollo embrionario *in vitro*. La fuente de fibroblastos provino de fetos y tejido epitelial de animales adultos, los óvulos se obtuvieron a partir de ovarios colectados en rastro. Los resultados obtenidos en la colección del complejo cumulos ovocito para la clase A-B, de ovarios con cuerpo lúteo fue de 50%, y para los ovarios sin cuerpo lúteo fue de 60.7%. El efecto del tratamiento con insulina sobre la maduración de ovocitos *in vitro* hasta metafase II fue de 52% comparado con los ovocitos madurados *in vitro* sin insulina que fue de 35.5%. El efecto del tratamiento de sacarosa a 0.3M, 0.7M y 1M en ovocitos madurados *in vitro* y activados, fue medido por el desarrollo de blastocistos partenogénicos con los siguientes resultados 17.2%, 16.7% y 14.8 respectivamente. El desarrollo de blastocistos producidos por clonación nuclear utilizando fibroblastos fetales de fetos hembra, fetos macho y un grupo control (embriones partenogénicos) se encontro un 24.6%,20% y 23% repectivamente. Así mismo se evaluó el desarrollo de blastocistos producidos por clonación nuclear utilizando fibroblastos de hembra adulta, fibroblastos de macho adulto y un grupo control (embriones partenogénicos) se encontro un 20.6%,18% y 20% respectivamente. Sin embargo, aunque los resultados son similares a los reportados por otros autores, cabe señalar que la técnica con la que fueron desarrollados los embriones es distinta pues en este trabajo no se utilizó el agente químico Hoechst 33342, la luz ultravioleta así como el 6 DMAP para la construcción de los embriones clonados, hoy se sabe que los tres son agentes mutagénicos y que sus efectos pueden ser evaluados en las distintas etapas del desarrollo embrionario, fetal y al posnacimiento. Del presente estudio se concluye que no existen diferencias importantes en el desarrollo de embriones de bovinos obtenidos mediante fibroblastos fetales de ambos géneros, así como en los fibroblastos de animales adultos de ambos géneros.

# 1.- Introducción

## Primera parte

Una de las áreas de la biotecnología animal es la clonación, aplicada a los animales domésticos de interés productivo, que promete ser una técnica que contribuirá de manera sustancial al desarrollo de la biotecnología, la producción animal, la biomedicina, la preservación de especies en extinción y la investigación básica.

El concepto de clonar un animal por transferencia de un núcleo dentro de un ovocito previamente enucleado fue primeramente propuesto por Di Berardino en 1938, sin embargo el primer éxito logrado fue en anfibios por Briggs quien lo informó hasta 1952; treinta y un años después, McGrath y Solter en 1984 anunciaron el primer éxito de clonación en ratón, lo que continuó con la clonación por transferencia de blastómeros en ovejas (Willadsen, 1986), en ganado (Prather et al., 1987), en conejos (Stice y Robl, 1988) y en cerdos (Prather et al., 1989a).

Se han obtenido animales por clonación utilizando células somáticas en diversas especies: en ovejas adultas (Wilmut et al., 1997), en vacas (Kato et al., 1998), en ratones (Wakayama et al., 1998), en cerdos (Polejaeva et al., 2000), en cabras (Zou et al., 2001), en gatos (Shin et al., 2002a) y en conejos (Chesne et al., 2002).

La clonación por transferencia nuclear de células somáticas es una técnica que sirve para multiplicar genotipos de animales únicos y preservar animales en peligro de extinción (Wells et al., 1998), esta aplicación ha iniciado su expansión a las áreas de transgénesis (Schnieke et al., 1997), bloqueo de genes (McCreath et al., 2000), o inserción de genes en producción animal (Lai et al., 2002). Aunque el éxito en la producción de animales clonados de células somáticas se ha logrado en varias especies, la eficiencia es sólo del 1 % de los embriones reconstruidos que llegaron a nacer vivos (cuadro 1) (Han et al., 2003).

**Cuadro 1. Baja eficiencia de la transferencia nuclear de células somáticas.**

Especie	Fusionados	Transferidos	Clones vivos/receptoras	Eficiencia (%) <sup>a</sup>	Referencia
Ovejas	277	29	1/13	0.4	Wilmut 1997
Vacas	68932	3435	148/935	0.2	Forsberg 2001
Cabras	138	47	1/15	0.7	Baguisi 1999
Cerdos	188	110	1/4	0.5	Onishi 2000
Ratón	463	274	3/25	0.6	Wakayama 1999
Gatos	ND	87	1/8	1.1	Shin 2002
Conejos	612	371	4/27	0.7	Chesne 2002

a) Eficiencia (%): Clones nacidos vivos/embriones fusionados  $\times 100$  b) ND: no descrito Han et al., 2003

Además, la transferencia nuclear ha resultado con varios problemas en el desarrollo fetal (Kazuchika et al., 2002. Dinnyes et al., 2002) incluyendo un alto índice de abortos durante la gestación temprana y un incremento en la muerte perinatal (Wilmut et al., 1997, Heyman et al., 2002, Hill et al., 1999, Hill et al., 2000a).

Se conoce muy poco acerca de los factores específicos o de los mecanismos que están involucrados con la reprogramación del citoplasto a un núcleo somático (Han et al., 2003). La falta de estudios especializados en reprogramación nuclear continúa siendo reflejada en una baja eficiencia de los procedimientos de clonación en bovinos (Bruggerhoff et al., 2002, Gibbons et al., 2002), cabras (Zou et al., 2001, Keefer et al., 2002), cerdos (Polejaeva et al., 2000), conejos (Chesne et al., 2002), gatos (Shin et al., 2002b). La transferencia nuclear involucra una serie de procedimientos complejos incluyendo el cultivo de células donantes, maduración de ovocitos in vitro, enucleación, reconstitución del núcleo o célula, fusión, activación, cultivo de embriones reconstruidos in vitro y transferencia de embriones.

Bovinos adultos han sido clonados usando células del cúmulus (Kato et al., 1998, Kato et al., 2000, Tani et al., 2001), fibroblastos (Kato et al., 2000, Zakhartchenko et al., 1999a, Hill et al., 2000b, Kishi et al., 2000, Kubota et al., 2000, Kasinathan et al., 2002, Heyman et al., 2002), granulosa (Gibbons et al., 2002, Wells et al., 1999a, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001, Piedrahita et al., 2002), glándula mamaria (Zakhartchenko et al., 1999b, Kishi et al., 2000), de músculo (Shiga et al. 1999), células del oviducto

(Kato et al., 1998, Kato et al., 2000, Goto et al., 1999), uterinas (Kato et al., 2000) y células de Sertoli (Wakayama et al. 1998).

Después de la colección, las células somáticas pueden ser utilizadas inmediatamente (Wakayama et al., 1998) o después de cultivarse por largo plazo (Kubota et al., 2000).

El uso del tipo de células adultas en estado de quiescencia inducida o no, (Wilmut et al., 1997) o sin quiescencia (Edwards et al., 2001, Shiga et al., 1999, Wakayama 1999a, Edwards et al., 2000), es requerido para producir crías clonadas de animales adultos.

Se ha mejorado la habilidad de los embriones clonados para implantarse y mantener la preñez a término (Gibbons et al., 2002, Edwards et al., 2001, Zakhartchenko et al., 1999c).

Para evitar la lisis al remover el ADN (enucleación), los ovocitos pueden cultivarse en presencia de un inhibidor de microfilamentos: cytochalasin B. (Prather y First, 1990) Esto induce la relajación de citoplasma que permite remover mecánicamente del 5% al 15% de citoplasma del ovocito conteniendo el ADN materno. La remoción del ADN materno puede ser verificada por la tinción de Hoescht y el transiluminador de luz ultravioleta.

Para clonación de ganado, los ovocitos generalmente provienen de un grupo no descrito de hembras obtenidas de fuentes comerciales, los rastros (Prather et al., 1987, Hill et al., 2000, Kishi et al., 2000, Kubota et al., 2000, Heyman et al., 2002, Wells et al., 1999b, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001, Piedrahita et al., 2002) o un grupo descrito de animales vivos usando aspiración por ultrasonido (Bruggerhoff et al., 2002).

El próximo paso es insertar un núcleo somático en el citoplasto del ovocito, para restaurar la equivalencia de una célula embrionaria. En especies domésticas, esto se realiza por la fusión de la inducción eléctrica de la célula somática con el citoplasto (Wilmut et al., 1997, Gibbons et al., 2002, Hill et al., 2000, Kishi et al., 2000, Kubota et al., 2000, Heyman et al., 2002, Wells et al., 1999, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001, Piedrahita et al., 2002).

Inicialmente una célula somática se inserta mecánicamente en el espacio perivitelino, después de esto el acoplamiento resultante (el citoplasma del ovocito y la célula somática) es alineado entre dos electrodos y con un pulso de corriente eléctrica (por

ejemplo, de 2.2 kV/cm<sup>2</sup> durante 40  $\mu$ s) inducirán >70 % de acoplamientos fundidos (Edwards et al., 1999).

La electrofusión depende de mantener el contacto de la célula somática con el citoplasma del ovocito de manera tal que las membranas de cada citoplasma se entremezclen después de la formación del poro que se produce posterior a la corriente eléctrica (First y Prather, 1991).

En los ratones, sin embargo, el método preferido para introducir un núcleo somático en el citoplasma del ovocito es la microinyección (Wakayama et al., 1998). A pocos minutos de introducir el núcleo somático en el citoplasma del ovocito, la membrana nuclear se rompe y la cromatina se condensa (Wakayama et al., 1998, Campbell et al. 1996a, Edwards et al., 1999).

En algunos casos, el pulso eléctrico utilizado para la fusión es también suficiente para activar al embrión clonado iniciando su desarrollo (Wilmut et al., 1997). Se han usado varias combinaciones químicas para la activación (Gibbons et al., 2002, Susko-Parrish et al., 1994), a pesar de los métodos de elección, la activación imita las acciones de una esperma después de la fertilización.

Pueden transferirse los embriones clonados en oviductos ligados de hembras nodrizas (Wilmut et al., 1997) o cultivarse en la incubadora durante un período de tiempo requerido para el desarrollo a mórula compacta o blastocisto (Edwards et al., 2001).

Para poder comprender los mecanismos básicos que se llevan a cabo en la clonación por transferencia nuclear de células somáticas se requiere del conocimiento de las bases fisiológicas y genéticas tanto del óvulo, como de las células somáticas.

## **1.1 Ovogénesis**

Los ovarios de mamífero tienen sólo una fuente finita de ovocitos. Se estima que los ovarios de bovino contienen un estimado de 420,000 ovocitos al nacimiento que es reducido a menos de 3,000 a los veinte años de edad (Ericsson, 1966; Gosden, 1995).

En los mamíferos, el ovario es la gónada de la hembra responsable de la diferenciación y liberación de un ovocito maduro para la fertilización y el éxito de la propagación de las especies (Figura 1) Igual de importante, el ovario es un órgano endócrino que produce esteroides para el desarrollo de las características sexuales

secundarias de la hembra y el soporte de la gestación. El ovario bovino tiene una capa ovoide y un tamaño aproximado de 4 X 2 X 1.5 cm. (Dyce et al., 1987). La capa más externa que cubre al ovario consiste de epitelio germinal. Directamente debajo del epitelio germinal se encuentra una capa de tejido conectivo denso conocido como túnica albugínea.

Los folículos ováricos, en unión con los fibroblastos que los envuelven, colágeno y fibras elásticas de la corteza del ovario son localizados sobre la túnica albugínea. La médula del ovario contiene los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y terminales nerviosas. La formación de un ovario funcional depende de tres eventos mayores que toman lugar durante los estadios tempranos de la gonadogénesis: la iniciación de la meiosis, la formación de folículos y la diferenciación de células productoras de esteroides.

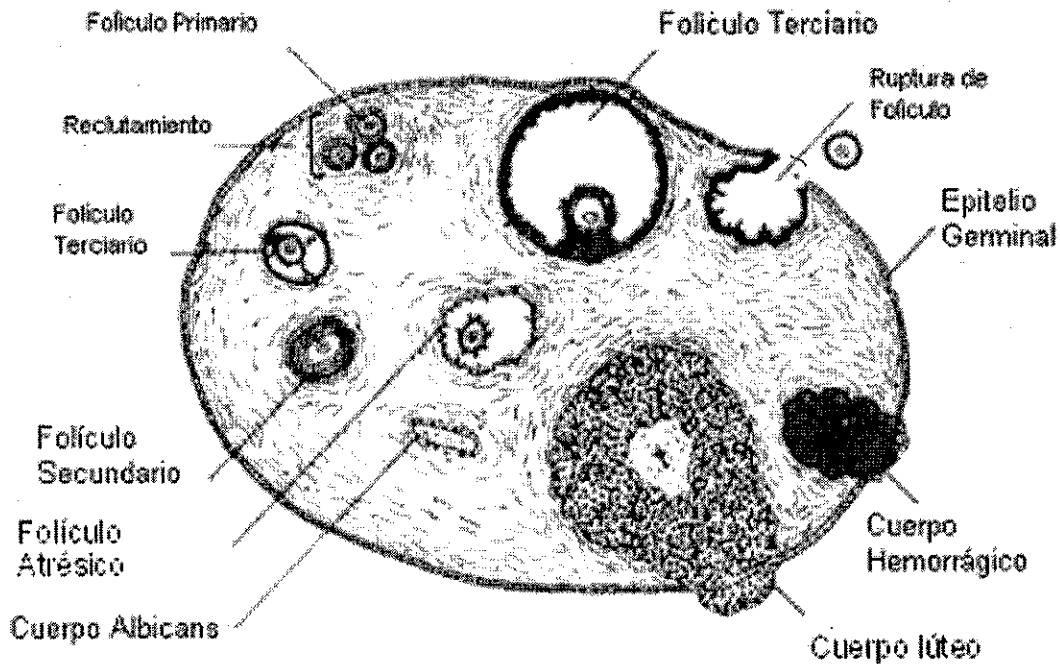


Figura 1. Diagrama del ovario mamífero. (Senger, 1997).

### **1.1.2 Desarrollo folicular**

El folículo del ovario es una unidad altamente compleja que consiste de distintos tipos celulares. Los folículos del ovario están compuestos por varias capas de células somáticas rodeados de una cavidad de fluido "Antro" que baña a los ovocitos y a las células somáticas que lo circundan. El fluido encontrado en el antro es conocido como fluido folicular. El folículo provee de un micro ambiente para el crecimiento del ovocito y este es responsable de la producción de hormonas (Gordon, 1990). El óvulo y estas células somáticas que lo acompañan comprenden una unidad folicular, manteniéndose una cercana asociación a través del desarrollo del estado primordial al preovulatorio.

Las paredes de folículos preovulatorios maduros consisten de células de la granulosa, teca interna y teca externa. Las células de la granulosa son células de tipo epitelial esenciales para el crecimiento y la sobrevivencia del ovocito. Las células de la granulosa no son un tejido homogéneo pero está mejor especializado en subpoblaciones que consisten en células de la corona radiada, células del cúmulus, pared y células de la granulosa. Las células del cúmulus son la subpoblación de células de la granulosa del ovario que circundan al ovocito. Las células del cúmulus en contacto estrecho con el ovocito son conocidas como corona radiada. Ellas están en estrecho contacto con el ovocito a través de extensiones citoplasmáticas que atraviesan a la zona pelúcida (De Loss et al., 1991). La corona radiada comunica al ovocito con otras células del cúmulus a través de uniones gap formando un sincitio electrofisiológico (De Loss et al., 1991). Las células del cúmulus alimentan el ovocito (Buccione et al., 1990) y participan en la formación de la zona pelúcida. Las células del cúmulus han sido implicadas en la modulación o generación de inhibidores de la maduración del ovocito (Eppig y Downs, 1984).

Las células de la granulosa cercanas a la membrana basal son conocidas como células de la pared granulosa, con la cercanía al antro folicular son conocidas como células de la granulosa antral. El antro folicular contiene el fluido folicular que es hecho de un exudado sanguíneo modificado por las secreciones locales y metabólicas (Gordon, 1990). Las subpoblaciones de células de la granulosa difieren en su distribución de receptores y características esteroideogénicas (Roullier et al., 1998). La membrana basal

o lámina propia es una capa acelular presente entre las células de la granulosa y las de la teca. La membrana basal contiene varios tipos de colágeno (colágeno IV alfa 1 y alfa 2, reducida cantidad de alfa 3- alfa 5), fibronectina, laminina y proteoglicanos (Rodgers et al., 1999). La teca interna y la teca externa son estroma o células fibroblásticas que constituyen la capa externa del folículo preovulatorio. Una extensa red capilar irriga las células de la teca. La teca interna es la mayor fuente de andrógenos durante el estado final del desarrollo del folículo de Graff (Moor, 1977). Los folículos pueden ser clasificados como folículos primordiales, folículos preantrales (folículos primarios y secundarios), antrales (terciarios) y folículos preovulatorios (de Graff).

La folículogénesis es el proceso responsable del desarrollo de folículos ovulatorios y la liberación de uno o más ovocitos maduros en un intervalo fijo a través de la vida reproductiva de una hembra. La folículogénesis es reactivada después de una larga fase quiescente que involucra transformaciones secuenciales subcelulares y moleculares por varios componentes del folículo. Durante la vida posnatal, los folículos ováricos continúan su crecimiento, maduración, ovulan o bien sufren regresión.

Los folículos son reclutados continuamente hasta que el almacenamiento queda saturado. La población folicular es dividida más o menos de manera uniforme entre cada uno de los dos ovarios. En especies monotocas, los folículos seleccionados para ovular son los de más rápido crecimiento funcional en el cuerpo de la hembra adulta mamífera. El folículo bovino crece de 300 a 400 veces en diámetro de el primario (50  $\mu\text{m}$ ) a el estado preovulatorio de (15 a 20 mm) (Rajakoski, 1960). El proceso entero del crecimiento folicular del estado primordial (50-60  $\mu\text{m}$ ) al estado preovulatorio (10-15 mm) toma aproximadamente 180 días en la vaca (Iussier et al., 1987). Este periodo extenso permite la construcción de la zona pelúcida y la acumulación de un número de productos conocidos y no conocidos requeridos para la fertilización, y los eventos tempranos del desarrollo embrionario. Cualquiera de los folículos puede ovular un ovocito maduro o sufrir la atresia.

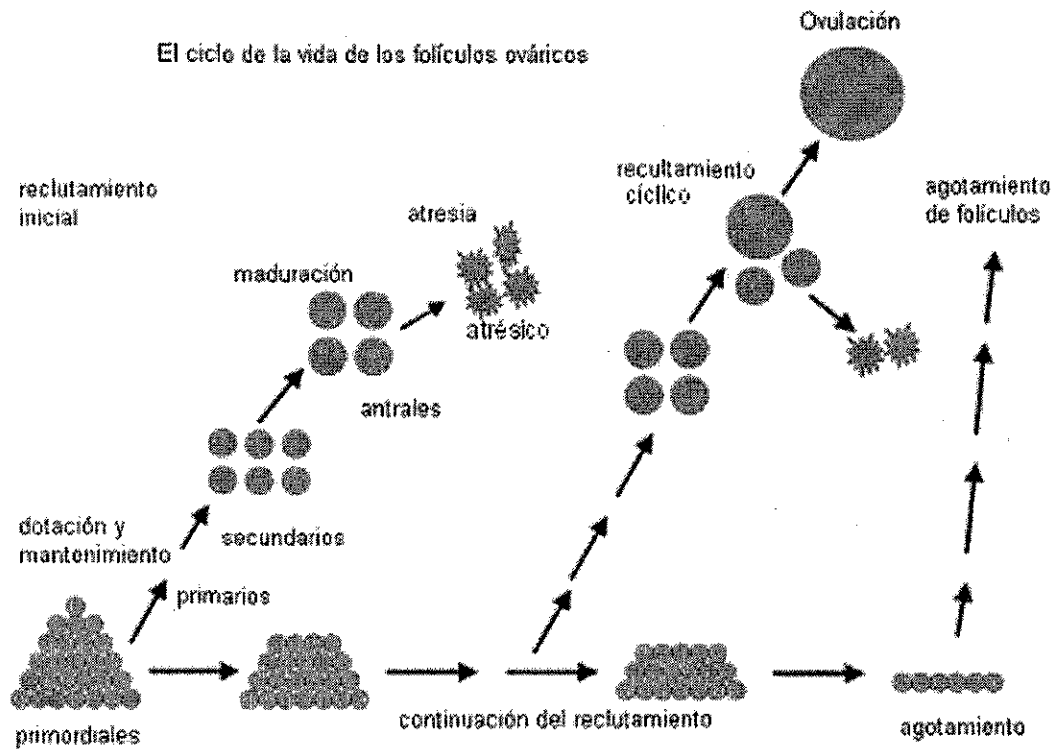
La ovogonia se agranda e inicia la meiosis independientemente de cualquier estímulo endócrino para formar un ovocito primario. El ovocito primario se encuentra arrestado



en el estado de paquiteno o dictiado de la primera profase meiótica (Byskov y Hoyer, 1994). En bovinos la meiosis inicia en el día 82 de la gestación (Rüsse, 1983).

Los folículos primordiales consisten de un ovocito dictiado envuelto por una capa de células de la granulosa aplanadas (Byskov, 1978). El ovocito y las células foliculares están independientes. El ovocito requiere de la presencia de las células de la granulosa para crecer y sobrevivir (Picton, 2001). El resto de las células pre-granulosas se encuentran en una delicada membrana basal opuesta a las células del estroma que tienen su origen en las células de la teca (Gougeon, 1996). El precursor de las células de la teca pudiera estar presente en un grupo de folículos en crecimiento (Hirshfield, 1991b). Esto sugiere que la interacción de las células de la teca y las células de la granulosa tienen importancia en la regulación del crecimiento y diferenciación del folículo a través de todos los estados de la folículogénesis.

Los folículos primordiales son la unidad del desarrollo fundamental del ovario mamífero. La fuente de folículos primordiales no es renovable y sirve en toda la vida reproductiva del adulto. En la figura 2, se presenta el ciclo de la vida de los folículos ováricos. Los folículos primordiales en el bovino son primeramente detectados en el día 90 de gestación (Ericsson, 1966, Szollosi, 1991). En bovinos, los folículos primordiales tienen un diámetro igual o más pequeño de 40  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal y Yossefi, 1997). Cada folículo primordial contiene un ovocito que mide aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  en diámetro (Picton, 2001). Los folículos primordiales son localizados en la periferia de la corteza del ovario. Los folículos en crecimiento se encuentran en la corteza con un antro en desarrollo y son visibles sobre la superficie del ovario. Los mecanismos de activación de los folículos primordiales y ovocitos restantes no son conocidos. Tal como el almacén de los folículos primordiales se establece en el día 140 de gestación en la vaca, los folículos reclutados inician y continúan sin detenerse por el resto de la vida hasta que el ovario es agotado.



