

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**EFFECTO DEL TIPO DE CÉLULA EN LA CAPACIDAD
DE DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS
CLONADOS**

Autor(a): Bach. Jenin Victor Cortez Polanco

Asesor(a): M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama

Registro:

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

Asesor: M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama

DNI: 33430926

Número de registro ORCID: 0000 – 0002 – 1473
– 9055

Campo de investigación y desarrollo OCDE

- 1.06.00 -- Biología
 - 1.06.08 – Biología reproductiva

Dedicatora

A Dios por brindarme la oportunidad de seguir
viviendo.

A Daniela mi madre por su apoyo incondicional.

Jenin Victor Cortez Polanco

Agradecimiento

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas por mi formación profesional.

A Genescol S.A por el apoyo y el financiamiento para la realización de la tesis.

A mis compañeros de trabajo, Nilton Luis Murga Valderrama, Gleni Tatiana Segura Portocarrero por su compañerismo y apoyo laboral a lo largo de mis estudios y la investigación realizada.

Jenin Víctor Cortez Polanco

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

RECTOR DE LA UNIVERSIDAD

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Dr. RAÚL RABANAL OYARCE

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO

VISTO BUENO DEL ASESOR

El M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama, hace constar que ha asesorado el proyecto y la realización de la tesis titulada **“CAPACIDAD DE DOS LINEAS CELULARES PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CLONADOS MEDIANTE TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS”** presentado por el Blgo. Jenin Víctor Cortez Polanco.

Se da el visto bueno al informe final de la tesis mencionada y comprometiéndose a supervisar el levantamiento de las observaciones dadas por el jurado evaluador, para su sustentación.

Chachapoyas 20 de Julio del 2019



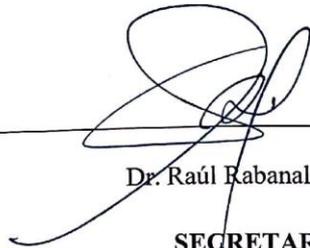
M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama
DNI: 33430926

JURADO EVALUADOR



M.Sc. Hugo Frias Torres

PRESIDENTE



Dr. Raúl Rabanal Oyarce

SECRETARIO



M.Sc. Reiner Pedro Gabriel Reátegui Inga

VOCAL



ANEXO 6-N

**ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER
EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR ()**

En la ciudad de Chachapoyas, el día 26 de Julio del año 2019, siendo
las 11:00 horas, el aspirante Jenin Victor Cortez Palanco
defiende en sesión pública la Tesis titulada: "Efecto del tipo de célula en la
Capacidad de desarrollo in vitro de embriones bovinos clonados"

para obtener el Grado Académico de Maestro (X)/Doctor () en Ciencias en Producción
Animal a ser otorgado por la

Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: M. Sc. Hugo Farias Torres

Secretario: Dr. Raúl Rabanal Oyarte

Vocal: M. Sc. Reiner Pedro Gabriel Realigui Jango



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la Tesis de Maestría ()/Doctorado (), en términos de:

Aprobado (X) Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 12:30 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis de Maestría ()/Doctorado ().


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:



ANEXO 6-O

**CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO (X) / DOCTOR ()**

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Efecto del tipo de célula en la capacidad de desarrollo en vitro de embriones bovinos clonados

presentada por el estudiante ()/egresado (X) Jenin Victor Cortez Polanco

de la Escuela de Posgrado, Maestría (X) / Doctorado () en Ciencias en Producción Animal.

con correo electrónico institucional jenin.cortez.epg@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 22 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chachapoyas, 19 de Julio del 2019



SECRETARIO

VOCAL

PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	ix
ÍNDICE	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	17
II.MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1. Colecta de ovocitos	20
2.2. Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos	20
2.3. Preparación de Citoplastos	21
2.4. Preparación de células somáticas.....	23
2.5. Emparejamiento y Electrofusión	25
2.6. Activación y cultivo <i>in vitro</i>	26
2.7. Transferencia de embriones y control de la preñez	27
III.RESULTADOS	28
3.1. Citoplastos reconstruidos y fusionados (%) con fibroblastos de piel y células del cúmulo a una hora de su fusión.....	28
3.2. Desarrollo de los embriones mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) tras su reconstrucción con dos líneas celulares en bovinos.....	29
3.3. Gestaciones establecidas tras la transferencia de blastocistos clonados obtenidos mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) utilizando	

dos tipos de líneas celulares en bovinos	29
IV.DISCUSIÓN	30
V.CONCLUSIONES	32
VI.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
VII.ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Citoplastos reconstruidos y fusionados (%) con fibroblastos de piel y células del cúmulo a una hora de su fusión	27
Tabla 2. Desarrollo de los embriones mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) tras su reconstrucción con dos líneas celulares en bovinos.....	28
Tabla 3. Gestaciones establecidas tras la transferencia de blastocistos clonados obtenidos mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) utilizando dos tipos de líneas celulares en bovinos	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ovocitos post maduración de 21 horas.	20
Figura 2. Ovocitos maduros libres de células del cúmulo.....	21
Figura3. Proceso de micromanipulación.....	21
Figura 4. Proceso de transferencia nuclear.....	22
Figura 5. Fibroblastos de piel y células de cúmulos en cultivo <i>in vitro</i> : A) Células de piel en confluencia, B) Células del cúmulo en crecimiento.....	23
Figura 6. Citoplasmas fusionados pos fusión celular.....	24
Figura 7. Embriones en estadio de blastocisto expandido.....	25

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SFB: Suero fetal bovino.

BSA: Suero de albumina bovina.

MIV: Maduración *in vitro*

CIV: Cultivo *in vitro*

FSH: Hormona folículo estimulante. .

LH: Hormona luteinizante

SOF: Fluido sintético de oviducto

ZP: Zona pelúcida

COCs: Complejos ovocito-cúmulo

TCM: Medio de cultivo tisular

EGF: Factor de crecimiento epidermal

RESUMEN

En este estudio se evalúa el efecto del tipo de célula en la capacidad de desarrollo *in vitro* de embriones bovinos clonados. Se obtuvieron fibroblastos de piel y células de cúmulos de donantes adultos para ser usados como citoplastos; asimismo, ovocitos fueron madurados *in vitro* por 21 horas. Los ovocitos madurados se incubaron 2 h en demecolcina (2,5 µg/mL) para promover la formación del cono con el plato metafásico y orientar la enucleación. La enucleación se realizó bajo un micromanipulador y la fusión entre la célula somática con el citoplasto se realizó mediante una cámara de fusión. Las estructuras se cultivaron durante 7 d hasta la fase de incubación/eclosión de blastocito, para posteriormente ser transferidos a receptoras y evaluarlas en el día 28, 60 y 75 de gestación. Se evaluó número y porcentaje de citoplastos reconstruidos a la hora de fusión superando las células somáticas de cúmulos (51.7 ± 7.8) ($p < 0.05$). A los siete días de cultivo *in vitro* se evaluó porcentaje de embriones superando la producción con las células de fibroblastos de piel (36.1 ± 8.4) en comparación con las células de cúmulos (34.1 ± 10.0). A los 28, 60 y 75 días post transferencia se evaluó permanencia de preñez siendo significativamente superior ($p < 0.05$) los embriones generados con células de cúmulos 16 (12.0%). En conclusión ambas líneas celulares son capaces de generar embriones y dar lugar a crías vivas, sin embargo existe un mayor porcentaje de retención de preñez con células de cumulus.

