

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL



**VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA CRIOPRESERVADAS Y LA
CAPACIDAD DE ENUCLEACIÓN DE OVOCITOS, EN GATA DOMÉSTICA (*Felis Catus*).**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTADO POR:

MVZ YAMID ESTEBAN VALENCIA TORRES

Matrícula 2212801380

yamid.valencia@unillanos.edu.co

CO-DIRECTORES

DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

DRA. LLERETNY RODRÍGUEZ ÁLVAREZ

ASESOR INTERNO

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA

JURADO

Presidente: Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Secretario: Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Vocal: Dr. Jose Ernesto Hernández Pichardo

Vocal: Dr. Salvador Romo García

Iztapalapa, Ciudad de México 16 de mayo de 2024

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 16 de mayo de 2024

Comisión Académica del Posgrado

Presente

El que suscribe Yamid Esteban Valencia Torres alumno con número de matrícula 2212801380, del posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Viabilidad de las células de la granulosa criopreservadas y la capacidad de enucleación de ovocitos, en gata doméstica (*Felis Catus*)” a desarrollar en el Laboratorio de Reproducción Animal Asistida W-210. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Nombre completo y firma autógrafa

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe Yamid Esteban Valencia Torres alumno de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Itztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada “Viabilidad de las células de la granulosa criopreservadas y la capacidad de enucleación de ovocitos, en gata doméstica (*felis catus*)”.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. jurado para la obtención del grado de maestría en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si esta no fuese mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 16 de mayo de 2024.

Atentamente

A handwritten signature in black ink that reads "Yamid Valencia". The signature is stylized, with the first letter 'Y' being particularly large and the last name 'Valencia' written in a cursive-like script.

Yamid Esteban Valencia Torres



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 16 de febrero de 2022.

DR. CARLOS TONATIUH MORALES CRUZ
SUBDIRECTOR DE SALUD PÚBLICA
ALCALDÍA DE IZTAPALAPA

Re: nte:

A través de este conducto le solicitamos su apoyo para obtener órganos reproductivos de gatas, luego de que sean ovariectomizadas en sus programas de esterilización. Dichos órganos reproductivos serán utilizados en el proyecto titulado: **Formación de un banco de recursos genéticos de felinos domésticos**, que corresponde a una Tesis del Programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal, dentro de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de nuestra Universidad. Este proyecto sentará las bases para proponer alternativas de reproducción y conservación de felinos silvestres en riesgo.

Agradeciendo la fina atención que se sirva prestar al presente, quedamos de usted para cualquier información adicional.

Atentamente:

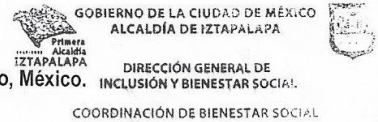
DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO
Codirectora interna de la Tesis

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA
Asesor interno de la Tesis

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Ccp. MVZ. Yamid Esteban Valencia Torres. Alumno de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal.
Ccp. Personal de la Clínica Veterinaria Delegacional.

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa C. P. 09340. Ciudad de México, México.
Edificio W Segundo Piso 201a Tel. 5804-4706 Fax 5804-4930



SUBDIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA

Recibido: M.VZ. Sergio Elguera Guzman
Ced. Prof. 09629008



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Ciudad de México a 12 de Abril de 2023.

**SUBDIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA
ALCALDÍA DE IZTAPALAPA**

Presente:

Por este conducto, nos permitimos solicitar su apoyo para obtener tejido de piel de abdomen de dimensiones de 0.3cm³, de 3 gatas que sean ovariectomizadas en sus programas de esterilización. Este tejido será utilizado en el proyecto titulado: **Eficiencia de las células de la granulosa en la fusión de carioplasto-citoplasto y la reconstrucción de embriones clones en gata doméstica (*Felis catus*)**, que corresponde a una Tesis del Programa de Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de nuestra Universidad. Será utilizado para derivar fibroblastos de piel en cultivos primarios que serán utilizados como grupo control, para la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) en ovocitos de gata enucleados y formar embriones. Se aclara que los embriones producidos, solo se utilizarán para teñirlos y determinar número de núcleos presentes, y otras tinciones vitales, más no para transferencia en gatas subrogadas. El proyecto sentará las bases para proponer alternativas de reproducción y conservación de felinos silvestres endémicos de México en riesgo, mediante la TNCSI.

Agradeciendo la fina atención que se sirva prestar al presente, quedamos de usted para cualquier información adicional.

Atentamente:

**DRA. MARÍA DEL CARMEN NAVARRO
MALDONADO**
Codirectora interna de la Tesis

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRÍZ GARCÍA
Asesor interno de la Tesis

GOBIERNO DE LA CIUDAD DE MÉXICO
ALCALDÍA DE IZTAPALAPA
DIRECCIÓN GENERAL DE
INCLUSIÓN Y BIENESTAR SOCIAL
SUBDIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA

21 ABR. 2023

RECIBIDO

RECIBIÓ: *[Signature]* HORA: 11:15

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

Ccp. MVZ. Yamid Esteban Valencia Torres. Alumno de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal.
Ccp. Personal de la Clínica Veterinaria Delegacional.

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco Núm. 186, Col. Leyes de Reforma 1ª Sección, Alcaldía Iztapalapa, C. P. 09310.
Ciudad de México, México.
Edificio W Segundo Piso 201-A Tel. 55-5804-4706

COMITÉ TUTORIAL

CO-DIRECTORA INTERNA

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

carmennavarro2006@yahoo.com.mx

CO-DIRECTORA EXTERNA

Dra. Lleretny Rodríguez Álvarez

Departamento de Ciencia Animal

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad de Concepción, Chile

lrodriguez@udec.cl

ASESOR INTERNO

Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Departamento de Biología de la Reproducción

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

deme@xanum.uam.mx

JURADO DE EXAMEN



Dr. Demetrio Alonso Ambriz García

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa



Dr. José Ernesto Hernández Pichardo

Departamento de Producción Agrícola y Animal
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco



Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Salvador Romo.

Dr. Salvador Romo García

Departamento de Ciencias Pecuarias
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Asistida Animal W-210 de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Este estudio contó con el apoyo de **CONAHCyT** para estudios de posgrado. Otorgado a Yamid Esteban Valencia Torres con **CVU**: 1188342.

El programa de **Maestría en Biología de la Reproducción Animal Asistida** de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el **Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONAHCyT** (PNPC) Registro 003797.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido la suma del trabajo y ayuda directa o indirecta de muchas personas, en primer lugar, quiero agradecerle a Dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida y poder dar un paso más hacia adelante, por darme la fuerza y la valentía de continuar cuando todo era oscuridad.

Siempre tendré una enorme deuda de agradecimiento con todos los Mexicanos puesto que los recursos para el desarrollo de este trabajo fueron dados a partir de todos los contribuyentes de este país, por lo cual agradezco a todas las personas, desde la más humilde hasta la más pudiente; también estaré agradecido porque a pesar de ser extranjero siempre fui muy bien tratado, en cada lugar y a cada casa a la que fui, siempre me hicieron sentir como en casa... ¡Muchas gracias México!

Agradecerles a mis directores de tesis, a la Profesora Lleretny Rodríguez a quien admiro por su trabajo y reconocimiento, muchas gracias por sus grandes aportes en el transcurso de mi tesis; a la Profesora María del Carmen Navarro y al Profesor Demetrio Ambriz por recibirme y aceptarme en su laboratorio, muchas gracias.

A los Profesores Ernesto Hernández y Luis Rodríguez de la UAM-X por su ayuda y colaboración durante este trabajo, al igual que al Profesor Daniel Veraguas por resolver mis dudas e inquietudes durante mi etapa experimental.

A mis jurados, Profesora Fahiel Casillas y Profesores Salvador Romo, Ernesto Hernández, porque gracias a sus comentarios y sugerencias pude mejorar mi trabajo final.

A las Licenciadas Vero Taumori y Violeta Luna Caballero, por su ayuda y disposición desde el inicio hasta el final de mi Maestría.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por darme la oportunidad de estudiar esta maestría como a todos los Profesores y Profesoras de la Maestría que me acompañaron en todo el proceso, en especial a las Profesoras, Socorro Retana por su ayuda y por sus clases magistrales y Marcela Arteaga quienes marcaron mi paso por la UAM con sus conocimientos.

A la Alcaldía de Iztapalapa y a la Clínica Veterinaria Delegacional de Iztapalapa por permitirme tomar las muestras de los animales, a los Médicos Veterinarios Jesús Nácar y Sergio Elguera, igualmente a todas las personas de la Clínica que siempre fueron atentas y amables conmigo.

A mis compañeros de laboratorio, Iván, Roberto, Dante, Diana y a todos los compañeros que pasaron por el laboratorio, también a mis compañeras de Maestría Elivier y Gabriela a quienes les deseo muchos éxitos.

A mi parcerero Mexicano Osvaldo Ipiña por ser mi amigo durante todos estos años, a su esposa e hija y a toda su familia quienes siempre tuvieron algún gesto de amor y hospitalidad hacia mí, gracias por abrirme las puertas de su casa.

A Felipe Portela (papito) y a Tania Arellano, sin ustedes no hubiese llegado a la UAM, ustedes también hacen parte del proceso.

A mis Profesores de pregrado a quien siempre admiré y respeté, Miguel Ángel Peña, Gustavo Pava, Juan José Romero, William León y Pedro René Eslava, gracias por todo lo aprendido.

A mis amigos de pregrado, Mariño, Linares, Roger, Bolívar, Felipe, Alexis, Cuan, Camilo, Sánchez, Vargas y a todos los que de alguna manera me apoyaron. Gracias Ana Milena, Ana María Fernanda y Natasha Vargas por sus consejos y apoyo.

A mis amigos Daniel Rodríguez, Javier Moreno, David Fabian Soler Niño y Jorge Santos (rojo), gracias por estar ahí en las buenas y no tan buenas, pero ante todo gracias por creer en mí, sin ustedes esto no sería posible. A mi mompa Daniel Herrera, gracias por su amistad sincera, vendrán tiempos mejores.

Agradecer también a Maira Lorena y Javier, gracias por su ayuda y apoyo en todo. A Laura Paola por creer en mí.

Muchas gracias a mis Profesores y amigos Jorge Pachón y Hernando Vergara por sus consejos y enseñanzas, a mi hermano Yul Jaider, gracias por acompañarme en este proceso, por sus consejos y por todos los momentos vividos, a mi sobrina Lauris, Antonella y Junior gracias.

Finalmente agradecerle a Doña Miriam y Karen por su amistad y por abrirme las puertas de su hogar. Gracias Carol por sus oraciones y consejos, gracias por guiarme.

¡Gracias por todo! Muchas gracias a todos por todo, incluso a los que en este momento se me escapan de mi memoria y recuerdos.

DEDICATORIA

Esta tesis quiero dedicársela en primer lugar a Dios y a la Virgen de Guadalupe por levantarme, guiarme y cuidarme. ¡Toda la gloria y la honra sea para Dios!

Dedicarle este trabajo al mejor hombre, al mejor padre, Jesús Over Valencia, a quien siempre extrañé, pero sé que siempre estuvo conmigo, acompañándome y guiándome.

A mi madre, Ana Lucila Torres, la vida siempre tiende al equilibrio, no me dió la oportunidad de tener un padre, pero me recompensó con la mejor madre, la mejor mujer y persona, gracias mamá por todo, gracias por tu ejemplo.

A mi hermano Miguel Ángel Torres, como muestra y ejemplo de que querer es poder, Dios te bendiga siempre.

A mis abuelitos Ana Graciela Torres y Miguel Antonio Torres por sus oraciones y cariño.

A mi tía Yolanda y Desi por su ayuda y palabras de aliento, a mi tía Blanca y Arnulfo, a mi tío Néstor y a mi madrina Elda, muchas gracias, al igual que a mis primos (Iván, Adriana, Alejandra y Julieta).

A los Salvajes (Marcela, Wilmer, Mariana, Luciana y Nicolás), gracias por recibirme en su hogar.

A mi primo hermano Fabian Torres, ahora somos más hermanos que antes, gracias por todo lo que ha hecho por mí.

A toda la Familia Torres por hacerme sentir querido y amado en el seno de mi hogar.

A Guayabita, gracias por verme, por ayudarme a levantar; lo que el hombre destruyó, Dios lo reconstruirá.

A Karina Vargas, muchas gracias por estar ahí, por creer en mí y apoyarme.

A mi mompirri Mexicano Roberto Vásquez por su amistad y cariño, a su mamá Doña Florencia, a sus hermanos (Mario, Raúl, Gabriel, Andrés y Victoria), a su cuñado y sobrinas y a toda su familia, Dios los bendiga siempre y multiplique todo lo que hicieron por mí.

Y por último, pero no menos importante mis amigos de cuatro patas (Katy, Negro, Mona, Muñeco, Rocky, Ramona, Picachu y Cumbia), gracias por todo.

Salmo 23

Tú, Señor estás conmigo

El Señor es mi pastor; nada me falta.
Me hace descansar en verdes pastos,
me guía a arroyos de tranquilas aguas,
me da nuevas fuerzas y me lleva por caminos rectos,
haciendo honor a su nombre.

Aunque pase por el más oscuro de los valles,
no temeré peligro alguno,
porque tú, Señor estás conmigo;
tu vara y tu bastón me inspiran confianza.

Me has preparado un banquete
ante los ojos de mis enemigos;
has vertido perfume en mi cabeza,
y has llenado mi copa a rebosar.
Tu amor y tu bondad me acompañan
a lo largo de mis días,
y en tu casa, oh Señor, por siempre viviré.