**Figura 2.** El ciclo de la vida de los folículos ováricos.

El número de folículos primordiales está determinado durante la vida temprana y más de estos están en estado de reserva. Antes y a través de la vida reproductiva de la hembra un número de estos folículos primordiales abandonan el estado de reposo e inician su crecimiento (reclutamiento inicial). Los folículos desarrollan a un estado antral y varios de ellos pasan por atresia; sin embargo, algunos de estos folículos son rescatados (reclutamiento cíclico) para llegar a el estado preovulatorio. El término de la vida reproductiva, ocurre cuando el grupo de folículos primordiales en reposo está agotado (McGree y Hsueh, 2000)

Los folículos primordiales bovinos son activados para formar folículos primarios sobre el día 140 de gestación (Rüsse, 1983). Un folículo primario contiene un ovocito con un diámetro de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  que es envuelto por células de la granulosa cuboidales (Hyttel et al., 1997). El ovocito bovino inicia su crecimiento cuando hay aproximadamente 40 células de la granulosa presente. (Braw-Tal y Yossefi, 1997). Por

esto los ovocitos de folículos primordiales y primarios no son significativamente diferentes en tamaño. Sin embargo cambios importantes toman lugar durante el estado de folículo primario. La corona radiada desarrolla uniones gap entre el ovocito y la zona pelúcida (Picton, 2001). La zona pelúcida no completa circundar al ovocito hasta que el folículo alcanza el estado pre-antral tardío (Braw-Tal y Yossefi, 1997).

Los folículos secundarios aparecen en el día 210 de gestación en el bovino cuando las células foliculares del folículo primario sobrellevan una intensa división mitótica. Un folículo secundario contiene al menos dos capas de células de la granulosa y el ovocito mide de 50 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro (Hyttel et al., 1997). Sobre todo las células de la teca son identificables fuera de la membrana basal y el folículo contiene una fina red capilar.

Los folículos antrales o terciarios son caracterizados por la presencia de una cavidad conocida como antro. El antro es una cavidad llena de fluido folicular. El antro primero es detectado en folículos bovinos que miden entre 0.12 y 0.28 mm de diámetro (Lussier et al., 1987). El primer folículo antral aparece alrededor del día 230 de gestación en el bovino (Rüsse, 1983). Los folículos terciarios contienen una extensa red de uniones gap que permiten la transferencia de nutrientes y regulan las señales entre el óvulo y las células de la granulosa (Espey, 1994). Las células de la teca parecen ser originadas del mesénquima del estroma (Harrison y Weir, 1977). Las células de la granulosa adquieren primero los receptores para LH cuando el folículo mide entre 8-9 mm de diámetro. El espacio perivitelino es formado entre el ovocito y la zona pelúcida justo antes de la ovulación. El aporte sanguíneo a las capas de la teca cambia dramáticamente durante los estadios finales de la maduración folicular y se desarrollan en un plexo interno en la teca interna y un plexo externo derivado del estroma capilar (Yamada et al., 1995).

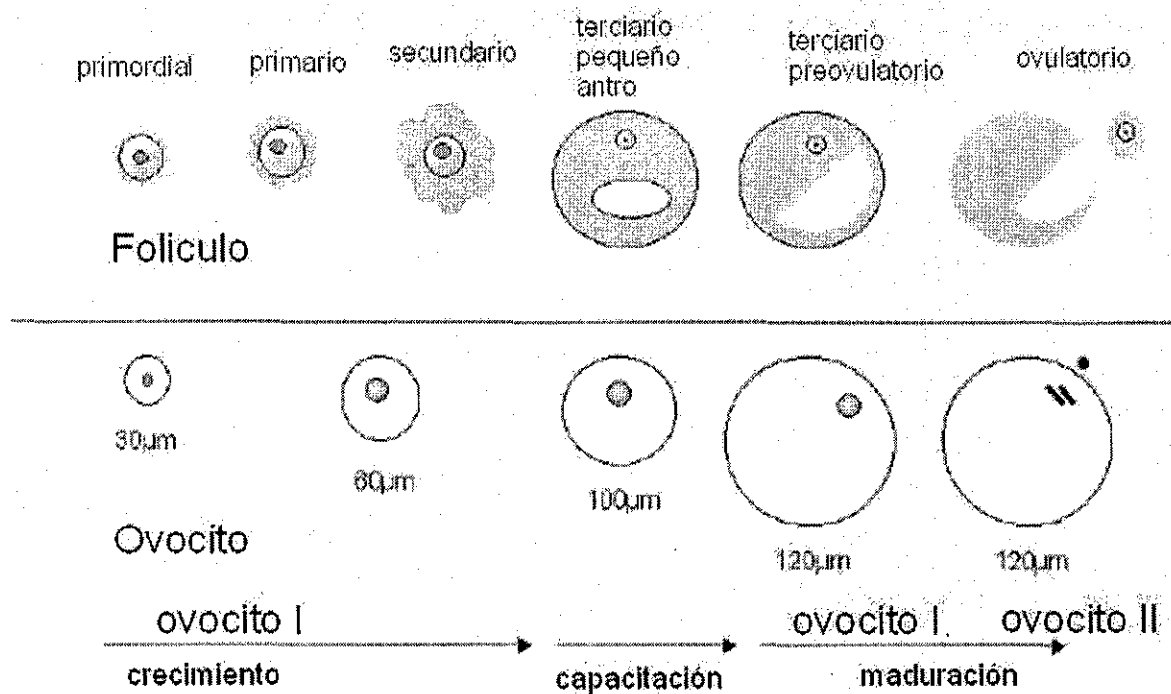
La intensidad de la síntesis del RNA en el ovocito se correlaciona con el estado de su crecimiento y los cambios que corresponden en la morfología del nucleolo. La actividad de síntesis del RNA decrece gradualmente cuando los ovocitos alcanzan su tamaño total. Los ovocitos bovinos de folículos entre 0.5 y 3 mm. Activan la síntesis del RNA. La síntesis del RNA decrece después que el tamaño del folículo ha llegado a 3 mm, sin

embargo los bajos niveles de transcripción continúan hasta que el ovocito ha alcanzado un diámetro de 110  $\mu\text{m}$ . (Crozet, 1989). La transcripción nucleolar continua, tiene importancia en la adquisición de la competencia del desarrollo de ovocitos. Los ovocitos con un diámetro mayor a 110  $\mu\text{m}$ . tienen una actividad electrodensa fibrilar nucleolar y una actividad transcripcional pobre (Hyttel et al., 1997).

La vesícula germinal o el núcleo del ovocito bovino contiene uno o dos nucleolos. Los nucleolos son el sitio de síntesis del RNAr. Los folículos primordiales contienen nucleolos transcripcionales inactivos que son caracterizados exclusivamente por la presencia de componentes granulares interespaciados con múltiples vacuolas. La actividad transcripcional del nucleolo tiene un apariencia fibrogranular (Hyttel et al., 1997).

Cuando un ovocito inicia su crecimiento en el folículo primordial, las espirales no condensadas de cromatina en el estado dictiado aseguran los elementos requeridos de la transcripción. Los productos del RNAm son trasladados inmediatamente o almacenados sobre condiciones especiales. El ovocito tiene la habilidad para acumular el RNAm en una forma estable, después del inicio de la maduración, las interrupciones de la transcripción ocurren en pocas horas. Se cree que el ovocito se origina de folículos competentes o diferenciados conteniendo un correcto RNAm en suficiente cantidad. Este RNAm acumulado en el ovocito es importante durante el progreso del embrión a través de la transcripción materna al cigoto.

Los folículos antrales bovinos requieren de aproximadamente 42 días para llegar al tamaño preovulatorio. Así el desarrollo de los folículos a través de los estados antrales requiere un periodo equivalente a dos ciclos estrales (Lussier et al., 1987).



**Figura 3.** Representación esquemática del crecimiento, capacitación y maduración del ovocito bovino a través del desarrollo folicular.

El crecimiento del ovocito empieza en el inicio del crecimiento folicular y este es completado por el tiempo que se forma el antro.

El ovocito pasa por modificaciones que le confieren al ovocito su competencia de desarrollo. La maduración del ovocito, que toma lugar después del pico de LH o siguiendo su remoción del ovocito del ambiente folicular, permite al ovocito continuar el estado de metafase II y expresar esta competencia de desarrollo siguiendo la fertilización. En la figura 3 se representa esquemáticamente el crecimiento, capacitación y maduración del ovocito bovino a través del desarrollo folicular. La sincronización de los cambios externos e internos del folículo permiten coordinar tanto la actividad esteroidogénica por las células de la granulosa y de la teca como el crecimiento del ovocito hasta su ovulación.

### 1.1.3 Potencial de desarrollo

La capacidad del desarrollo es la habilidad del ovocitos para producir, crías normales, viables y fértiles después de la fertilización. Los pasos finales de la maduración del ovocito son cruciales para la adquisición de propiedades funcionales necesarias para un futuro desarrollo (Hyttel et al., 1997). La capacidad de desarrollo del ovocito es adquirido dentro del ovario durante los estadios que preceden a la ovulación o en caso de la maduración *in vitro*, precede del aislamiento del ovocito de su folículo.

La adquisición de la capacidad de desarrollo es un proceso gradual durante el desarrollo folicular. El incremento gradual se refiere al porcentaje de ovocitos competentes y no a una alta competencia de un ovocito sencillo (Gandolfi, 1998). La capacidad de desarrollo embrionario es un parámetro difícil de evaluar ya que sus fallas pueden ser debido a razones independientes de la calidad del ovocito. La capacidad de desarrollo es usualmente expresada como los porcentajes de los ovocitos que pueden desarrollarse a estados de blastocisto (Gandolfi, 1998). Sin embargo, los estados de desarrollo del blastocisto no garantizan que el embrión desarrolle a término. Otros aspectos usados para evaluar la capacidad del desarrollo incluyen, evaluaciones morfológicas tales como el número de blastómeros o la proporción de la célula de la masa interna y el número de células del trofoectodermo. Evaluaciones funcionales tales como el grado metabólico y la habilidad para continuar el desarrollo después del congelamiento deben ser también considerados para proveer una idea más completa del potencial del desarrollo del ovocito (Blondin et al., 1995a)

Múltiples estudios se han llevado a cabo para evaluar los factores que afectan la capacidad del desarrollo del ovocito. El tamaño y la calidad del folículo de origen influyen la capacidad del desarrollo del ovocito bovino (Blondin et al., 1995b). Estudios que siguieron el destino individual de ovocitos de acuerdo al folículo de origen tienen corroborado la capacidad del desarrollo de los ovocitos incrementándose con el tamaño folicular (Blondin et al., 1995b). Los ovocitos de bovino con folículos mayores a 6 mm de diámetro producen blastocistos *in vitro* a rangos substancialmente mayores de 2 a 6 mm y la producción de ovocitos de folículos menores a 2 mm son capaces de ser fertilizados, pero carecen de la habilidad de dividirse a un estado no mayor de 8

células. El folículo debe llegar por lo menos a un diámetro de 2 a 3 mm antes que el ovocito alcance una capacidad de desarrollo satisfactoria.

Algunos ovocitos han adquirido una capacidad intrínseca para desarrollar hacia un embrión después de la maduración in vitro (MIV) fertilización in vitro (FIV) y el cultivo de embriones in vitro (CEIV) en los estadios foliculares de 3 mm, pero la proporción de ovocitos competentes no se incrementa durante el desarrollo o hasta 7 mm (Hendriksen et al., 2000). En vivo esta pre-maduración ocurre durante el crecimiento preovulatorio anterior a la oleada de LH. Otros factores además del tamaño folicular pueden ser críticos para que adquiera la capacidad de desarrollo. Algunos folículos grandes contienen ovocitos incompetentes en su desarrollo como, algunos folículos medianos contienen folículos competentes. (Blondin y Sirard, 1995). La atresia folicular promueve la adquisición de la capacidad de desarrollo. Sin embargo la salud de los folículos al término de la atresia no puede ser usada para predecir la capacidad del desarrollo del ovocito. Los ovocitos obtenidos de folículos ligeramente atrésicos, intermedios o sin atresia poseen una capacidad del desarrollo similar. (Blondin y Sirard, 1995: Blondin, 1996a).

La morfología del ovario es otro parámetro usado para estimar la capacidad de desarrollo de los ovocitos. El número y el tamaño de los folículos presentes en el ovario en el momento de la aspiración, son usados para seleccionar ovocitos con una alta capacidad de desarrollo. Ovocitos recuperados de ovarios que tienen al menos un folículo mayor a 10 mm de diámetro o con más de 10 folículos de 2 a 5 mm tienen un alto potencial de desarrollo.

En contraste, los ovocitos recuperados de ovarios con poco menos que 10 folículos de 2 a 5 mm o folículos no mayores que 10 mm llegan al estado de blastocisto en un bajo rango y los blastocistos tuvieron un bajo número de células (Gandolfi, 1997).

La composición del fluido folicular tiene importancia en la capacidad del desarrollo. La capacidad de desarrollo del ovocito puede perderse durante la MIV. La incubación prolongada durante la maduración del ovocito lleva a una disminución de la capacidad del desarrollo que sería el resultado del envejecimiento de los ovocitos. En el tiempo en el que los ovocitos son aspirados de ovarios *post mortem* afecta el periodo del

desarrollo. El tiempo transcurrido entre el rastro y la aspiración del ovocito no debe ser mayor a cuatro horas, ya que esto ha reportado un mayor rango de desarrollo después de 5 días de CEIV (Blondin et al., 1995). Las células del cúmulus algunas veces se pierden durante la aspiración del ovocito, el número y la calidad de las células del cúmulus que circundan al ovocito, son importantes en la capacidad del desarrollo. La capacidad del desarrollo de los ovocitos bovinos con células de la corona radiada (ovocitos con corona compactada) no es comparable con el CCO.

#### **1.1.4 Apoptosis**

La apoptosis juega un papel importante en la pérdida a gran escala de ovogonias y ovocitos a través de la vida embrionaria y neonatal (Tilly, 1996; Tilly et al., 1991). La apoptosis es el resultado de la activación de genes que codifican proteínas efectoras necesarias para encender la programación de muerte celular programada. La apoptosis probablemente es el mecanismo primario por el cual es mediada la muerte celular durante la degeneración folicular (Hirshfield, 1991a; Tilly, 1996). Una vez que el grupo de folículos primordiales se ha establecido, la mayoría de esta población folicular experimenta la atresia en vez de la ovulación (Hirshfield, 1991a). De hecho el 85% de los folículos del ovario en algún momento del ciclo estral son atrésicos (Kruip y Dieleman, 1982). Los folículos presentes en ondas no ovulatorias entran en estado atrésico. En ganado, la proporción de folículos atrésicos aumenta con el tamaño del folículo (Rajakoski, 1960). Una proporción alta de ovocitos de bovino con un cúmulus degenerado son recuperados de folículos arriba de los 3 mm de diámetro que de folículos de 1 a 3 mm. Los primeros signos de atresia son manifestados por la degeneración de las células de la granulosa que pierden la actividad aromatasa y experimentan apoptosis (Gordon y Lu, 1990). Después, las células de la teca sufren una hipertrofia y su producción de androsterona disminuye (Driancourt, 1991; Greenwalt y Terranova, 1988). El ovocito es afectado durante los últimos estadios de la atresia folicular (Kruip y Dieleman, 1982).

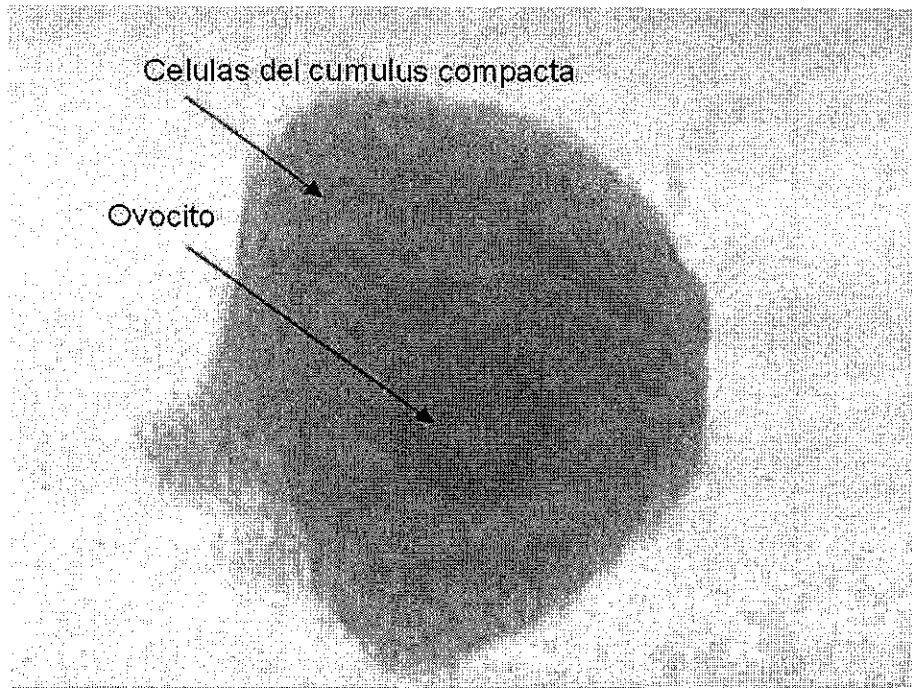


En condiciones normales, los ovocitos adquieren su capacidad de desarrollo más adelante en la fase folicular del ciclo estral (Blondin et al., 1995). El inicio tardío de la atresia puede permitir la conservación de la capacidad de desarrollo del ovocito por un periodo corto de tiempo incluso si la atresia folicular ha arrancado (Hazeleger et al., 1995). También es posible que los efectos positivos de la atresia en el potencial de desarrollo *in vitro* puedan ser resultado de un crecimiento prolongado durante el cual el ovocito se prepara para la maduración, fertilización y desarrollo. Por otra parte, la capacidad de desarrollo del ovocito *in vitro* puede ser menor si el grado de atresia folicular está muy avanzado (Blondin y Sirard, 1995).

Los CCO con signos de atresia experimentan una reorganización de orgánulos y cambios nucleares que demuestran algunas similitudes con los procesos asociados con una maduración final en los ovocitos dominantes. Este fenómeno ha sido descrito como "pseudo-maduración" (Assey et al., 1994). La Pseudo-maduración puede ocurrir debido a la atresia folicular imitada por cambios ocurridos post-LH. La rápida disminución de estradiol, el aumento de andrógenos, progesterona y PGE<sub>2</sub>, la presencia de condiciones inflamatorias (Ireland y Roche, 1982; Ireland y Roche, 1983; Assey et al., 1994) quizá induce una serie de cambios en el ovocito que son extremadamente importantes en la adquisición de la capacidad de desarrollo (Blondin et al., 1996a).

### **1.1.5 Maduración del ovocito**

La maduración del ovocito es un fenómeno complejo durante el cual los ovocitos progresan del estado de diploteno al de metafase II (maduración nuclear) (figura 6). La transición del estado de diploteno a metafase II es llamado diacinesis. El ovocito reanuda la meiosis en respuesta a la oleada de LH ovulatoria (Channing et al., 1978; Dieleman et al., 1983; Ireland y Roche, 1982; Masui).



**Figura 4.** El complejo cúmulus ovocito bovino (CCO) con capas compactas de células del cúmulus en el inicio de la maduración *in vitro*.

Durante la diacinesis la membrana nuclear comienza a plegarse, los poros nucleares desaparecen y entonces la membrana nuclear se fragmenta después desaparece rápidamente para permitir sólo sacos pequeños con doble pared (Kubelka et al., 1988; Szollosi et al., 1972). Estos eventos son conocidos como vesícula germinal fragmentada (GVBD), es el primer signo visible de la reactivación de la meiosis. Los nucleolos desaparecen rápidamente después de aproximarse un contacto con el citoplasma. En el ovocito bovino ocurre el GVBD dentro de horas después de remover el folículo o de la señal de LH ovulatoria. En el bovino por 6.6 horas de cultivo, el 50% de los ovocitos presentaron el GVBD (De Loos et al., 1994; Sirard et al., 1989), entonces los cromosomas se condensan más. Los cinetocoros aparecen y los microtúbulos arrastran los cromosomas y ellos forman el plato metafásico de la MI. La separación de los cromosomas homólogos y la migración de los cromosomas para sus respectivos polos toman lugar durante la anafase I. durante la telofase I, los cromosomas se encuentran en cada polo estando envueltos por la membrana nuclear. La segunda división meiótica sin la replicación de los cromosomas toma lugar

inmediatamente y los ovocitos alcanzan la metafase II. Los ovocitos se encuentran arrestados en el estado de metafase II hasta que toma lugar la fertilización y el ovocito completa la meiosis y forma los pronúcleos. La maduración del ovocito también involucra transformaciones a nivel del citoplasma que prepara la célula para sostener la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplásmica). La terminación de la maduración nuclear sola no garantiza el subsiguiente desarrollo embrionario (Sirard et al., 1989; Yang et al., 1998).

### 1.1.6 Meiósis

Meiósisis del griego *meiōsis*, que significa reducción, consiste en dos sucesivas divisiones celulares seguidas de una ronda de replicación del DNA. La meiósisis da como resultado cuatro células haploides a partir de una célula diploide. Este tipo de división celular es característico de las células germinales. En el ovario fetal la meiósisis avanza hasta el estado diploteno. Durante la primera división meióitica, los genes maternos y paternos son intercambiados, antes los pares de cromosomas son divididos en dos células hijas, cada uno contiene 1n cromosoma y 2 copias de DNA. La segunda división meióitica ocurre sin estar precedida por la síntesis de DNA y la formación nuclear. Las células germinales haploides están formadas con un grupo 1n de cromosomas y una copia de DNA. Las dos divisiones meióiticas del ovocito son asimétricas, resultando en la expulsión de los cuerpos polares. La meiósisis en cada célula germinal femenina resulta en un solo óvulo y dos cuerpos polares.