Palabras clave: reproducción asistida, bovino, clonación

ABSTRACT

In this study, the effect of cell type on the capacity of in vitro development of cloned bovine embryos is evaluated. Skin fibroblasts and cumulus cells were obtained from adult adults to be used as cytoplasts; Likewise, oocytes were matured in vitro for 21 h. The matured oocytes were incubated 2 hours in demecolcine (2.5µg/mL) to promote formation of the cone with the metaphase plate and to direct the enucleation. The enucleation was performed under a micromanipulator and the fusion between the somatic cell and the cytoplasm was carried out by means of a fusion chamber. The structures were cultured for 7 days until the blastocyst incubation / hatching phase, and then transferred to recipients and evaluated on day 28, 60 and 75 of gestation. The number and percentage of reconstructed cytoplasts were evaluated at the time of fusion, surpassing the somatic cells of clusters (51.7 ± 7.8) ($p < 0.05$). At seven days of in vitro culture, the percentage of embryos was evaluated, exceeding the production with the skin fibroblast cells (36.1 ± 8.4) compared to the cumulus cells (34.1 ± 10.0). At 28, 60 and 75 days after the transfer, the permanence of the pregnancy was evaluated, being significantly better ($p < 0.05$) the embryos generated with cumulus cells 16 (12.0%). However, there is no higher percentage of retention of people with cumulus cells.

Key words: assisted reproductive technology, bovine, clone

I. INTRODUCCION

Los 20 años de historia de la transferencia nuclear de células somáticas está lleno de controversias, y la tasa de avance hacia la aplicación comercial práctica de la técnica ha sido más lenta de lo esperado. Muchos factores externos, incluidas las preocupaciones bioéticas, barreras administrativas, aversión emocional de los laicos, falta de apoyo financiero para la investigación académica relacionada, y la desconfianza de los socios comerciales potenciales desempeña un papel importante en el avance lento (Kwon, Ji, Lee, Seo and Kang, 2017).

Sin embargo, el principal problema ha sido la baja eficiencia general del proceso (Akagi, Matsukawa, and Takahashi, 2014). Para la mayoría de los propósitos prácticos, especialmente para aplicaciones agrícolas, el parámetro decisivo es la descendencia sana por tasa de transferencia de embriones. Existe una considerable variación entre especies, pero esta tasa es generalmente baja, alrededor de 1% a 10%, mucho más baja que la lograda con contrapartes fertilizadas *in vivo* o *in vitro*. Aunque los resultados obtenidos hoy en día significan un pequeño avance desde el éxito inicial de hace 20 años (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind and Campbell, 1997), con mejoras muy modestas durante la última década.

Se han realizado diversos esfuerzos para superar este problema, incluido el tratamiento de células somáticas con agentes químicos o biológicos para facilitar la reprogramación o para aumentar la capacidad de los ovocitos enucleados para inducir el proceso; para encontrar la etapa óptima de tiempo y ciclo celular para la enucleación, fusión y activación; y para optimizar la activación y el período de cultivo *in vitro* (Wilmut, Bai and Taylor, 2015).

Muchos de estos esfuerzos han permitido mejorar los resultados de laboratorio, pero ninguno de ellos ha tenido un efecto positivo confirmado y generalmente aceptado en el desarrollo *in vivo*, especialmente en el avance al último período de la gestación y el nacimiento de descendencia sana. Cabe señalar que, debido a razones financieras y técnicas, muy pocos grupos de investigación han tenido la posibilidad de pasar de la fase de laboratorio a las transferencias y al seguimiento *in vivo* del desarrollo. En

consecuencia, en la mayoría de los laboratorios, la transferencia nuclear de células somáticas todavía se realiza como se describió hace 20 años, con pequeñas modificaciones relacionadas con los requisitos específicos de cada especie.

Mientras tanto, el rápido avance en genómica y epigenómica ha permitido revelar diferencias considerables entre los perfiles de expresión génica de embriones clonados y sus homólogos fertilizados *in vitro* o producidos *in vivo* (Niemann, Kues, Lucas-Hahn and Carnwath, 2011). Como los abortos tempranos suelen asociarse con anomalías en el desarrollo de la placenta (Ogura, Inoue and Wakayama, 2013), la intervención para corregir los perfiles anormales de expresión génica parece ser una posibilidad viable (Loi, Iuso, Czernik and Ogura, 2016). Sin embargo, puede requerir la manipulación de la función del genoma con posibles consecuencias biológicas, legales y bioéticas adicionales.

Datos recientes indican que en algunas especies, una técnica alternativa de transferencia nuclear también puede ser eficiente. Un trabajo representativo en cerdos basado en más de 200,000 embriones reconstruidos ha reportado alrededor del 75% de las tasas de gestación después de las transferencias, y 75% de las gestaciones dieron como resultado lechones sanos, aunque la descendencia por embriones reconstruidos se mantuvo baja (1.5%) (Liu et al., 2015).

Otro grupo, utilizando el mismo enfoque informó que transferencia de más de 5000 embriones clonados porcino resultó en alrededor del 90% de las tasas de embarazo, y el 90% de estos embarazos resultó en lechones sanos. El número de lechones por el embrión transferido fue un impresionante 15% (Callesen, Liu, Pedersen, Li and Schmidt, 2014). Estos experimentos utilizaron un método simplificado para la reconstrucción llamada clonación de zona libre o hecha a mano (HMC) (Peura and Vajta, 2003; Vajta, 2007) y cultivo *in vitro* hasta la etapa tardía de mórula / blastocito. Un experimento comparativo reciente demostró que los embriones porcinos producidos por HMC tienen mejores tasas de desarrollo *in vitro* y mayores números de células que sus contrapartes tradicionalmente clonadas (Liu et al., 2017).

La clonación manual se introdujo originalmente en bovinos y posteriormente se aplicó con éxito en otras especies, incluyendo ovejas, cerdos, cabras y búfalos de agua (Du et

al., 2007; Khan et al., 2014; Peura and Vajta, 2003; Shah et al., 2009; Vajta, Lewis and Tecirlioglu, 2006). Sin embargo, a pesar de la prometedora eficacia *in vitro* (alrededor del 50% de blastocito por embrión reconstruidos en bovinos) (Vajta et al., 2003), durante los últimos 17 años no hubo oportunidad de hacer experimentos de transferencia con embriones clonados a gran escala. Por consiguiente, las tasas de embarazo y parto informadas fueron esporádicas y, a menudo, se obtuvieron en circunstancias no óptimas, incluida la falta de incubadoras apropiadas o arreglos de laboratorio.

Las mayores limitaciones biológicas de la clonación es que las células somáticas son completamente diferenciadas, con patrones de expresión génica que se correlacionan con la función del tejido del cual se originaron. Por esta razón, la mayoría de los investigadores concentraron sus trabajos en encontrar el tipo celular y las mejores condiciones de las células donantes para que la información genética pudiera ser reprogramada de forma eficiente en el citoplasto receptor, aumentando la eficiencia de la clonación somática. Hasta la fecha se han utilizado muchos tipos celulares como donante de núcleo para la producción de animales clonados. Dolly fue creada a partir de la reprogramación del núcleo de una célula de glándula mamaria (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind and Campbell, 1997). Sin embargo, otros resultados exitosos incluyen la utilización de células de la granulosa (Wakayama, Perry, Zuccotti, Johnson and Yanagimachi, 1998), fibroblastos fetales y adultos (Kato, Tani and Tsunoda, 1998; Rodriguez, Schellander and Lewin, 2008), células del oviducto (Kato, Tani, Tsunoda, 2000), leucocitos (Galli, Duchi, Moor, Lazzari, 1999), células de la granulosa mural (Wells, Misica and Tervit, 1999), células germinales (Bordignon et al., 2003), células de hígado (Brem and Kuhholzer, 2002) entre otras. A pesar de los resultados obtenidos, aún no está claro qué tipo celular es más eficiente para la transferencia nuclear. Las diferencias que se producen en la eficiencia de la transferencia nuclear con diferentes tipos celulares podrían estar más relacionadas con los protocolos de clonación y de mantenimiento de las líneas celulares que con el origen de éstas (Yang et al., 2007).