INDICE

INDICE	14
ABREVIATURAS	16
ÍNDICE DE FIGURAS.....	17
INDICE DE TABLAS.....	17
RESUMEN.....	18
ABSTRACT	19
INTRODUCCIÓN.....	20
1.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA GATA.....	22
1.2. EL GATO DOMÉSTICO COMO MODELO EXPERIMENTAL	25
1.3. BIOTECNOLOGÍAS PARA LA REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN FELINOS.....	25
1.4. ENUCLEACIÓN DE OVOCITOS DE GATA EN MII	28
1.5. LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA	29
1.6. CRIOPRESERVACIÓN CELULAR	31
2. ANTECEDENTES.....	32
2.1. LAS CÉLULAS SOMÁTICAS EN ESPECIES EXTINTAS.....	32
2.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS EN ALGUNAS ESPECIES ANIMALES	32
2.2.1 DERIVA DE FIBROBLASTOS	32
2.2.2 CÉLULAS DE LA GRANULOSA Y FIBROBLASTOS COMO CARIOPLASTOS	33
2.3 TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS INTERESPECIE EN FELINOS (TNCSI)	35
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
4. JUSTIFICACIÓN.....	37
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	37
6. HIPÓTESIS	37
7. OBJETIVOS	37
7.1. OBJETIVO GENERAL	37
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
8. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39

9.1.	DERIVA DE FIBROBLASTOS DE PIEL Y DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE OVOCITOS DE GATA DOMÉSTICA, EN CULTIVOS PRIMARIOS	39
9.1.1	DERIVA DE FIBROBLASTOS DE PIEL.....	39
9.1.2	DERIVA DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA	40
9.2	MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV) DE OVOCITOS DE GATA	42
9.3	ENUCLEACIÓN DE LOS OVOCITOS DE GATA.....	43
10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
11	RESULTADOS.....	45
11.1	DERIVA DE FIBROBLASTOS DE PIEL Y CÉLULAS DE LA GRANULOSA DEOVOCITOS DE GATA DOMÉSTICA, EN CULTIVOS PRIMARIOS	45
11.2	MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV) DE OVOCITOS DE GATA	48
11.3	ENUCLEACIÓN DE OVOCITOS DE GATA EN MII	50
12	DISCUSIÓN.....	52
12.1	DERIVA DE FIBROBLASTOS DE PIEL Y DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE OVOCITOS DE GATA DOMÉSTICA, EN CULTIVOS PRIMARIOS	52
12.2	MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> (MIV) DE OVOCITOS DE GATA	55
13	CONCLUSIONES.....	56
14	BIBLIOGRAFÍA.....	57

ABREVIATURAS

COC:	Complejos Ovocito- células del cúmulo
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Medio Eagle Modificado de Dulbecco.
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DPBS:	Dulbecco's Phosphated Buffered Saline / Solución Salina de Dulbecco amortiguada con fosfatos.
EGF:	Epidermal Growth Factor / Factor de crecimiento epidérmico
EPM:	Extrusión de placa metafásica
GC:	Células de la granulosa de gata doméstica
GE:	Fibroblastos de piel de gata doméstica
ITS:	Insuline-Transferrine- Selenio
HCM:	Handmade cloning / Clonación manual
MII:	Metafase II
MIV:	Maduración In Vitro
RPM:	Revoluciones por minuto.
SOF-1:	Synthetic Oviductal Fluid / Fluido Oviductal Sintético.
SSF:	Solución salina fisiológica.
SFN:	Suero fetal bovino
T10:	TCM-199 suplementado con 10% de SFB
T2:	TCM-199 suplementado con 2% SFB
T20:	TCM-199 suplementado con 20% SFB
T30:	TCM-199 suplementado con 30% SFB
TCM-199:	Tissue Culture Medium 199/ Medio de Cultivo Tisular 199
TNC S:	Transferencia Nuclear de Células Somáticas.
TNC SI:	Transferencia Nuclear de Células Somáticas Interespecie.
DIV:	Desarrollo <i>In Vitro</i>
WOW:	Well of the Well, o celda sobre celda.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Imagen representativa de la deriva de fibroblastos de piel de gata en cultivo primario. Día 4 de cultivo. Aumento 20X. Fuente: Archivo personal.	4545
Figura 2 Imagen representativa de la deriva de células de la granulosa de gata en cultivo primario. Día 2 de cultivo. Aumento 20 X. Fuente: Archivo personal.....	4646
Figura 3 Imagen representativa de la monocapa de células de la granulosa q al día 7 de cultivo. Aumento 20X. Fuente: Archivo personal	46
Figura 4 Presencia del primer cuerpo polar en ovocito maduro. Aumento 40X. Fuente: archivo personal.....	49
Figura 5 Proceso de enucleación manual (HMC) y reconstitución de ovocitos de gata. (a). Disgregación de zona pelúcida y enucleación. 1.T2. 2.Pronasa. 3.T20. 4. T30 con citocalasina b. (b), Enucleación mediante corte manual. (c) y(d). Ovocitos reconstituídos. Fuente: Archivo personal.	50
Figura 6 Ovocitos reconstituídos de gata enucleados manualmente (citoplastos).	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentración celular de fibroblastos de piel de gata de 5 pasajes.	49
Tabla 2 Viabilidad celular pre y postcongelación de células de la granulosa y fibroblastos de piel de gata doméstica.	48
Tabla 3 Tasa de MIV de ovocitos de gata doméstica con diferentes tratamientos hormonales.	48
Tabla 4. Tasa de MIV de ovocitos de gata doméstica, utilizando medio MIV-T3 sin y con Insulin-Transferrin-Selenium (ITS).....	49
Tabla 5 Porcentaje de ovocitos reconstituídos y eficiencia de la enucleación manual de ovocitos de gata.....	51

RESUMEN

La situación de las poblaciones de diversas especies de mamíferos a nivel mundial es compleja porque, dadas las condiciones antropogénicas, se encuentran en estado vulnerable o incluso en riesgo. Los grandes felinos se encuentran en esta situación a pesar de los esfuerzos internacionales para evitarlo. Una parte de estos esfuerzos de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) es el uso de biotecnologías reproductivas. La clonación de embriones puede ser un recurso importante, así como el uso de modelos animales filogenéticamente cercanos a la especie de interés, en este caso, el gato doméstico. La clonación de embriones utiliza células somáticas de la especie que se desea clonar y ovocitos maduros (Metafase II) enucleados de especies relacionadas, como receptores de núcleos. En el presente estudio, se evaluaron las células de la granulosa derivadas de ovocitos de gata doméstica vs. Fibroblastos de piel de la misma especie, para establecer cultivos celulares. Los fibroblastos alcanzaron el quinto pasaje, mientras que las células de la granulosa sólo alcanzaron el segundo pasaje. Los fibroblastos criopreservados a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ tuvieron una supervivencia satisfactoria hasta del 90% después de la descongelación, pero las células de granulosa no sobrevivieron más allá del 2do pasaje. En otro experimento, se maduraron *in vitro* ovocitos de gata doméstica, evaluándose el efecto de diferentes tratamientos hormonales para la maduración *in vitro* (MIV), siendo el mejor tratamiento: eCG 5 UI, hCG 5 UI y estradiol $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ suplementados en el medio TCM-199. Además, al agregar $10\text{ }\mu\text{L/mL}$ de insulina-transferrina-selenio (ITS) al medio de MIV, dio como resultado una tasa más alta (59 % vs. 45 % del grupo control, $p = \leq 0.001$). La enucleación de ovocitos en Metafase (MII) tuvo una eficiencia del 98%. Se concluye que, si bien fue posible derivar células de la granulosa de gata doméstica, éstas no sobrevivieron más allá del 2do pasaje celular, ni a la congelación, por lo que se creó un banco de germoplasma de estas células en 2do pasaje como donadoras de núcleos para programas de clonación de embriones, mientras los fibroblastos llegaron hasta el 5to pasaje. Por otro lado, la utilización del ITS mejoró la MIV entretanto la eficiencia en la enucleación manual de ovocitos en MII demuestra que pueden ser utilizados como receptores de núcleos para la clonación de embriones en esta especie.

Palabras clave: Células de la granulosa, fibroblastos, enucleación, gato.

ABSTRACT

The situation of the populations of several mammal species worldwide is complex because, given the anthropogenic conditions, they are in a vulnerable state or even at risk. Big cats are in this situation despite international efforts to help. One part of these efforts of the International Union for Conservation of Nature (IUCN) is the use of reproductive biotechnologies. The cloning of embryos can be an important resource, as well as the use of animal models phylogenetically close to the species of interest, in this case, the domestic cat. Embryo cloning uses somatic cells of the species that needs to be cloned and enucleated mature oocytes (MII) of related species, as recipients of nuclei. In the present study, the granulosa cells derived from domestic cat oocytes were evaluated vs. skin fibroblasts, to establish cell cultures for a gene bank. Fibroblasts reached the fifth passage, while granulosa cells only reached the second passage. Fibroblasts cryopreserved at -196°C , had a satisfactory survival after thawing, but granulosa cells did not. In another experiment, domestic cat oocytes were matured *in vitro*, evaluating the effect of different hormonal treatments for *in vitro* maturation (IVM), being eCG 5UI, hCG 5UI and estradiol $1\mu\text{g}/\text{mL}$ supplemented in TCM-199 the best treatment. Furthermore, adding $10\mu\text{L}$ of Insulin-transferrin-selenium (ITS) to the IVM medium, resulted in a higher rate (59% vs. 45% control group, $P=0.001$). The enucleation of MII oocytes had an efficiency of 98%. It is concluded that, although it was possible to derive granulosa cells from domestic cat, they did not survive beyond 2 cellular passages, nor freezing, making not possible to create a gene bank of these cells as nuclei donors for embryo cloning programs. On the other hand, the efficiency in the enucleation of MII oocytes demonstrates that they can be used as recipients of nuclei for embryo cloning in this species.

Key words: Granulosa cells, fibroblasts, enucleation, cat.

INTRODUCCIÓN

La degradación de hábitats y ecosistemas de las distintas especies de fauna silvestre es de impacto para la humanidad, pues dependemos de la vida silvestre y de los recursos generados por la biodiversidad para un completo equilibrio ecosistémico. Más de 8,400 especies de fauna y flora silvestre se encuentran en franco peligro de extinción, mientras que cerca de 30,000 se consideran vulnerables o en peligro de extinción (ONU 2022). Con base en estas estimaciones, la ONU (2022) sostiene que más de un millón de especies animales están amenazadas de extinción, lo que conlleva a la probable pérdida de material genético de animales únicos e irrepetibles.

Con respecto a los felinos, en el mundo existen 38 especies de las cuales, una tercera parte se encuentra en América y todas ellas, a excepción del gato doméstico, se encuentran amenazadas (Dell'Amore, 2017). La familia *Felidae* ha estado en el centro de esta problemática puesto que el aumento de la frontera agrícola y ganadera ha generado el deterioro directo de su hábitat (Castaño *et al.*, 2016). Estos animales cumplen una importante función biológica como depredadores ayudando al control de poblaciones animales. La disminución de su corredor biológico y de alimento, ha generado el enfrentamiento de estos felinos con poblaciones humanas por la presa, que generalmente ahora son animales de granja, lo que ha ocasionado el aumento de felinos muertos y lesionados intencionalmente en países como México, Guatemala, Panamá, Colombia, Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay (Castaño *et al.*, 2016). Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) países como el Salvador y Uruguay han extinguido las poblaciones de jaguar en su territorio (Molpeceres, 2021).

Para el caso de México, según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se reportan cuatro miembros de la familia *Felidae*, de los cuales, tres están categorizados como en peligro de extinción: *Leopardus pardalis* u ocelote, *Leopardus wiedii* o margay, *Panthera onca* o jaguar y uno como amenazado *Herpailurus yagouaroundi* o jaguarundí, lo que deja en evidencia el riesgo en el que se encuentran los felinos nacionales. Aunque (Conanp, 2021) reporta que el jaguarundí, se encuentra en estado de conservación amenazado, mientras el margay, el jaguar y el ocelote en estado de peligro de extinción, por otra parte, reporta el lince (*Lynx rufus*) y el puma (*Puma concolor*) sin estatus en su estado de conservación.

En la conservación de las especies felinas en América Latina se han llevado a cabo esfuerzos entre los diferentes países que comparten corredores de su hábitat, como es el identificar los puntos o zonas críticas de conflicto entre humanos y felinos en

México (Hoogesteijn *et al.*, 2016a), Panamá (Moreno *et al.*, 2016), Colombia (Castaño *et al.*, 2016), Guatemala (García *et al.*, 2016), Costa Rica (Corrales *et al.*, 2016), además de Brasil, Uruguay y Paraguay. En estos esfuerzos no sólo se han identificado las áreas de confrontamiento, sino que se han desarrollado estrategias con el fin de encontrar formas de coexistencia entre el humano y estos depredadores, como es la crianza del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) en rebaños solos o mixtos con bovinos (Hoogesteijn *et al.*, 2016b) y el manejo más estricto de rebaños con cercos eléctricos. También es importante que en las zonas en donde se generan estos enfrentamientos se resuelvan las necesidades básicas de todas las comunidades, por lo que es importante considerar prioritario el capital social. En Colombia, en 60 predios modelo, se ha logrado con aumento de la concientización y técnicas, implementar una mejora de la convivencia del humano con los felinos silvestres, siendo un ejemplo de que la coexistencia con ellos es posible, factible y en algunos casos conveniente (Gallo, 2021).

En el 2018, durante la última Conferencia del Convenio sobre Diversidad Biológica, en Egipto, al abordar las problemáticas a las cuales se enfrenta el jaguar en América latina por la reducción de su hábitat y la caza ilegal, se elaboró el Plan Jaguar 2030. Que es un plan regional para la conservación del felino más grande del continente así como sus ecosistemas, que tiene como fin la identificación, promoción y conservación, del corredor biológico entre los diferentes países utilizado por dicha especie de felino (Sierra, 2018; Molpeceres, 2021).