La Maduración del ovocito *in vivo* vs *in vitro*. Los ovocitos de mamífero pasan por la maduración espontánea después de ser removidos del folículo (Edwards, 1965). Los ovarios obtenidos de rastros son una fuente económica de un gran número de ovocitos que permiten la producción a gran escala de embriones *in vitro* y la evaluación de nuevas tecnologías. La maduración de ovocitos *in vivo* o *in vitro* presenta similar tasa de maduración nuclear, fertilización y división, pero claramente difieren en su potencial de desarrollo (Blondin et al., 1996a; Sirard y Blondin, 1996). Diferencias en el desarrollo entre los ovocitos cultivados *in vitro* e *in vivo* son expresadas en los días 4 y 5 post-fertilización en el estado de mórula a blastocisto (Blondin et al., 1996a; Hyttel et al., 1997). La maduración de ovocitos *in vivo* alcanza mayores porcentajes de blastocistos

cuando son comparados con los ovocitos madurados *in vitro* (IVM) (Greve et al., 1987; Leibfried-Rutledge et al., 1987). El hecho que aproximadamente el 85% de ovocitos ovulados en vacas inseminadas desarrollan un embrión capaz de establecer la preñes es indicativo de una alta competencia en el desarrollo de un ovocito capacitado que ha madurado y ovulado *in vivo*. Por el contrario sólo un tercio de ovocitos madurados *in vitro* desarrollan a estados de mórula o blastocisto a pesar de si ellos son fertilizados *in vivo* (Gordon y Lu, 1990) o *in vitro* (Brackett y Zuelke, 1993; Dominko y First, 1997; Gordon, 1994).

Los factores importantes, bajo la forma de proteínas o bajo la forma de RNAm estables, se almacenan durante crecimiento del ovocito y la maduración folicular final después de que el crecimiento se haya completado (Blondin y Sirard, 1995). Los ovocitos madurados *in vitro* esquivan la capacitación del ovocito (Hyttel et al., 1997) y otros cambios substanciales ocurren *in vivo* bajo influencia de la LH y del ambiente folicular (Motlik y Fulka, 1981). El término "capacitación del ovocito" describe las modificaciones ultraestructurales que ocurren en el ovocito de folículos dominantes antes del pico de la LH. Estas modificaciones permiten que el ovocito logre la capacidad completa de desarrollo (Hyttel et al., 1997). La formación del pronúcleo masculino se reduce perceptiblemente en los ovocitos madurados *in vitro* (69%) cuando son comparados con los ovocitos madurados *in vivo* (el 88%) (Leibfried-Rutledge et al., 1987). Sin embargo, la sobre estimulación de vacas con 6 dosis de FSH y una dosis de la LH después de que un período de 48 hrs se producen de 80% blastocistos. El potencial de desarrollo del CCO se afecta grandemente por el período entre la estimulación hormonal y la colección del ovario (Blondin y Sirard, 1997) y el intervalo entre la colección de ovarios y la aspiración del ovocito (Blondin et al., 1995) de los ovarios. El ovocito ovulado durante el ciclo estrual normal de la vaca se origina del folículo dominante. El folículo dominante crece a partir 2 a 15 milímetros en aproximadamente 5 días (Driancourt, 1991). Varios ovocitos colectados para la maduración *in vitro* se originan de folículos subordinados o de los folículos crecientes que están por lo menos 4 a 10 días alejados de cualquier ovulación posible. Aun cuando la mayor parte de estos ovocitos terminan su maduración nuclear, pocos llegan a la etapa del blastocisto (Van de Leemput et al., 1999). Incluso los procedimientos de selección rigurosos no

permiten siempre a los ovocitos su capacidad de convertirse en blastocisto después de procedimientos de maduración *in vitro* y fertilización (IVM/IVF). Se presume que estos ovocitos no pueden experimentar fertilización normal y desarrollo, son un resultado de una maduración citoplásmica incompleta. La maduración de ovocitos *in vitro* es independiente del ciclo estrual (Arlotto et al., 1996; Fukui y Sakuma, 1980).

Diversos patrones de la síntesis de la proteína se han reportado por ovocitos madurados *in vivo* contra aquellos madurados *in vitro* (Kastrop et al., 1991a). Diferencias se pueden también encontrar en los niveles ultraestructurales tales como la localización de los gránulos corticales (Szollosi, 1991). Finalmente, la expansión de las células del cúmulo es más extensa *in vivo* que *in vitro* (Hendriksen et al., 2000).

### **1.1.7 Maduración nuclear**

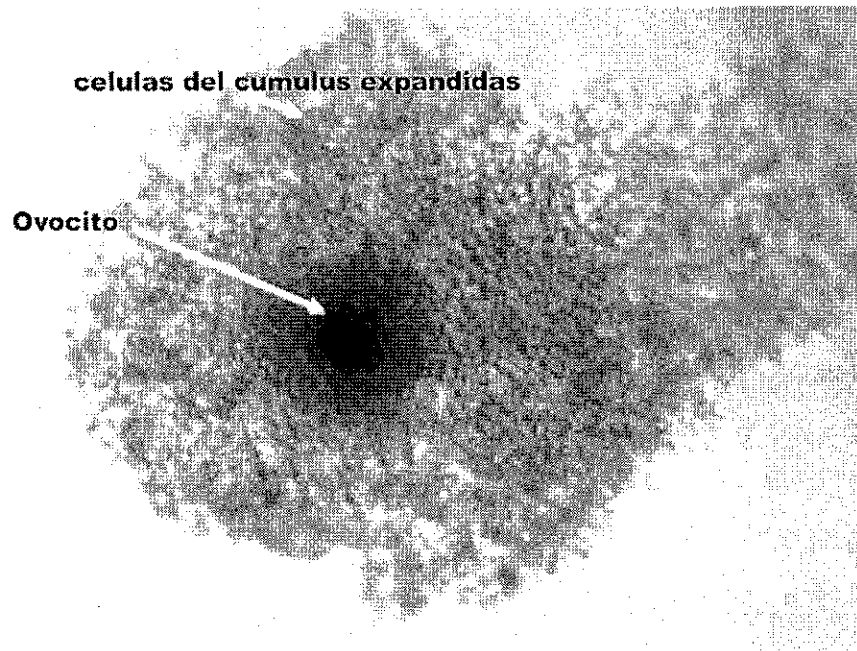
La maduración nuclear se refiere al progreso del núcleo del ovocito desde la vesícula germinal hasta la metafase II. La maduración nuclear involucra la GVBD, el condensamiento de los cromosomas, la formación del huso metafásico, la separación de cromosomas homólogos con la expulsión del primer cuerpo polar y el arresto en la metafase II (Kubelka et al., 1988). La membrana nuclear comienza a plegarse, los poros nucleares desaparecen entonces la membrana nuclear experimenta una fragmentación y rápidamente desaparece (Szollosi, 1991). Es necesario un periodo de 24 hrs para que un ovocito bovino complete la maduración nuclear. Aparentemente la maduración nuclear sigue el mismo patrón *in vivo* que *in Vitro* (Hyttel et al., 1986b). La maduración nuclear implica cambios en la síntesis y patrones de las proteínas (Hunter y Moor, 1977). Los ovocitos bovinos muestran cambios marcados en los patrones de síntesis de proteínas después de la GVBD *in Vitro* e *in Vivo*, mientras que los ovocitos que permanecen en el estado de vesícula germinal tienen patrones de síntesis de proteínas consistentes (Kastrop et al., 1990a; Kastrop et al., 1990b).

La habilidad del ovocito para completar la meiosis es conocida como potencial meiótico. El potencial meiótico se adquiere gradualmente durante el crecimiento folicular. Los ovocitos primero adquieren la capacidad de entrar a GVBD y la condensación de los cromosomas, más adelante en el desarrollo folicular se requiere adquirir la habilidad de

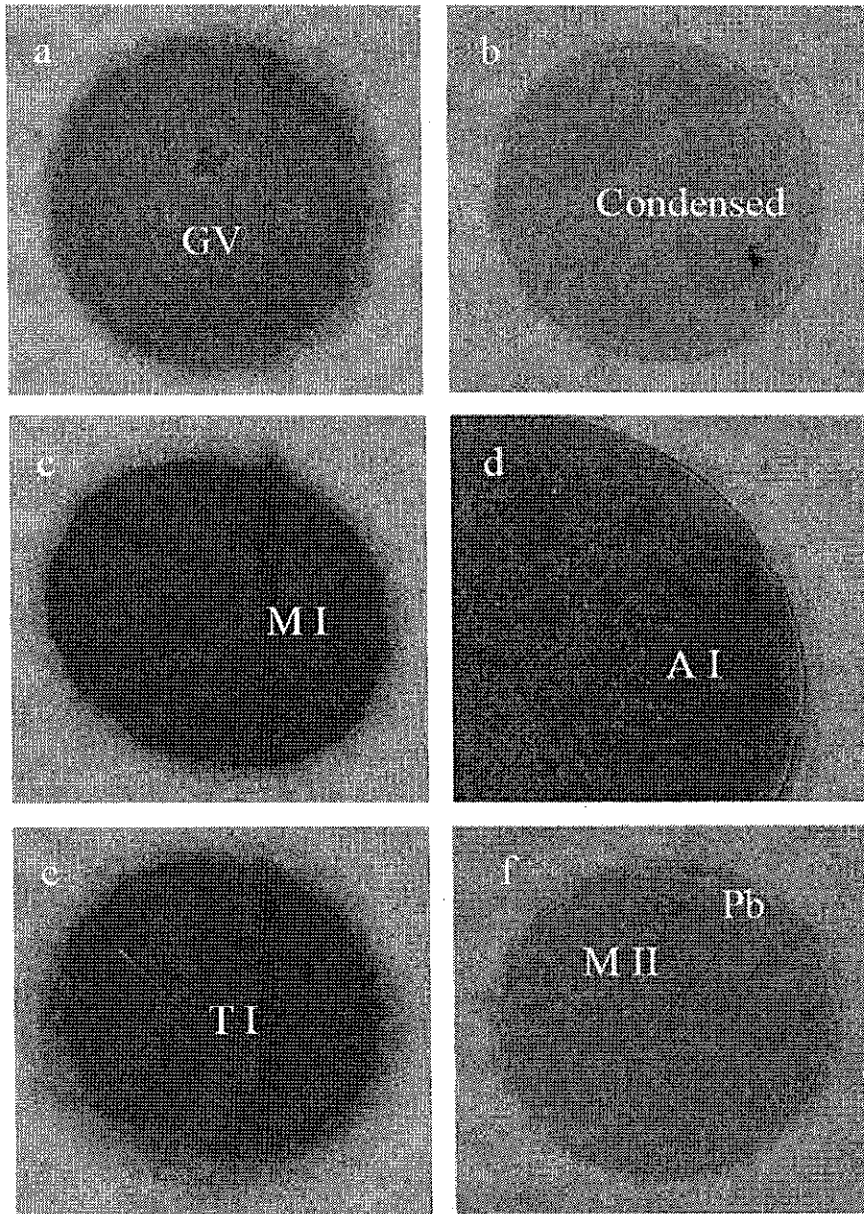
progresar hasta la metafase I y finalmente estos adquieren la habilidad de alcanzar la metafase II. La habilidad de completar la transición de MI hasta la MII coincide con que se logra el tamaño total y con el proceso de la compactación nucleolar (Motlik et al., 1984).

Los ovocitos en crecimiento pueden ser categorizados como competentes o incompetentes para reanudar la meiosis (Arlotto et al., 1996). Los ovocitos bovinos incompetentes se quedan en el estado de vesícula germinal porque no poseen suficiente ciclina B para avanzar más allá de la profase I (Chesnel y Eppig, 1995). El potencial meiótico está asociado con un aumento en la concentración de p34, esta se acumula al final del crecimiento del ovocito (Chesnel y Eppig, 1995), y también en desfosforilaciones específicas o un p34 fosforilado inactivo en residuos de treonina y tirosina por la fosfatasa cdc25 (Dunphy y Kumagai, 1991). La adquisición de un completo potencial meiótico coincide con la reducción de la actividad transcripcional nucleolar en ovocitos bovinos (Hyttel et al., 1997; Motlik et al., 1984). El potencial meiótico está relacionado estrechamente con el tamaño del ovocito, y este a su vez está relacionado con el tamaño del folículo (Armstrong, 2001). El tamaño del folículo antral en el que el ovocito adquiere su potencial meiótico específico de especie. Los ovocitos bovinos adquieren la habilidad de completar la GVBD y la meiosis cuando el folículo antral alcanza de 2 a 3 mm de diámetro (Fair et al., 1995; Lonergan et al., 1994b; Motlik y Fulka, 1986). El potencial meiótico está relacionado al diámetro del ovocito, los ovocitos de bovino deben tener un diámetro 110  $\mu\text{m}$  para completar la maduración nuclear hasta la metafase II (Fair et al., 1995; Otoi et al., 1997). Los ovocitos bovinos con un diámetro dentro de la zona pelúcida menor a 95  $\mu\text{m}$  son incapaces de reanudar la meiosis *in vitro*. Una gran proporción de los ovocitos bovinos son capaces de reanudar la meiosis en la MI una vez que el diámetro del ovocito es al menos de 100  $\mu\text{m}$  (Fair et al., 1995; Otoi et al., 1997). Como sea, el ovocito debe medir 110  $\mu\text{m}$  o más para poder alcanzar la MII (Fair et al., 1995). La habilidad de desarrollar hasta el estadio de blastocisto *in vitro* aumenta con el crecimiento del ovocito (Arlotto et al., 1996; Fair et al., 1995; Harada et al., 1997). Los porcentajes de segmentación y de blastocistos aumentan paralelamente con el potencial meiótico y son significativamente altos los porcentajes obtenidos cuando el diámetro de los ovocitos fertilizados es mayor

a 120  $\mu\text{m}$  (Hazeleger et al., 1995). El potencial de desarrollo es aparentemente similar en ovocitos originados de folículos no atrésicos o levemente atrésicos (Blondin et al., 1996a; Blondin y Sirard, 1995; Fair et al., 1995). Una vez que el ovocito se vuelve meióticamente competente, los factores inhibidores son necesarios para mantener al ovocito en arresto meiótico.



**Figura 5.** El complejo cúmulus ovocito (COC) con capas expandidas de células del cúmulus después de 24h de maduración.



**Figura 6.** Los estados de maduración nuclear de ovocitos de bovino (Sirard et al, 1989).

El tiempo promedio que los ovocitos pasan en cada estadio está indicado en el cuadro 2 siguiente:



**Cuadro 2.** El tiempo promedio por estadio del ovocito en maduración.

Foto	Estado nuclear	Tiempo (h)
a	Vesícula Germinal (GV)	0-6.36
a	Vesícula Germinal fracturada (GVBD)	6.36-8.0
b	Condensado	8.0-10.18
c	Metafase I (M I)	10.18-15.24
d	Anafase I (A I)	15.24-16.36
e	Telofase I (T I)	16.36-18.0
f	Metafase II (MII) y cuerpo polar (Pb)	18.0-24.0

El tiempo 0 representa el inicio de la maduración in vitro. (Adaptado de Sirard et al, 1989).

### **1.1.8 Maduración citoplasmática**

La maduración citoplasmática describe los cambios ultraestructurales que toman lugar en el ovocito desde vesícula germinal hasta la etapa de MII y la adquisición del potencial de desarrollo del ovocito (Calarco, 1995; Duranthon y Renard, 2001; Hyttel et al., 1986a; Hyttel et al., 1986b). La maduración citoplasmática es indirectamente y retroactivamente evaluada como la habilidad de un ovocito maduro de experimentar la fertilización, segmentación y el desarrollo a blastocisto. Otros parámetros morfológicos indirectos tomados en cuenta para evaluar la maduración citoplasmática incluyen la expansión del cúmulus, la expulsión del cuerpo polar y un aumento en el espacio perivitelino (Kruip et al., 1982). En la figura 4 se muestra un ovocito inmaduro que presenta una apretada capa compacta de células del cumulus, la calidad de estas células permitiera en gran medida la maduración citoplasmática del ovocito.

### **1.1.9 Cambios morfológicos y ultraestructurales del ovocito**

Los cambios ultraestructurales que toman lugar durante la maduración del ovocito son importantes para alcanzar la maduración citoplasmática y asegurar el futuro desarrollo. La vesícula germinal esta localizada excéntricamente en los ovocitos bovinos con un diámetro menor 110  $\mu\text{m}$ , mientras que la vesícula germinal de óvulos con un diámetro mayor o igual a 110  $\mu\text{m}$  esta localizada cercana a la zona pelúcida (Fair, 1995). El núcleo de los ovocitos bovinos arrestados en estado de vesícula germinal contiene uno o dos nucleolo. El nucleolo encontrado en el ovocito de folículos primordiales es inactivo, mientras que el nucleolo encontrado en ovocitos preantrales con un diámetro de 0.5 a 1.6mm muestran una activa síntesis del RNA. (Crozet et al., 1989). El nucleolo de ovocitos con un diámetro de 3 a 4 mm se condensa y disminuye la transcripción. La inactivación del nucleolo ocurre durante el crecimiento de los ovocitos bovinos cerca de 110 a 120  $\mu\text{m}$ . (Fair et al., 1996).

La localización y la morfología de la mitocondria cambia a través del desarrollo del ovocito, la mitocondria esta centralmente localizada en el ovocito con un diámetro más pequeño de 100  $\mu\text{m}$ , la mitocondria se desplaza a la periferia de ovocitos grandes mayores a 110  $\mu\text{m}$ , el movimiento de la mitocondria es dependiente de los microtúbulos, la morfología de la mitocondria es diferente de acuerdo al diámetro del ovocito. La mitocondria es redonda cuando el ovocito tiene un diámetro menor a 110  $\mu\text{m}$ ; oval cuando el diámetro del ovocito se encuentra entre 100 y 110  $\mu\text{m}$ . y elíptica (típica) cuando el diámetro del ovocito es de 110  $\mu\text{m}$ . (Fair 1995). El aparato de Golgi es responsable de producir gránulos corticales y la zona pelúcida. El número de aparato de Golgi en el ovocito se incrementa con el diámetro del folículo creciente. (Fair 1995). Los cambios en la localización de los gránulos corticales constituyen el más obvio signo ultra-estructural de maduración citoplásmica. Los gránulos corticales que se originan del aparato de Golgi son localizados originalmente en el centro del ovocito. Sin embargo, como el ovocito progresa al estadio de metafase I, los gránulos corticales se mueven hacia la periferia del ovocito y se adhieren a la membrana plasmática, el patrón y localización de gránulos corticales parecen ser cruciales para una fertilización normal (Hyttel et al.,1986) la liberación del contenido de los gránulos corticales cambian las

propiedades físicas y químicas de la zona pelúcida, incrementa el tamaño del espacio perivitelino y previenen la poliespermia (Hyttel et al., 1986; Kruij et al., 1986).

Las células del cúmulo alimentan al ovocito y proveen productos claves para la adquisición de la capacidad de desarrollo (figura 5). El nivel de glutatión es bajo en el ovocito inmaduro, y se incrementa durante la maduración para llegar a un máximo nivel en la metafase II y entonces liberarse durante el estado temprano del desarrollo, el glutatión está involucrado en la reducción de enlaces disulfuro en la descondensación de la cromátida del esperma y en el reemplazo de protaminas por histonas, la ausencia o un número pequeño de células del cúmulo tiene un efecto negativo durante la producción del embrión (Blondin y Sirard, 1995), ovocitos desnudos en cultivo son capaces de alcanzar el estado de MII, pero ellos son incapaces de sobrellevar la fertilización normal y el desarrollo.

El retiro de las uniones gap cúmulo-ovocito del citoplasma está temporalmente correlacionado con GVBD en ovocitos bovinos tanto in vitro como in vivo. Sin embargo el análisis metabólico ha mostrado que el GVBD en ovocitos de bovino toma lugar antes de cualquier disminución detectable en el transporte de pequeñas moléculas radio-marcadas entre el cúmulo y el ovocito (Laurincik et al., 1992).

#### **1.1.10 El MPF en la maduración del ovocito**

El factor promotor de la maduración (MPF) fue originalmente reportado como un factor encontrado en los ovocitos de la rana (*Rana pipiens*) que indujeron a ovocitos a reanudar la meiosis. El factor promotor de la maduración fue retitulado más adelante como factor que promueve la metafase porque está presente en las células que se dividen en casi todos los eucariotas y es igualmente eficaz en promover la entrada en la metafase independiente de la especie de las células receptoras o células donantes (Gautier et al., 1988). El MPF regula la transición de G2/M en meiosis y células somáticas. Hasta el momento MPF se ha demostrado ser activo durante la maduración del ovocito de todas las especies estudiadas. MPF es una proteína kinasa cuya actividad acciona una serie de reacciones que conducen a la interrupción de la membrana nuclear, condensación y alargamiento de los cromosomas y por lo tanto la

entrada a meiosis y la detención en la segunda meiosis. MPF es una proteína compleja integrada por dos subunidades: p34cdc2 y ciclina B (Gautier et al., 1988). P34cdc2 es una proteína del 32 kDa homóloga del gene de la levadura cdc2 del ciclo de la división celular (Erikson y Maller, 1989). Ciclina B es una proteína del 45 kDa que en síntesis coincide con la activación de p34. Así, ciclina B es el componente regulador y p34cdc2 es el componente catalítico de MPF. En ovocitos de bovino, la ciclina B es el factor limitador para reactivar la meiosis (Levesque y Sirard, 1996). La inyección de ciclina B en ovocitos bovinos tratados con ciclohexamida reanuda la meiosis (Levesque y Sirard, 1996). La activación de MPF requiere primero la formación del complejo p34cdc2-ciclina B y en segundo lugar, fosforilación y defosforilación de p34cdc2 sí mismo. Ciclina B se sintetiza y se acumula durante interfase, mientras que p34cdc2 está siempre presente en el citoplasma. La naturaleza cíclica de MPF se explica por las fases de la síntesis y de la degradación de ciclina B. La degradación de ciclina B inicia la transición de la metafase a la anafase y la declinación de la actividad p34cdc2 (Hashimoto y Kishimoto, 1988). Así los niveles de MPF en el ovocito en GV son bajos, pero se incrementan en GVBD y están alcanzando un máximo MI; hay entonces una pérdida rápida en actividad en la anafase hacia telofase seguido por otra elevación pues el ovocito arriba a MII (Fulka et al., 1992). Este segundo nivel se mantiene hasta la terminación de MII en la fertilización o la activación partenogenética (Fulka et al., 1992; Hashimoto y Kishimoto, 1988). Los niveles máximos de la actividad de MPF en ovocitos de los bóvidos corresponden con las dos metafases: 9-12 h y después de 18 h de cultivo in vitro. La declinación temporal en actividad del MPF ocurre en bóvidos entre las dos metafases. La reactivación de meiosis y el proceso de maduración son controlados por proteínas cinasas y fosfatasa, que modulan procesos celulares por eventos de fosforilación y defosforilación. En la especie de los bóvidos, es reactivada la meiosis.