Por consiguiente, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de las células de piel y cúmulos sobre el desarrollo *in vitro* que permita seleccionar el tipo de célula más eficiente como donante de núcleo en la transferencia nuclear de células somática.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio la empresa GENESCOL S.A y el Laboratorio de Biotecnología Animal Reproducción y mejoramiento genético del Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología en la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas y tuvo lugar el año 2018.

2.1. Colecta de los ovocitos

Se colectaron ovarios de vacas de la raza gyr, con un rango de edades de 1 a 4 años y fisiológicamente sanas. Los ovarios fueron transportados del centro de beneficio al laboratorio en un recipiente isotérmico conteniendo cloruro de sodio al 0.9% (wt/vol) suplementado con 0.025 mg/ml de estreptomicina y temperado a 37 °C. Luego de ser lavados en la misma solución limpia, se aspiraron los folículos de tamaño medio (de 3 a 6mm) usando una jeringa de 10ml y aguja de 18 G. El contenido de los folículos era depositado en tubos que contenían medio de manipulación TCM199-HEPES suplementado con 50 mg/ml de gentamicina y 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB).

2.2. Maduración in vitro de los ovocitos

Después de 20 min de sedimentación, los ovocitos fueron localizados bajo el estereomicroscopio y lavados en medio de retención (TCM199 con bicarbonato 4 mM, Hepes 18 mM y gentamicina 50 µg / ml) suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS). Los ovocitos grado I y II con citoplasma oscuro y homogéneo y cúmulos compactos, se maduraron en placas de cuatro pocillos (25-30 ovocitos por pocillo) en medio TCM199 tamponado con bicarbonato suplementado con 0,6 mM glutamina, 0,2 mM piruvato, 0,01 UI / ml de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), 1 mg / ml de estradiol, 50mg / ml de gentamicina, 10 ng / ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 10% de SFB a 38.5 ° C en 5% CO₂ por 21 horas (figura 1).

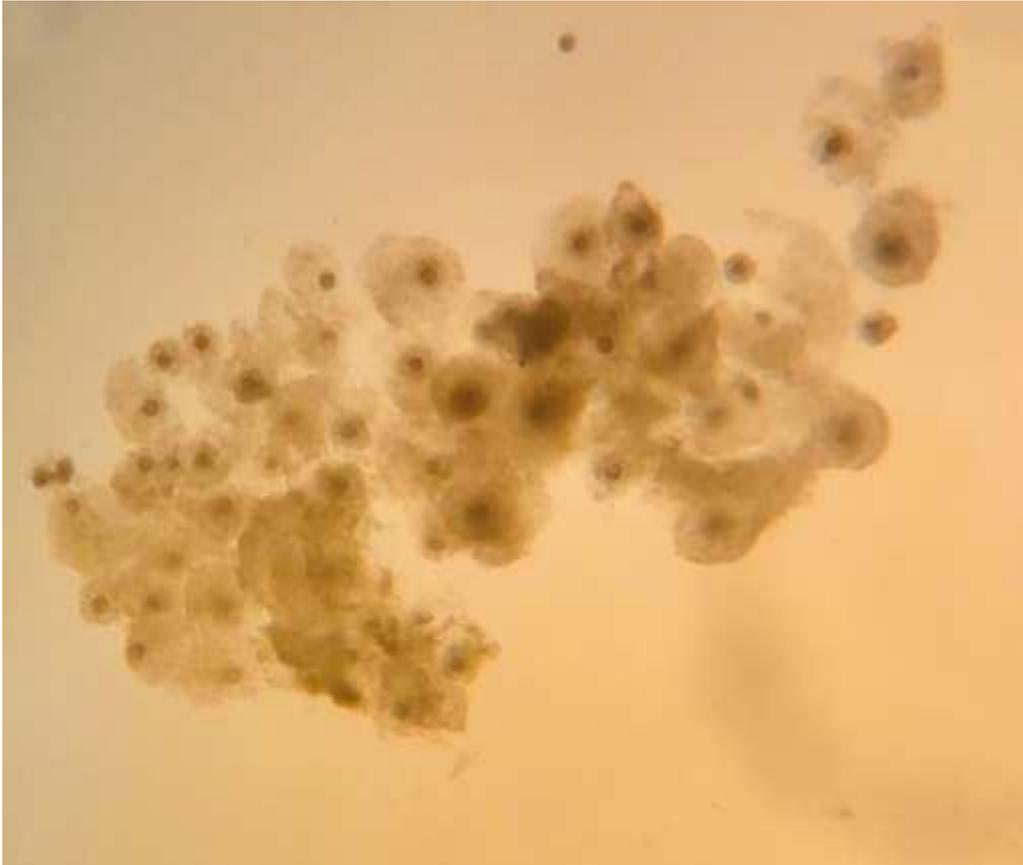


Figura 1. Ovocitos post maduración de 21 horas.

2.3. Preparación de Citoplastos

Después de la maduración se removieron las células del cúmulo por medio de vortex en una solución de hialuronidasa de 0,3 mg / ml seguidos de una agitación vorticial durante 6 minutos (figura 2). Se confirmó la enucleación mediante tinción usando Hoechst 33342 y posterior visualización bajo luz UV. Para la manipulación se utilizó bajo un micromanipulador (Ti2 Nikon, Japón) y luz ultravioleta (filtro bloqueador UV-1a, con 365 nm de excitación y 400 nm de emisión) con un aumento de 60X (figura 3 y 4).

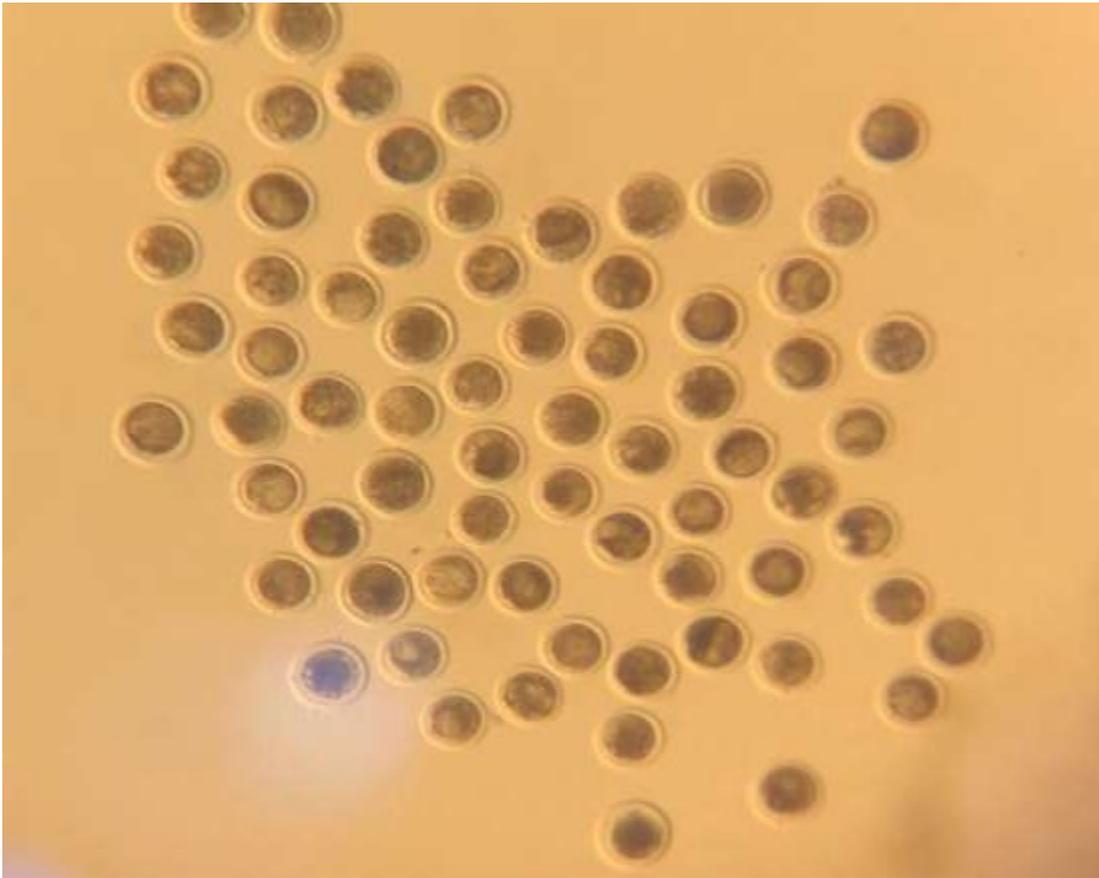


Figura 2. Ovocitos maduros libres de células del cúmulo.