A la fecha no se cuenta con un censo que permita identificar cuántos individuos hay en México de las diferentes especies de felinos. Estos animales se enfrentan a diferentes amenazas y problemáticas en las zonas que habitan debido a la pérdida y fragmentación del hábitat a consecuencia del aumento de la frontera agropecuaria, obras de infraestructura pública (tendidos eléctricos, presas, carreteras, asentamientos humanos irregulares e infraestructura turística). Algunas especies también son víctimas de la cacería furtiva, asimismo el número de sus presas ha disminuido debido a la caza indiscriminada de las mismas, lo cual genera una disminución en la disponibilidad de alimento llevando a que estos animales busquen alimento en granjas, generando daños en animales domésticos y enfrentamientos entre el hombre y los felinos, adicionalmente, algunas especies son cazadas por su piel; otra problemática que ha aumentado la mortalidad ha sido las colisiones con vehículos en algunos sitios (SEMARNAT, 2018).

En su programa de acción para la conservación de pequeños felinos (SEMARNAT, 2018) establece 5 estrategias de conservación basadas en 1. El manejo integrado del paisaje, que consiste en la protección y manejo del hábitat, restauración del hábitat y la conservación de corredores biológicos para la conectividad de las

especies. 2 Manejo y monitoreo de poblaciones, a través de la protección y vigilancia, prevención de impactos sobre las poblaciones, manejo de las poblaciones para mantenerlas o recuperarlas, la coordinación con los diferentes actores de las zonas de conservación (gobiernos estatales y municipales, academia y organizaciones sociales), la investigación y monitoreo de las especies para fomentar el conocimiento y protección. 3 Participación social y cultura para la conservación, fomentando la educación, comunicación y difusión de la importancia de las especies y fomentar el involucramiento de la sociedad para generar acciones de conservación. 4 Economía de la conservación, generar y consolidar actividades productivas que permitan la conservación de las especies y su hábitat, 5 Cambio climático, realizar acciones dirigidas a identificar la vulnerabilidad de las poblaciones y del hábitat de las especies, contribuir en la adaptación de las especies al cambio climático y por último generar relaciones interinstitucionales que contribuyan a mitigar las amenazas del cambio climático en las poblaciones.

1.1. Anatomía y fisiología reproductiva de la gata

Los felinos presentan varias singularidades que caracterizan el crecimiento folicular y la ovulación en comparación con otros mamíferos (Perego *et al.*, 2021). Las gatas son poliéstricas estacionales, por lo que pueden presentar varios ciclos estrales dentro de una estación, que es continuado por un tiempo anovulatorio o anestro. Éstos son activos reproductivamente durante los días largos, disminuyendo su temporada reproductiva cuando las horas luz son acortadas, por lo cual la ciclicidad en la gata puede variar en diferentes partes del mundo, dependiendo de la altitud y el fotoperiodo, los felinos domésticos en países tropicales o cercanos a la línea del ecuador pueden mostrar ciclicidad durante todo el año sin presentar anestro estacional (Johnson, 2022), aunque se ha demostrado en condiciones artificiales que cuando están expuestos a 14 horas de luz día pueden ciclar durante todo el año, aunque con algunos cambios, como que sólo expresen un celo al mes (Leyva *et al.*, 1989), asimismo las tasas de gestación pueden disminuir ligeramente durante los meses de invierno a pesar de la iluminación artificial (Johnson, 2022). Las gatas se caracterizan por tener dos tipos de ovulación la inducida y la espontánea, en la primera ovulan en respuesta a múltiples apareamientos naturales, aunque artificialmente también se puede lograr realizando varios masajes en la vulva con un isopo; y la segunda que se presenta en un tercio de las gatas (Johnson, 2022), la incidencia de la ovulación espontánea se ve afectada por el aumento de peso corporal, lo que hace que incremente este tipo de ovulación (Binder *et al.*, 2019), aunque todavía no son conocidos todos los factores que puedan afectar la ovulación espontánea, se ha observado que gatas alojadas en presencia visual, olfativa y auditiva de un macho entero, aumentan la frecuencia de aparición de ovulación (Johnson, 2022); un incremento también ha sido reportado cuando son alojadas en

grupo, teniendo una incidencia del 0-22% a diferencia de un 33-57% cuando se incorporó un macho en una jaula separada dentro del grupo (Gudermuth *et al.*, 1997).

Las gatas muestran distintas oleadas de desarrollo y crecimiento folicular, en donde los folículos crecen desde 1-1.5 mm formando folículos antrales dependientes de gonadotropinas (Saint *et al.*, 2007). Varios folículos son seleccionados y se convierten en folículos dominantes que continúan creciendo hasta la ovulación, mientras los demás sufren regresión y atresia (Malandain *et al.*, 2011), pero, aun la información sobre el proceso fisiológico del crecimiento y desarrollo ovárico y folicular al igual que la regulación hormonal de la proliferación de las células de la granulosa y esteroidogénesis es limitada en felinos (Perego *et al.*, 2021).

En el felino doméstico la pubertad aparece aproximadamente entre los 6 a 12 meses de edad o en peso entre los 2 a 3 Kg que representa alrededor del 80% de su peso adulto. La edad a la que estos animales alcanzan la pubertad también se puede ver afectada por la temporada del año en el que nacen, de esta manera una cría que nace en primavera es probable que alcance la pubertad hasta la siguiente temporada de reproducción cuando los días son más largos, además de esto la raza es otro factor que pueda afectar la edad de la pubertad (Johnson, 2022).

Los ovarios en la gata tienen un tamaño promedio de 1 cm x 0.5 cm y se encuentran sostenidos dentro de la cavidad abdominal por el ligamento suspensorio del ovario, además se encuentran recubiertos por la bolsa ovárica que proviene del mesosalpinx y es una porción del ligamento ancho que sostiene el oviducto; los ovarios se encuentran unidos al útero por medio del ligamento propio del ovario, estos se encuentran irrigados por la arteria y la vena ovárica (Johnson, 2022).

Los oviductos en la gata son largos y tortuosos, llegando a medir entre 5 a 9 cm de largo, y están compuestos por la fimbria, el infundíbulo, el ámpula y el istmo, es en la unión de estos últimos en donde ocurre la fecundación. El útero en el felino doméstico es bicornada y lo forman el cuerpo que puede medir 2 cm y dos cuernos uterinos que llegan a medir entre 7 a 10 cm, estos dos se encuentran irrigados por la arteria y vena uterina; luego del cuerpo del útero se encuentra el cérvix, seguido del vestíbulo vaginal y la vulva (Johnson, 2022)

El proestro en la gata es de una corta duración menor a 24 horas por lo cual no suele observarse en gatas, además de tener nulos signos de comportamiento, este se asocia con la preparación para el estro, en donde el tamaño folicular aumenta incrementando las concentraciones de estrógenos (>20 pg/ml) y el subsecuente engrosamiento del epitelio vaginal, al igual que la receptividad al macho y aceptación del coito. El estro también es denominado como fase folicular y tiene una duración de 5 a 7 días (Johnson, 2022). Durante el celo, los folículos

dominantes alcanzan la madurez y miden 2-3mm de diámetro, cada ovario puede tener entre tres a seis folículos maduros en cada oleada folicular. Por otro lado en la gata los signos del celo no son tan evidentes como en la perra pero, suelen consistir en frotarse el cuello y la cara contra paredes y muebles, revolcarse sobre el lomo, vocalizar, adoptar una posición lordótica; en un estudio se reportó que sólo el 8% de las gatas reflejaban signos en el día 1 de celo, pero este porcentaje incrementó hasta el 80% en el día 4 y un 100% el día 6 del celo (Shille *et al.*, 1979); si la monta ocurre antes de la maduración de los folículos, es probable que no se dé la ovulación.

Si la ovulación no se da, ocurre la fase de interestro, que tiene una duración de aproximadamente 8-9 días, durante éste, los folículos dominantes sufren atresia y la concentración de estradiol disminuye, a medida que el número de folículos se reduce, la siguiente oleada de desarrollo folicular ya está en marcha, de esta manera el interestro vuelve a dar paso al estro; por otro lado si la ovulación si se produce, se dará la fase de diestro, en donde la presencia de uno o más cuerpos lúteos en el ovario confirma esta fase (Johnson, 2022); se ha demostrado que los cuerpos lúteos aumentan la secreción de progesterona en el cuarto día después de la primera monta, entrando la gata en la fase lútea (Verstegen *et al.*, 1993).

Para que se dé la ovulación depende del número de apareamientos, además de la frecuencia de los mismos, por lo que generalmente se necesitan cuatro o más montas para generar el suficiente estímulo que libere la hormona luteinizante (LH) para que se genere la ovulación. La LH aumenta poco tiempo después del apareamiento, llegando a su punto más alto a las 2 horas y permaneciendo elevada hasta por 8-12 horas aproximadamente, luego de esto la ovulación ocurre después de 36 horas pasada la monta, siempre y cuando existan folículos preovulatorios.

Cuando se da la gestación, la progesterona alcanza su punto máximo entre los 13 y 21 días y luego disminuye gradualmente alcanzando su nivel basal a los 65 días, la gestación tiene una duración aproximada de 64 después del primer apareamiento (Verstegen *et al.*, 1993). La producción de progesterona ovárica es imprescindible para el mantenimiento de la gestación, aunque se ha demostrado que la placenta en estos animales es capaz de producir progesterona llevando a término la gestación en gatas ovariectomizadas durante la segunda mitad de la gestación (Siemieniuch *et al.*, 2012). Luego de la gestación el celo fértil aparecerá entre los 10 días después del destete, puesto que los gatos lactantes producen una retroalimentación negativa en la ciclicidad o anestro posparto, este estímulo se puede ver afectado por el tamaño de la camada (Johnson, 2022)

En las gatas se puede dar el apareamiento y ovulación, pero el animal no queda gestante, en este caso se produce un pseudoembarazo, el cual dura entre 40 a 45 días, un poco inferior a la duración de la gestación. La progesterona aumenta al

igual que en la gestación pero disminuye de manera constante después del día 30 alcanzando su nivel basal a los 40-41 días después del primer apareamiento (Siemieniuch et al., 2012). Luego la aparición del primer celo fértil es de más o menos 17 días, por lo que la monta con un macho estéril o subfértil que induzca la ovulación puede provocar la ausencia del celo entre 40-50 días (Johnson, 2022).

El tiempo entre la presentación de un estro y otro puede ayudar a dilucidar si la hembra ovuló o no, si el intervalo es de 10 días la gata no ovuló, pero, si el tiempo es de 40-50 días, el animal ovuló pero no quedó gestante; la medición de la progesterona también puede servir para determinar si una hembra ovuló, la progesterona estará baja (<2,0 ng/ml) si la gata no ovuló y se elevará si ovuló (>2,0 ng/ml) (Johnson, 2022).

1.2. El gato doméstico como modelo experimental

Algunas de estas características reproductivas de la gata doméstica como el tipo de ovulación espontánea o inducida y la estacionalidad reproductiva son similares a las presentadas en otras especies de felinos silvestres como el jaguar (*Panthera onca*), el puma (*Puma concolor*), el tigrillo (*Leopardus tigrinus*) y el león (*Panthera leo*), aunque esta estacionalidad reproductiva puede ser más marcada en unos que en otros (Brown 2006; Thongphakdee et al., 2020).

En su caso, el guepardo (*Acinonyx jubatus*), al ser una especie solitaria, el comportamiento social puede llegar a suprimir la actividad reproductiva. Así tenemos que, en zoológicos, en donde varias hembras son obligadas a convivir, la hembra dominante suprime la reproducción de las demás hembras, confirmándose que al ser separadas reinician su actividad ovárica. Por su parte, en hembras de ocelotes (*Leopardus pardalis*) se observó el efecto contrario, pues al mantenerlas aisladas su actividad reproductiva desaparecía (Brown, 2006). Si bien existen ciertas diferencias entre especies, también hay similitudes en los ciclos reproductivos, de manera que algunos estudios o técnicas reproductivas desarrolladas en el gato doméstico, pueden ser extrapoladas con consideraciones a felinos silvestres (Brown, 2006; Thongphakdee et al., 2020), de aquí la importancia del estudio reproductivo de la gata doméstica por su cercanía con especies silvestres en las cuales su estudio e investigación es de difícil acceso y manejo, por lo cual la gata ha sido utilizada como modelo experimental en el avance del conocimiento reproductivo de las especies felinas.

1.3. Biotecnologías para la reproducción asistida en felinos

Una alternativa de suma importancia para la conservación de la fauna silvestre que se encuentra en riesgo de extinción dado que sus poblaciones han disminuido

alarmantemente, es el uso de las biotecnologías reproductivas. Éstas permiten conocer la fisiología y el comportamiento reproductivo de las especies, en particular de aquellas de las que se conoce muy poco o de las que no hay conocimiento alguno (Thongphakdee *et al.*, 2020), además de que coadyuvan en la preservación de la diversidad genética en dichas especies. Algunas de estas biotecnologías reproductivas incluyen la inseminación artificial (IA), la producción de embriones mediante fertilización *in vitro* (FIV), la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) o clonación de embriones, y la transferencia de embriones (TE), entre otras. Ellas permiten el mantenimiento de la diversidad genética de pequeñas poblaciones y de animales en cautiverio (Moro, 2015). El material biológico obtenido puede criopreservarse en bancos de germoplasma o de recursos genéticos, que incluyen gametos, embriones, células somáticas y células madre pluripotenciales obtenidas por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), así como de tejidos (Agca, 2012; Thongphakdee *et al.*, 2020).