MPF parece ser el regulador Universal de la metafase en los ciclos celulares en meiosis y mitosis (Fissore et al., 1996). El MPF fosforila un número de proteínas y se cree que es el responsable de la desintegración de la membrana nuclear, condensación del cromatina y de la reorganización microtubular durante la meiosis (Kastrop et al., 1990b).

Inicialmente, el ovocito adquiere la capacidad de condensar completamente su cromatina. La condensación de cromatina requiere activo el MPF, que es predeterminado por una suficiente cantidad del ciclina B1 y p34cdc2 en una forma activa (Levesque y Sirard, 1996). El ovocito entonces adquiere la capacidad de formar una placa del MI y un huso funcional. El mecanismo de la separación del cromosoma no se relaciona simplemente con la formación del huso, porque los inhibidores de la fosfatasa I tales como ácido okadaic permiten su separación, pero no su alineación en el huso (Levesque y Sirard, 1995). El siguiente paso es una progresión a la segunda placa de metafase y una protuberancia del cuerpo polar. El acontecimiento meiótico pasado es detenido en el paso MII, que requiere el factor citostático funcional (CSF). La detención en MII es mantenida por un factor citoestático (CSF). El CSF promueve el arresto meiótico estabilizando la actividad del MPF durante MII y por lo tanto evita que los ovocitos progresen más allá del metafase (Levesque y Sirard, 1996). El arresto de la metafase II es mantenido hasta la reactivación de la meiosis debido a la mediación del esperma o la activación partenogénica. Estos acontecimientos liberan del arresto de la metafase II a través de la inactivación del MPF por la degradación del componente ciclina.

### **1.1.11 Arresto meiótico**

La maduración de ovocitos bovinos es un proceso prolongado caracterizado por múltiples paros-arranques para su control. El primer arresto meiótico ocurre durante la vida prenatal cuando el ovocito procede a través de las primeras etapas de la meiosis y en la etapa del diploteno de la primera división meiótica. El ovocito se detiene en arresto meiótico por muchos meses o aún años hasta que el proceso meiosis es reactivado por la oleada preovulatoria de LH (Hyttel et al., 1997), atresia (Assey et al., 1994) o por retiro del folículo. Los ovocitos de los bovinos son competentes para reactivar la meiosis cuando el diámetro del ovocito mide más el 110µm (Fair et al., 1995; Hyttel et al., 1997). Está generalmente aceptado que las células foliculares secretan los factores necesarios para mantener la meiosis de ovocitos competentes en arresto meiótico. El segundo arresto meiótico ocurre cuando el ovocito alcanza la etapa del metafase de la segunda división meiótica. El ovocito termina la meiosis en respuesta de la fertilización o por la activación partenogénica. Estudios sobre

maduración de ovocitos permitió el desarrollo de tratamientos más eficaces para mantener a los ovocitos de bovino en arresto meiótico. El arresto meiótico *in vitro* ha sido estudiado usando los productos químicos o las fracciones foliculares para bloquear los procesos esenciales para la maduración del ovocito.

#### **1.1.12 Líquido folicular**

Además de proporcionar el alimento al ovocito, el líquido folicular también está implicado en la regulación de la maduración del ovocito. Se ha reportado que el líquido folicular no tiene ningún efecto para estimular o para inhibir la maduración del ovocito (Sirard et al., 1995; Sirard et al., 1998). El efecto del líquido folicular en la maduración del ovocito depende del tamaño del folículo, de la etapa del ciclo estrual (Sirard et al., 1995) y la fracción del líquido folicular usada.

El origen del líquido folicular es importante pero el efecto de su adición no es uniforme sobre ovocitos originados de folículos de diferentes tamaños. El efecto inhibitorio del líquido folicular en la maduración del ovocito ha sido reportado en los ratones, las ovejas, en el ganado, en los cerdos, los hámsteres y los seres humanos (Downs y Eppig, 1985).

El líquido folicular de los bovinos (BFF) inhibe totalmente y reversible la reactivación de la meiosis espontánea del ratón y ovocitos de hámster. Por otra parte, la maduración de los ovocitos de bovino es retrasada solamente por el líquido folicular bovino (Sirard y Bilodeau, 1990b). La presencia del líquido folicular bovino en el medio de incubación reduce grandemente el número de las células del granulosa requeridas para mantener el complejo cúmulus ovocito CCO en arresto meiótico (Sirard y Bilodeau, 1990b).

El líquido folicular de los bovinos recogido de los pequeños y medianos folículos en el estro, tuvieron una capacidad más grande de prevenir el arresto meiótico, mientras que el líquido folicular recogido de los folículos grandes en el estro tenían menos capacidad de mantener la detención meiótica. La cantidad de líquido folicular presente en el medio de cultivo tiene una relación lineal inversa con la maduración nuclear de los ovocitos bovinos. Los ovocitos de los bovinos aislados del ambiente folicular rápidamente experimentan la reactivación de la meiosis (Sirard y Bilodeau, 1990b).

Los factores inhibitorios potenciales se han aislado del líquido folicular bovino.

La presencia de una proteína quinasa soluble también se ha reportado en los bovinos y el líquido folicular humano (Sirard et al., 1989). El PKA soluble es probablemente un producto de las células de la granulosa de los folículos y sugiere que un estado altamente fosforilado sostendría la detención meiótica. Además, la presencia de una proteína de aproximadamente 6000 Mr encontrados en líquido folicular de los bovinos sugiere desempeñar un papel en el control de la meiosis (Dostal y Pavlok, 1996). Esta proteína no previene la reasunción meiótica de ovocitos desnudos. La suplementación del medio de incubación con 2.0 mg/ml de la proteína aislada induce la detención meiótica en todos los ovocitos tratados (Dostal y Pavlok, 1996).

El ácido linoleico puede desempeñar un papel en mantener la detención meiótica de los ovocitos bovinos in vivo, el ácido linoleico es el ácido graso no saturado más abundante encontrado en líquido folicular bovino. La concentración del ácido linoleico disminuye perceptiblemente durante el desarrollo folicular (Homa y Brown, 1992). La incubación de los CCO bovinos con el ácido linoleico inhibió perceptiblemente GVBD de una manera dosis-dependiente, mientras que todos los otros ácidos grasos probados no tenían un efecto en la maduración del ovocito (Homa y Brown, 1992). Según lo mencionado antes, las purinas tienen un efecto débil en la inhibición de la reactivación meiótica de los ovocitos bovinos (Sirard y First, 1988). Hipoxantina está presente en líquido folicular bovino, pero la cantidad de purinas encontradas en líquido folicular bovino no es comparable a las encontradas en el líquido folicular del ratón (Downs et al., 1989; Eppig et al., 1985).

### **1.1.13 Células de la granulosa**

Las células del granulosa de los bovinos tienen una capacidad moderada de evitar que los ovocitos reasuman la meiosis in vitro (Sirard et al., 1995). Altas concentraciones de las células de la granulosa (10 a 100 millones de células /ml) mantienen a los ovocitos en la detención meiótica, mientras que las bajas concentraciones de células de la granulosa (1 a 5 millones células /ml) estimulan al ovocito para reasumir la meiosis *in vitro* (Sirard y Bilodeau, 1990b), especialmente si el medio de cultivo incluye gonadotropinas o suero del estro (Sirard y Bilodeau, 1990a). El efecto inhibitorio de las células de la granulosa es amplificado por la presencia de BFF y del contacto directo

entre las células de la granulosa y las células del cúmulus (Sirard et al., 1992). El contacto directo entre las células de la granulosa y el CCO parece mantener ovocitos en la detención meiótica. El cultivar en agra el CCO antes del cultivo con las células del granulosa quita el efecto inhibitorio de las células del granulosa (Sirard y Bilodeau, 1990b). Las células de la granulosa en suspensión son más eficaces en la prevención de la reactivación meiótica de los COC que una monocapa de célula de la granulosa (Sirard y Bilodeau, 1990a). Las monocapas de las células de la granulosa de los bovinos con su medio condicionado proporcionan condiciones inhibitorias hasta el 33% de esos ovocitos que se adhieren a monocapas (Sirard y Bilodeau, 1990a). Sin embargo, ninguna suspensión de las células frescas de la granulosa de los bovinos (Leibfried y First, 1980a; Sirard y Bilodeau, 1990b) ni monocapas de las células del granulosa de los bovinos previenen completamente GVBD en los CCO de bovino (Richard y Sirard, 1996b; Sirard y Bilodeau, 1990a).

Por lo menos el 50% de los CCO bovinos conectados con la membrana de la granulosa (CCOG) permanecen en detención meiótica por lo menos 22 h (Van tol et al., 1996). El efecto de la membrana granulosa es revertido por la adición de FSH al medio de cultivo. La incubación de CCOG en presencia de las células de la teca realza la proporción de ovocitos en arresto meiótico incluso en presencia de FSH adicionado. Así, las células del teca secretan un factor que previene el GVBD inducido por FSH sobre CCOG. Además, la hemisección del folículo, que contienen las células de la granulosa y del teca, inhiben la reasunción meiótica de CCO incluso en presencia de hormonas gonadotropinas (Carbonneau y Sirard, 1994). Las células de la granulosa bovina pueden participar en mantener la detención meiótica, pero la principal señal inhibitoria viene de las células de la teca (Richard y Sirard).

#### **1. 1.14 Células de la teca**

Las células de la teca mantienen a los ovocitos de bovino en arresto meiótico durante la maduración *in vitro* (Sirard y Bilodeau, 1990a). Las células de la teca son obtenidas por digestión enzimática de las capas externa e interna de la teca de los folículos que se extienden a partir de 2 a 5 milímetros de diámetro. La teca interna o externa son igualmente efectivas en mantener el CCOs en arresto meiótico (Richard y Sirard, 1996).



Por otra parte, el CCOs cocultivados con una monocapa de células de la granulosa reactivan la meiosis (Richard y Sirard, 1996). Las monocapas de la célula de la teca son capaces de mantener el arresto meiótico secretando dos proteínas de aproximadamente 214 000 daltons y 190 000 daltons (Richard y Sirard, 1998). El patrón proteico de la monocapa de las células de la teca difiere del patrón proteico secretado por las células de la granulosa. Además, la secreción de las proteínas de 214 000 daltons decrecen cuando las células de las teca están creciendo sobre una cubierta de colágeno. Por lo tanto, la proteína de los 214 000 daltons pudiera estar involucrada en los procesos del mantenimiento de arresto meiótico en los ovocitos de bovino (Richard y Sirard, 1998).

La monocapa de las células de la teca mantienen al CCOs pero no a los ovocitos desnudos (OD) en el arresto meiótico (Richard y Sirard, 1996; Richard y Sirard, 1998). Por lo tanto, el factor inhibitorio actúa sobre el ovocito a través o en asociación con las células del cúmulo (Richard y Sirard, 1996). Sin embargo, los OD co-cultivados con el CCOs aumenta perceptiblemente el porcentaje de arresto meiótico mantenido en el CCOs. Esto sugiere que los ovocitos desnudados producen un factor que modula las células de la teca o las células del cúmulo para incrementar la eficacia de las vías inhibitorias (Richard y Sirard, 1998).

Remplazando el suero fetal por la albúmina sérica bovina (BSA) o el crecimiento de las células de la teca sobre una cubierta de colágeno resulta en una baja actividad inhibitoria (Richard y Sirard, 1998). Una monocapa de células de la teca requiere la presencia del 10% del suero fetal bovino para producir el efecto inhibitorio sobre la maduración del ovocito (Richard y Sirard, 1998). El contacto directo entre las células del teca y el CCOs no se requiere para mantener a los ovocitos bovinos en arresto meiótico porque la monocapa de las células de la teca libera el factor inhibitorio en el medio de cultivo. Además, el efecto inhibitorio de las células de la teca es completamente reversible hasta 24 h (Richard y Sirard, 1996).

## Segunda parte

### 1.2.1 Biología del fibroblasto

Las células epiteliales de varios órganos pueden estar creciendo y ha la vez estudiados en un cultivo de tejido por que ha progresado la tecnología básica para el cultivo celular y ha mejorado el entendimiento de los distintos requerimientos de varios epitelios.

El desarrollo de una estructura ordenada y un epitelio bien organizado durante la embriogénesis tal como el mantenimiento de la homeostasis de los epitelios estrictamente dependen sobre las interacciones epiteliales con tejido conectivo apropiado.

De acuerdo con el tejido, la formación y mantenimiento de la epidermis madura, consiste en un estrato basal, granular y cornificado, un proceso continuo que involucra la proliferación de queratinocitos y diferenciación terminal, siendo regulado por influencias mesenquimas (figura 7).

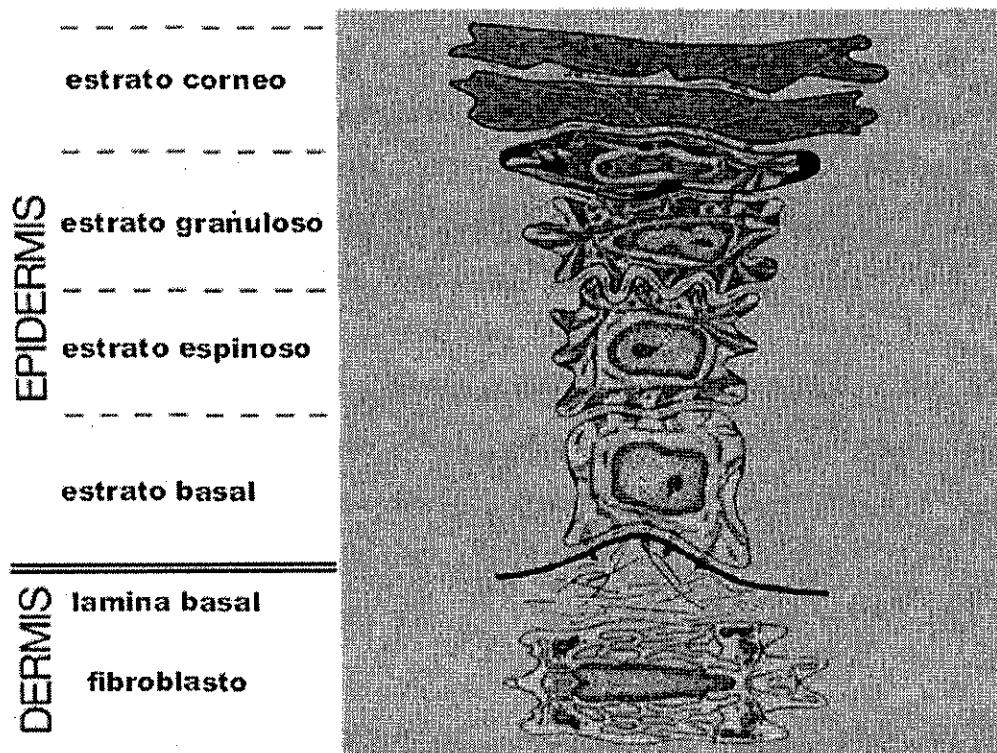


Figura 7. Ilustración esquemática de la arquitectura de la epidermis.

Los fibroblastos se originan del mesodermo, y dan soporte estructural. Son el tipo celular principal del tejido conectivo, de forma ahusada, producen fibras de colágeno, reticulares y elastina, estas fibras llenan los espacios del tejido conectivo y ayuda a formar cápsulas para órganos, tendones y ligamentos.

Hay dos tipos de fibroblastos, los fibroblastos activos que se encuentran muy relacionados con el colágeno, poseen un RER y un aparato de Golgi bien desarrollado y es un tipo celular muy común. Los fibroblastos inactivos que son muy difíciles de distinguir de los que están activos, pero la diferencia estructural de estos radica en que el RER no está tan desarrollado y posee muchos ribosomas.

Las fibras que los fibroblastos producen tienen múltiples funciones. Las fibras de colágeno proporcionan una gran fuerza de tensión, además de ser una proteína muy abundante. Las fibras reticulares forman redes para dar un marco estructural. Las fibras elásticas dan las propiedades flexibles al tejido conectivo (Wilson, 2003).

Además los fibroblastos son únicos, ya que pueden transformarse en cualquier célula de estos tejidos, y esta propiedad es llamada plasticidad fenotípica. En este proceso, la diferenciación puede ser alterada por moléculas de origen externo, que interactúan con los receptores de superficie, e inducen cascadas de interacciones moleculares; eventualmente estas activan la expresión génica, y esto lleva a la traducción de mRNA en proteínas, organización de proteínas en complejos supramoleculares (organelos), y por lo tanto diferentes apariencias celulares.

Cierto número de estudios han sugerido que el fibroblasto es una célula madre para adipositos. Este fibroblasto puede derivar de una célula mesenquimatosa menos diferenciada; en tejido adiposo blanco, se ha mostrado síntesis inicial de lípidos en células fibroblásticas, después se intensifica su actividad lipogénica, y por último desarrolla una morfología más redonda y elabora lamina (Napolitano, 1963). Las características de traslapo de monocitos o macrófagos, unos en un lado, y los fibroblastos de otro. La posibilidad de que estos podrían transdiferenciarse uno a otro ha sido reconocido por cierto tiempo.

Una de las características principales de los miofibroblastos incluyen la vimentina y la  $\alpha$ -smooth-muscle actin ( $\alpha$ SMA) (Eyden, 1981). Una de las diferencias principales entre los fibroblastos y los miofibroblastos es la ausencia de  $\alpha$ SMA y miofilamentos en los fibroblastos.

### **1.2.2 Ciclo celular**

El ciclo de división celular consiste en: Mitosis (profase, metafase, anafase y telofase); fase G1 (que se divide en los estados "preinicio" G1, "Inicio", y en "postinicio" G1); fase S (involucra la síntesis del DNA); y fase G2 (antes de la mitosis y después de la síntesis de DNA). El éxito de la mitosis depende de la alternación fiel de la segregación de los cromosomas (la fase M) y la duplicación de los cromosomas (fase S). (Nurse, 1990). Se ha demostrado que mientras la célula posee su propia maquinaria para completar las diferentes fases del ciclo, también existe un control central del sistema (que es independiente de la maquinaria utilizada para los diferentes procesos involucrados en el ciclo celular) y esto es responsable de la regulación del inicio de estas diferentes fases de una manera ordenada. Este sistema de control, asegura que la célula no entre en mitosis antes de la síntesis del ADN sea completada o DNA dañado sea reparado, y tampoco entre a anafase antes de que todos los cromosomas se encuentren alineados en el plato ecuatorial y los cinetocoros de todos los cromosomas estén unidos al huso.

Es sabido que el ciclo de división celular depende de dos tipos de proteínas, CDks y las ciclinas (Nurse, 1990).

### **1.2.3 Quiescencia**

Cuando las células en cultivo están sembradas a una baja densidad en un medio que contiene suero, estas células pasan de una fase a otra del ciclo celular: G1, S, G2 y M. cada una de estas fases están reguladas por la acción coordinada de kinasas y proteasas (Kirschner, 1996). Cuando se les priva de suero las células continúan su ciclo hasta que completan la mitosis, con lo cual entran al estado G0 (Pardee 1989). G0 es un arresto quiescente de las células en mamíferos, donde se propone que las células se encuentran "fuera de ciclo". Se sugiere que la habilidad de la célula para

entrar a la fase G0 esta determinada por la carencia de suero o por factores de inhibición. Aunque estas células pueden ser reintroducidos al ciclo celular por la readición de suero o un factor de crecimiento purificado (Jones, 2001). Estos mitogenos debe estar presente antes del punto de restricción (Punto R) varias horas antes de la transición entre la fase G1 y S (Pardee A.B., 1989).

#### 1.2.4 Telómeros

Una característica estructural del DNA es que la mayoría de las células somáticas en división, tanto in vivo como in vitro sobre llevan el acortamiento de los telómeros, que son estructuras de función crítica que participan en la estabilidad, replicación y segregación del cromosoma durante la mitosis, y la perdida gradual de las secuencias telomericas es como un "reloj mitótico" que lleva a un arresto del ciclo celular o también llamado senescencia celular (Holt et al. 1996). Esta pérdida de DNA telomérico ha sido calculado entre 50 y 200 pb por cada división celular. Una vez que los telómeros se acortan debajo de una longitud crítica pierden la capacidad de protegerse efectivamente y se piensa que esto activa la repuesta al daño del DNA y esto causa el arresto del ciclo celular (Lanza et al 2000). Las células pueden vencer esta pérdida, con la activación/expresión de una ribonucleoproteína llamada telomerasa, la cual sintetiza la secuencia TTAGGG repitiéndola de nuevo al final de los cromosomas. La pérdida de los telómeros observada en células somáticas ha sido atribuido a la edad del animal y la propagación del cultivo *in vitro* (Shiels et al., 1999; Lanza et al 2000). Se ha observado que los niveles reducidos de la actividad de la telomerasa en pasajes tardios de células madre embrionarias en bovino, puede reparar el daño en los telómeros pero no previene el acortamiento de estos. Las células derivadas de pasajes tempranos cultivados a bajas concentraciones de suero pueden ser susceptibles a un incremento del daño/acortamiento a causa de los niveles reducidos de telomerasa debido de la salida del ciclo celular hacia un estado quiescente (Holt et al. 1996). Aun no ha sido determinado exactamente la longitud del telómero que refleja la edad fisiológica del animal (Shiels et al., 1999; Lanza et al 2000).

### 1.2.5 Partenogénesis

La partenogénesis se puede definir como la generación de un individuo sin participación del genoma paterno: su éxito depende de una adecuada activación del ovocito, de que la embriogénesis sea normal y de la obtención de un nacido vivo capaz de reproducirse.

En el caso de los mamíferos no se ha reportado hasta la fecha el nacimiento del primer ser vivo derivado de un embrión exclusivamente partenogénico.

La partenogénesis se ha descrito en diferentes especies dentro de la escala zoológica: insectos (Gottlieb et al 1998; Stouthamer et al., 1993), anélidos (Stephano et al., 1995), marsupiales (Anderson et al., 1993), erizos de mar, batracios (Klotz et al 1990), peces (Matzuk et al 1997; Washitani et al 1997), pavos y plantas (Cassar et al 1998). Es de anotar que a pesar de haber obtenido nacidos vivos con capacidad reproductiva normal, estos animales partenogénicos tienen algún grado de retraso en su desarrollo comparados con los obtenidos por reproducción sexual.

En los individuos que se reproducen sexualmente son necesarios los genomas paterno y materno para un adecuado desarrollo embrionario. *In vivo* e *in vitro* se ha observado algún grado de desarrollo cuando sólo participa uno de los genomas. Tal es el caso de los androgénicos, embriones cuyo genoma es exclusivamente de origen paterno, los cuales alcanzan el estadio de blastocisto pero no superan el de somites temprano. Se ha demostrado que si se introducen en embriones normales células embrionarias provenientes de embriones androgénicos éstas serán casi exclusivamente parte de la placenta y excepcionalmente del embrión. En el caso de embriones con participación exclusivamente materna (ginogénicos), al ser transferidos al útero, pueden llegar a implantarse de una manera inadecuada y no tener un desarrollo normal por el escaso tejido placentario que presentan.