Figura 3. Proceso de micromanipulación.



Figura 4. Proceso de transferencia nuclear.

2.4. Preparación de células somáticas

Las células somáticas fueron obtenidas de una vaca de la raza Gyr, siguiendo los protocolos establecidos por Tovar et al. (2008). El tejido fue lavado varias veces en buffer fosfato salino (PBS) con antibióticos y fue sometido a digestión por 18 h en 10 ml de colagenasa (1 mg/ml en medio DMEM-F12 suplementado con antibióticos-antimicóticos y 10% SFB) a 37 °C y con agitación orbital. Luego, el tejido fue agitado vigorosamente para desprender células que aún pudieran encontrarse adheridas al mismo. Se dejó reposar por 3 min y se recuperó el sobrenadante, siendo sembrado en placas Petri de 35 mm estériles y cultivados por 12 d (pase 0). El volumen del cultivo se completó a 2 ml con medio DMEM-F12 suplementado con 1 mM de glutamina, 0.2 mM de piruvato, 10 ng/ml de EGF (epidermal growth factor) y 30% de suero fetal bovino (SFB). Las células del cumulus fueron extraídas de ovocitos de una sola donante por aspiración folicular guiada por ecografía (Ovum Pick Up – OPU) (Easote, Italia). Las células fueron separadas por pipeteo constante y luego fueron cultivadas por 5 d (pase 0), como lo descrito para las células de piel. Transcurrido el periodo de incubación, los cultivos primarios (pase 0) fueron expandidos mediante subcultivo 1:3 a placas nuevas empleando tripsina-EDTA al 0.025% (pase 1) para ambos tipos de células. La acción de la tripsina se detiene adicionando medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Las células fueron cultivadas hasta alcanzar 100% de confluencia,

donde fueron nuevamente sometidas a la acción de la tripsina, colectadas y congeladas en viales Nalgene de 2 ml (Nalgene, Dinamarca), a razón de 3×10^6 células/ml (pase 2) en medio de cultivo suplementado con 10% SFB y 8% de DMSO (dimetil sulfóxido). La congelación se llevó a cabo mediante un gradiente de -1 °C/min, empleando el sistema Mister Frosty (Nalgene, Dinamarca) en el interior de un congelador comercial de -80 °C. Luego de 18 h, los viales fueron introducidos a un tanque de nitrógeno líquido (-196 °C). De este modo, se creó un banco maestro congelado con células en pase 2. Para el trabajo de rutina, se descongeló un vial mediante inmersión en baño a 37 °C por 1 min. Las células se sembraron y cultivaron como se ha descrito y se expandieron 1:5 en pase 3, para posteriormente congelarlas en pase 4, tal como se describió anteriormente, creando así el banco de trabajo. Para el trabajo de rutina en el laboratorio, se emplearon siempre células descongeladas del banco de trabajo. Las células descongeladas con un total de dos a cuatro pasajes, sin privación de suero, pero con al menos 24 horas después de la confluencia total se utilizaron para la reconstrucción embrionaria. Después de la digestión con tripsina al 0,025%, las células suspendidas se mantuvieron a temperatura ambiente durante un máximo de 3 horas.

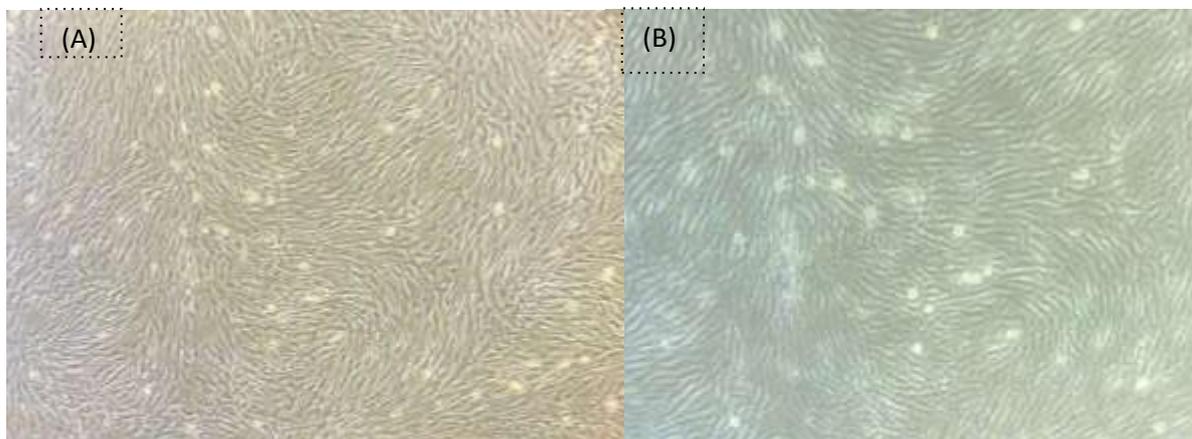


Figura 5. Fibroblastos de piel y células de cúmulo en cultivo *in vitro*: A) Células de piel en confluencia, B) Células del cúmulo en crecimiento.

2.5. Emparejamiento y electrofusión

Se emparejo una célula somática con un citoplasto. Después de la unión, el par se transfirió a una cámara de fusión (Modelo 450, 01-000209-01; BTX Corp, San Francisco, CA), cubierta con una solución de manitol a 0,3 M, 0,05 mM CaCl₂, 0,1 mM MgCl₂ y alcohol polivinilo (PVA) a 1 mg / ml. El par se hizo flotar a uno de los cables con la célula somática utilizando una corriente alterna generada por una máquina de electrofusión (BLS, Budapest, Hungría). La fusión fue inducida por un único pulso de corriente continua de 2 kV/cm por 9 μ s. Luego se retiraron cuidadosamente de la cámara y se incubaron en el medio de retención con 20% de FBS durante 30 minutos para completar la fusión (figura 6).



Figura 6. Citoplastos fusionados post fusión celular.