El grado de complejidad que implica realizar la reproducción asistida en felinos silvestres ha obligado a su estandarización en especies emparentadas como modelos animales. En los felinos silvestres, el gato doméstico ha sido utilizado como modelo de experimentación en distintos estudios para el desarrollo de técnicas reproductivas (Jewgenow y Zahmel, 2020). Ello ha permitido comprender los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan el desarrollo embrionario temprano y la reprogramación nuclear (Gómez *et al.*, 2004; Veraguas, 2018), y ha permitido avanzar en la aplicación de las técnicas reproductivas y su extrapolación a felinos silvestres de interés (Jewgenow y Zahmel, 2020), lográndose nacimientos de crías vivas de especies de felinos no domésticos por TNCS (Gómez *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2008; Pope, 2014). Sin embargo, aún quedan algunos problemas por resolver, como la baja tasa de MIV del 50-65% comparado con otras especies con fines zootécnicos, además, de estos ovocitos que alcanzan la metafase II, sólo el 20-30% pueden desarrollarse hasta blastocisto luego de la FIV (Vien *et al.*, 2013); otros problemas son la reprogramación nuclear anormal y la baja eficiencia de la TNCS (Gómez *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2022), asimismo la transferencia embrionaria en los felinos tiene una baja tasa de implantación y de desarrollo embrionario comparado con el de otras especies, sumado a esto los embriones generados por TNCS o TNCS interespecie tienen una menor capacidad de desarrollo embrionario (Gómez *et al.*, 2009; Veraguas *et al.*, 2023), por lo que es imperativo encontrar las técnicas que mejoren los resultados al momento obtenidos. Por otra parte, es de suma importancia aumentar los estudios en felinos, puesto que son muy pocas las investigaciones realizadas en felinos domésticos y aún más en especies exóticas en el área reproductiva comparada con otras especies productivas y de mayor valor comercial; las publicaciones realizadas sobre reproducción en felinos domésticos y no domésticos en la base de datos PubMed

de 2010- 2016 fueron 151, de los cuales 28 estaban relacionados con avances en técnicas de reproducción asistida y de éstos sólo 3 eran de felinos silvestres, en cuanto a clonación sólo se publicaron 15 y de éstos la pobre cifra de 2 fueron realizados en especies exóticas (Jewgenow *et al.*, 2017).

La TNCS ha permitido el nacimiento de individuos idénticos, teniendo un gran potencial para la multiplicación de ejemplares en especies con bajas poblaciones y con problemas reproductivos. Sin embargo, esta es la tecnología reproductiva más compleja con una baja eficiencia en la obtención de individuos viables, existiendo problemas y preguntas por resolver con respecto a la reprogramación celular, considerada el cuello de botella en el desarrollo de la técnica (Cordova *et al.*, 2017; Vázquez *et al.*, 2022), los embriones generados por TNCS tienen expresión anormal de genes, los cuales son regulados por mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN que consiste en la metilación de una base nitrogenada generalmente citosina en el C5, estos patrones de metilación del ADN varían dependiendo del tipo celular (Duan 2020; Vázquez *et al.*, 2022) y en embriones clones son dados por la célula somática; han sido reportados en estos embriones patrones de metilación del ADN anormal comparado con embriones producidos in vivo, lo cual ha sido relacionado con alteraciones placentarias en fetos clonados (Koroghi 2018; Vázquez *et al.*, 2022). Así mismo la modificación postraduccional de histonas también puede afectar la carga electrostática de la cromatina alterando la interacción del ADN con las histonas, por otra parte, ocurre la acetilación y metilación de lisina, la cual es dependiente del tipo de célula somática utilizada como carioplasto; en embriones clones el patrón anómalo de metilación puede atribuirse a una reprogramación inadecuada de las células somáticas en la activación del genoma embrionario (Vázquez *et al.*, 2022). Debido a esto la TNCS no es tan eficiente como otras biotecnologías reproductivas, de esta manera varios estudios se han centrado en mejorar la reprogramación nuclear de las células somáticas, así como tratar de entender los mecanismos involucrados en todos los procesos que puedan ayudar a mejorar la eficiencia y el nacimiento de crías vivas (Vázquez *et al.*, 2022).

Con la TNCS se han obtenido nacimientos de gatos domésticos (Shin *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2019), gatos silvestres africanos (*Felis silvestris lybica*) (Gómez *et al.*, 2004), y gatos del desierto (*Felis margarita*) (Gómez *et al.*, 2008), por el método tradicional que utiliza micromanipuladores. Para lograrlo, fue necesaria la transferencia nuclear interespecie (TNCSI), en la que la célula receptora del núcleo (citoplasto) pertenecía a una especie diferente de la célula donadora del núcleo (carioplasto). Los nacimientos fueron posibles a su vez, gracias a la transferencia heteróloga de embriones, en la que embriones de felinos silvestres de talla pequeña se transfirieron a úteros de gatas domésticas. Esto demuestra la importancia del gato doméstico en la reproducción de felinos silvestres, pues no sólo puede ser

utilizado en el establecimiento de técnicas reproductivas *in vitro*, sino que también puede ser utilizado como incubadora biológica de embriones de diversos felinos silvestres de talla pequeña (Gómez *et al.*, 2004).

La TNCS utiliza al carioplasto, que es aquella célula somática diploide donadora de núcleo que guarda la información genética de un individuo. Varios tipos celulares han sido utilizados como carioplastos, entre los que se encuentran principalmente los fibroblastos derivados de piel, las células de la granulosa y, en menor medida, las células Natural Killer (Cortez *et al.*, 2017). También utiliza una célula receptora de la información genética, llamada citoplasto, que consiste en un ovocito madurado (en la etapa MII de su ciclo celular) y enucleado, que puede ser de la misma especie de la célula donadora o de una especie filogenéticamente cercana (Gómez *et al.*, 2006).

Debido a las dificultades para obtener gametos de felinos silvestres amenazados, la TNCS surge como alternativa para la conservación de las diferentes especies de felinos, ya que el ovocito enucleado (citoplasto) de la gata doméstica, puede recibir a la célula donadora de núcleo (carioplasto) de felinos silvestres (Gómez *et al.*, 2006). Además, por medio de la transferencia de embriones heteróloga, es posible transferir embriones de felinos silvestres de talla pequeña a gatas domésticas subrogadas.

1.4. Enucleación de ovocitos de gata en MII

La TNCS presenta dos formas mayormente conocidas para realizar el proceso de la enucleación, la primera es la forma tradicional con la cual se realizó la clonación de la oveja Dolly, en la que se necesita de un micromanipulador, el ovocito en MII es enucleado por medio de una micropipeta especializada bajo un microscopio invertido equipado de un micromanipulador, luego una célula donante es transferida al espacio perivitelino del ovocito enucleado. Este método está bien establecido y ha sido utilizado para clonar diferentes especies animales, pero tiene una desventaja sobre todo en grandes animales como el búfalo, el bovino y el cerdo que, debido al alto contenido lipídico del citoplasma del ovocito, la MII se debe identificar mediante tinción de fluorescencia (Hoechst 33342) y es visualizado bajo luz ultravioleta lo cual tiene efectos perjudiciales sobre el desarrollo embrionario (Srirattana *et al.*, 2022). Recientemente tratando de contrarrestar esto se ha desarrollado la enucleación robótica precisa y sin etiquetas en cerdos, esta técnica redujo la pérdida del citoplasma en un 60% con una tasa de éxito del 95% (Zhao *et al.*, 2021), pero estas técnicas tienen otra desventaja y son los equipos costosos que se necesitan para realizarlas.

La segunda técnica es la Handmade Cloning (HMC) o clonación manual, esta técnica resuelve el problema de los equipos costosos de la forma tradicional, pues

no requiere micromanipulador, en la enucleación manual se debe remover la zona pelúcida del ovocito para llevar a cabo la enucleación, utilizando una cuchilla ultra afilada bajo un estereomicroscopio. La enucleación manual ha sido realizada en diferentes especies como bovinos, cerdos, búfalos, ovejas y camellos; pero tiene ciertas desventajas, por ejemplo, el que, al quitar la zona pelúcida del ovocito hace que los embriones puedan estar expuestos a sustancias tóxicas durante el cultivo *in vitro*, y la necesidad de un mayor número de ovocitos, ya que se necesitan dos ovocitos para formar un embrión. Por ello se estableció una técnica de clonación artesanal modificada (mHMC) en la que no se requiere del proceso de bisección y no se pierde la mayor parte del citoplasma del ovocito, en esta técnica la enucleación se realiza utilizando una pipeta Pasteur bajo un estereomicroscopio, por lo cual sólo se necesitará de un ovocito, aunque también se requiere de remover la ZP. Este método ha sido empleado en ovejas, cabras, cerdos, bovinos y camellos (Srirattana *et al.*, 2022).

1.5. Las células de la granulosa

Las células de la granulosa son importantes en la composición del ovario puesto que ayudan en la nutrición de las células germinales, participan en la maduración de los ovocitos, además de ayudar en el proceso hormonal para la receptividad el útero con la liberación de ovocitos maduros y el mantenimiento del embarazo en su etapa inicial. Estas células somáticas son las más cercanas al ovocito desde la formación del folículo hasta la liberación del mismo en la ovulación, durante este proceso las células de la granulosa experimentan varios cambios funcionales y morfológicos (Baumgarten y Stocco, 2018; Dompe *et al.*, 2021).

La diferenciación de las células pregranulosas es esencial para la diferenciación de las ovogonias, la formación de la reserva folicular y del ovario, estas células se forman a partir de células epiteliales proliferantes celómicas que proliferan e invaden las gónadas en desarrollo, se pueden clasificarse en células medulares y corticales dependiendo de su ubicación en la gónada en desarrollo, de esta manera se incorporan a folículos medulares y folículos primordiales corticales, los primeros se activan luego del nacimiento, hasta llegar a folículos antrales durante la pubertad, mientras que los corticales se activan en el transcurso de la etapa reproductiva de la hembra (Zheng *et al.*, 2014).

Los folículos primordiales corticales se convierten en folículos primarios, pasando de una capa de células de la granulosa aplanadas a células cuboidales, la activación de estos folículos primordiales es independiente de las hormonas hipofisarias y es regulada por la interacción entre las células pregranulosas y el ovocito. Luego el folículo primario se convierte en folículo preantral o secundario y a medida que esto ocurre la capa de células de la granulosa cuboidales crece formando varias capas,

esta proliferación también es independiente de gonadotropinas, aunque es posible que el ovocito tenga alguna injerencia en el proceso (Baumgarten y Stocco, 2018; Dompe *et al.*, 2021).

En el proceso de folículo preantral a preovulatorio se forma dentro del folículo el antro, el crecimiento de este folículo está determinado principalmente por el aumento del fluido dentro del antro y no por la proliferación de las células de la granulosa. La formación del antro es dependiente de gonadotropinas, que aumentan la producción y secreción de polisacáridos y proteínas en las células de la granulosa, a su vez estas células producen y secretan hialuronano y un proteoglicano de condroitin sulfato hacia el espacio extracelular, estas moléculas generan un gradiente osmótico que atrae líquido desde la vasculatura tecal (Baumgarten y Stocco, 2018; Dompe *et al.*, 2021).

La formación del antro hace que las células de la granulosa sean divididas en dos tipos celulares funcionalmente diferentes, células del cúmulo y células murales. Las células granulosas del cúmulo son las más cercanas al ovocito, participando en la maduración del mismo, éstas nutren al ovocito proporcionándole aminoácidos, productos de la glucólisis y sustratos para la biosíntesis del colesterol, mientras las células granulosas murales se encuentran en la pared del folículo y son las principales sintetizadoras de hormonas esteroideas sexuales, de esta manera produce estradiol a medida que el folículo madura hasta la fase preovulatoria (Baumgarten y Stocco, 2018; Dompe *et al.*, 2021).

A medida que las células de la granulosa preantrales pasan a ser células granulosas murales, la regulación del crecimiento celular deja de ser por factores intraováricos para pasar a ser mediada por factores extraováricos, principalmente por la hormona folículo estimulante (FSH), de esta manera estas células expresan receptores para FSH y LH. Este aumento de receptores para FSH conlleva la teoría de las dos células, en donde las células de la teca generan un aumento en la síntesis de enzimas necesarias para la producción de andrógenos, mientras las células de la granulosa murales aumentan la actividad de la aromatasa y de esta manera sintetizar estrógenos a partir de andrógenos; por otra parte la expansión de las células del cúmulo se da a partir de LH, aunque en estas células los receptores para LH son menores en comparación con las murales, de esta manera, las células de la granulosa murales median este proceso bajo la estimulación de LH, produciendo Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), que es liberado y activa el receptor para EGF en las células del cúmulo y de esta manera aumentar la expresión de genes necesarios para la expansión de las células del cúmulo, lo que conlleva a la ruptura del folículo y la subsecuente ovulación (Baumgarten y Stocco, 2018; Dompe *et al.*, 2021).

Luego de la ovulación las células de la granulosa del cúmulo expandidas y murales tienen dos destinos diferentes, las primeras son liberadas con el ovocito y lo acompañan en el oviducto en donde alcanza la metafase II, mientras las murales permanecen en el ovario para participar en la formación del cuerpo lúteo, durante la luteinización las células de la granulosa luteinizadas o también llamadas células lúteas aumentan la síntesis de progesterona, la cual estimula la angiogénesis y secreción de nutrientes en el endometrio del útero necesarios para la implantación del embrión (Baumgarten y Stocco, 2018; Dompe *et al.*, 2021).

Además de participar en esta compleja interacción molecular con el ovocito, estas células de la granulosa presentan propiedades similares a las de las células madre mesenquimales (Dompe *et al.*, 2021), y se diferencian en otros tipos celulares como osteoblastos, neuronas y condrocitos (Kossowska *et al.*, 2009); así mismo estas células han sido derivadas para su uso en la TNCS en diferentes especies animales, y son obtenidas de los folículos ováricos para su aislamiento a partir de los complejos cúmulo-ovocito (COC) (Cortez *et al.*, 2017).