Debido a que una pequeña proporción de ovocitos se activan espontáneamente, en ocasiones la formación y el desarrollo de los embriones pueden darse sin la activación del espermatozoide y originar un embrión partenogénico. Actualmente se pueden obtener mediante la activación artificial de los ovocitos y la manipulación de las células embrionarias.

En la mayoría de los mamíferos, los ovocitos son ovulados en metafase II y son retenidos en este estado hasta su activación por la fertilización de un espermatozoide o por estímulos artificiales (activación partenogenética). Los ovocitos son arrestados en MII debido a la persistencia de gran cantidad del factor que promueve la maduración (MPF) un heterodímero de P34 cdc2 quinasa, una ciclina B y de un factor citostático (CSF) productos de los proto-oncogenos *c-mos* que previene la degradación de las ciclinas y son mantenidas por las enzimas de la familia de las mitógenos activadas proteínas quinasas (MAPK) (Dupont, 1998). La penetración de la célula espermática dentro del ovocito promueve alteraciones en las concentraciones de  $Ca^{++}$  intracelular por varias horas en el ratón (Vitullo y Ozil, 1992; Jones y Whittingham, 1996; Lawrence et al., 1998), cerdos (Sun et al., 1992) y bovino (Nakada y Mizuno, 1998; Tosti et al., 2002). Tales oscilaciones son responsables para la inactivación de MPF por medio de la inactivación de MAPK y CSF, además de la destrucción de la ciclina B (White y Yue, 1996; Dupont, 1998).

Los ovocitos activados, bien sea espontáneamente o inducidos, son indistinguibles desde el punto de vista morfológico. Las proporciones de inducción espontánea de la partenogénesis bovina varían desde 3.6% a 57% (Lechniak et al 1998). La activación de los ovocitos en metafase II puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos químicos cuya efectividad disminuye a medida que el ovocito envejece (Kaufman et al 1987). Estos estímulos permiten la movilización del  $Ca^{++}$  intra o extracelular y los consecuentes eventos similares a los observados en la fertilización. Se encuentran entre estos el etanol (Nagai et al., 1987), el ionóforo de calcio A23187 (Wiston et al 1991), la solución ácida de Tyrode (Jonson et al., 1990), la puromicina (Balakier et al., 1993; De Sutter et al., 1992) y la estimulación eléctrica. Cada especie responde a la activación en una forma diferente: en los bovinos se ha reportado hasta un 64% de activación utilizando etanol al 7%. Otros estudios como el de Marshall y col. 1997, informan un 92% de activación partenogénica con pulsos eléctricos en el modelo del mono tití; en los humanos Levron y col. 1995, mostraron un 95% de activación utilizando manitol y electricidad, y finalmente Winston y col. 1991, obtuvieron un 16% utilizando etanol. La puromicina produce una activación de los ovocitos del 20% pero compromete el desarrollo, ya que el 90% de los embriones no se dividen (Balakier et al., 1993). Los

embriones obtenidos pueden ser haploides o diploides dependiendo de la extrusión o no del segundo cuerpo polar. Los embriones diploides (cromosómicamente normales) son los que usualmente alcanzan el estado de blastocisto y sus células pueden formar parte de individuos nacidos vivos. Sin embargo, varios reportes demuestran que estos embriones tienen un menor potencial de desarrollo que puede ser explicado por la baja celularidad al compararlos con embriones de la misma edad obtenidos por fertilización *in vivo* o *in vitro* (Dyban et al., 1989). Estos embriones activados en ciertas especies no alcanzan estadios de desarrollo avanzados y en el humano no pasan del estadio de 8 células cuando se cultivan *in vitro* (Wiston et al 1991). De la Fuente y King (De la fuente et al., 1998) demostraron que los embriones partenogénicos tenían menos células de la masa celular interna y del trofoblasto que los obtenidos por fertilización, y que además su constitución genética estaba alterada siendo poliploides o mixoploides. Por otro lado, utilizando sistemas de agregación celular embrionaria en murinos, Surani y col. en 1977 obtuvieron nacidos vivos a partir de embriones quiméricos que tenían tanto blastómeros de embriones normales como de partenogénicos diploides; reportaron en su estudio que del 30 al 50% de las células de los nacidos vivos eran de origen partenogénico. Estos hallazgos demostraron la posibilidad de que las células de embriones partenogénicos pudieran ser parte de individuos adultos, y dejaban abierta la factibilidad de su manipulación.

Se ha realizado la clonación mediante la transferencia de núcleos de células provenientes de embriones partenogénicos a ovocitos activados, para así poder aclarar las interacciones citoplasma núcleo a escala embrionaria (Boediono et al., 1995). Esta interacción puede evidenciarse por el hinchamiento del núcleo, la condensación prematura de la cromatina y los cambios en la estructura de los nucléolos (Winger et al 1997), en condiciones de ausencia del genoma materno o paterno. La producción de embriones partenogénicos es importante para el análisis de los mecanismos que regulan el desarrollo embrionario, el crecimiento de los embriones y potenciales individuos uniparentales. En el modelo murino se ha estudiado el papel de los genomas paterno y materno durante el desarrollo, sentando con ello las bases de la impronta genética y también de los patrones de herencia de los centrosomas.



El desarrollo de las técnicas de clonación mediante la transferencia de núcleos se conoce desde 1977, cuando se transfirieron núcleos de células embrionarias a ovocitos enucleados (Zurani et al., 1977). De estos estudios se pudo demostrar la totipotencialidad de los núcleos de las células de las primeras divisiones embrionarias y la pérdida de esta propiedad conforme avanza el desarrollo.

En el análisis de los mecanismos que regulan el desarrollo y el crecimiento de los embriones uniparentales, se ha informado en el modelo murino que el gen del factor de crecimiento insulinoide II (IGFII) que se expresa en los individuos, es el de origen paterno. Se ha observado en estudios de quimeras de agregación una fuerte selección hacia las células de origen partenogénico, excluyéndolas prácticamente de algunos tejidos como el músculo esquelético; esta es una evidencia indirecta de la necesidad de la impronta parental de los genomas (Nagy et al., 1989).

Se ha demostrado en los centrosomas (los organelos celulares en donde se organiza el huso mitótico para la división celular) que su forma de herencia es paterna y por lo tanto, en la mayoría de las especies, su construcción y sus patrones de herencia son motivo de una activa investigación (Schatten et al., 1991). Los embriones partenogénicos son fuente de información en esta área dado que dividen sus células sin replicar su centrosoma. Todo lo expuesto muestra cómo en los mamíferos se pueden observar fenómenos genéticos y de desarrollo que no se observan en otros modelos animales, y que además junto con las nuevas tecnologías *in vitro* de manipulación de embriones se pueden aclarar y entender los mecanismos de repartición de los cromosomas, del desarrollo embrionario temprano, del estudio de nuevas formas de herencia y, finalmente, gracias a la clonación, la interacción del citoplasma y el núcleo en los modelos embrionarios.

#### **1.2.6 Reprogramación nuclear de células somáticas**

Las mayores pérdidas embrionarias ocurren durante el desarrollo de la preimplantación. En bovinos (Bruggerhoff et al., 2002, Gibbons et al., 2002, Kishi et al., 2000, Kubota et al., 2000, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001, Shiga et al., 1999, Hill et al., 2000) como en otras especies incluyendo cabras (Zou et al., 2001), ovejas (Wilmut et al., 1997) y conejos (Chesne et al., 2002), siendo mayores al 65 % de embriones clonados

fallidos en el periodo de desarrollo de mórula compacta a blastocisto. Aproximadamente el 50% de los embriones clonados bovinos en etapa de blastocisto establecen la preñez después de su transferencia a una hembra nodriza. Sin embargo, comenzando 30 días aproximadamente y continuando hacia el día 60 de la gestación, la muerte embrionaria pudiera ocurrir en 50 al 100% de las gestaciones (la ausencia de latido del corazón y separación de las membranas de la placenta). (Gibbons et al. 2002, Hill et al., 2000, Kasinathan et al., 2002, Wells et al., 1998) han reportado similares pérdidas comparadas con las pérdidas de preñez en bovinos por servicio natural (pérdidas del 2 al 10%, o usando los procedimientos de IVMFC (16%);) (Hasler J.F., 1998, Hasler et al., 1995). La examinación de la placenta originada de los embriones clonados entre los días 40-50 de gestación revelan que la placenta, esta hipoplástica, parcialmente desarrollada con cotiledones rudimentarios (Stice et al., 1996), o aquellos que son esencialmente normales cuando se comparan con los embriones derivados de FIV (Hill et al., 2000). El incremento en la incidencia de abortos espontáneos durante el segundo trimestre de gestación fue reportado por (Kato et al., 2000, Kishi et al., 2000, Kubota, et al., 2000, Wells et al., 1999, Edwards et al., 2001), y los exámenes macroscópicos e histopatológicos de fetos abortados revelan pocas anomalías (McCracken et al., 2001). Sin embargo, las placentas a menudo son anormales con una marcada reducción en los cotiledones del feto (menores que 20 comparados con los normales de 70 a 120) (Young et al., 2001). Aún más, las membranas fetales son pesadas y edematosas.

El aborto de fetos bovinos clonados ocurren durante el tercer trimestre de gestación entre los días 200 a 265 (280 días = término). Las pérdidas durante éste periodo están generalmente caracterizadas por un incremento marcado en la incidencia de hidroalantoides y muerte fetal (Gibbons et al., 2002, Zakhartchenko et al., 1999, Heyman et al., 2002, Wells et al., 1999, Piedrahita et al., 2002, Hill et al., 1999, Chavatte-Palmer et al., 2002). El hidroalantoides es acompañado por una marcada reducción de los placentomas, el advenimiento de la placenta y edema de los intercotiledones de la membrana placental. (Edwards et al., 2003).

La muerte tardía de los fetos clonados son primeramente el resultado de la inadecuada placentación, los exámenes microscópicos de fetos neonatales no se han identificado

con cualquier conocimiento genético o anomalía generada (McCracken et al., 2001). El líquido amniótico y meconio generalmente se encuentran presentes en los pulmones de todos los fetos a término indicando algún grado de estrés en el útero antes de morir. Los terneros clonados son más grandes al nacimiento y tienen un rango bajo de supervivencia postnatal cuando se comparan con su contraparte *in vitro*. (Edwards et al., 2003) (Kato et al., 2000, Heyman, et. al. 2002). La mayoría de los terneros derivados de la placenta anormal requieren un monitoreo intenso y terapia después de su nacimiento para tratar las complicaciones que pudieran incluir dismasturia del pulmón, hipertensión pulmonar, dolor respiratorio, hipoxia, hipotermia, hipoglicemia, acidosis metabólica, incremento del tamaño de las venas y arterias umbilicales, así como el desarrollo de sepsis en cualquiera de las estructuras umbilicales o pulmonares (Gibbons et al., 2002, Wells et al., 1999, Wells et al., 1998, Hill et al., 2000, Hill et al., 1999).

Severas complicaciones pueden no ser evidentes por varios meses. Gibbons et al., 2002, reportó la pérdida de un ternero aproximadamente a los 60 días de edad y la necropsia reveló adhesiones consistentes en los pulmones con neumonía, y problemas digestivos asociados con indigestión vaginal. Similares complicaciones han sido descritas de clones derivados de fetos (Hill et al., 1999) y células embrionarias (Garry et al., 1996).

Pace et al., 2002, reportaron similares rangos de crecimiento en el desempeño reproductivo y características de la lactación de los bovinos clonados comparados con los bovinos naturales lecheros. Aún más, Enright et al., 2002, demostró que las vaquillas clonadas no presentaron diferente longitud del ciclo estral, diámetro del folículo ovulatorio, número de oleadas foliculares o perfiles de los cambios hormonales (LH, FSH, Estradiol y Progesterona). La concentración de hormonas de crecimiento para clones derivados de 13 años de edad en la raza Holstein, los valores registrados de IGF-I y GFBP3 se encontraron todos en el mismo rango reportado para las vaquillas no clonadas de edad similar (Govoni et al., 2002).

Sin embargo, aunque los animales clonados pudieran parecer normales y saludables, es posible que patologías no diagnosticadas puedan desarrollarse tardíamente en la vida (Chavatte-Palmer et al., 2002). Como un resultado de cambios subsecuentes en la

estructura de la cromatina y/o expresión génica. Miyashita et al., 2002, encontraron diferencias en las longitudes de los telómeros entre bovinos clonados derivados de diferentes tipos de células. Más aún, puede o no ser normal la inactivación del cromosoma X reportada en el ratón (Eggan et al., 2000) y en el bovino (Xue et al., 2002). Wrenzycki et al., 2002, notaron una aberrante expresión de genes que pueden ser de importancia en la adaptación del estrés, función trofoblástica y metilación del DNA, durante el desarrollo de la preimplantación en embriones de bovinos clonados. Aún, muchos ratones y otros animales han sobrevivido a la madurez a pesar de presentar disfunción de genes, indicando que el desarrollo en mamíferos puede ser bastante tolerante a las aberraciones epigenéticas del genoma (Humpherys et al., 2001). Las últimas consecuencias de aberraciones epigenéticas del genoma en animales clonados permanecen inciertas pero puede resultar en una muerte temprana.

### **1.2.7 Factores que afectan la reprogramación celular**

Ciertamente varios factores relacionados con SCNT así como los procedimientos y el medio ambiente de cultivo pueden contribuir a la muerte embrionaria y fetal de embriones clonados. La enucleación de un ovocito involucra remover físicamente del 5-15% o más del citoplasma. Para la confirmación de que el ovocito ha sido enucleado, este se irradia con luz ultravioleta y se ha demostrado que este procedimiento altera la integridad de la membrana, que incrementa la demanda de metionina, altera la síntesis de proteínas y la actividad mitocondrial (Smith, 1993). La inserción de un núcleo de una célula somática al citoplasma de un ovocito generalmente involucra la fusión por inducción eléctrica o microinyección. Algunos grados de lisis ocurren después de cualquiera de los procedimientos anteriores indicando alteraciones en la integridad de la membrana del citoplasma (Ritchie y Campbell, 1995, Van Stekelenburg-Hamers et al., 1993). Una variedad de protocolos han sido descritos para la activación de embriones clonados, la mayoría involucra exposiciones a agentes químicos nocivos para iniciar el ciclo celular embrionario (Gibbons et al., 2002, Wells et al., 1999 y Cibelli et al., 1998). Los embriones son nutridos en un ambiente hostil hasta su transferencia dentro de receptoras nodrizas.

Estas dificultades que se presentan pueden ser asociadas a la producción de embriones in vitro ya que en ella hay alteraciones en la expresión de genes en embriones y fetos de bovino (Blondin et al., 2000), borrego (Young et al., 2001), el incremento de abortos con un 16% (Hasler et al., 1995), hidroalantoides con 1% (Hasler, 1998), fetos muy pesados (Farin et al., 1995), distocia (Hasler 1998 y Walker et al., 1996), síndrome del ternero gigante (Garry et al., 1996, Young et al., 1998) incrementan la mortalidad hasta un 14.9% (Hasler et al., 1995).

La expresión de genes importantes para el desarrollo embrionario y fetal son alterados en embriones clonados. Más recientemente, Yong-Kook et al., 2001, encontró, que los modelos de metilación están muy dañados en varias regiones genómicas en embriones clonados de bovino. Sobre todo, el análisis de varios genes importantes en el desarrollo en embriones clonados revelaron una expresión anormal en IL6, FGF4, y FGFR2, (Daniels et al., 2000), G6PD y Xist (Wrenzycki et al., 2002) y Oct4 (Boiani et al., 2002). Además, Wrenzycki et al., 2001, reportaron que las alteraciones en la expresión de genes que ocurren en embriones clonados, pudieran ser dependientes de los protocolos usados para clonación. Así mismo, la habilidad del citoplasma del ovocito para una reprogramación efectiva del núcleo somático puede diferir de acuerdo al tipo de célula. Por ejemplo, los núcleos obtenidos de células de Sertoli y del cerebro siguiendo la microinyección dentro de citoplastos en MII no sobrellevaron el desarrollo a término comparados con núcleos de células del cúmulo de ratón (Wakayama et al., 1998). Observaciones similares se han hecho en bovinos (Kato et al., 2000, Forsberg et al., 2002).

Los animales clonados por transferencia nuclear de ovocitos de rastro tienen genomas nucleares idénticos pero diferente ADN mitocondrial; por esto, ellos pudieran no ser verdaderamente idénticos. El ADN mitocondrial de origen materno (ovocitos), puede ser asociado con algunas características de producción tales como la producción de la leche (Schutz et al., 1994) y características de la canal (Mannen et al., 1998).

### **1.2.8 Problemas asociados a la clonación animal**

Las mayores pérdidas embrionarias ocurren durante el desarrollo de la preimplantación. En bovinos (Bruggerhoff et al., 2002, Gibbons et al., 2002, Kishi et al., 2000, Kubota et al., 2000, Wells et al., 1998, Edwards et al., 2001, Shiga et al., 1999, Hill et al., 2000) como en otras especies incluyendo cabras (Zou et al., 2001), ovejas (Wilmut et al., 1997) y conejos (Chesne et al., 2002), siendo mayores al 65 % de embriones clonados fallidos en el periodo de desarrollo de mórula compacta a blastocisto. Aproximadamente el 50% de los embriones clonados bovinos en etapa de blastocisto establecen la preñez después de su transferencia a una hembra nodriza. Sin embargo, comenzando 30 días aproximadamente y continuando hacia el día 60 de la gestación, la muerte embrionaria pudiera ocurrir en 50 al 100% de las gestaciones (la ausencia de latido del corazón y separación de las membranas de la placenta). (Gibbons et al. 2002, Hill et al., 2000, Kasinathan et al., 2002, Wells et al., 1998) han reportado similares pérdidas comparadas con las pérdidas de preñez en bovinos por servicio natural (pérdidas del 2 al 10%, o usando los procedimientos de IVMFC (16%);) (Hasler J.F., 1998, Hasler et al., 1995). La examinación de la placenta originada de los embriones clonados entre los días 40-50 de gestación revelan que la placenta, esta hipoplástica, parcialmente desarrollada con cotiledones rudimentarios (Stice et al., 1996), o aquellos que son esencialmente normales cuando se comparan con los embriones derivados de FIV (Hill et al., 2000). El incremento en la incidencia de abortos espontáneos durante el segundo trimestre de gestación fue reportado por (Kato et al., 2000, Kishi et al., 2000, Kubota, et al., 2000, Wells et al., 1999, Edwards et al., 2001), y los exámenes macroscópicos e histopatológicos de fetos abortados revelan pocas anomalías (McCracken et al., 2001). Sin embargo, las placentas a menudo son anormales con una marcada reducción en los cotiledones del feto (menores que 20 comparados con los normales de 70 a 120) (Young et al., 2001). Aún más, las membranas fetales son pesadas y edematosas.

El aborto de fetos bovinos clonados ocurren durante el tercer trimestre de gestación entre los días 200 a 265 (280 días = término). Las pérdidas durante éste periodo están generalmente caracterizadas por un incremento marcado en la incidencia de hidroalantoides y muerte fetal (Gibbons et al., 2002, Zakhartchenko et al., 1999,

Heyman et al., 2002, Wells et al., 1999, Piedrahita et al., 2002, Hill et al., 1999, Chavatte-Palmer et al., 2002). El hidroalantoides es acompañado por una marcada reducción de los placentomas, el advenimiento de la placenta y edema de los intercotiledones de la membrana placental. (Edwards et al., 2003).

La muerte tardía de los fetos clonados son primeramente el resultado de la inadecuada placentación, los exámenes microscópicos de fetos neonatales no se han identificado con cualquier conocimiento genético o anomalía generada (McCracken et al., 2001). El líquido amniótico y meconio generalmente se encuentran presentes en los pulmones de todos los fetos a término indicando algún grado de estrés en el útero antes de morir. Los terneros clonados son mas grandes al nacimiento y tienen un rango bajo de sobrevivencia postnatal cuando se comparan con su contraparte in vitro. (Edwards et al., 2003) (Kato et al., 2000, Heyman, et. al. 2002). La mayoría de los terneros derivados de la placenta anormal requieren un monitoreo intenso y terapia después de su nacimiento para tratar las complicaciones que pudieran incluir dismasturia del pulmón, hipertensión pulmonar, dolor respiratorio, hipoxia, hipotermia, hipoglicemia, acidosis metabólica, incremento del tamaño de las venas y arterias umbilicales, así como el desarrollo de sepsis en cualquiera de las estructuras umbilicales o pulmonares (Gibbons et al., 2002, Wells et al., 1999, Wells et al., 1998, Hill et al., 2000, Hill et al., 1999).

Severas complicaciones pueden no ser evidentes por varios meses. Gibbons et al., 2002, reporto la perdida de un ternero aproximadamente a los 60 días de edad y la necropsia reveló adhesiones consistentes en los pulmones con neumonía, y problemas digestivos asociados con indigestión vagal. Similares complicaciones han sido descritas de clones derivados de fetos (Hill et al., 1999) y células embrionarias (Garry et al., 1996).

Pace et al., 2002, reportaron similares rangos de crecimiento en el desempeño reproductivo y características de la lactación de los bovinos clonados comparados con los bovinos naturales lecheros. Aún más, Enright et al., 2002, demostró que las vaquillas clonadas no presentaron diferente longitud del ciclo estral, diámetro del folículo ovulatorio, número de oleadas foliculares o perfiles de los cambios hormonales (LH, FSH, Estradiol y Progesterona). La concentración de hormonas de crecimiento para

clones derivados de 13 años de edad en la raza Holstein, los valores registrados de IGF-I y GFBP3 se encontraron todos en el mismo rango reportado para las vaquillas no clonadas de edad similar (Govoni et al., 2002).

Sin embargo, aunque los animales clonados pudieran parecer normales y saludables, es posible que patologías no diagnosticadas puedan desarrollarse tardíamente en la vida (Chavatte-Palmer et al., 2002). Como un resultado de cambios subsecuentes en la estructura de la cromatina y/o expresión génica. Miyashita et al., 2002, encontraron diferencias en las longitudes de los telómeros entre bovinos clonados derivados de diferentes tipos de células. Más aún, puede o no ser normal la inactivación del cromosoma X reportada en el ratón (Eggan et al., 2000) y en el bovino (Xue et al., 2002). Wrenzycki et al., 2002, notaron una aberrante expresión de genes que pueden ser de importancia en la adaptación del estrés, función trofoblástica y metilación del DNA, durante el desarrollo de la preimplantación en embriones de bovinos clonados. Aún, muchos ratones y otros animales han sobrevivido a la madurez a pesar de presentar disfunción de genes, indicando que el desarrollo en mamíferos puede ser bastante tolerante a las aberraciones epigenéticas del genoma (Humpherys et al., 2001). Las últimas consecuencias de aberraciones epigenéticas del genoma en animales clonados permanecen inciertas pero puede resultar en una muerte temprana.