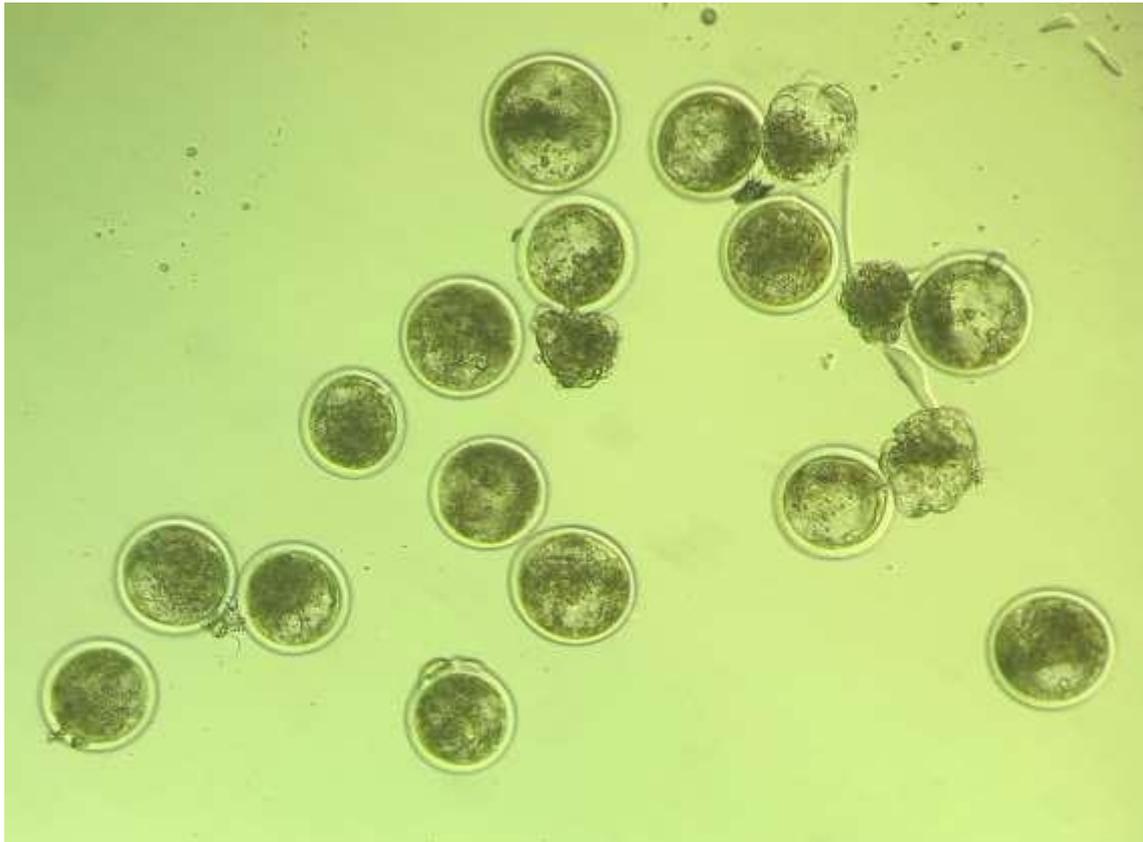


Figura 7. Embriones en estadio de blastocisto expandido.

2.6. Activación y cultivo in vitro

Después de los 30 min de incubación en el medio de retención, los embriones reconstruidos fueron inubados por 2 horas en medio TCM- bicarbonato con 10% de SFB en 5% de CO₂ a 38.5 ° C. Posteriormente los embriones reconstruidos fueron activados mediante incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente en 7% de etanol en medio de mantenimiento suplementado con 20% de SFB, seguido de una incubación de 5 horas en el mismo medio suplementado con 5 µg / ml de citocalasina B y 10 µg / ml de cicloheximida a 38.5 ° C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, los embriones se cultivaron en placas de cuatro pozos (Vajta et al., 2000) en medio SOFaaci (Holm, Booth, Schmidt, Greve and Callesen, 1999) suplementado con albúmina bovina (BSA) al 0,3% en 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% N₂ a 38.5 ° C durante 7 días. Para evitar cualquier inconsistencia en el contenido de gas y la temperatura, la incubación se realizó en bolsas selladas (Vajta, Holm, Greve, and Callesen, 1997) no se determinó la tasa de escisión, y el medio no se renovó durante este período.

2.7. Transferencia de embriones y control de la preñez

Todas las transferencias fueron realizadas en haciendas en el departamento de Santander - Colombia, en un clima tropical propio de la raza chino santanderiano de las receptoras. Se seleccionaron vacas receptoras sincronizadas con cuerpo lúteo de más de 16 mm de diámetro. Las transferencias de embriones al cuerno uterino ipsolateral se realizaron utilizando una pistola de transferencia de embriones de 21 pulgadas con mangas con punta de acero (Agtech, Manhattan, KS). La tasa de gestación se evaluó al día 28, 60 y 75 mediante ultrasonografía.

Análisis estadístico

Los dos tipos de células somáticas fueron comparadas en función a la proporción de dobletes fusionados, producción de embriones clonados y permanencia de preñez para ello se aplicó una prueba «t» de Student para muestras o grupos de observaciones independientes con un nivel de significancia de 0.05. Previamente se realizó una prueba de homogeneidad de varianza, además de haberse determinado el comportamiento normal de las observaciones.

III. RESULTADOS

La sincronía del ciclo celular entre el núcleo de la célula donante y el ovocito receptor es un requisito previo esencial para la reprogramación nuclear exitosa y el desarrollo a largo plazo en TNCS (Wilmot et al., 1997). Un total de 3243 ovocitos de grados I y II fueron seleccionados para el desarrollo de la investigación, de los cuales 2887 (89%) presentaron el primer cuerpo polar después de la maduración *in vitro*.

Se generaron líneas celulares a partir de los dos tipos de células somáticas (fibroblastos de piel adulto y células de cúmulos) para ser usados como carioplastos (núcleo). El número de dobles fusionados y el porcentaje por tipo de célula somática puede ser apreciado en la Tabla 1. Hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la proporción de dobles de citoplastos fusionados entre los tipos celulares.

Se obtuvo una diferencia del 2% en la tasa de clivaje para los embriones reconstruidos con células del cúmulo en comparación con los fibroblastos de piel, sin embargo esta no es significativa ($p < 0.05$). En la tasa de embriones no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) pero se encontró un mejor resultado en un 2% superior con células del cúmulo (Tabla 2). En total, se reconstruyeron 1285 citoplastos por transferencia nuclear de las dos células somáticas, produciendo un total de 246 blastocitos al día 7 (35.1%).

Tabla 1. Citoplastos reconstruidos (%) con fibroblastos de piel y células del cúmulo a una hora de su fusión

Células	Complejo célula/ovulo (n)	Reconstruidos (n)	Reconstruidos (%)
Fibroblastos de piel	1487	556	37.4 ± 6.8^b
Células del cumulus	1400	724	51.7 ± 7.8^a

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística ($p < 0.05$)

Tabla 2. Desarrollo de los embriones mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) tras su reconstrucción con dos líneas celulares en bovinos

	Reconstruidos cultivados (n)	Clivaje (%)	Blastocistos	
			Embriones (%)	Reconstruidos (%)
Fibroblastos de piel	427	71.1 ± 5.1 ^a	36.1 ± 8.4 ^a	37.4 ± 6.8 ^a
Células del cumulus	549	73.1 ± 5.4 ^a	34.1 ± 10.0 ^a	51.7 ± 7.9 ^b

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística (p<0.05)

Se transfirieron 246 blastocistos día 7 a 246 receptoras sincronizadas en el día 7 después de la ovulación, 113 embriones producidos a partir de fibroblastos de piel y 133 embriones producidos a partir de células de cúmulo, calidad de los embriones según la (IETS, 2010) (Tabla 3). En el día 28 de la gestación, se encontró 46.0% de gestación para los embriones producidos con células de fibroblastos de piel y 47.4% con células de cúmulos sin diferencias significativas (p<0.05). El día 60 de la gestación, se encontró 24.8% con fibroblastos de piel y 25.6% con células de cúmulo sin diferencias significativas (p<0.05). Al día 75 se pudo observar las vesículas embrionarias en las receptoras con embriones reconstruidos a partir de fibroblastos de piel (7.1%), mientras que en receptoras que fueron transferidas con embriones reconstruidos con células del cúmulo se obtuvieron el (12.0%) encontrándose diferencias significativas (p<0.05) (Tabla 3).