1.6. Criopreservación celular

La criobiología se relaciona con la conservación de la función, crecimiento y desarrollo de tejidos y células a bajas temperaturas para su posterior uso sin que se pierda la eficiencia celular, en este orden se ha podido identificar dos métodos de conservación celular relacionados con la velocidad de congelación y el uso de crioprotectores como el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol, propilenglicol y metanol, aunque el mecanismo de su funcionamiento no está totalmente comprendido; hay otros aspectos que afectan la viabilidad celular como la respuesta osmótica de la célula frente al crioprotector y la pérdida osmótica de agua de la célula a medida que se elimina el agua en forma de hielo; en cuanto a la velocidad de enfriamiento a temperaturas bajo cero, el punto más crítico es en temperaturas de -5 a -35°C, por otro lado la velocidad a la que se descongela la muestra también tiene injerencia en la viabilidad al igual que la respuesta osmótica de la células al momento de retirar el crioprotector. Generalmente las células se encuentran dentro de soluciones isotónicas, pero cuando se van a criopreservar se dejan en soluciones hipertónicas para garantizar que los crioprotectores por gradiente de concentración entren a la célula para eliminar el agua dentro de la célula y evitar el daño que podrían generar la formación de cristales de hielo dentro de la misma. El éxito de la Criopreservación también depende del entrenamiento o experticia al igual que de la elección e implementación del método adecuado para garantizar la viabilidad celular (Pomeroy *et al.*, 2022).

La Criopreservación también es una técnica de reproducción asistida, en donde se pueden conservar gametos, embriones y tejidos gonadales, en la TNCS es de suma importancia la conservación de células somáticas para la conservación de material genético y para futuros programas de clonación en especies productivas de alto valor y de especies silvestre en peligro de extinción (Siengdee *et al.*, 2018; Pomeroy *et al.*, 2022).

2. ANTECEDENTES

2.1. Las células somáticas en especies extintas

Uno de los mejores ejemplos de la importancia de los bancos de recursos genéticos en animales silvestres extintos, es el del bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*), íbex o cabra montesa de los Pirineos, España. En el año 1999 se tomó y criopreservó una biopsia de piel del último ejemplar vivo, que era una hembra. En el año 2000 murió dicho espécimen y, sin embargo, tres años después se obtuvieron fibroblastos a partir de la muestra criopreservada, que fueron utilizados como carioplastos en la TNCSI, fusionándolos con citoplastos provenientes de ovocitos de cabra doméstica (*Capra hircus*). Fue así como se logró clonar embriones de bucardo que fueron transferidos a cabras domésticas receptoras, obteniéndose 2 hembras gestantes hasta los 45 y 72 días de gestación. Las gestaciones fueron interrumpidas espontáneamente (Folch *et al.*, 2003). Años más tarde, en el 2009 se logró por primera vez el nacimiento de un clon de esta especie extinta, que sobrevivió solo 2 días, debido a problemas respiratorios. Sin embargo, dejó un importante precedente en la historia de la TNCSI, por la posibilidad de traer a la vida especies extintas y recalcó la importancia de la formación de bancos de recursos genéticos para la conservación de animales silvestres (Folch *et al.*, 2009).

2.2. Obtención de células somáticas en algunas especies animales

2.2.1 Deriva de fibroblastos

Existen diferentes métodos para derivar fibroblastos de piel, generalmente, de una biopsia de la oreja. Los métodos más reportados son el mecánico y el enzimático. En el mecánico, la biopsia obtenida es cortada en pequeños fragmentos de 1 a 2 mm en cada lado, incubados en medios de cultivo como el DMEM (Medio Mínimo Esencial de Dulbecco). Mientras que, en el método enzimático, estos fragmentos de 1 a 2 mm son sometidos además a disgregación con colagenasas, para luego ser incubados. Durante la incubación, tanto en el método mecánico como en el enzimático, se realiza seguimiento del crecimiento celular bajo microscopio para estimar la densidad del cultivo y, según el porcentaje de la placa que esté cubierto

de células adheridas a su base, se determina la confluencia. Una vez que el cultivo llega a la confluencia, es sometido a otra enzima como la tripsina, para despegar las células del fondo de la caja de cultivo, completando así el primer pasaje celular y obteniendo los fibroblastos (Mestre *et al.*, 2016).

En elefantes asiáticos (*Elephas maximus*), se ha utilizado la combinación de los métodos mecánico y enzimático con colagenasa, para la obtención de fibroblastos a partir de piel de oreja de ejemplares con 6 y 20 horas *post mortem* Obteniendo una viabilidad celular del 97.3% (Siengdee *et al.*, 2018). El mismo método efectuado en el camello árabe (*Camelus dromedarius*), reportó una confluencia celular de hasta el 90% en los diferentes pasajes (del 4 al 7). Si bien no se reportó la viabilidad celular, obtuvieron fibroblastos de piel con capacidad para diferenciarse en distintos tipos celulares (Saadeldin *et al.*, 2019). Por otra parte, en el camello de dos jorobas (*Camelus bactrianus*) de la India, con el método mecánico se ha obtenido una viabilidad celular de hasta el 98% (Sharma *et al.*, 2017).

Con respecto a los felinos silvestres se han derivado fibroblastos de piel de tigre (*Panthera tigris*) y chita (*Acinonyx jubatus*) (Moro, 2015), de jaguar (Mestre *et al.*, 2016), de güiña (*Leopardus guigna*) (Veraguas, 2018), de gato silvestre africano (*Felis silvestris lybica*) (Gómez *et al.*, 2004) y de gato del desierto (*Felis margarita arena*) (Gómez *et al.*, 2008). Mientras que en el gato doméstico ha sido posible derivar fibroblastos con mayor frecuencia, dada la facilidad de obtención de muestras en comparación con los felinos silvestres (Yin *et al.*, 2007; Moro, 2015). Si bien se ha realizado la deriva de fibroblastos en varias especies felinas, en estos estudios no se ha reportado la viabilidad celular como en las especies anteriormente nombradas, por lo cual realizar este tipo de estudios de viabilidad celular en el gato doméstico toma importancia, debido a la baja información existente en este aspecto, teniendo en cuenta que la viabilidad celular es uno de los aspectos que puede afectar la TNCS.

2.2.2 Células de la granulosa y fibroblastos como carioplastos

Las granulosas, han sido derivadas para su uso en la TNCS en diferentes especies animales. En la oveja, para la clonación de corderos transgénicos (Gou *et al.*, 2003) y de ovejas no transgénicas (Peura *et al.*, 2003). En bovinos, se han utilizado para producir embriones clones (Gjørret *et al.*, 2005). En camellos (*Camelus dromedarius*) se han utilizado como células donadoras de núcleo (Wani y Hong, 2017) al igual que en conejos (Inoue *et al.*, 2006), donde además se han utilizado células del cúmulo (Liu *et al.*, 2016).

En gatos domésticos, las células de la granulosa y del cúmulo se han utilizado en la TNCS (Shin *et al.*, 2002; Skrzyszowska *et al.*, 2002), sin embargo en muy pocos experimentos han sido consideradas estas células como carioplastos en especies felinas, por lo cual es de vital importancia aumentar las investigaciones en estas células como células donadoras de núcleo en la TNCS, teniendo en cuenta que podrían tener un futuro potencial.

El origen de la célula donadora de núcleo es un factor que probablemente pueda afectar la TNCS. Si bien aún no se conocen exactamente los motivos por qué elegir un tipo de célula en particular como donadora de núcleo y cómo esto pueda afectar la TNCS, se han realizado estudios en diferentes especies con células de la granulosa utilizadas como carioplastos para determinar su respuesta. En bovinos Cortez *et al.* (2017), encontraron un mayor porcentaje de fusión de citoplasto-carioplasto utilizando células de la granulosa ($86.9\% \pm 7.8$) frente a fibroblastos ($65.8\% \pm 6.8$) con diferencias estadísticas, al igual que un mayor porcentaje de blastocistos reconstruidos con células de la granulosa que con fibroblastos. En ovinos, Vazquez *et al.* (2022) describen que las células de la granulosa han sido utilizadas como donadoras de núcleo. Si bien los resultados reportados no muestran diferencias entre las células de la granulosa y los fibroblastos, sí se evidencia que con las primeras se obtienen resultados menos dispersos que con los fibroblastos, que son más variables. En el camello (*Camelus dromedarius*), se compararon las células de la granulosa y los fibroblastos de piel como células donadoras de núcleo en la TNCS, con un porcentaje de fusión citoplasto-carioplasto de $94.2\% \pm 2.9$ y $85.2\% \pm 2.8$, respectivamente. El porcentaje de reconstrucción de blastocistos fue más alto para los fibroblastos de piel ($50.6\% \pm 5.5$) que para las células de la granulosa ($42.5\% \pm 2.7$). Sin embargo, de los embriones así formados, se transfirieron 35 (a partir de fibroblastos) y 23 (a partir de células de la granulosa), naciendo 3 crías vivas únicamente en este último grupo (Wani y Hong, 2017). En felinos, se ha reportado el uso de células de la granulosa y fibroblastos como células donadoras de núcleo (Kitiyanant *et al.*, 2003), sin diferencias significativas en la fusión del citoplasto-carioplasto, mientras que el porcentaje de segmentación de embriones reconstruidos con células de la granulosa fue significativamente mayor (70.7 vs 54.8%, respectivamente). Por otra parte, los embriones reconstruidos con fibroblastos (25.8%) llegaron hasta mórula en menor porcentaje que los de las células de la granulosa (37.9%). Esto demuestra el posible potencial que pudieran tener las células de la granulosa como donadoras de núcleo en la TNCS, por esta razón es de vital importancia generar investigaciones que comparen el comportamiento de diferentes células somáticas tanto en su cultivo como en la TNCS.

2.3 Transferencia nuclear de células somáticas interespecie en felinos (TNCSI)

A través de la TNCSI se logró el nacimiento de 17 gatos silvestres africanos (*Felis silvestris lybica*) a partir de fibroblastos de piel de esta especie, fusionados con ovocitos enucleados de gata doméstica, de los cuales fueron transferidos 1,405 embriones a 51 gatas domésticas (Gómez *et al.*, 2004). De éstos, tres lograron sobrevivir hasta su vida adulta e incluso lograron reproducirse. En el gato del desierto (*Felis margarita arena*), se fusionaron fibroblastos de piel con ovocitos enucleados de gata doméstica y nacieron 11 crías, pero sólo una sobrevivió hasta los dos meses (Gómez *et al.*, 2008). En el gato doméstico (Shin *et al.*, 2002), nació vivo un gato clonado a partir de células del cúmulo que se fusionaron con ovocitos enucleados, cuatro gatos clones vivos a partir fibroblastos de piel (Song *et al.*, 2019) y cinco gatos clones vivos con estas mismas células, de los cuales sólo uno murió a las pocas horas del nacimiento (Yin *et al.*, 2007).

Si bien ha sido posible clonar al gato doméstico y algunos felinos silvestres utilizando los ovocitos de gata doméstica como citoplasto, la TNCSI se efectuó mediante la clonación convencional que utiliza micromanipuladores. Es importante mencionar que no hay información sobre la aplicación de la clonación manual o Handmade cloning (HMC por sus siglas en inglés) en felinos, misma que sí ha sido reportada en ovinos (Vázquez *et al.*, 2022) y bovinos (Cortez *et al.*, 2017), entre otros. Por lo anterior, la HCM tiene un gran potencial en la clonación del gato doméstico como modelo animal y su futura aplicación en felinos silvestres, ya que es más económica y permite un mayor porcentaje de fusión con respecto a la forma tradicional (Vazquez *et al.*, 2022).

Considerando que el éxito en la producción de embriones por TNCS se ve afectado por la naturaleza de las células donantes, el estado del núcleo donante y la calidad del citoplasto (Inoue *et al.*, 2006); en este estudio se evaluó por un lado, la deriva y el cultivo de células de la granulosa de gata doméstica, el número de pasajes celulares logrado y la sobrevivencia a la criopreservación, para determinar la posibilidad de ser utilizadas como carioplastos en programas de clonación de embriones en esta especie. Por otro lado, también se determinó la eficiencia en la maduración *in vitro* de ovocitos y en la enucleación, para su uso como receptores de núcleos en programas de clonación de embriones en esta especie.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial, diversas especies de fauna silvestre se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, es por ello, por lo que existen grupos de investigación y conservacionistas, que se dan a la tarea de evaluar y aplicar las biotecnologías de

la reproducción animal asistida como la TNCS con fines de reproducción y conservación de individuos en soporte de las poblaciones. Debido a la dificultad para obtener gametos de felinos silvestres, estas biotecnologías son entonces probadas y estandarizadas primero en modelos animales que, por lo general, consisten en especies domésticas emparentadas (filogenéticamente cercanas) con aquellas especies silvestres que se desea reproducir o conservar.

Una de las especies que ha sido del interés nacional e internacional por reproducir, conservar y preservar, es el jaguar (*Panthera onca*) que habita desde Arizona y Nuevo México, en el sur de Estados Unidos, hasta Argentina. En México tiene una distribución desde Sonora y Tamaulipas, hasta Chiapas y la península de Yucatán (Briones *et al.*, 2012).

Sin embargo, la disminución de las áreas en donde habita el jaguar en México, al igual que el número de sus poblaciones y los distintos factores sociales relacionados, ha puesto en riesgo su función biológica dentro de su hábitat, por lo cual se encuentra categorizado (NOM-056) como en peligro de extinción (Briones *et al.*, 2012). En la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el jaguar es categorizado como especie “Casi Amenazada”, razón por la cual se cree que pronto se encontrará “En Peligro” o en “Peligro Crítico”, por lo que son necesarias medidas especiales de conservación para la especie en carácter de urgente (Pesquisa Javeriana, 2021).