### **1.2.9 Aplicación de la clonación por transferencia nuclear**

El éxito de la clonación de ovejas (Wilmut et al., 1997), bovinos (Kato et al., 1998), cerdos (Polejaeva et al., 2000) y cabras (Zou et al., 2001) confirman la utilidad de la transferencia nuclear de células somáticas con el propósito de la expansión clonal en la producción de alimentos de origen animal. Hay también interés creciente a utilizarse para restaurar especies en peligro, o incluso extintas. Wells et al., 1998, reportaron el primer uso exitoso de la transferencia nuclear de células somáticas para conservar la última vaca superviviente de la Isla de Enderby Ecuador una raza única de esta isla. Lanza et al., 2000, usaron ínterespecies usando SCNT para clonar una especie puesta en peligro de extinción (*Bosgaurus*).



El uso de SCNT aumenta la eficiencia en la producción de animales transgénicos a un 100% (Schnieke et al., 1997). El anuncio del primer cordero clonado transgénico (Schnieke et al., 1997) y bovino (Cibelli et al., 1998), usando SCNT inmediatamente despertó la posibilidad de producir células madre embrionarias en especies domésticas y la posible utilidad para introducir o suprimir genes en el genoma de animales domésticos. McCreath et al., 2000 anunciaron el nacimiento de la primera oveja clonada modificada. Recientemente, Lai et al., 2002, demostró que SCNT podría utilizarse para producir cerdos clonados con el bloqueo del gen  $\beta$ -1,3-galactosiltransferasa. Lanza et al., 2002, demostraron que la SCNT podría usarse para la generación de tejidos histocompatibles dirigiendo uno de los desafíos mayores en la medicina del trasplante.

## **2 Planteamiento del problema**

La capacidad de reprogramación de células somáticas por transferencia nuclear en ovocitos enucleados madurados en MII posibilita el uso de animales genéticamente superiores para su manipulación genómica. Sin embargo, la eficiencia es muy baja por lo que sería de gran utilidad llevar a cabo estudios en células de fibroblasto de origen fetales como de adulto, además del efecto que pudiera tener el género (hembra o macho) para ser reprogramadas en ovocitos de bovino buscando incrementar el desarrollo de embriones clónicos, comprender la reversión nuclear y que a la vez sirvan como un modelo animal para la transfección y/o modificación del genoma.

### **3 Hipótesis**

Existen diferencias debidas a la reprogramación de genomas de fibroblastos fetales y de adulto, así como diferencias en el desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear.

## **4 Objetivos**

### **Objetivo General**

Determinar el índice de reprogramación nuclear de fibroblastos fetales y adulto de ambos géneros en ovocitos madurados y enucleados a través del desarrollo embrionario.

### **Objetivos específicos:**

- 1.- Establecer protocolo: Obtención y maduración de ovocitos in vitro.
- 2.- Obtener el cultivo, almacenamiento de fibroblastos fetales y de adulto.
- 3.- Enuclear, fusionar y activar ovocitos reconstruidos.
- 4.- Desarrollar embriones clónicos in vitro.
- 5.- Determinar el efecto del género de fibroblastos fetales sobre su reprogramación nuclear en el desarrollo de embriones clonados.
- 6.- Determinar el efecto del género de fibroblastos de adulto sobre su reprogramación nuclear en el desarrollo de embriones clonados.
- 7.- Establecer el mejor índice de desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear tanto el origen de las células de fibroblasto como del género.

## **5.- Material y Método.**

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Fisiología Animal del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. El material de tejido ovárico y tejido conjuntivo (fibroblastos fetales) de bovino se suministró, tanto por el Rastro Municipal de Zapópan como por el Rastro Municipal de Guadalajara. El material de tejido conjuntivo (fibroblastos de adulto) provino de sementales y hembras del Rancho ganadero Uberaba, ubicado en el Municipio de Tlajomulco en Jalisco.

### **5.1 Cultivo de fibroblastos fetales de bovino.**

1.- Colección del feto en el rastro: Se removió el útero del animal, se limpió con alcohol, se extrajo la placenta y se lavó con PBS y antibiótico (*penicilina 100 UI/ml*) el feto con su saco amniótico, se depositó en un frasco estéril con nuevo medio PBS y antibiótico a 4 °C para ser transportado al laboratorio.

2.- Preparación del feto: Se transfirió el feto a una caja petri de 10 cm. de diámetro. Con tijeras estériles y unas pinzas, se abrió el saco amniótico y se cambió el feto a otra caja petri que contenía PBS. El líquido amniótico se removió con una jeringa. Se seccionó la cola y la cabeza para congelarlas en PBS con 10% de glicerol para futuros análisis moleculares.

Se seccionó el feto por la línea media, se removió los órganos internos. Todo el tejido que forma la piel incluyendo el costillar, a excepción de las extremidades se diseccionó para realizar los cultivos. Se obtuvo secciones de la piel del feto y tejido muscular, estas se colocaron en una caja petri de 5 cm. de diámetro con PBS y antibiótico.

3.- Disgregación celular: Las piezas de tejido diseccionadas, se cortaron en pequeños trozos con ayuda de un bisturí y pinzas, los trozos se pasaron a una caja petri que contenía 4 ml de solución tripsina al 0.25% y 1mM de EDTA en PBS. Este tejido colectado y cortado, se succiono dentro y fuera de una pipeta pasteur, se puso a incubar 15 minutos a 38 °C agitando la suspensión y pipeteando para facilitar la disgregación.

4.- Sembrado y cultivo celular: Para el cultivo, previamente se precalentó el medio MEM (sigma) con suero fetal bovino al 15 % y antibiótico (Amikacina 150 µg/ml y penicilina 100 µg /ml). Para inactivar la tripsina, la suspensión se centrifugo y se retiro el sobrenadante. El pellet se resuspendió en medio de cultivo (MEM) y se centrifugo una vez mas 5 min. a 700 rpm. Se resuspendió el pelet en 2ml de medio de cultivo, esta suspensión se filtro por medio de tres capas de gasa estéril, el filtrado se centrifugo, se resuspendió en 2 ml de medio y se sembró en una caja de petri de 10 cm. y se puso a incubar a 38.5 °C con 90 % de humedad relativa en 5% de CO<sub>2</sub> y aire filtrado. Los cultivos se examinaron después de 24 hrs. Para estas células el número de pasajes fue de 4.

## **5.2 Cultivo de Fibroblastos de adulto**

Las células de fibroblasto adulto fueron cultivadas de una biopsia de tejido de la oreja de bovinos adultos de la raza Holstein, biopsia de oreja de 1 cm. de hembra y macho adultos.

Se colocaron en PBS y antibiótico, la muestra de tejido se lavo varias veces en PBS, la muestra se disecciono en cuadros de 1 mm<sup>2</sup>, el tejido fue transferido a una caja de

cultivo de 100 mm<sup>2</sup> en un medio Dulbecco Modificado de Eagle's (DMEM) + 10% de suero fetal bovino, 10,000 U/ml de penicilina G, 10,000 ug/ml de estreptomina y se cultivo a 39°C, y 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Cuando el cultivo se torno confluyente (alrededor de 10 días) las células fueron tripsinizadas por 5 min. y se recuperaron por centrifugación a 800 RPM, el pelet resultante fue resuspendido en el medio de cultivo anterior y cultivado una parte hasta su uso.

Para preservar las células de fibroblasto se congelaron de la siguiente manera. Las células fueron congeladas en DMEM-F12 conteniendo 10% de Dimetil Sulfoxido, se reposaron las células en este medio y se introdujeron al ultracongelador a -80° C. Las células para la transferencia nuclear fueron del pasaje 4.

### **5.3 Obtención y maduración de ovocitos in vitro de bovino**

Los ovarios fueron colectados en el rastro directamente del aparato reproductivo, se seccionaron los ovarios y se transportaron al laboratorio en la solución salina fisiológica con penicilina a una concentración de 100, 0000 UI por litro, se enjuagaron y se seleccionaron los ovarios para su aspiración, descartando aquellos ovarios que se encontraron en anestro.

Obtención de ovocitos: los folículos de 2 a 7 mm de diámetro fueron aspirados utilizando una jeringa de 10 cm. con una aguja de calibre 19 G. El líquido folicular recuperado fue vaciado a un tubo cónico de plástico de 50 ml. donde se dejo sedimentar a baño maría a 38°C durante 15 minutos. Se deposito el liquido folicular en cajas petri de 10 cm. donde fueron colectados el complejo cúmulos ovocito CCO de mejor calidad de acuerdo a su clasificación morfológica. Una vez colectados los CCO fueron puestos en gotas de medio de cultivo 199 (TCM-199) suplementado con 20 mM

de Hepes, 0.4 % de suero albúmina bovina, 0.2 mM de piruvato de sodio y 100 U7ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina. Los CCO se lavaron y posteriormente fueron transferidos al medio de maduración que consistió del medio TCM-199 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 0.2 mM de piruvato de sodio, 35ug/ml de FSH (Foltropin) ,10 mg de insulina humana y penicilina estreptomina a la concentración anterior. Las cajas se transfirieron a la estufa a una temperatura de 39°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y una saturación de humedad superior al 90 % durante 20 hrs.

#### **5.4 Enucleación y reconstrucción nuclear**

Inicialmente se prepararon todos los medios necesarios para desnudar, manipular, fundir, activar y cultivar. Se calentó una alícuota de hialuronidasa a 39° C una hora antes de desnudar. Se preparo aproximadamente 25 ml de medio de manipulación a partir del stock de medio TCM más hepes adicionándole 50 µg/ml de gentamicina y 5 % de suero fetal bovino (SFB) y se mantuvo a 37 °C en la incubadora sin CO<sub>2</sub>. A partir de este medio de manipulación se preparo 10 ml para la micromanipulación adicionando 75 µl para una concentración de trabajo de 7.5 µg/ml. Después de 18 horas de maduración los ovocitos fueron desnudados con hialuronidasa en TCM-199 hepes durante 5 min. en vórtex , posteriormente se lavaron en medio de manipulación. Se seleccionaron los ovocitos con cuerpo polar, citoplasma oscuro y homogéneo para clonación. Antes de la micromanipulación los ovocitos fueron incubados en medio PBS adicionando 7.5ug/ml de citoquelacina B y 0.3% de sacarosa durante 10 minutos. Se descongelo un vial celular a 37 °C. Previamente se calentó DMEM con 5 % de suero



fetal bovino, se centrifugo a 800 rpm por 15 min. en el mismo medio añadiendo 5 ml. Se descarto con cuidado el sobrenadante y se resuspendió 10 veces en 5 ml de DMEM con 5-10 % de SFB. Se procedió a enuclear los ovocitos los cuales se pasaron a las placas, en el micromanipulador los platos cromosómicos fueron removidos usando una pipeta de vidrio de 20 micras de diámetro interno, el plato metafásico con un mínimo volumen de citoplasma fue removido al eyectar una protucion en el espacio perivitelino, inmediatamente después, se reconstruyo el citoplasma con las células de fibroblasto y se procedio a la organización de la polaridad del ovocito-fibroblasto.

### **5.5 Activación:**

Se preparo la cicloheximida para la activación, 10 µl del stock de cicloheximida en 1 ml de TCM Hepes para una concentración de trabajo de 10 pg/ml.. El Etanol se utilizo al 7 % en medio TCM Hepes. 5 minutos en medio de manipulación, se lavo con medio de manipulación varias veces, y después en TCM Hepes. 5 horas en cicloheximida (10 pg/ml) en TCM Hepes se incubaron los pre-embriones en atmósfera 5 % de CO<sub>2</sub> a 39° C. los ovocitos como grupo control se activaron con el protocolo de Etanol para producir embriones partenogénicos.

### **5.6 Desarrollo de embriones clónicos in vitro**

48 horas Pos incubación se sacaron los óvulos degenerados y sin fragmentación, los pre-embriones con segmentación se lavaron 3 veces en TCM Hepes y se pasaron a SOF aa, se incubo durante 5 días en la incubadora a 38.5 °C con una humedad relativa

del 90% y una mezcla de gases compuesta por 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de Nitrógeno. Los embriones se evaluaron a los días 5 y 7 a partir de su activación.

### **5.7 Diseño Experimental**

Desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear de fibroblasto tanto de origen fetal como de adulto de macho y hembra en ovocitos madurados y enucleados.

Células de fibroblasto fetales de hembra y macho, cultivados en el pasaje 4, fueron usados para la reconstrucción nuclear de ovocitos en MII previamente enucleados, tanto para la enucleación, reconstrucción y activación se midieron sus efectos en respuesta a los porcentajes de fusión, división, mórulas, blastocistos y en degeneración. Como valor de referencia se utilizó un grupo control de ovocitos activados. Para este experimento se propuso contar con tres repeticiones, para cada repetición se contó con 50 ovocitos por tratamiento y 20 ovocitos para el grupo control, el efecto de fibroblastos fetales y el sexo fueron medidos por el desarrollo embrionario temprano utilizando la prueba de  $\chi^2$ . Programa SPSS para Windows Versión 7.52S

## 6.- Resultados

Los resultados que permitieron establecer el desarrollo de embriones por transferencia nuclear de células de fibroblasto se presentan a continuación.

Los resultados que presenta la relación de la actividad ovárica y la calidad de CCO colectados se presentan en el Cuadro 3. La colección de CCO aspirados de ovarios que presentaron cuerpo lúteo para las clases 1-3, 4-5 y ovocitos con fibrina fueron 990, 1190 y 201 respectivamente, así como los CCO aspirados de ovarios sin cuerpo lúteo con actividad folicular para las clases 1-3, 4-5 y ovocitos con fibrina fueron 846, 1534 y 148 respectivamente. Los ovarios que no presentaron actividad folicular ni lúteal fueron descartados. Con un total de 4909 CCO evaluados, la calidad de CCO fue mayor para los CCO aspirados de ovarios que no presentaron cuerpo lúteo en comparación a aquellos que se aspiraron de ovarios con cuerpo lúteo, así mismo se encontró diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) ente las dos variables.

**Cuadro 3.** Relación de la actividad ovárica con la calidad de CCO colectado.

Actividad ovárica	Clases 3, 4 y 5	Clases 1, 2	Fibrina 6	Total
Con cuerpo lúteo	990	1190	201	2381
Sin Cuerpo lúteo	846	1534	148	2528
total	1836	2724	349	4909

Chi-Sq =58.435 DF = 2, P – Value = 0.000

Los resultados que presenta la suplementación con o sin insulina aplicada a la maduración de ovocitos in vitro se muestran en el Cuadro 4. La maduración que presentaron los ovocitos suplementados con insulina para las clases GV, MI y MII fueron 37, 160 y 213 respectivamente, así mismo para la maduración de ovocitos in vitro sin suplementación con insulina fueron: 49, 208, 142 respectivamente. Con un total de 809 ovocitos evaluados, la maduración hasta metafase II suplementada con insulina fue mayor en comparación cuando la insulina no fue suplementada. Sin embargo, para Metafase I (MI) se observa una ligera activación de los procesos de maduración sin llegar a Metafase II (MII). Así mismo, se encontró diferencias significativas ( $\alpha < 0.01$ ) entre las dos variables.

**Cuadro 4.** Maduración de ovocitos in vitro suplementados con o sin insulina.

suplementos	GV	MI	MII	ovocitos
Con Insulina	37	160	213	410
Sin insulina	49	208	142	399
total	86	368	355	809

Chi-Sq =21.990 DF = 2, P – Value = 0.000

Los resultados que se presentan en el Cuadro 5 citan el efecto de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo de embriones partenogénéticos. En esta tabla se muestra la concentración de sacarosa que se usó a 0.3 moles, 0.7 moles y 1 mol y su relación sobre la proyección metafásica, la división celular y la formación de blastocistos encontrándose que para 0.3 moles 99, 64 y 34 blastocistos se obtuvieron para sus

variables de medición respectivamente, para 0.7 moles 84, 55 y 28 blastocistos se obtuvieron para sus variables de medición respectivamente, y para la sacarosa a 1 mol se obtuvieron 83, 49 y 23 embriones respectivamente para las variables antes mencionadas con una muestra total de 519 óvulos trabajados. Cuando se realizó el análisis estadístico no se encontró diferencias significativas entre la concentración de 0.3, 0.7 y 1 mol en la evaluación de su efecto para la formación de blastocistos. No se encontró diferencias significativas con P – Value = 0.963.

**Cuadro 5.** Efecto de la concentración de la sacarosa sobre el desarrollo de embriones partenogénéticos.

<b>concentración</b>	<b>Proyección metafásica</b>	<b>División</b>	<b>blastocistos</b>	<b>totales</b>
<b>Sacarosa 0.3 mol</b>	99	64	34	197
<b>Sacarosa 0.7 mol</b>	84	55	28	167
<b>Sacarosa al 1 mol</b>	83	49	23	155
<b>total</b>	266	168	85	519

Chi-Sq = 0.605 DF = 4, P – Value = 0.963

En el Cuadro 6. se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos fetales de ambos géneros. En este cuadro se analizan las variables de ovocitos reconstruidos con fibroblastos fetales tanto de hembra como de macho y se mide el efecto sobre las variables de fusión, división, mórulas y blastocistos. Para el uso de fibroblastos fetales de hembra se encontraron 150, 102, 55 y 37 para las variables antes mencionadas respectivamente,

así mismo, para fibroblastos fetales de macho 150, 105, 46 y 30 respectivamente. También, se utilizó un grupo control de óvulos que fueron activados partenogénicamente utilizando la activación por fusión encontrándose 60 ovocitos control, 42, 17 y 14 respectivamente. Un total de 360 óvulos fueron trabajados y se obtuvo 81 blastocistos. No se encontraron diferencias significativas para las dos variables medidas con  $P - \text{Value} = 0.939$ .

**Cuadro 6.** Desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos fetales de ambos géneros.

	<b>fusionados</b>	<b>divididos</b>	<b>mórulas</b>	<b>blastocistos</b>
<b>Ovocitos reconstruidos con fibroblastos fetales de hembra</b>	150	102	55	37
<b>Ovocitos reconstruidos con fibroblastos fetales de macho</b>	150	105	46	30
<b>Ovocitos control</b>	60	42	17	14
<b>Totales</b>	360	149	118	81

Chi-Sq = 1.776 DF = 6,  $P - \text{Value} = 0.939$

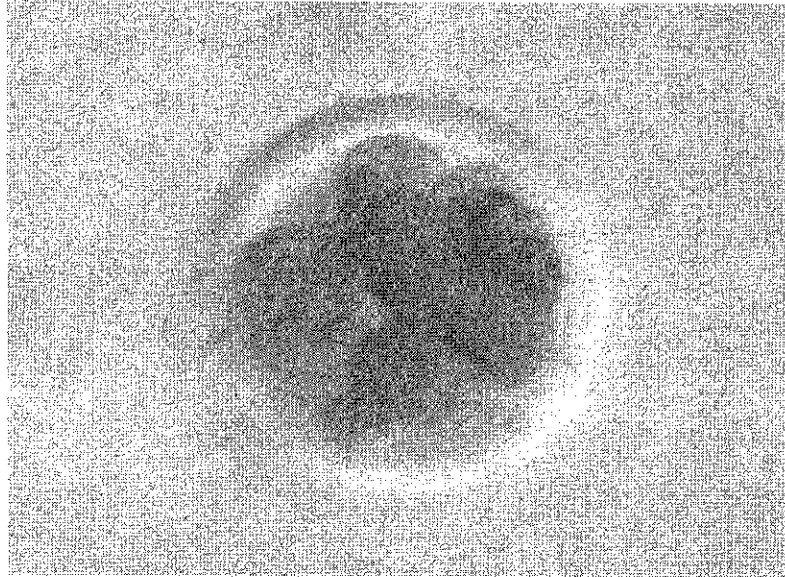
En el Cuadro 7 se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos adultos de ambos géneros. En esta tabla se analizan las variables de ovocitos reconstruidos con fibroblastos adultos tanto de hembra como de macho y se mide el efecto sobre las variables de fusión, división, mórulas y blastocistos. Para el uso de fibroblastos adulto de hembra se encontraron 150, 98, 50 y 31 para las variables antes mencionadas respectivamente,

así mismo, para fibroblastos fetales de macho 150, 108, 45 y 27 respectivamente. También, se utilizó un grupo control de óvulos que fueron activados partenogenéticamente encontrándose 60 ovocitos control, 38, 15 y 12 respectivamente. Un total de 360 óvulos fueron trabajados y se obtuvo 70 blastocistos. No se encontraron diferencias significativas para las dos variables medidas con  $P - \text{Value} = 0.945$

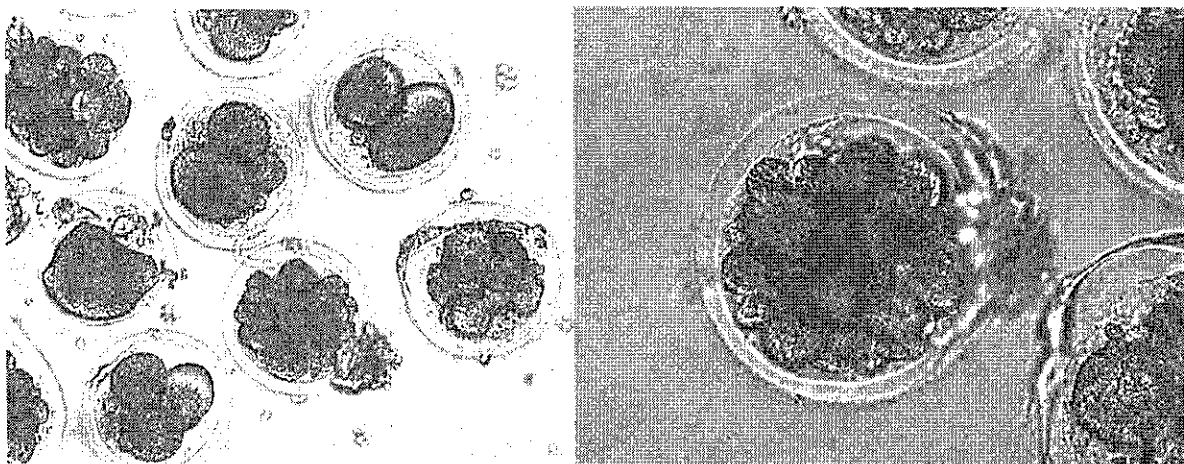
**Cuadro 7.** Desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos de adulto de ambos géneros.