Tabla 3. Gestaciones establecidas tras la transferencia de blastocistos clonados obtenidos mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) utilizando dos tipos de líneas celulares en bovinos

Células usadas para la reconstrucción	Embriones transferidos (n)	Receptoras (n)	Permanencia		
			Día 28 (n) (%)	Día 60 (n)(%)	Día 75 (n)(%)
Fibroblastos de piel	113	113	52(46.0)	28(24.8)	8(7.1) ^a
Células del cúmulo	133	133	63(47.4)	33(25.6)	16(12.0) ^b

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística (p<0.05)

IV. DISCUSIÓN

La transferencia nuclear de células somáticas, originalmente propuesto a principios de 1900 como una forma de probar la retención de la potencia genómica durante la especialización celular, ahora se lleva a cabo en una amplia gama de especies, utilizando una amplia gama de combinaciones de células núcleo donante-receptor y una amplia gama de metodologías (Dasari Amarnath and Keith E. Latham, 2014). Las células donantes de núcleos (carioplastos) son uno de los principales factores que afectan la eficiencia de la clonación somática. La capacidad de las células de fundirse con el citoplasto receptor y luego ser reprogramadas depende de la línea celular utilizada como donante de núcleo y, esto a su vez influye en la eficiencia de producción de embriones (Miyoshi, Rzucidlo, Pratt and Stice, 2003). La razón más factible es la reprogramación insuficiente de los núcleos donantes en los ovocitos receptores. A diferencia de los núcleos embrionarios, la reprogramación de los núcleos de células somáticas se produce en el citoplasma de los ovocitos no activados, pero no en los ovocitos activados (Tani et al., 2001). Nuestro estudio demostró diferencias significativas en los porcentajes de fusión de las dos líneas celulares. Así mismo, indirectamente se demostró que la membrana de las células donantes no fue afectada por el aislamiento de la línea celular durante las rutinas de trabajo con las células (cultivo *in vitro*, congelación y descongelación), ni por el pulso eléctrico durante la fusión. Estos resultados coinciden con el trabajo de Hayes et al. (2005). Los porcentajes de fusión obtenidos (37.4 vs. 51.7%) de las dos líneas celulares fueron similares a los reportados para la técnica de clonación con micromanipuladores, independientemente de las células donantes (Hayes et al., 2005). Los porcentajes de blastocistos obtenidos (36.1 vs 34.1%) fueron similares a los obtenidos por Kato et al. 2000, donde evaluó que la producción de blastocistos con diversos tejidos provenientes de donantes no fueron muy diferentes, y tampoco hubo diferencias en los porcentajes de blastocistos que se desarrollaron a partir de ovocitos que contenían células adultas (42%), recién nacidos (37%) o fetales. núcleos de pantorrilla (40%), o entre núcleos femeninos (39%) y masculinos (40%).

Los dos grupos de transferencia nuclear produjeron blastocistos al día 7 con una alta eficiencia, aunque con una ligera mayor proporción con el empleo de fibroblastos de

piel. En la literatura, los resultados más eficientes de producción de blastocistos bovinos mediante transferencianuclear somática con micromanipuladores, se encuentran alrededor del 30% (First et al., 2002). Cuando se utilizaron células cúmulo y células oviducto establecidas a partir de la primera vaca (línea 1), la tasa de preñez fue alta (50 vs 83%). Sin embargo, la tasa de embarazo fue baja (19 vs 13 %) cuando se usó (línea 2). Cuando se usaron las células del cúmulo y oviducto establecidas a partir de la (línea 3), ninguno de los ocho receptores quedó embarazada (Yoko Kato and Yukio Tsunoda, 2014); resultados similares a los que obtuvimos con células de cumulos y donde evidencian que la línea celular de una misma donadora puede generar resultados diferentes.

Nuestros resultados de nacimientos con células de fibroblastos y cumulus (7.1 vs 12.0%), y los obtenidos por Yoko Kato and Yukio Tsunoda, 2014, en vacas con células del cumulo y oviducto (35 vs 56%) indican que la técnica utilizada es competitiva en términos de eficiencia general. Nuestros estudios demostraron que las líneas celulares de piel y cúmulo son células que pueden ser utilizadas como donante de núcleos para la clonación de terneros. Se desconocen las razones de las diferencias en el potencial de desarrollo entre el origen celular o las líneas celulares, manipulaciones rápidas y eficientes que disminuyen el estrés ambiental de los ovocitos y embriones (Gerger et al., 2017; Vajta et al., 2006) y el daño del ADN por radiación ultravioleta podría ser otra posibilidad. Las células del oído y el tejido de la piel son especialmente propensas a sufrir daño solar por la radiación ultravioleta (Bernstein et al., 1996). Existen varias razones posibles para la alta tasa de abortos, la muerte perinatal y posnatal de los jóvenes y las anomalías de los jóvenes.

V. CONCLUSIONES

- Los citoplasmas reconstruidos con células del cúmulus presentaron mejores porcentajes de fusión, con respecto a los fundidos con células de piel.
- Se generaron embriones clonados con las dos líneas celulares empleadas, no obstante con la línea celular de cúmulus se pueden generar de modo más eficiente embriones clonados.
- Los embriones clonados producidos con ambas líneas celulares son capaces de continuar su desarrollo una vez transferidos a hembras receptoras y dar lugar a crías vivas, sin embargo los embriones formados con células de cumulus tuvieron mayor porcentaje de permanencia en la gestación.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akagi, S., Matsukawa, K. and Takahashi, S. (2014). Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *J. Reprod. Dev.* 60, 329–335.

Bernstein, E.F., Chen, Y.Q., Kopp, J.B., Fisher, L., Brown, D.B., Hahn, P.J., et al., 1996. Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34, 209–218.

Brem, G and Kühholzer, B. (2002). The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning Stem Cells.* 4:57-63.

Bordignon, V., Keyston, R., Lazaris, A., Bilodeau, A.S., Pontes, J.H., Arnold, D., Fecteau, G., Keefer, C and Smith, L.C. (2003). Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biol Reprod.* 68:2013-23.

Callesen, H., Liu, Y., Pedersen, H.S., Li, R and Schmidt, M. (2014). Increasing efficiency in production of cloned piglets. *Cell. Reprogram.* 16, 2–5.

Dasari marnath and Keith E. Latham A. (2014). Donor Cell Type and Cloning Efficiency in Mammals. *Principles of Cloning.* Chapter 19, 127-134

Du, Y., Kragh, P.M., Zhang, Y., Li, J., Schmidt, M., Bøgh, I.B., Zhang, X., Purup, S., Jørgensen, A.L., Pedersen, A.M., Villemoes K, Yang H, Bolund, L and Vajta G. (2007). Piglets born from handmade cloning, an innovative cloning method without micromanipulation. *Theriogenology.* 68, 1104–1110.

First, N., Beyhan, Z and Ambroggio J. (2002). Cloning of Cattle. En: *Principios de la clonación*. pag. 375-390

Galli, C., Duchi, R., Moor, R.M and Lazzari G. (1999) Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning*. 1:161-70.

Gerger, R., Rossetto, R., Ribeiro, E., Ortigari, I., Zago, F., Aguiar, L., Costa, U., Lopes, R., Ambro´sio, C., Miglino, M., et al. (2017). Impact of cumulative gain in expertise on the efficiency of handmade cloning in cattle. *Theriogenology* 95, 24–32.

Hayes, O., Ramos, B., Rodríguez, L.L., Aguilar, A., Badía, T and Castro, F.O. (2005). Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0/G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Anim Reprod Sci* 87: 181-192. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.11.011

Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., and Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52, 683–700.

International Embryo Transfer Society, Manual, IETS. (2010). Pg. 67-70.

Kato, Y., Tani, T and Tsunoda, Y. (2000). Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*. 120:231-7.

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

Khan, F.A., Bhat, M.H., Yaqoob, S.H., Waheed, S.M., Naykoo, N.A., Athar, H., Khan, H.M., Fazili, M.R., Ganai, N.A., Singla, S.K and Shah, R.A. (2014). *In vitro* development of goat-sheep and goat-goat zona-free cloned embryos in different culture media. *Theriogenology* 81, 419–423.