Por otro lado, la utilización del gato doméstico como modelo experimental, toma en consideración que es una especie de la familia *Felidae* cercana al jaguar y otras especies de felinos silvestres, con similitud en sus ciclos reproductivos como se mencionó anteriormente.

Como especie cercana a los felinos silvestres, se han obtenido ovocitos de gata doméstica con fines de TNCSI (*Felis catus*) (Yin *et al.*, 2007). Pero además se han utilizado los ovocitos enucleados como citoplastos receptores de núcleos provenientes de células somáticas de especies pequeñas de felinos silvestres, para producir embriones clones interespecie, que luego son transferidos en gatas domésticas como madres subrogadas (Gómez *et al.*, 2006).

El estudio que se propuso en gata doméstica como modelo experimental, representa una alternativa para, por un lado, evaluar la utilidad de las células de la granulosa para formar con ellas un banco de germoplasma y, por el otro, evaluar la maduración *in vitro* de ovocitos y su enucleación, como una propuesta para su uso en la TNCS. De lograrse la formación de bancos de germoplasma de células de la granulosa y la MIV de ovocitos en gatas, permitirá incursionar en programas de TNCS, técnica que luego podría ser extrapolada como TNCSI a felinos silvestres en riesgo.

4. JUSTIFICACIÓN

Se plantea la utilización de la gata doméstica como modelo experimental, sobre la cual, por un lado, evaluar las células de la granulosa en sus pasajes celulares y su respuesta a la congelación y, por el otro, madurar *in vitro* ovocitos y enuclearlos, con el propósito de proponerlas para su uso en programas de TNCS.

Teniendo en cuenta que las células de la granulosa han sido poco investigadas en diferentes especies y especialmente en felinos como células donadoras de núcleo, se ha propuesto este trabajo puesto que el poco conocimiento existente ha hecho que no sea claro su comportamiento en la TNCS y que aún se desconoce qué hace que un tipo celular sea mejor que otro, además no se ha estudiado su viabilidad pre y post congelación; por otro lado la MIV en felinos domésticos sigue siendo baja comparada con otras especies productivas, por lo que la búsqueda de medios que puedan mejorar estos porcentajes de maduración, como el subsecuente comportamiento en estadios posteriores a FIV y TNCS es de suma importancia para mejorar las técnicas de reproducción asistida en felinos, así mismo la enucleación manual en felinos aún no ha sido descrita, pues en su mayoría ha sido realizada con micromanipuladores, por lo que precedentes de la enucleación manual son de vital importancia para investigaciones futuras en la TNCS de estas especies.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué eficiencia tendrán las células de la granulosa comparada con los fibroblastos para formar un banco de germoplasma, y los ovocitos para madurar *in vitro* y ser enucleados en gata doméstica?

6. HIPÓTESIS

Las células de la granulosa permitirán la formación de bancos de germoplasma, en tanto que los ovocitos lograrán la MIV y la enucleación de manera eficiente en la gata doméstica.

7. OBJETIVOS

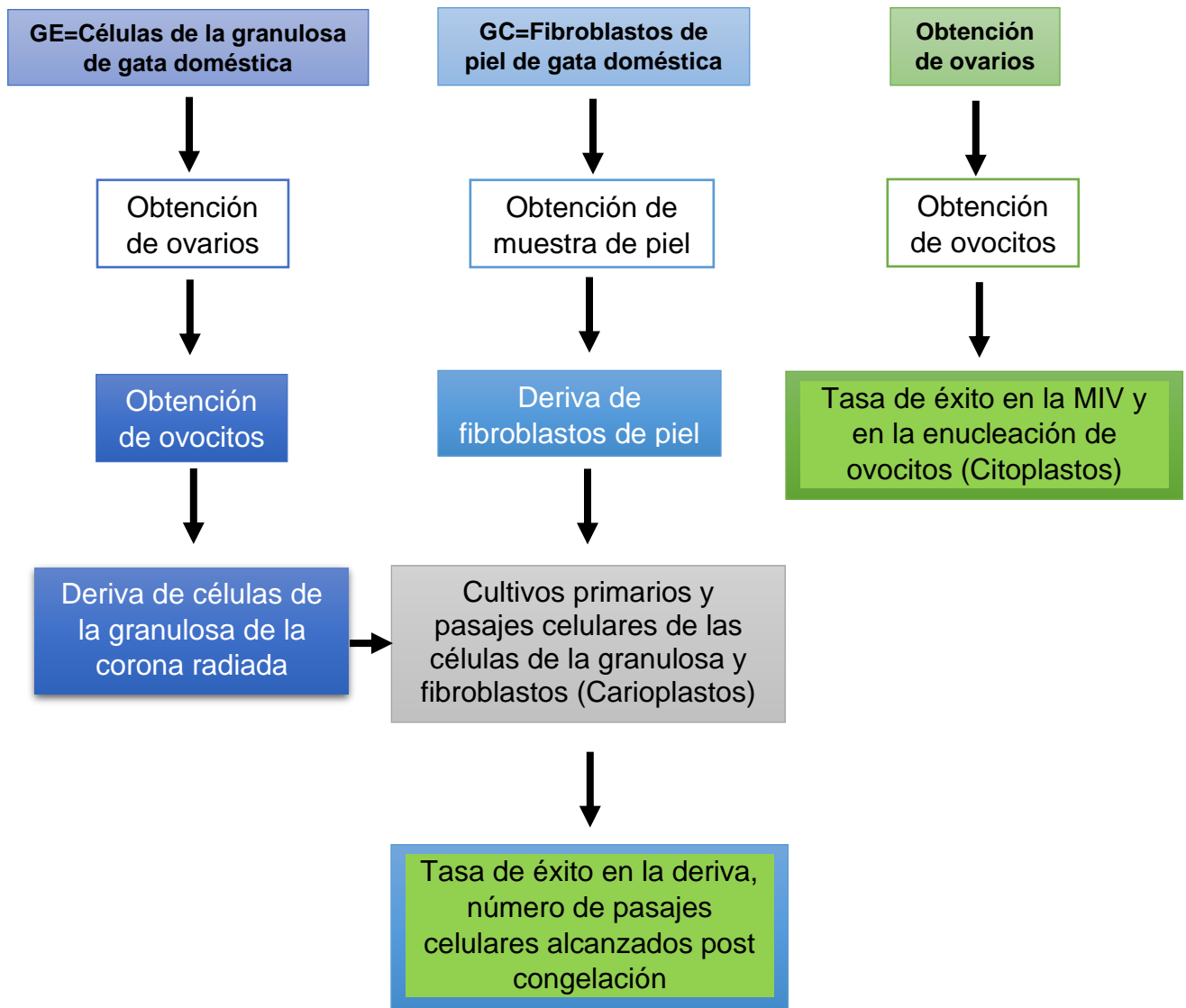
7.1. Objetivo General

Determinar la viabilidad de las células de la granulosa criopreservadas, así como la maduración *in vitro* y enucleación de ovocitos, en gata doméstica (*Felis catus*).

7.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la eficiencia de la deriva y pasajes de las células de la granulosa de gata doméstica (*Felis catus*).
2. Evaluar la eficiencia de las células de la granulosa de gata en su viabilidad post congelación.
3. Evaluar la capacidad de maduración *in vitro* de ovocitos de gata.
4. Evaluar la eficiencia de enucleación de ovocitos de gata.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Deriva de fibroblastos de piel y de células de la granulosa de ovocitos de gata doméstica, en cultivos primarios

Para este estudio se manejaron dos grupos, uno control (GC) que utilizó fibroblastos derivados de piel de abdomen de gata doméstica y uno experimental (GE) que utilizó células de la granulosa provenientes de la corona radiada de ovocitos colectados de los ovarios de la misma especie (Se anexan cartas de permisos de colecta del Centro de Zoonosis, solicitadas a la Alcaldía de Iztapalapa, CDMX). Para ambos grupos se utilizaron hembras enteras vacías con edades entre los 6 meses y los 2 años, cabe resaltar que, para el GE, las mismas hembras fueron esterilizadas realizando la ovariectomía ventral.

9.1.1 Deriva de fibroblastos de piel

Para el GC, se obtuvieron dos biopsias de piel de abdomen de 0.2 cm² de gatas domésticas de 6 meses a 2 años de edad, durante las jornadas de esterilización en el Centro de Zoonosis de la Alcaldía de Iztapalapa, CDMX.

Las biopsias se transportaron al Laboratorio de Reproducción Animal Asistida W-210 de la UAM-I, en DPBS (Dulbecco Phosphated Buffered Saline, In Vitro, SA. de CV., CDMX, México); suplementado con antibiótico/antimicótico (2% de Antibac-Antifun con 10,000 unidades de Penicilina, 10 mg de Sulfato de Estreptomicina y 25 µg de Anfotericina B por mL, In Vitro, SA. de CV., CDMX, México) en un termo a 37 °C. Una vez en el laboratorio, se eliminó la mayor cantidad de pelo de la muestra con una cuchilla y fue desinfectada con cloro al 1% y lavado 3 veces en DPBS (Mestre *et al.*, 2016). La biopsia fue seccionada finamente con bisturí sobre una caja de Petri en pequeños fragmentos de 1 a 2 mm, los cuales fueron colocados en un tubo de ensayo que contenía colagenasas tipo I (17100-017, Gibco) y II (17101-015, Gibco) al 0.02%, el tubo se cerró herméticamente y se dejó en oscilación bajo incubación durante 1 hora a 37 °C para que las enzimas actuaran.

Luego del tiempo de incubación se detuvo la reacción enzimática, añadiendo 4 mL de DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, In Vitro, S.A. de C.V) suplementado con antibiótico/antimicótico y 10% de SFB, Microlab. Se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente retirando el sobrenadante. Posteriormente se agregó 4 mL de DMEM suplementado y se volvió a centrifugar, el sobrenadante fue retirado y el botón celular que contenía los fibroblastos fue resuspendido en 1 mL de DMEM-F12, ME-093, In vitro S.A de C.V. suplementado (20% SFB, 1% Antibac-Antifun, In Vitro, S.A. de S.V. glutamina 1 mM, Sigma G3126-100G, Piruvato de Sodio 0.2 mM, Sigma P5280-25G, y Factor de Crecimiento Epidérmico EGF 10

ng/ μ L, Sigma E4127) (Vázquez, 2016, Cortez *et al.*, 2017), para luego sembrarlo en una caja de Petri de 35 mm, (Thermo Scientific 150318) agregando 2 mL de medio para obtener un volumen final de 3 mL.

Las muestras se incubaron a 38.5 °C y 5% de CO₂ en humedad a saturación y se evaluó diariamente el crecimiento celular bajo microscopio invertido a 40X y 100X, estimando la densidad del cultivo de células según el porcentaje de la caja de Petri con crecimiento celular (confluencia). A los 3 días de la siembra, se realizó el cambio de medio en las condiciones ya mencionadas. Las células se cultivaron hasta que cubrieron la mayor parte de la caja (90% confluencia) entre 7 a 14 días de la primera siembra, luego fueron sometidas a tratamiento enzimático, para lo cual se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con DPBS, posteriormente se agregaron 750 μ L de (Tripsina-Verseno 0.025%/0.025%, In vitro) y se incubó bajo las condiciones ya mencionadas durante 5 minutos, para separar las células de su matriz extracelular y de la base de la caja de cultivo, quedando sueltas en la superficie del medio de cultivo y así recuperarlas para la selección e identificación de fibroblastos (primer pasaje) (Mestre *et al.*, 2016).

Los fibroblastos se separaron en dos mitades, una fue criopreservada en crio tubos, Thermo Scientific, CDMX, México, con 1.5 mL de medio de congelación de células a base de dimetilsulfóxido (DMSO 7%, Sigma D2650, SFB 15% en Medio Mínimo Esencial o DMEM, In Vitro, S.A. de CV., CDMX, México). El crio tubo fue enfriado a 4 °C durante una hora y posteriormente se congeló y almacenó a -196 °C. La segunda mitad se resembró hasta obtener 5 pasajes celulares (Navarro *et al.*, 2016).

9.1.2 Deriva de células de la granulosa

Teniendo en cuenta que para el centro veterinario, después de la cirugía (ovariorrectomía) el sistema reproductor es un desecho, se aprovechó la obtención de estos ovarios para este estudio; la deriva de células de la granulosa (GE) en cultivos primarios, se obtuvo ovarios de gatas domésticas de 6 meses a 2 años de edad previamente esterilizadas. Se transportaron en solución salina (0.9% NaCl) con antibiótico/antimicótico (100 UI/mL de penicilina G sódica, 0.1 mg/mL de estreptomina y sulfato de estreptomina, 0.25 μ g/mL de anfotericina B, In Vitro, SA. de CV., CDMX, México) a temperatura ambiente. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces en solución salina con antibiótico/antimicótico. Luego los COC fueron colectados por Slicing, con una cuchilla de bisturí en una caja de Petri con medio de aspiración (TCM-199 con HEPES 25 mM, In Vitro, S.A. de C.V. CDMX, México) y heparina 100 UI/mL, (Sigma H5515). Una vez obtenidos, los COC fueron lavados dos veces en el medio de aspiración anteriormente mencionado, para el aislamiento de las células de la granulosa de la corona radiada. Los COC se dejaron en un tubo Eppendorf, Soreson 11510, CDMX, México, con 1.5 mL de hialuronidasa

1mg/mL, Sigma H4272 durante 2 minutos a 38.5 °C y 5% de CO₂, luego se realizó pipeteo constante durante 10 minutos (Moro, 2015; Veraguas, 2018).