	<b>fusionados</b>	<b>divididos</b>	<b>mórulas</b>	<b>blastocistos</b>
<b>Ovocitos reconstruidos con fibroblastos adultos de hembra</b>	150	98	50	31
<b>Ovocitos reconstruidos con fibroblastos adultos de macho</b>	150	108	45	27
<b>Ovocitos control</b>	60	38	15	12
<b>Totales</b>	360	244	110	70

Chi-Sq = 1.776 DF = 6,  $P - \text{Value} = 0.945$



**Figura 8** Embriones reprogramados nuclearmente de 72 hrs pos activación con una fragmentación blastomérica y con blastomeos en degeneración así como una desigualdad en el estadio de segmentación.



**Figura 9** En el lado izquierdo se muestra embriones reprogramados nuclearmente (8-16 blastomeros) con una fragmentación blastomérica y una desigualdad en el estadio de segmentación, en el lado derecho tenemos una morula temprana (de 16 a 32 células).



## **7.-Discusión.**

Los nuevos modelos experimentales de reprogramación celular aplicados a los programas de transferencia nuclear de células somáticas han sido modificados a partir del modelo propuesto por Ian Wilmut et al., (1997), donde la aplicación del modelo al control del ciclo celular han variado, como ejemplo tenemos los trabajos en clonación encabezados por Jose Cibelli y col. (1998) que han propuesto que no es necesaria la inducción de la quiescencia para la reprogramación nuclear, por otro lado los trabajos desarrollados por Kato y col. (1998) sobre los factores que afectan a la reprogramación y enfocados a la sincronización de la célula donante independientemente del citoplasto receptor, en base a estos estudios nosotros utilizamos el modelo clásico de reprogramación propuesto por Ian Wilmut, ya que para fines prácticos y optimizando recursos este modelo es viable ya que la reprogramación de células donantes en fase G<sub>0</sub> se puede obtener entre un 90%.

Se han probado varias estirpes celulares tanto fetales, embrionarias y de adulto de ambos géneros mas no se ha determinado con exactitud cual es la célula idónea para reprogramación. Una de las líneas celulares mas probadas hoy día son los fibroblastos de origen dérmico, los cuales han presentado una facilidad para su crecimiento y reprogramación, así como que este tejido proviene de una biopsia que no pone en riesgo la salud del donante y se puede disponer de ambos géneros.

Aunque las investigaciones continúan desarrollando alternativas viables para producir embriones clonados por transferencia nuclear de células somáticas, las fuentes del citoplasma receptor es de suma importancia en cualquier técnica que se desarrolle.

Las fuentes de ovocitos pueden provenir de ovarios que son colectados en rastro, lo que representa un gran reto en México para poder contar con un ganado libre de implantes hormonales (esteroides, anabólicos) que se utilizan hoy en día sin medida. Se sabe que la administración de estos químicos provoca perturbaciones en la dinámica folicular así como un fuerte impacto en el desarrollo de los ovarios, así mismo los diferentes estados nutricionales varían ya que la evaluación previa al entrar al sacrificio demuestra variaciones en la conformación del animal. Otras variables pueden ser la edad, el estrés por transporte así como la salud del animal.

### **Relación de la actividad ovárica con la calidad de CCO colectado**

Se encontró una variación en las consistencias del tejido ovárico de aquellos ovarios que son colectados en el rastro y las distintas patologías que se observan en los ovarios de los animales sacrificados. Se encontraron diferencias significativas de ovarios que presentaron actividad folicular con o sin cuerpo lúteo, los resultados indican que la calidad de CCO obtenidos de folículos con un diámetro de 2 a 7 mm de diámetro que provenían de ovarios sin cuerpo lúteo tuvieron mejor respuesta a la maduración *in vitro* que aquellos que provenían de ovarios con cuerpo lúteo.

Cabe señalar que aquellos ovarios que presentaron patologías así como que se encontraban sin actividad folicular o luteal fueron descartados para este trabajo.

Por lo antes citado se requieren de estudios que permitan seleccionar con certeza aquellos ovarios que sean viables para obtener citoplastos bovinos.

## **Maduración de ovocitos in vitro suplementados con o sin insulina**

El efecto que presenta la suplementación con o sin insulina aplicada a la maduración de ovocitos in vitro como un factor que promueve el crecimiento celular, se encontró que para las clases GV, MI y MII dicha suplementación fue superior su crecimiento de ovocitos *in vitro* cuando se comparo con ovocitos sin suplemento para las clases antes mencionadas, Spicer (1993) reporto que la insulina bovina aumenta la mitosis de las células de la granulosa bovina. Gong et al., (1993) reporto el efecto estimulante de la insulina sobre la proliferación de las células de la granulosa presenta un efecto de sinergismo con las gonadotropinas. Spicer et al., (1993) encontro que la insulina incrementa la produccción de progesterona y estradiol por las células de la granulosa en presencia de FSH, así mismo la suplementación al medio de maduración mejora los rangos de fertilización por el efecto directo que tiene sobre las células de la granulosa cuando es incubado en el medio de fertilización de los CCO mas espermatozoides. La insulina y el factor de crecimiento Insulinico IGF-I están relacionados con la cantidad y calidad de los cambios en la sisntesis de proteínas o en la promoción de nueva síntesis de RNA entre el estadio embrionario de 8 a 16 celulas porque la insulina estimula el transporte de aminoacidos (Gardner y Kaye, 1991). Por lo anterior se cree que la insulina pudiera soportar la proliferación celular tanto de ovulos y embriones con actividad mitogenica en las celulas granulosas y transporte de aminoácidos en ovulo y embrión bovino.

## **Efecto de la concentración de la sucrosa sobre el desarrollo de embriones partenogénéticos.**

Se han utilizado varios tipos celulares en programas de reprogramación nuclear incluyendo los derivados de fetos, embriones y de adulto como donadores para la transferencia nuclear, sin embargo los ovulos son limitados al estado de metafase II.

Como ejemplo tenemos que ovocitos enucleados en MII de ratos y fusionados con células del cumulus o fibroblastos han permitido el nacimiento de crías clonadas (Wakayama et al., 1998; Wakayama et al., 1999; Kubota 1998). Mientras que los cigotos de raton enucleados inyectados con células del cumulus son bloqueados en el estado de 2 a 4 células (Wakayama et al., 1999). Esto sugiere efectos considerables sobre la eficiencia de la transferencia nuclear de los estados del citoplasto receptor.

De los citoplasmas mas opacos, el plato metafásico alargado y los cromosomas en los ovocitos de bovino son invisibles sobre microscopia de luz estandar. La solución tradicional fue identificar la posición de los cromosomas indirectamente, localizando el primer cuerpo polar (PB1). Se asumió que los cromosomas se encuentran cerca al área del espacio perivitelino donde fue extruido el primer corpúsculo polar. Sin embargo el PB1 puede migrar de su posición original.

Un método alternativo para estimar la posición de los cromosomas indirectamente es a través de la localización del segundo cuerpo polar (PB2) (Liu J et al 2000; Nour et al., 1999). Porque el PB2 es expulsado cerca del pronúcleo después de la activación, el PB2 se mantiene cerca al material nuclear como este no ha tenido tiempo suficiente para migrar. Los rangos de enucleación mejoran hasta un 90% cuando se aspira un volumen pequeño (aproximadamente 10%) de citoplasma removido. Este método ha sido exitosamente aplicado en la clonación de cabras (Baguisi et al., 1999).

Puesto que hay un uso amplio de ovocitos en MII para transferencia nuclear, es necesario explorar métodos para mejorar la enucleación en esta etapa. Se prefiere para visualizar directamente el plato metafásico y los cromosomas. La tinción de los cromosomas de los ovocitos con Hoechst 33342 ha sido ampliamente utilizada dentro de varias especies. Sin embargo, los daños resultantes por la exposición a esta tinción y luz UV (ultravioleta) se ha divulgado extensamente (Smith et al., 1993). Recientemente, Dominko y colaboradores mejoraron la eficiencia de la enucleación hasta un 100% con la proyección de imagen dinámica del huso MII y cromosomas. Ellos microinyectaron un componente de polimerización X-rodamina-tubulina y/o un fluorocromo de larga longitud de onda que excita al ADN (Sybr14) y esto visualiza los cromosomas bajo luz común. Tales manipulaciones no dañan a los ovocitos o reducen su potencial de desarrollo. La complejidad del paso de microinyección, limita su uso práctico.

Se ha reportado previamente el uso de una solución de sacarosa de 0.09 M en el tratamiento previo de los ovocitos de ratón que puede ayudar en la visualización de cromosomas bajo microscopia de luz estándar y así mejorar perceptiblemente la eficacia de la enucleación (Wang et al., 2001).

Se encontró que en la observación de los ovocitos de buena calidad en un medio de sacarosa con una concentración de 0.09 M formó una hinchazón alrededor de los cromosomas del plato metafásico (Wang et al., 2001). Procuramos aplicar el mismo protocolo a los ovocitos bovinos pero no obtuvimos ningún efecto. Sin embargo, cuando la concentración de la sacarosa fue aumentada a 0.3 M, una proyección obvia era visible en la mayoría de los ovocitos bovinos (Cuadro 5). Cuando la concentración de la sacarosa fue aumentada a partir de la 0.3 a 1 M, seguía exhibiendo una

proyección en los ovocitos tratados. La solución hipertónica de la sacarosa hizo a los ovocitos contraerse y cambió la concentración de las proteínas del citoplasma, que puede inducir otros cambios en características de la membrana y afectar la dinámica del citoesqueleto (Wang et al., 2001). La proyección inducida por la sacarosa puede resultar de la interacción entre la actina cortical y agregado del huso y/o los cromosomas. La proyección vista en ovocitos de bovino, o la hinchazón y el área transparente observada en ovocitos, después del tratamiento de sacarosa ilustra que los ovocitos de diversas especies tienen diversas reacciones al tratamiento de la sacarosa. Por ejemplo, la sacarosa al 3% (0.09 M) es suficiente para la visualización de los cromosomas en ovocitos de ratón mientras que no tienen ningún efecto obvio en los ovocitos de bovino. Morfológicamente la proyección causada por la sacarosa de 0.3 M dentro de los ovocitos de bovino mostraron una forma piramidal y un color más ligero en la proyección que en otra parte de citoplasma, mientras que en el ratón los ovocitos tratados con sacarosa 0.09 M exhibió solamente una hinchazón redonda, lisa y un área transparente. Estas diferencias reflejan la diversa organización citoesquelética entre las especies.

Similar a los resultados encontrados en los ratones (Wang et al., 2001), cerca de un décimo de los ovocitos de bovino presentan una pobre calidad y se deforman cuando se incuban en la solución con sacarosa. La deformidad se puede causar por cambios desiguales del citoplasma heterogéneo en ovocitos con morfología pobre.

Los cambios en los ovocitos causados por la incubación en la solución hipertónica de sacarosa fueron reversibles. Se observó que los ovocitos de bovino enucleados en el medio hipertónico de 0.3 M de sacarosa recuperaron su volumen normal en 10 minutos después de lavarlos y de incubarlos en el medio isotónico sin sacarosa.

Así mismo se observó que la exposición de 1 h a 0.3 M la sacarosa es inofensiva y que no interviene en el desarrollo de embriones bovinos partenogénéticos.

El uso de tratamientos a base de sacarosa anteriormente nos permitió una confiabilidad mayor puesto que diferentes tratamientos a base de sacarosa ha sido ampliamente utilizados en la criopreservación de gametos y en varios tipos de manipulaciones que amplían del espacio del subzonal deseable, por ejemplo la inyección de espermias y la inserción de blastómeros en ovocitos.

### **Desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos fetales de ambos géneros.**

El desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear de fibroblastos fetales ha permitido el estudio de la reprogramación nuclear, las modificaciones epigenéticas en cuanto a su necesidad y al entorno bioquímico que demanda el desarrollo futuro del feto para su implantación y nacimiento del ternero.

Nosotros encontramos que al reprogramar fibroblastos de fetos los valores fueron los siguientes 37 y 30 embriones de 150 citoplastos reprogramados para cada género. Cuando comparamos los trabajos reportados por Jonathan R. Hill 2000, obtuvo 31 embriones de 156 citoplastos reprogramados. Los datos obtenidos aquí muestran que no hay diferencias significativas cuando se compara los fibroblastos de origen fetal tanto de hembras como de machos, además nos permite saber que no hay un riesgo claro en cuanto a la inactivación del segundo cromosoma X en el caso de los fibroblastos que son cultivados de fetos hembra y tal parece que las modificaciones que se esperarían por la impronta genómica para este caso, no se encuentran ligados con la inactivación de genes sexuales, así mismo no hay reportes de disfunciones

reproductivas o alteraciones de los organos sexuales tanto del macho como de la hembra.

Al no encontrar estas diferencias podemos inferir que los fibroblastos de origen fetal de ambos sexos cuando son cultivados en los pasajes 3-4 y son sincronizados a fase de Go no alteran el desarrollo del embrión hasta una etapa de blastocisto.

### **Desarrollo de embriones clonados por transferencia nuclear utilizando fibroblastos de adulto de ambos géneros.**

Los trabajos de Cibelli como los de Kato en el año de 1998, lograron establecer los primeros terneros clonados obtenidos por transferencia nuclear de células de fibroblasto. El origen de los fibroblastos adultos reprogramados por subnutrición (0.5%) de SFB, permitió que la producción de terneros clonados se replicara en diferentes laboratorios hoy en día a través del mundo.

Si bien es cierto que estos trabajos fueron los pioneros en la aplicación de la clonación en bovinos, los problemas como fallas de implantación embrionaria, absorción de fetos y abortos durante la gestación, problemas al parto y aun establecerse con vida durante las primeras semanas de vida, ha sido todo un reto para demostrar que la técnica puede ser aplicada a una escala mayor que la de investigación.

La eficiencia de la reprogramación nuclear de células somáticas depende de las diferentes variables que están implicadas ya que tienen un impacto importante en el desarrollo de la clonación como: calidad del citoplasma receptor, calidad y sincronización de la célula donante, activación y regulación del desarrollo nuclear y citoplasmático del embrión clónico así como la transferencia de este a una hembra nodriza sincronizada.



Nosotros encontramos que para los embriones clónicos desarrollados a partir de fibroblastos tanto de hembras y macho adultos fue 31 y 27 de 150 citoplastos reconstruidos, que al compararlos con los reportes de Jonathan R. Hill 2000, quien reporto similares resultados variando la disposición de suero fue de 58 de 102 citoplastos reconstruidos. Sin embargo aunque los resultados fueron similares la técnica con la que fueron desarrollados es distinta pues en nuestro trabajo no utilizamos el agente químico Hoechst 33342, la luz ultravioleta así como el 6 DMAP, que hoy se sabe que los tres son agentes mutagénicos y que sus efectos pueden ser evaluados en las distintas etapas del desarrollo embrionario, fetal y al posnacimiento.

Uno de los aportes de esta técnica implementada es el uso de sacarosa y etanol como agentes deshidratantes y a la vez activadores del desarrollo temprano del embrión.

Nuevas áreas se están explorando hoy como la reprogramación de células fibroblásticas de equinos adulto en citoplastos de bovino, así mismo la fusión de 2 y 3 citoplastos con una célula somática reprogramada técnica conocida como zona libre, que implica disolver con enzimas la zona pelúcida y enuclear de una manera sencilla el óvulo para después fusionarlo con la célula donante con una eficiencia del 100 % y una activación mayor a la alcanzado por las técnicas tradicionales.

## 8.- Conclusiones

1.- La técnica de clonación por transferencia nuclear de fibroblasto permitió alcanzar estadios de blastocistos previo a su implantación.

2.- El tratamiento con sacarosa de 0.3 a 1 Mol indujo la formación de una proyección alrededor del plato metafásico en los ovocitos madurados hasta metafase II *in vitro* permitiendo una localización directa del material nuclear, así mismo no comprometió el desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos activados para la formación de embriones partenogenéticos.

3.- El efecto del género de fibroblastos fetales sobre su reprogramación nuclear no se encontraron diferencias y no afectó el desarrollo de embriones clonados.

4.- El efecto del género de fibroblastos de adulto sobre su reprogramación nuclear no se encontraron diferencias y no afectó el desarrollo de embriones clonados.

5.- No se encontraron diferencias significativas en la evaluación de embriones clonados por transferencia nuclear, tanto en el género como en el origen de las células de fibroblasto.

## 9.- Literatura citada.

- Adams GP, Kot K, Ginther OJ. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci* 1993; 30: 259-71.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-88.
- Anderson R, Breed W. In vivo parthenogenetic activation of ovulated oocytes in a marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *Zygote* 1993; 1: 231-236.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996; 45: 943-956.
- Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1303-22.
- Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 335-344.
- Ayoub MA, Hunter AG. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *J Dairy Sci* 1993; 76: 95-100.
- Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang E, Packer A, Gyssler C, et al. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W:pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Development Suppl* 1993: 125-137.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 1999; 17:456– 461.
- Balakier H, Casper R. Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum Rep* 1993; 8: 740-743.
- Blondin P, Guilbault LA, Sirard MA. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology* 1995a; 43: 168.

Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995b; 41: 54-62.

Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology* 1996a; 46: 1191-1203.

Blondin P, Dufour M, Sirard MA. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol Reprod* 1996b; 54: 631-7.

Blondin P, Sirard MA. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef cattle oocytes. *Theriogenology* 1997; 47: 184.

Blondin P, Farin PW, Crosier AE, Alexander JE, Farin CE. In vitro production of embryos alters levels of insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid in bovine fetuses 63 days after transfer. *Biol Reprod*; 2000;62:384–389.

Boediono A, Saha S, Sumantri C, Suzuki T. Development in vitro and in vivo of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 1995; 5: 1.073 –1.079

Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ, 2002. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*; 16:1209–1219.

Bordignon V, Smith LC. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 1998; 49:29–36.

Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 43-64.

Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 165-171.

Briggs R, King T., 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs\_ eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*; 38:455–463.

Bruggerhoff. K, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Prella K, Schernthaner W, Alberio R, Kuchenho. H, Stojkovic M, Brem G, Hiendleder S, Wolf E. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: e.ect of maternal lineage of oocyte donors. *Biol Reprod* 2002; 66:367–373.

- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 1990; 43: 543-47
- Bryskov AG, Hoyer PE. Embryology of mammalian gonads and ducts. In: Knobil E and Neill J, editors. *The physiology of reproduction*. Vol 1. New York: Raven Press, 1994: 265-302.
- Byskov AG. The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol Reprod* 1978; 19: 720-35.
- Calarco PG. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Dev Genet* 1995; 16: 36-43.
- Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 1986; 43: 1115-28.
- Campbell, .H., Loi, P., Otaegui, P.J., and Wilmut, I. Cell cycle coordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev. Reprod.* 1996a;1:40-46.
- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., and Wilmut, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996b;380: 64-66.
- Cassar G, John T, Etches R. Observations on ploidy of cells and on reproductive performance in parthenogenetic turkeys. *Poult Sci* 1998; 77: 1.457-1.462.
- Carbonneau G, Sirard MA. Influence of follicular wall on meiotic resumption of bovine oocytes when cultured inside or outside hemisections. *J Reprod Dev* 1994; 40: 125-132.
- Carolan C, Lonergan P, Monget P, Monniaux D, Mermillod P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 477-83.
- Chang M. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization, and subsequent development in the fallopian tubes. *J Exp Zool* 1955; 128: 378-405
- Channing CP, Hillensjo T, Schaerf FW. Hormonal control of oocyte meiosis, ovulation and luteinization in mammals. *Clin Endocrinol Metab* 1978; 7: 601-24.
- Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, LeBourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 1596-1603.

Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20:366–369.

Chesnel F, Eppig JJ. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 503-8.

Christmann L, Jung T, Moor RM. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 1994; 38: 85-90.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, and Robl, J.M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998a;280:1256–1258.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce, de Leon., and Robl, J.M. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell derived stem like cells *Nat. Biotechnol.* 1998b;16:642–646.

Coviello Mclaughlin, G.M. & Prowse, K. R. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25, 3051-3058.

Cran DG. Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 38: 49-62.

Crozet N, Kanka J, Motlik J, Fulka J. Nucleolar fine structure and RNA synthesis in bovine oocytes from antral follicles. *Gam Res* 1986; 14: 65-73.

Crozet N. Nucleolar structure and RNA synthesis in mammalian oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 38: 9-16.

Daen FP, Sato E, Naito K, Toyoda Y. The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 667-73.

Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod* 2000; 63:1034–1040.

De Sutter P, Dozortzev d, Cieslak j, Wolf g, verlinsky y, Dyban a. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *Assist Reprod Gen* 1992; 9: 740-743.

De la Fuente R, KING A. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod* 1998; 58: 952-962.

De Loos F, Kastrop P, Van Maurik P, Van Beneden TH, Kruip TAM. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Mol Reprod Dev* 1991; 28: 255-9.

De Loos FA, Zeinstra E, Bevers MM. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 162-5.

Di Berardino MA, Animal cloning – the route to new genomics in agriculture and medicine. *Differentiation* 2001; 68:67–83.

Dieleman SJ, Kruip TAM, Fontijne P, de Jong WHR, van der Weyden GC. Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentration in follicular fluid and in micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J Endocrinol* 1983; 97: 31-42.

Dinnyes, De Sousa P, King T, Wilmut I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells* 2002; 4:81-90.

Dominko T, First NL. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 456-67.

Dominko T, Chan A, Simerly C, Luetjens CM, Hewitson L, Martinovich C, Schatten G. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol Reprod* 2000; 62:150–154.

Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 1986; 44: 831-8.

Dostal J, Pavlok A. Isolation and characterization of maturation inhibiting compound in bovine follicular fluid. *Reprod Nutr Dev* 1996; 36: 681-90.

Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 454-8.

Downs SM, Daniel SA, Bornslaeger EA, Hoppe PC, Eppig JJ. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Res* 1989; 23: 323-34.

Downs SM, Eppig JJ. Cyclic adenosine monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinology* 1984; 114: 418-27.

Driancourt MA. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 1991; 35: 55-68.

Ducibella T, Duffy P, Buetow J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 1994; 50: 467-73.

Dupont, G., 1998. Link between fertilization-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations and relief from metaphase II arrest in mammalian eggs: a model based on calmodulin-dependent kinase II activation. *Biophys. Chem.* 72, 153-167.