Kwon, D., Ji, M., Lee, S., Seo, K.W., and Kang, K.S. (2017). Reprogramming enhancers in somatic cell nuclear transfer, iPSC Technology, and direct conversion. *Stem Cell Rev.* 13, 24–34.

Li, J., Du, Y., Zhang, Y.H, Kragh, P.M, Purup, S., Bolund, L., Yang, H., Xue, Q.Z and Vajta, G. (2006). Chemically assisted handmade enucleation of porcine oocytes. *Cloning Stem Cells* 8: 241-250. doi: 10.1089/clo.2006.8.241

Liu, Y., Lucas-Hahn, A., Petersen, B., Li, R., Hermann, D., Hassel, P., Ziegler, M., Larsen, K., Niemann, H., and Callesen, H. (2017). Developmental competence and epigenetic profile of porcine embryos produced by two different cloning methods. *Cell. Reprogram.* 19, 171–179.

Liu, T., Dou, H., Xiang, X., Li, L., Li, Y., Lin, L., Pang, X., Zhang, Y., Chen, Y., Luan, J., Xu, Y., Yang, Z., Yang, W., Liu, H., Li, F., Wang, H., Yang, H., Bolund, L., Vajta, G and Du, Y. (2015). Factors determining the efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer: Data analysis with over 200,000 reconstructed embryos. *Cell. Reprogram.* 17, 463–471.

Loi, P., Iuso, D., Czernik, M., and Ogura, A. (2016). A new, dynamic era for somatic cell nuclear transfer? *Trends Biotechnol.* 34, 791–797.

Miyoshi, K., Rzucidlo, S.J., Pratt, S.L and Stice, S.L. (2003). Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod.* 68: 1079-1086. doi: 0.1095/biolreprod.102.010876

Niemann, H., Kues, W.A., Lucas-Hahn, A., and Carnwath, J.W. (2011). Somatic cloning and epigenetic reprogramming in mammals. In *Principles of Regenerative Medicine*. pp. 129– 158.

Ogura, A., Inoue, K., and Wakayama, T. (2013). Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20110329.

- Peura, T.T and Vajta, G. (2003). A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*. 5, 257–277.
- Peura, T.T., Lewis, I.M., and Trounson, A.O. (1998). The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 50, 185–191.
- Rodriguez - Zas S.L, Schellander K, Lewin, H.A. (2008). Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction*. 135:129-39.
- Shah, R.A., George, A., Singh, M.K., Kumar, D., Anand, T., Chauhan, M.S., Manik, R.S., Palta, P., and Singla, S.K. (2009). Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 71, 1215–1219.
- Tani, T., Kato, Y., Tsunoda, Y., 2001. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol. Reprod.* 64, 324–330.
- Tecirlioglu, R.T., Cooney, M.A., Lewis, I.M., Korfiatis, N.A., Hodgson, R., Ruddock, N.T., Vajta, G., Downie, S., Trounson, A.O., Holland, M.K. and francés, A.J. (2005). Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 573–585.
- Tovar, H., Navarrete, F., Rodriguez, L., Skewes, O., and Castro, F.O. (2008). Cold storage of biopsies from wild endangered native Chilean Species in field conditions and subsequent isolation of primary culture cell lines. *In Vitro Cell. Biol. Anim.* 44, 309–320.
- Vajta, G., Rienzi, L., and Bavister, B.D. (2010). Zona-free embryo culture: Is it a viable option to improve pregnancy rates?. *Reprod. Biomed.* 21, 17–25.

Vajta, G. (2007). Handmade cloning: the future way of nuclear transfer?. *Trends Biotechnol.* 25, 250–253.

Vajta, G., Lewis, I., and Tecirlioglu, R. (2006). Handmade somatic cell cloning in cattle. *Methods Mol. Biol.* 348, 183–196.

Vajta, G., Lewis, I., Trounson, A., Purup, S., Maddox-Hyttel, P., Schmidt, M., Pedersen, H., Greve, T., and Callesen, H. (2003). Handmade somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. *Biol. Reprod.* 68, 571–578.

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., and Callesen, H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 53–58.

Vajta, G., Holm, P., Greve, T., and Callesen, H. (1997). The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: A technique report. *Theriogenology.* 48, 1379–1385.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature.* 394:369-74.

Wells, D.N., Misica, P.M and Tervit, H.R. (1999). Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod.* 60:996-1005.

Wilmut, I., Bai, Y., and Taylor, J. (2015). Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370, 20140366.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385:810-813.

Yang, X., Zhang, L., Kovacs, A., Tobback, C and Foote, R.H. (1990). Potential of hypertonic medium treatment for embryos micromanipulation: II assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, sub-zona insertion and electrofusion of blastomeres to intact of functionally enucleated in rabbit. *Mol Reprod Dev.* 27:118-129.

VII. ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLOS PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CLONES

TABLA 1: Preparación de la solución salina.

SOLUCIÓN SALINA 0.9% PARA 1L

NaCl	9g
AGUA DESTILADA	1L
GENTAMICINA	1ml

* Luego de la preparación llevar a la autoclave para después agregarle el antibiótico.

TABLA 2: Preparación del medio de manipulación.

MEDIO DE MANIPULACIÓN PARA 100ml

TCM-HEPES	90ml
SFB	10ml
GENTAMICINA	100ul

TABLA 3: Preparación del medio de maduración.

MEDIO DE MADURACIÓN PARA 10ml

TCM-199	9ml
SFB	1ml
PIRUVATO	20ul
FSH-LH	50ul
GLUTAMINA	60ul
EGF	10ul
ESTRADIOL	10ul
GENTAMICINA	10ul

TABLA 4: Preparación del medio de fusión

Componente	Stock	Concentra W	Cantidad 100 mL
MgCl₂ 6 H₂O	0,023 g/10mL (10mM)	0,5 mM	500 µL
CaCl₂ 2 H₂O	0,00735 g/10mL (5mM)	0,25 mM	500 µL
Manitol		0,3 M	5,465 g
PVA			0,1 g

TABLA 5: Preparación del medio de cultivo base

COMPONENTES	MW () DE W	200ml	250ml
NaCl	58.44	1258.2mg(100mM)	1572.75mg
KCl	74.55	106.8mg(7mM)	133.5mg
KH₂PO₄	136.1	32.4mg(1.2mM)	40.5mg
CaCl₂ + 2H₂O	147	49.6mg	62mg
MgCl₂ + 6H₂O	203.31	19.2mg	24mg
NaHCO₃	84.01	421.2mg	526.5mg
ROJO FENOL	.-	0.28mg	0.35mg
LACTATO DE Na	//1.3g/ml	94.12ul (60%)	117.65ul

*Filtrar y almacenar a 4°C hasta añadir aditivos (3 tubos de 50ml).