Una vez los ovocitos fueron desnudados de las células de la granulosa, fueron dejados en una caja Petri con los 1.5 mL de hialuronidasa agregados anteriormente, en donde se agregó 1.5 mL de medio de aspiración (TCM-199 con HEPES 25 mM, In Vitro, S.A. de C.V. CDMX, México, y heparina 100 UI/mL) para inactivar la hialuronidasa, inmediatamente se procedió a retirar los ovocitos dejando sólo las células de la granulosa en la caja de Petri.

El medio conteniendo las células de la granulosa, fue pasado a tubos Eppendorf para someterlos a centrifugación a 1,800 rpm durante 4 minutos y dejar el botón celular en el fondo del tubo. Después se retiró el sobrenadante y se añadieron 500 µL de DMEM-F12 suplementado con antibiótico-antimicótico al 1%, Suero Fetal Bovino (SFB) 20% Microlab, CDMX, México, L-Glutamina 1 mM, Piruvato de Sodio 0.2 mM y Factor de Crecimiento Epidérmico (EFG) 10ng/µL, Sigma E4127. El botón celular conteniendo las células de la granulosa se resuspendió y fue sembrado en una caja de Petri en 3 mL del mismo DMEM-F12 ME-093, (In vitro S.A de C.V, CDMX, México), suplementado, a 38.5 °C y 5% de CO₂, hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente se procedió a realizar el primer pasaje, retirando el medio de cultivo y agregando 500 µL de Tripsina-Verseno 0.025%-0.025%, (In vitro, S.A. de C.V. CDMX, México), durante 1 minuto a 38.5 °C y 5% de CO₂, para que las células se despegaran del fondo de la caja. Pasado el minuto, se observó bajo microscopio invertido que las células se despegaron y se procedió a agregar 500µL de medio de cultivo (DMEM-F12, ME-093, In vitro S.A de C.V, CDMX, México, suplementado con antibiótico-antimicótico al 1%, (SFB) 10% Microlab, CDMX, México, L-Glutamina 1 mM, Piruvato de Sodio 0.2 mM y (EFG) 10ng/µL, Sigma E4127), con la diferencia de que, en los siguientes pasajes, el DMEM-F12 ME-093, In vitro S.A de C.V, CDMX, México fue suplementado, reduciendo la concentración del SFB de 20% a 10%, Microlab, CDMX, México). El medio con las células fue pasado a tubos Eppendorf para ser centrifugado a 500 gravedades durante 4 minutos, dejando el botón celular en el fondo del tubo. Se retiró el medio y se le agregaron 500 µL de DMEM-F12 suplementado, (ME-093, In vitro S.A de C.V, CDMX, México), para luego resembrarlo en cajas de Petri con 3 mL del mismo medio, incubando a 38.5 °C y 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia. El proceso se repitió hasta alcanzar el segundo pasaje (Cortez *et al.*, 2017).

Durante cada pasaje se realizó el conteo celular de fibroblastos y células de la granulosa, en una cámara de Neubauer, registrando la concentración.

Al igual que como se hizo para los fibroblastos de piel, las células de la granulosa procedentes de los cultivos confluentes se separaron en dos mitades, una fue criopreservada en criotubos con 1.5 mL de medio de congelación de células a base

de dimetilsulfóxido (DMSO 7%, SFB 15% en Medio Mínimo Esencial o DMEM, In Vitro, S.A. de CV., CDMX, México). El crio tubo fue enfriado a 4 °C durante una hora y posteriormente se congeló y almacenó a -196 °C. La segunda mitad se resembró hasta obtener 2 pasajes celulares (Cortez *et al.*, 2017).

Antes y después de congelar las células del último pasaje en ambos tratamientos, se evaluó la viabilidad celular tiñendo la suspensión celular 1:1 en Azul Tripán 0.4% durante 5 minutos a temperatura ambiente, para luego evaluar en cámara de Neubauer. Se contaron 100 células identificando aquellas que fueron teñidas de azul como muertas y las células sin tinción como vivas; de esta manera se obtuvo el porcentaje de viabilidad (Siengdee *et al.*, 2018).

9.2 Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de gata

Siguiendo la metodología descrita por Moro (2015) y Veraguas (2018) con algunas modificaciones, se recolectaron ovarios de gatas enteras vacías con edades entre 6 meses y 2 años de edad, por medio de cirugía (ovariohisterectomía), que fueron transportados al laboratorio en solución salina (0.9% de NaCl) con una mezcla de antibiótico/antimicótico (100 UI/mL de penicilina G sódica, 0,1 mg/mL de estreptomina y sulfato de estreptomina, 0,25 µg/mL de anfotericina B), a temperatura ambiente. En el laboratorio, los ovarios fueron lavados tres veces en solución salina con antibiótico/antimicótico, revisando la presencia o ausencia de folículos y cuerpos lúteos. Los COC se colectaron de los ovarios por slicing utilizando bisturí, en una caja de Petri con medio de aspiración (TCM-199 con HEPES 25 mM, In Vitro y heparina 100 UI/mL). Una vez obtenidos, los COC se clasificaron, seleccionando los ovocitos de categoría I con cinco capas de células de la granulosa, citoplasma oscuro y homogéneo, y los de categoría II, con citoplasma oscuro y homogéneo, con tres capas de células de la granulosa (Veraguas, 2018). Los ovocitos fueron lavados dos veces en medio de maduración. En un primer experimento, se utilizó para la MIV, el TCM-199 suplementado (Albumina Sérica Bovina (BSA) 0.3% p/v, Sigma A9418-5G, Piruvato de Sodio 0.36 mM, L-Glutamina 2 mM, EGF 10ng/mL, antibiótico-antimicótico 1%). EL diseño comprendió lo siguiente: Tratamiento 1 (T1): 1 UI Gonadotropina Coriónica equina (eCG; Gonaforte, Parfam, S.A) y 1 µg/mL β-estradiol (Sigma E4389). Tratamiento 2 (T2): 1 UI de eCG y Gonodotropina Coriónica humana (hCG) (Choriomon, IBSA), y 1 µg/mL de β-estradiol. Tratamiento 3 (T3): FSH 0.1 UI/mL (Gonal-F, Merck), eCG 5 UI/mL y 1 µg/mL de β-estradiol. Tratamiento 4 (T4): 5 UI eCG, 5 UI hCG y 1 µg/mL β-estradiol.

Posteriormente, los ovocitos de cada tratamiento hormonal se cultivaron por separado en cajas de cuatro pozos (Thermo Scientific 179830), con 500 µL de medio MIV suplementado con las hormonas y cubierto con 200 µL de aceite mineral,

colocándolos en grupos de 25 a 30 ovocitos e incubando 24 horas a 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación (Moro *et al.*, 2015; Veraguas *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2020).

A las 24 horas, los ovocitos de cada tratamiento hormonal se colocaron en tubos Eppendorf con hialuronidasa (1 mg/mL), y se incubaron por 5 minutos a 38.5 °C y 5% de CO₂. Posteriormente fueron sometidos a pipeteo constante por 10 minutos (Moro *et al.*, 2015; Veraguas *et al.*, 2018). Los ovocitos desnudos de las células de la granulosa fueron evaluados en un estereomicroscopio, para determinar la presencia del primer cuerpo polar considerado como indicador de la maduración *in vitro* (MII o Metafase II).

Finalmente se seleccionó el medio con el que se obtuvo el mejor índice de MIV y se le adicionó Insulin-transferrin-selenium (ITS) 10 µL/mL (Gibco 41400-045) (Moro, 2015), para los experimentos subsecuentes.

9.3 Enucleación de los ovocitos de gata

Para la enucleación de los ovocitos de gata se siguió el método descrito por Vajta *et al.* (2001 y 2006), con algunas modificaciones (Moro, 2015; Veraguas, 2018).

Los ovocitos en MII y sin daños en la membrana citoplasmática fueron seleccionados para la enucleación. Para ello, se colocaron en 500 µL de medio MIV con 4 µM de Demecolcina (Sigma D1925), y se incubaron a 38.5 °C, 5% de CO₂ en aire y humedad a saturación por 2 h. Posteriormente, los ovocitos se colocaron en una caja de Petri y se lavaron en micro gotas de 30 µL de TCM-199 con Hepes y 2% de SFB. Para disgregar la zona pelúcida (ZP), los ovocitos se colocaron en micro gotas de 30 µL con 2 mg/mL de Pronasa (Sigma P8811) por 8 minutos. Esta reacción fue detenida en micro gotas de 30 µL con TCM-199 con Hepes y 20% de SFB y luego para su enucleación fueron dejados en microgotas de 30 µL de TCM-199 con Hepes, 30% de SFB y 10 µg/mL de citocalasina B (Sigma C6762), en este medio los ovocitos se colocaron alineados para su posterior enucleación manual (Navarro *et al.*, 2016, Veraguas, 2018).

Los ovocitos fueron enucleados por bisección manual de acuerdo con lo descrito por (Vajta *et al.*, 2003), utilizando una micronavaja (Ultra Sharp Splitting Blade, Bioniche). El primer cuerpo polar de los ovocitos fue orientado hacia el norte de tal forma que, se seccionó la porción del citoplasma del ovocito que contenía la placa metafásica y el primer cuerpo polar. Los citoplastos (ovocitos enucleados) fueron recuperados en una microgota de 30 µL de TCM-199 con Hepes y 20% de SFB (Vásquez, 2016).

Para constatar la eliminación del material genético, los ovocitos enucleados fueron fijados 24 horas en 500 µL de Paraformaldehído al 4% en refrigeración.

Posteriormente se depositaron en una gota de 2 μ L sobre un porta objetos, retirando el exceso de fijador y añadiendo 10 μ L de una solución al 2.5% de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma MBD0020) en DPBS, para luego ser cubiertas con un cubreobjetos. Se evaluaron en microscopio de epifluorescencia utilizando filtro UV de 405 nm.

10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el conteo celular de células de la granulosa y de fibroblastos se realizó una estadística descriptiva, mientras para la viabilidad celular pre congelación y post congelación sólo fueron expresados los resultados en porcentajes. Las variables de los grupos del primer experimento de MIV comparando medios, fueron cotejadas mediante un análisis de varianza para estimar diferencias significativas $p < 0.05$. Para las medias de MIV de los grupos con ITS y sin ITS se realizó una prueba de t-student de los resultados obtenidos considerando diferencias significativas $p < 0.05$ (Veraguas, 2018). Mientras, para los datos obtenidos de la enucleación manual se realizó una estadística descriptiva.

11. RESULTADOS

11.1 Deriva de fibroblastos de piel y células de la granulosa de ovocitos de gata doméstica, en cultivos primarios

Se logró la deriva tanto de fibroblastos de piel como de las células de la granulosa de gata doméstica (Figuras 1 y 2) por los métodos utilizados. Las células de la granulosa lograron la confluencia a los 4 días de cultivo, momento en el que se realizó el primer pasaje (Figura 3), alcanzando la confluencia al día 10, en donde se efectuó el segundo pasaje, sin alcanzar el tercer pasaje. En tanto que los fibroblastos alcanzaron hasta el 5to pasaje. Durante todos los pasajes se colocó el 50% del total de las células para que de esta manera llegaran nuevamente a la confluencia

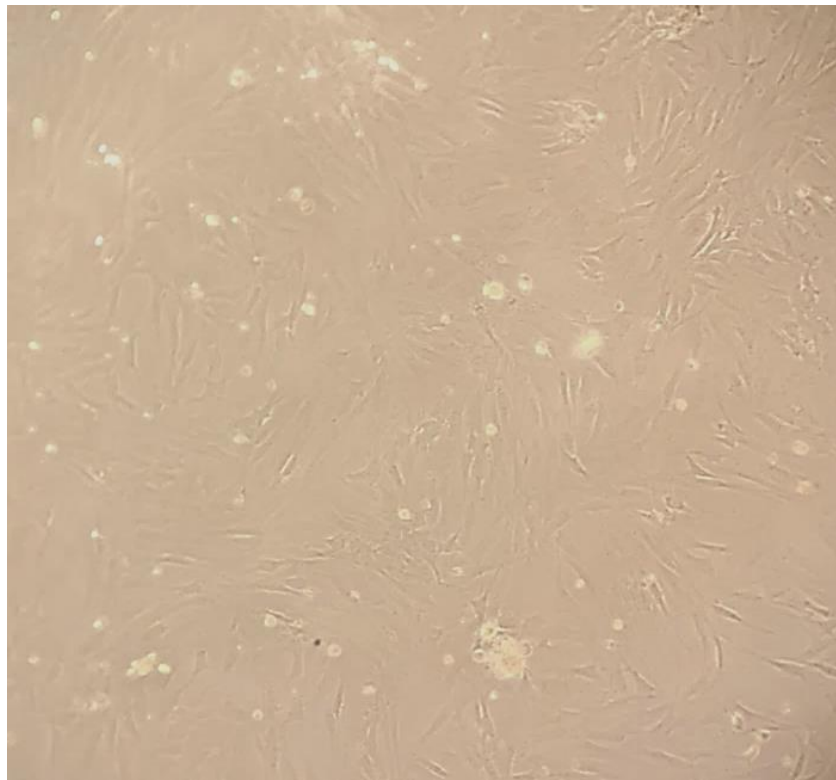


Figura 1. Imagen representativa de la deriva de fibroblastos de piel de gata en cultivo primario. Día 4 de cultivo. Aumento 20X.