Dunphy WG, Kumagai A. The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 1991; 67: 189-96.

Duranthon V, Renard JP. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 2001; 55: 1277-89.

Dyban AP, Baranow WS. haploidie. In: DYBAN AP, BARANOW, ES (eds): *Die Zytogenetik der Sauger- Embryogenese*. Pareys Studentexte 64, Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey ; 1989: 216-268.

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *The pelvic and reproductive organs of the female ruminants*. Philadelphia: W B Saunders Company, 1987.

Eddy EM, Clark JM, Gong D, Fenderson BA. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gam Res* 1981; 4: 333-62.

Edwards R. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovaries. *Nature* 1965; 208: 349-351.

Edwards JL, Dorado CM, Wilson TJ, Schrick FN. Development of cloned embryos reconstructed with serum fed or serum starved adult granulosa cells. *Theriogenology* 2001; 55:265.

Edwards JL, Powell AM, Talbot NC, Garrett WM, Pursel VG. Developmental potential of reconstructed embryos activated immediately or 4 hours after assessment of fusion with fetal fibroblasts. *Theriogenology* 1999; 51:202.



Edwards JL, Schrick FN, Dorado CM, Miller J, McCann L, Wilson TJ, Malone M, Hockett M, Towns TM, Blackmon H, Welborn M, Hopkins F. Cloning of an adult Jersey cow using proliferating somatic cells. National Swine Improvement Federation Proceedings; 2000; 25:40.

Edwards JL, Schrick FN, McCracken MD, van Amstel SR, Hopkins FM, Welborn MG, Davies CJ. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *AJRI* 2003; 50:113–123.

Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W, Yanagimachi R, Jaenisch R. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 2000; 290:1578–1581.

Enright BP, Taneja M, Schreiber D, Riesen J, Tian XC, Fortune JE, Yang X. Reproductive characteristics of cloned heifers derived from adult somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66:291–296.

Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod* 1985; 33: 1041-9

Eppig JJ, Downs SM. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod* 1984; 30: 1-11.

Erikson BH. Development and senescence of the post natal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 1966; 25: 800-05.

Erikson E, Maller JL. Biochemical characterization of the p34cdc2 protein kinase component of purified maturation-promoting factor from *Xenopus* eggs. *J Biol Chem* 1989; 264: 19577-82.

Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 1994; 50: 233-8

Evans AC, Adams GP, Rawlings NC. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *J Reprod Dev* 1994; 102: 462-70.

Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 437-42.

Fair T, Hyttel P, Greve T, Boland M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Mol Reprod Dev* 1996; 43: 503-12.

Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 1995; 52:676–682.

First NL, Prather RS. Production of embryos by oocyte cytoplasm–blastomere fusion in domestic animals. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 43:245–254.

Fissore RA, He CL, Vande Woude GF. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55: 1261-70.

Forsberg EJ, Betthausen J, Strelchenko N, Golueke P, Childs L, Jurgella G, et al. Cloning non-transgenic and transgenic cattle. *Theriogenology* 2001;55:269

Forsberg EJ, Strelchenko NS, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsythe TM, Golueke PJ, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pace MM, P.ster- Genskow M, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Production of cloned cattle from in vitro systems. *Biol Reprod* 2002; 67:327–333.

Fukui Y, Sakuma Y. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol Reprod* 1980; 22: 669-73.

Fulka J, Jr., Jung T, Moor RM. The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1992; 32: 378-82.

Gandolfi F, Luciano AM, Modina S, Ponzini A, Pocar P, Armstrong DT, et al. The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology* 1997; 48: 1153-1160.

Gandolfi F. Embryonic development as a function of oocyte competence. In: Lauria A, Gandolfi F, Enne G and Gianaroli L, editors. *Gametes development and function*. Rome: Serono Symposia, 1998: 337-53.

Gardner, H.G. and P.L. Kaye. 1991. Insulin increase cell numbers and morphological development in mouse preimplantation embryos in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, 3: 79-92.

Garry FB, Adams R, McCann JP, Odde KG. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 1996; 45:141–152.

- Gautier J, Norbury C, Lohka M, Nurse P, Maller J. Purified maturation promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Cell* 1988; 54: 433-39.
- Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, Miyoshi K, Waltensburg R, Respass D, Venable A, Stice S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66:895-900.
- Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1989a; 20: 187-200.
- Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L. Intraovarian relationship among dominant and subordinate follicles and corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 1989b; 32: 787-95.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989c; 87: 223-30.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 2001a; 65: 638-47.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Beg MA, Kot K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. *Biol Reprod* 2001b; 65: 345-50.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1996; 55: 1187-94.
- Gong, J.G., D. McBride, T.A. Bramley and R. Webb. 1993. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *Journal Endocrinology*, 139: 67-75.
- Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International, 1994.
- Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 1990; 33: 77-87.
- Gosden RG. Ovulation 1: Oocyte development throughout life. In: Grudzinskas JG and Yovich JL, editors. *Gametes - The oocyte*. Vol III. Cambridge: Cambridge University Press, 1995: 119-49.

- Gosden, R.G. (1998) Biology and technology of primordial follicle development. In: Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G., and Gianaroli, L. (eds) *Gametes: Development and Function*. Sorono Symposia, Rome, pp,71-83.
- Goto Y, Kaneyama K, Kobayashi S, Imai K, Shin-noh M, Tsujino T, Nakano T, Matsuda S, Nakane S, Kojima T. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. *Anim Sci J* 1999; 70:243–245.
- Gottlieb y Zchori-Fein. Phylogenetic analysis of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in the genus *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Mol Biol* 1998; 7: 393-396.
- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis. *Endocrine Rev* 1996; 17: 121-155.
- Govoni KE, Tian XC, Kazmer GW, Taneja M, Enright BP, Rivard AL, Yang X, Zinn SA. Age-related changes of the somatotropic axis in cloned Holstein calves. *Biol Reprod* 2002; 66:1293–1298.
- Greenwalt GS, Terranova PF. Follicular selection and its control. In: Knobil E and Neill J, editors. *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988: 387-445.
- Greider, C.W. & Blackburn, E.H. (1985) *cell* **51**, 887-898
- Greve T, Xu KP, Callesen H, Hyttel P. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *J of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1987; 4: 281-5.
- Gurdon, J.B. & Colman, A. (1999) *Nature* (Londres) **402**, 743-746.
- Gwatkin RB, Andersen OF. Hamster oocyte maturation in vitro: inhibition by follicular components. *Life Sci* 1976; 19: 527-36.
- Han Y.M, Kang Y.K, Koo D.B, Lee K.K. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2003; 59: 33-44.
- Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyake M, Kato S. Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: Effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology* 1997; 48: 743-755.
- Harley, C.B., Flutcher, A. B. & Greider, C.W. (1995) *Nature* (Londres) **345**, 458-460.
- Blackburn, E.H. (1991) *Nature* (Londres) **350**, 569-573
- Harrison RJ, Weir BJ. Structure of the mammalian ovary. In: Zuckerman L and Weir BJ, editors. *The ovary I: General Aspects*. New York: Academic Press, 1977.

Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol* 1988; 126: 242-52.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995; 43:141-152.

Hasler JF. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals with an emphasis on the bovine. *J Anim Sci* 1998; 76:52-74.

Hazeleger NL, Hill DJ, Stubbings RB, Walton JS. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 1995; 43: 509-522.

Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 2000; 53: 11-20.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;66:6-13.

Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller MW. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 1999;51:1451-1465.

Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod* 2000a;62:1135-1140.

Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer T, Thompson JA, Winger QA, Westhusin M. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2000b; 63:1787-1794.

Hillensjo T, Batta SK, Schwartz-Kripner A, Wentz AC, Sulewski J, Channing CP. Inhibitory effect of human follicular fluid upon the maturation of porcine oocytes in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 1332-5.

Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* 1991a; 124: 46-101.

Hirshfield AN. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol Reprod* 1991b; 44: 1157-62.

Holt, S.E., Wright, W.E., & Shay, J.W. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 2932-2939

Homa ST, Brown CA. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 153-60.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001; 293:95-97.

Hunter AG, Moor RM. Stage dependent effects of inhibiting RNA and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J Dairy Sci* 1987; 70: 1646-1651.

Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil* 1986a; 76: 645-56.

Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 1986b; 78: 615-25.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47: 23-32.

Ireland JJ, Roche JF. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: Changes in serum hormone, steroids in follicular fluid and gonadotropin receptors. *Endocrinol* 1982; 111: 2077-2086.

Ireland JJ, Roche JF. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J Anim Sci* 1983; 57: 157-67.

Jacobs T. Control of the cell cycle. *Dev Biol* 1992; 153: 1-15.

Johnson M, Pickering S, Braudet P, Vincent C, Cant A, Currie J. Acid Tyrode's solution can stimulate parthenogenetic activation of human and mouse oocytes. *Fertil Steril* 1990; 53: 266-270.

Jones, K.T., Whittingham, D.G., 1996. A comparison of sperm- and IP3-induced Ca<sup>2+</sup> release in activated and aging mouse oocytes. *Dev. Biol.* **178**, 229-237

Kadam AL, Koide SS. Identification of hypoxanthine in bovine follicular fluid. *J Pharm Sci* 1990; 79: 1077-82.

Kasinathan P, Knott JG, Wang Z, Jerry DJ, Robl JM. Production of calves from G1 .broblasts. *Nat Biotechnol* 2002; 19:1176–1178.

Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruip TAM. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 1990a; 26: 222-6.

Kastrop PM, Bevers MM, Destree OH, Kruip TAM. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fertil* 1990b; 90: 305-10.

Kato, Y., Tani, T, Sotomaru, Y., Kurokawa, K, Kato, J, Doguchi, H, Yasue, H, and Tsunoda, Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998;282:2095–2098.

Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 2000; 120:231–237.

Kaufman M. Parthenogenesis: a system facilitating understanding of factors that influence early mammalian development. In: HARRISON R, HOLMES R, eds. *Progress in Anatomy*. Cambridge: Cambridge University Press; 1981: 1-34.

Kazuchika Miyoshi, S. Jacek Rzucidlo, Scott L. Pratt, and Steven L. Stice. Improvements in cloning efficiencies may be possible by Increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod* 2002;66:895-900.

Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Ka.di N, Wang B, Bladassarre H, Karatzas CN. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66:199–203.

Kirschner, M.W. (1992) *impoirtant Adv. Oncol.* 3-16 King R.W., Deshaies, R.J. , Peters, J.M. & Kirschner, M.W. (1996) *Science* **274**, 1652-1659.

Kishi M, Itagaki Y, Takakura R, Imamura M, Sudo T, Yoshinari M, Tanimoto M, Yasue H, Kashima N. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived .broblast cells. *Theriogenology* 2000; 54:675–684.

Klotz C, Dabauvalle M, Paintraind M. Parthenogenesis in *Xenopus* eggs requires centrosomal integrity. *J Cell Biol* 1990; 110: 405-415.

Kruip TA, Dieleman SJ. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod Nutr Dev* 1982; 22: 465-73.

Kubelka M, Motlik J, Fulka JJ, Prochazka R, Rimkevickova Z, Fulka J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and paminobenzamidine block. *Gam. Res.* 1988; 19: 423-431.

Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N, Barber M, Yang X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:990-995.

Kubota C, Yang X, Dinnyes A, Todoroki J, Yamakuchi H, Mizoshita K, Inohae S, Tabara N. In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:281-286.

Kuwana T, Fujimoto T. Active locomotion of human primordial germ cells in vitro. *Anat Rec* 1983; 204: 21-5.

Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greentein JL, Im GS. Production of  $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase Knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295:1089-1092.

Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ, Wettstein PJ, Blackwell C, Borson N, Hofmeister E, Schuch G, Soker S, Moraes CT, West MD, Atala A. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotechnol* 2002; 20:689-696.

Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 2000a;288:665-669.

Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. Cloning of endangered species (*Bosgaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2000b; 2:79-90.

Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Blackwell, C., Cristofalo, V.J., Francis, M.K., Baerlocher, G.M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E.A., Sawyer, N, et al. (2000) *Science* **288**, 665-669.

Lawrence, Y., Ozil, J.P., Swann, K., 1998. The effects of a  $Ca^{2+}$  chelator and heavy-metal-ion chelators upon  $Ca^{2+}$  oscillations and activation at fertilization in mouse egg suggest a role for repetitive  $Ca^{2+}$  increases. *Biochem. J.* 335, 335-342.



Laurincik J, Krosiak P, Hyttel P, Pivko J, Sirotkin AV. Bovine cumulus expansion and corona-oocyte disconnection during culture in vitro. *Reprod Nutr Dev* 1992; 32: 151-61.

Levesque JT, Sirard MA. Effects of different kinases and phosphatases on nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 114-21.

Levesque JT, Sirard MA. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biol Reprod* 1996; 55: 1427-1436.

Lechniak D, Cieslak D, Sosnowski J. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology* 1998; 49: 779-785.

Levron J, Cohen J, Willadsen S. Highly effective method of human oocyte activation. *Zygote* 1995; 3:157-161.

Liu JL, Wang MK, Sun QY, Xu Z, Chen DY. Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer. *Theriogenology* 2000; 54:989-998.

Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 301-07.

Mannen, H., Kojima, T., Oyama, K., Mukai, F., Ishida, T., Tsuji, S., 1998. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.* 76, 36-41.

Marshall V, Wilton I, Moore H. Parthenogenic activation of Marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of Marmoset parthenogenotes in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1998; 59: 1.491-1.497.

Matzuk F, Meyer H, Horsmann C. A specific alphas-tubulin is associated with the initiation of parthenogenesis in Salmo wheat lines. *Hereditas* 1997; 126: 219-224.

McCracken M, Bochsler P, Schrick F, Hopkins F, Welborn M, Edwards J. Pathologic changes in late term fetuses and neonates cloned from an adult Jersey cow. *Vet Pathol* 2001; 38:77.

McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000; 405: 1066-1069.

McGrath, J., and Solter, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 1984;226:1317-1319.

McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-14.

Miyashita N, Shiga K, Yonai M, Kaneyama K, Kobayashi S, Kojima T. Remarkable differences in telomere lengths among cattle derived from different cell types. *Biol Reprod* 2002;66:1649-55.

Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1977; 49: 101-9.

Motta, P.M., Nottola, s.a. and Makabe, S. (1997) Natural history of the female germ from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *European Journal of obstetrics and Gynaecological reproduction* 75, 5-10.

Nakada, K., Mizuno, J., 1998. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. *Theriogenology* 50, 269-282.

Nagy A, Sass M, Markkula M. Systematic nonuniform distribution of parthenogenic cells in adult mouse quimeras. *Development* 1989; 106 : 321- 324

Nagai T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res* 1987; 3: 243-249.

Napolitano L. The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *J Cell Biol.* 1963; 18: 663-679.

Nour MS, Takahashi Y. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 1999; 51:661-666.

Nurse P. Universal control mechanism regulating the onset of M-phase. *Nature* 1990; 344: 503-8.

Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda k, Awata T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000;289:1188-90.

Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 1997; 48: 769-774.

Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeiser TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, P.ster-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod* 2002; 67:334–339.

Pardee, A.B., (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **71**, 1286-1290

Picton HM. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 2001; 55: 1193-210.

Piedrahita JA, Wells DN, Miller AL, Oliver JE, Berg MC, Peterson AJ, Tervit HR. Effects of follicular size of cytoplasm donor on the efficiency of cloning in cattle. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:317–326.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dal Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Coleman A, Campbell KHS. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407:86–90.

Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987; 37:859–866.

Prather, R.S., Sims, M.M., Maul, G.G., First, N.L., and Schatten, G. Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis. *Biol. Reprod.* 1989a;41:123–132.

Prather, R.S., Sims, M.M., and First, N.L. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 1989b;41: 414–418.

Prather RS, First NL. Nuclear transfer in mammalian embryos. *Int Rev Cytol* 1990; 120:169–190.

Rajakoski E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta Endocrinol* 1960; 52: 6-68.

Ritchie WA, Campbell KHS. Intracytoplasmic nuclear injection as an alternative to cell fusion for the production of bovine embryos by nuclear transfer. *J Reprod Fertil* 1995; 15:175.

Rodgers RJ, van Wezel IL, Irving-Rodgers HF, Lavranos TC, Irvine CM, Krupa M. Roles of extracellular matrix in follicular development. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; 54: 343-52.

Rouillier P, Matton P, Dufour M, Sirard MA, Guilbault LA. Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural granulosa cells: development of an in vitro model to study estradiol production. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 170-7.

Rüsse I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 1983; 24: 77-92.

Schatten G, Simerly C, Schatten H. Maternal inheritance of centrosomes in mammals? Studies on parthenogenesis and polyspermy in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 6.785-6.789.

Schnieke AE, Kind Aj, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278:2130-2133.

Schutz, M.M., Freeman, A.E., Lindberg, G.L., Koehler, C.M., Beitz, C., 1994. The effect of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. *Livestock Prod. Sci.* 37, 283-295.

Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. Pullman, WA: Current Conceptions, Inc, 1997.

Sirard MA, Bilodeau S. Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1990a; 89: 459-65.

Sirard MA, Bilodeau S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biol Reprod* 1990b; 43: 777-83.

Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 1996; 42: 417-426.

Sirard MA, Richard F, Mayes M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: A review. *Theriogenology* 1998; 49: 483-497.

Sirard MA, Roy F, Mermillod P, Guilbault LA. The origin of follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44: 85-94.

Shiels, P. G., Kind, A. J., Campbell, K. H., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A. & Schinieke, A.E., (1999) *Nature* 399, 316-117.

Shiga K, Fujita T, Hirose K, Sasae Y, Nagai T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology* 1999; 52:527–535.

Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002a; 415:859.

Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Renard J-P. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnol* 2002b;20:366-9.

Telford, N.A.,

Smith LC. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil* 1993;99:39–44.

Spicer, L.J., E. Alpizar and S.E. Echtenkamp. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I and gonadotrophins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production in vitro. *Journal Animal Science*, 71: 1232-12421.

Stephano J, Gould M. Parthenogenesis in *Urechis caupo* (Echiura). I. Persistence of functional maternal asters following activation without meiosis. *Dev Biol* 1995; 167: 104-117.

Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988; 39:657–664.

Stice SL, Strelchenko NS, Keefer CL, Matthews L. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* 1996; 54:100-110.

Stouthamber R, Breeuwert J, Lucky R, Werren J. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 1993; 361: 66-68.

Surani H, Barton S, Kaufman M. Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilized embryos. *Nature* 1977; 270: 601-603.

Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V, First NL. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Biol* 1994; 166:729–739.

Sun, F.Z., Hoyland, J., Huang, X., Mason, W., Moor, R.M., 1992. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 115, 947–956.

- Szollosi D. Maturation de l'ovocyte. Paris: Ministère de la Recherche et de la Technologie (DIST), 1991.
- Tani T, Kato Y, Tsunoda Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod* 2001; 64:324–330.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; 129: 2799-2801.
- Tilly JL, Ratts VS. Biological and clinical importance of ovarian cell death. *Contemporary Obstetrics and Gynecology* 1996; 41: 59-86.
- Tosti, E., Boni, R., Cuomo, A., 2002. Fertilization and activation currents in bovine oocytes. *Reproduction* 124, 835–846
- Van Stekelenburg-Hamers AE, Van Inzen WG, Van Achterberg TA, Kruip TA, de Laat SW, Weima SM. Nuclear transfer and electrofusion in bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos: effect of media and electrical fusion parameters. *Mol Reprod Dev* 1993;36:307–312.
- Vitullo, A.D., Ozil, J.-P., 1992. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev. Biol.* 151, 128–136.
- Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394:369–374.
- Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genet* 1999a;22:127-128.
- Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999b; 96:14984–14989.
- Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* 1996; 45:111–120.
- Wang MK, Liu JL, Li GP, Lian L, Chen DY. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocytes. *Mol Reprod Dev* 2001; 58:432–436.

Washitani-Nemotos. Activation at the terminal vesicle stage of starfish oocytes produces parthenogenetic development through the failure of polar body extrusion. *Dev Growth Differ* 1997; 39: 295-303.

Wasserman F. The development of adipose tissue. In: Renold AE and Cahill GF eds. *Handbook of physiology: adipose tissue*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1965: 87-90.

Wells DN, Misica PM, Pavla PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island xattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:369-378.

Wells, D.N., Misica, P.M., McMillan, W.H., and Tervit, H.R. Production of cloned bovine fetuses following nuclear transfer using cells from a fetal fibroblast cell line. *Theriogenology* 1998;49:330.

Wells DN, Misica PM, Tervit HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 1999a; 60:996–1005.

Wells, D.N., Misica, P.M., Forsyth, J.T., Berg, M.C., Lange, J.M, Tervit, H.R., and Vivanco, W.H. The use of adult somatic cells nuclear transfer to preserve the last surviving cow of the enderby island cattle breed. *Theriogenology* 1999b;51:217.

Willadsen, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986;320:63–65.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810–813.

Winger Q. Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development. *Dev Genet* 1997; 2: 160-166.

Wiston N, Johnson M, Pickering S, Braudet P. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. *Fertil Steril* 1991; 56: 904-912.

White, K.L., Yue, C., 1996. Intracellular receptors and agents that induce activation in bovine oocytes. *Theriogenology* 45, 91–100.

Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2001; 65:309–317.

Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene

transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 2002; 66:127–134.

Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 2002; 31:216–220.

Yamada O, Abe M, Takehana K, Hiraga T, Iwasa K, Hiratsuka T. Microvascular changes during the development of follicles in bovine ovaries: a study of corrosion casts by scanning electron microscopy. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 567-74.

Yong-Kook K, Deog-Bon K, Jung-Sun P, Young-Hee C, An-Sik C, Kyung-Kwang L. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* 2001; 28:173–177.

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998; 3:155–163.

Young LE, Fernandez K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genet* 2001;27:153-154.

Zakhartchenko V., Durcova-Hills, G., Schernthaner, W. Stojkovic, M., Reichenbach, H.D., Mueller, S., Stein-born, R., Mueller, M., Wengerkind, H., Prella, K., Wolf, W., and Brem, G. Potential of fetal germ cells for nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 1999a;52:421–426.

Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, Prella K, Schernthaner W, Stojkovic P, Wenigerkind H, Wanke R, Duchler M, Steinborn R, Meuller M, Brem G, Wolf E. Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Mol Reprod Dev* 1999b; 54:264–272.

Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Schernthaner W, Prella K, Steinborn R, Muller M, Brem G, Wolf E. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil* 1999c; 115:325–331.

Zou X, Chen Y, Wang Y, Luo J, Zhang Q, Zhang X, Yang Y, Ju H, Shen Y, Lao W, Xu S, Du M. Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning* 2001; 3:31–37.