ADITIVOS SOF (medio de cultivo)

	250ml	100ml	10ml
PIRUVATO	1ml	400ul	40ul
GLUTAMINA	500ul	200ul	20ul
AAE	5ml	2ml	200ul
AAE	2.5ml	1ml	100ul
EGF	250ul	100ul	10ul
AC. CITRICO	250ul	100ul	10ul

MYOINOSITOL	2.5ml	1ml	100ul
SFB	5ml	2ml	200ul
GENTAMICINA	250ul	100ul	10ul
BSA FAF	750mg	0.3g	0.03

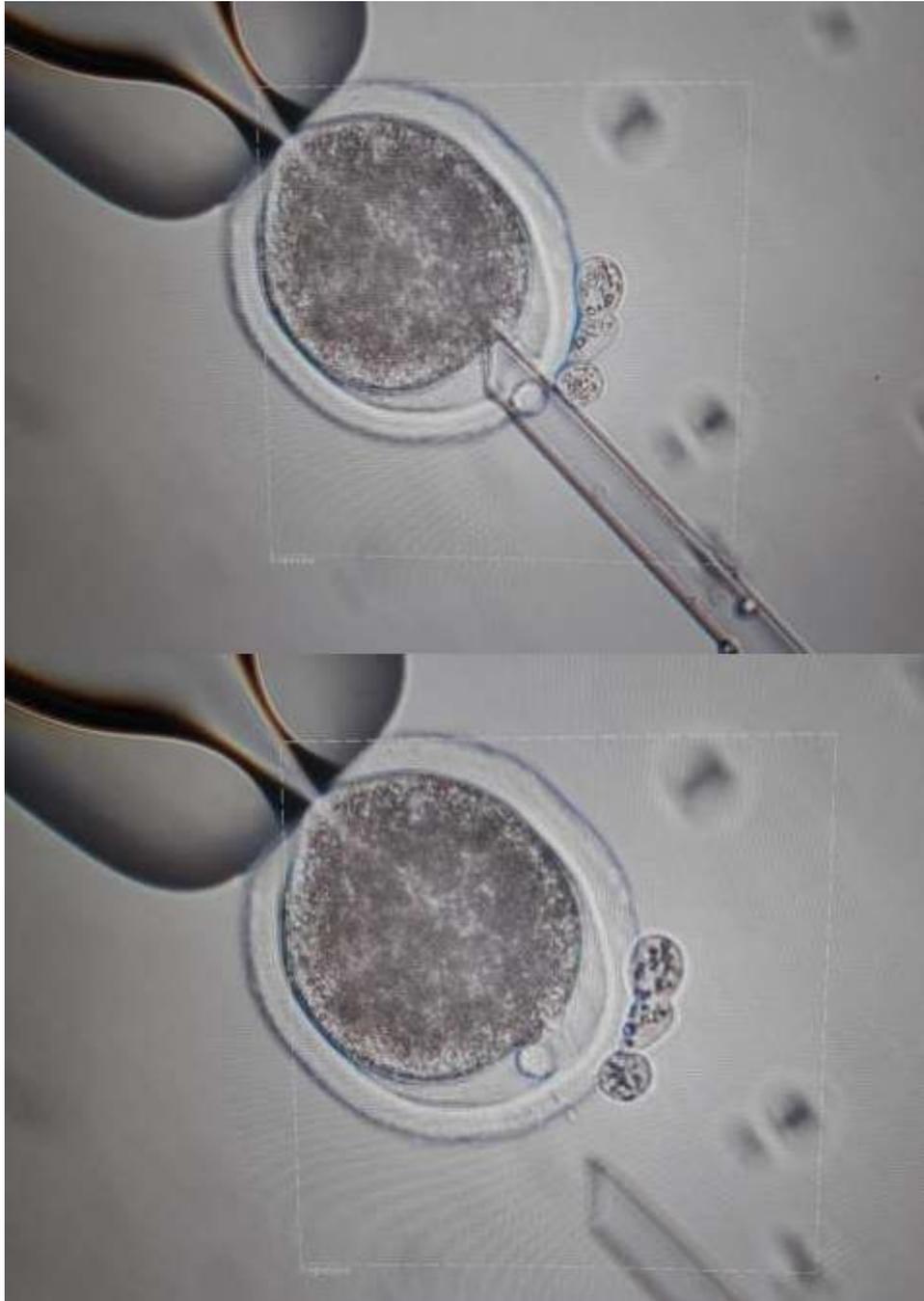
ANEXO B: FOTOS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CLONES.



Enucleación de óvulos maduros



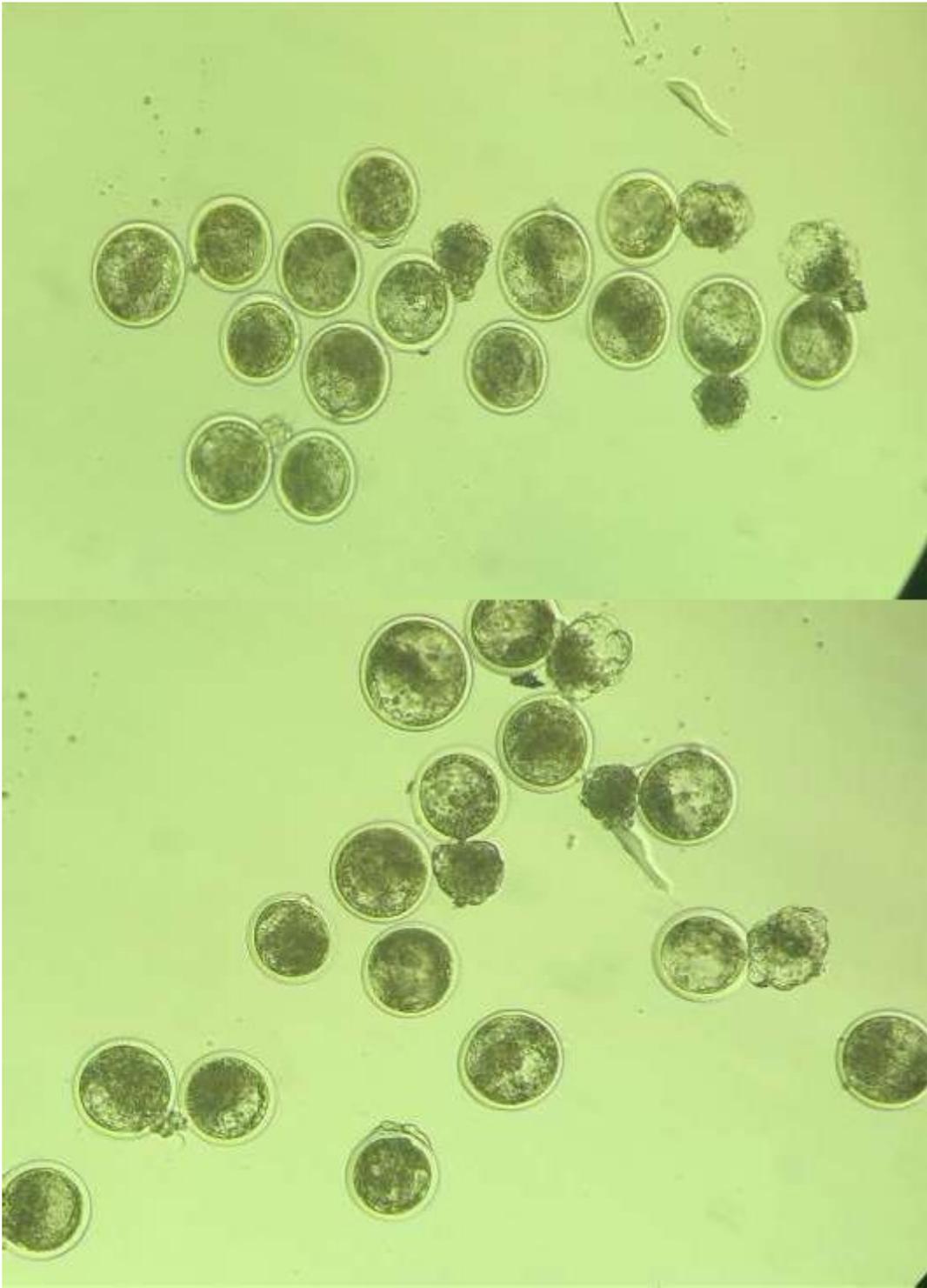
Manipulación de óvulos maduros



Inyección del nuevo núcleo (célula)



Proceso de electrofusión entre el citoplasma del ovulo y la membrana del nuevo núcleo



Embriones clones



Los terneros clonados mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). A: Tenera Gyr Ofelia-C1, en el día del nacimiento. B) Ternera Gyr Ofelia-C2