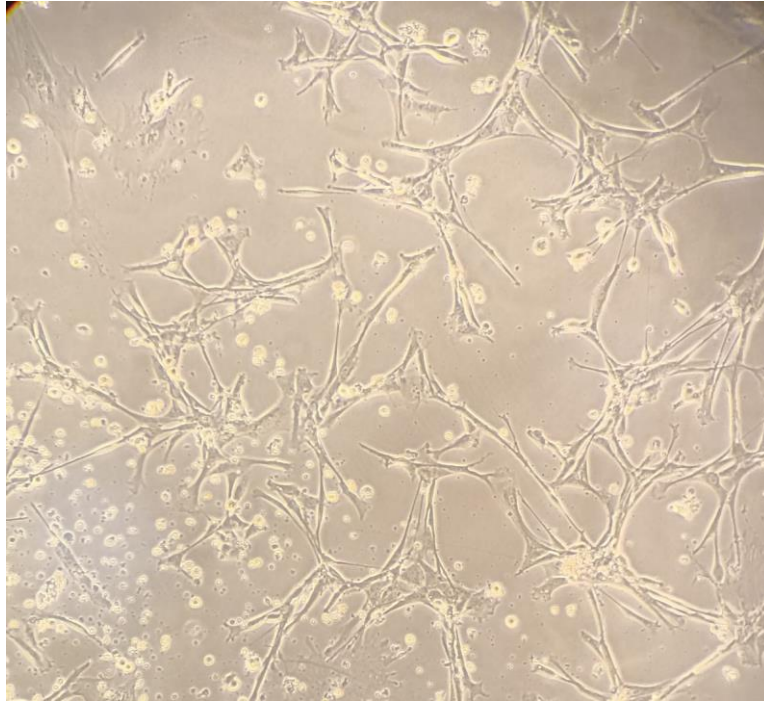


Figura 2. Imagen representativa de la deriva de células de la granulosa de gata en cultivo primario. Día 2 de cultivo. Aumento 20 X.

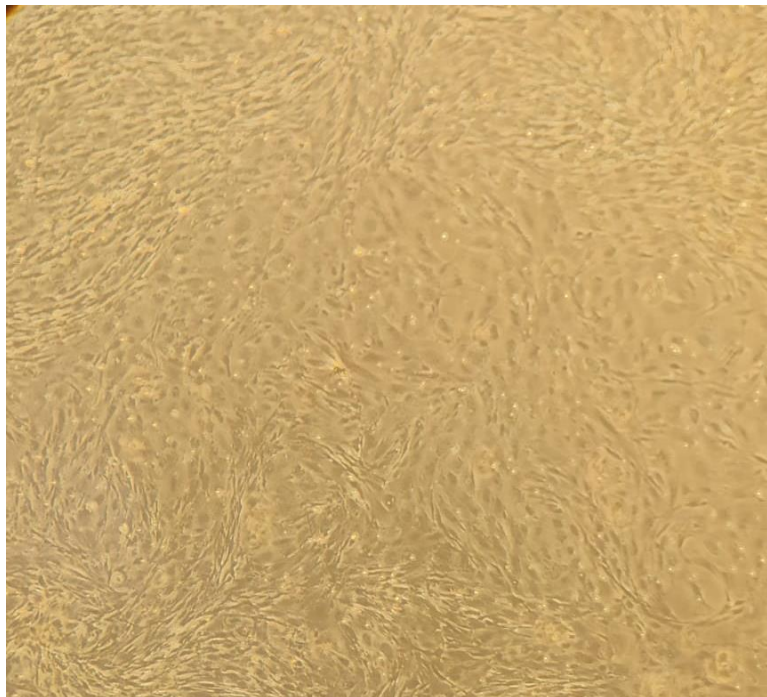


Figura 3. Imagen representativa de la monocapa de células de la granulosa que muestran confluencia al día 4 de cultivo. Aumento 20X.

De cada tipo celular y de cada pasaje, se realizó el conteo celular (Tablas 1 y 2, Figura 2 y 3).

Durante los primeros 4 pasajes el conteo celular de fibroblastos denotó un crecimiento homogéneo entre pasajes, a diferencia del 5to pasaje en donde hubo un incremento poblacional notorio del 45%.

Las células de la granulosa tuvieron un número celular mayor en cada pasaje vs. los fibroblastos. Aunque este tipo celular sólo alcanzó el 2do pasaje, ya que al ser llevadas al 3er pasaje no mostraron adhesión al fondo de la caja.

Tabla 1. Concentración celular en pasajes de fibroblastos de piel y células de la granulosa de gata.

	TIPO CELULAR	
	Fibroblastos	Células de la granulosa
No. de pasajes	Concentración	Concentración
1	310,000	621,250
2	305,000	705,000
3	315,000	
4	354,000	
5	515,000	663,125
Media ± DE	359,800 ± 88,897	663,125 ± 41,875

En el último pasaje (5to pasaje para los fibroblastos y 2do pasaje para las células de la granulosa), se evaluó la viabilidad celular pre y postcongelación, para determinar si las células sobrevivían después del proceso de congelación (Tabla 2). La viabilidad fue evaluada mediante la tinción azul tripán, usando una cámara de Neubauer. La viabilidad pre congelación fue del 96% para las células de la granulosa del 2do pasaje y la viabilidad post congelación del 85%. Mientras que para los fibroblastos del 5° pasaje la viabilidad pre congelación fue del 98% y post congelación del 90%.

Tabla 2. Viabilidad celular pre y postcongelación de células de la granulosa y fibroblastos de piel de gata doméstica.

Tipo Celular	Tiempo de deriva (Días)	N. Pasajes	Viabilidad Precongelación	Viabilidad Postcongelación
Células de la granulosa*	4	2	96%	85%
Fibroblastos*	7	5	98%	90%

*3 Repeticiones

11.2 Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de gata

En un primer experimento se probaron diferentes tratamientos hormonales en el medio MIV para determinar el que mejor resultados diera en la tasa de MIV de los ovocitos y que fue el utilizado en las sucesivas maduraciones *in vitro*. Observándose diferentes tasas de MIV según el tratamiento hormonal utilizado, aunque sin diferencias significativas, probablemente debido a la dispersión de los datos. Sin embargo, el Tratamiento 3 mostró una mejor tasa de MIV (38%), por lo que fue el que se utilizó para suplementar el medio MIV (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de MIV de ovocitos de gata doméstica con diferentes tratamientos hormonales.

Tratamiento	Ovocitos	No. de ovocitos maduros	% MIV (Media ± DE)	No. de ovocitos no maduros	% No maduros (Media ± DE)
1	57	20	34 ± 20	37	66 ± 20
2	51	8	18 ± 15	43	82 ± 15
3	64	21	38 ± 17	43	62 ± 17
4	62	14	26 ± 12	48	74 ± 12

T1: eCG 1 UI, *T2: eCG 1 UI, hCG 1 UI, *T3: eCG 5 UI, FSH 0,1 UI, *T4: eCG 5 UI, hCG 5 UI. *= 3 Repeticiones.

La MIV se evidenció por la presencia del primer cuerpo polar en los ovocitos una vez que fueron desnudados de las células del cúmulo (Figura 4).

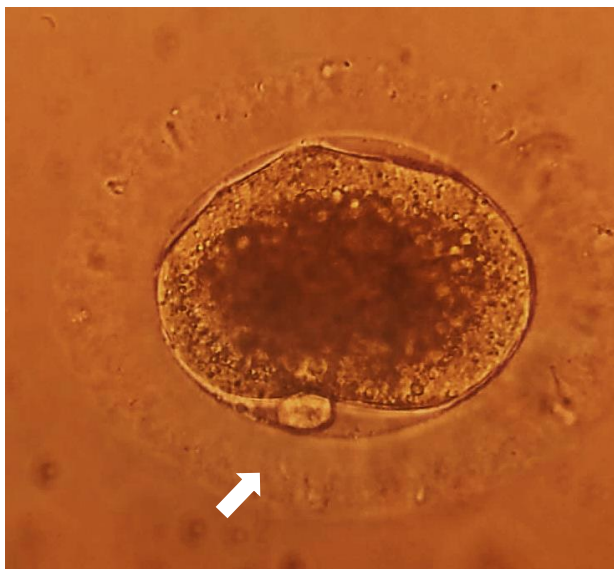


Figura 4. Presencia del primer cuerpo polar en ovocito de gata doméstica indicando su maduración *in vitro* (MIV). Aumento 40X

En un segundo experimento, se incorporó Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) al medio MIV del tratamiento 3 anteriormente descrito y se manejaron dos grupos: En el primer grupo se utilizó el medio MIV del T3 sin ITS. En el segundo grupo se utilizó el medio MIV del T3 suplementado con ITS (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Observando que el ITS mejora la tasa de MIV en los ovocitos de gata (59%), en comparación con el medio en que no se usó ITS (45%), existiendo diferencias significativas entre estos grupos ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de MIV de ovocitos de gata doméstica, utilizando medio MIV-T3 sin y con Insulin-Transferrin-Selenium (ITS).

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	NUMERO DE COC	NUMERO DE OVOCITOS MADUROS N (%)	CALIDAD DE OVOCITOS
Sin ITS	5	137	61 (45%) ^a	Categoría I y II
Con ITS	5	142	84 (59%) ^b	Categoría I y II

COC= Complejos Ovocito-Células del Cúmulo

ITS= Insulin-Transferrin-Selenium.

^{a,b} Literales diferentes en columna indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

11.3 Enucleación de ovocitos de gata en MII

De acuerdo con lo descrito en la metodología, después de la MIV se provocó la protusión de la placa metafásica de los ovocitos de gata con demecolcina, para poder enuclearlos manualmente (proceso requerido para la HMC). Observándose que los ovocitos enucleados lograron su reconstitución posterior, es decir que volvieron a tomar su forma esférica (Figura 5 y Tabla 6). Ello demuestra que es posible la enucleación manual de los ovocitos de gata para su uso posterior como citoplastos en la HMC de embriones en esta especie. Dato que no había sido reportado en la literatura en felinos.

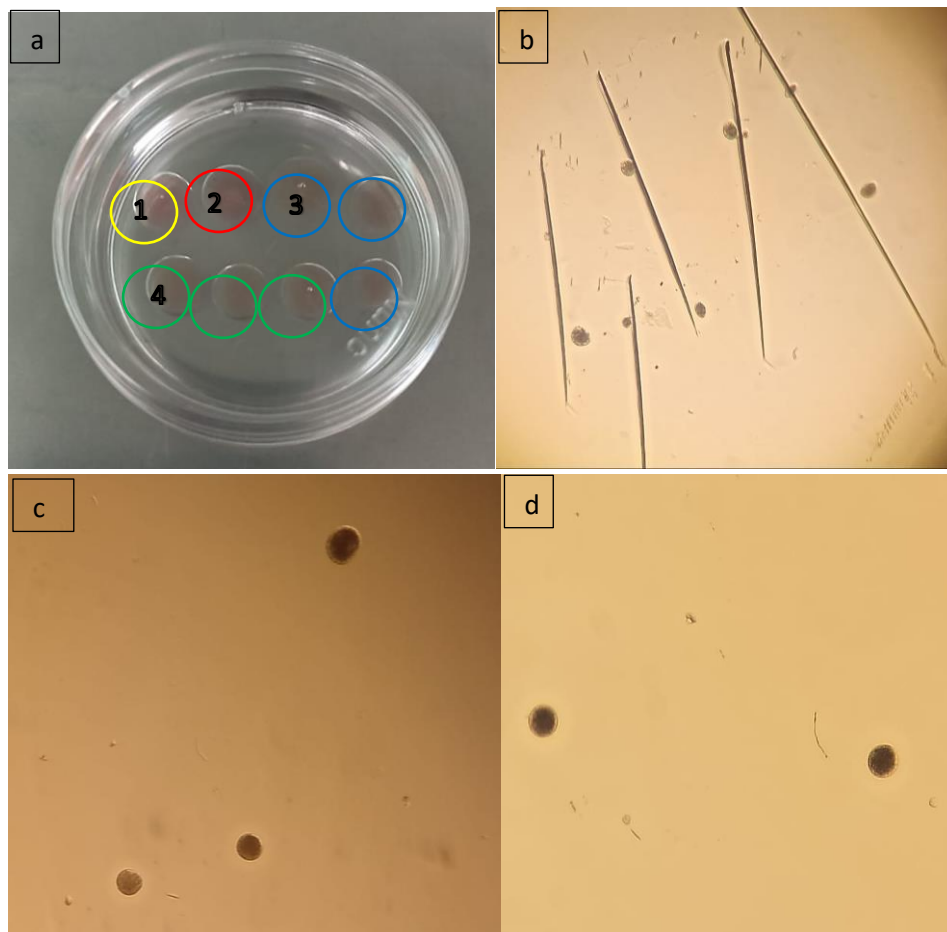


Figura 5. Enucleación manual y reconstitución de los ovocitos de gata. a 1. T2 (TCM-199 suplementado con 2% de SFB). a 2. Digestión enzimática de la ZP en pronasa. a 3. T20 (TCM-199 suplementado con 20% de SFB). a 4. T30 (TCM-199 suplementado con 30% de SFB y con citocalasina B). b. Enucleación manual. c y d. Ovocitos reconstituidos posterior a su enucleación.

Tabla 5. Porcentaje de ovocitos reconstituidos y eficiencia de la enucleación manual de ovocitos de gata.

No. Réplicas	Numero de ovocitos	Ovocitos enucleados	Ovocitos reconstituídos (%)	Ovocitos sin Cromatina	% eficiencia de la enucleación
1	12	12	12 (100%)	9	75
2	17	17	15 (88%)	14	93
3	42	42	12 (29%)	9	75
4	37	37	17 (46%)	16	94
Media ± DE			66 ± 34		84 ± 11

Los citoplastos generados fueron teñidos con DAPI para la evaluación de la enucleación y confirmar así el retiro total del material genético nuclear. En estos experimentos se logró una eficiencia de hasta 94% (Tabla 5). En la figura 6 se observan ovocitos enucleados de gata, en campo claro (Figura 6a) y en epifluorescencia (Figura 6b). En la figura 6c se observa un ovocito con parte del material genético.

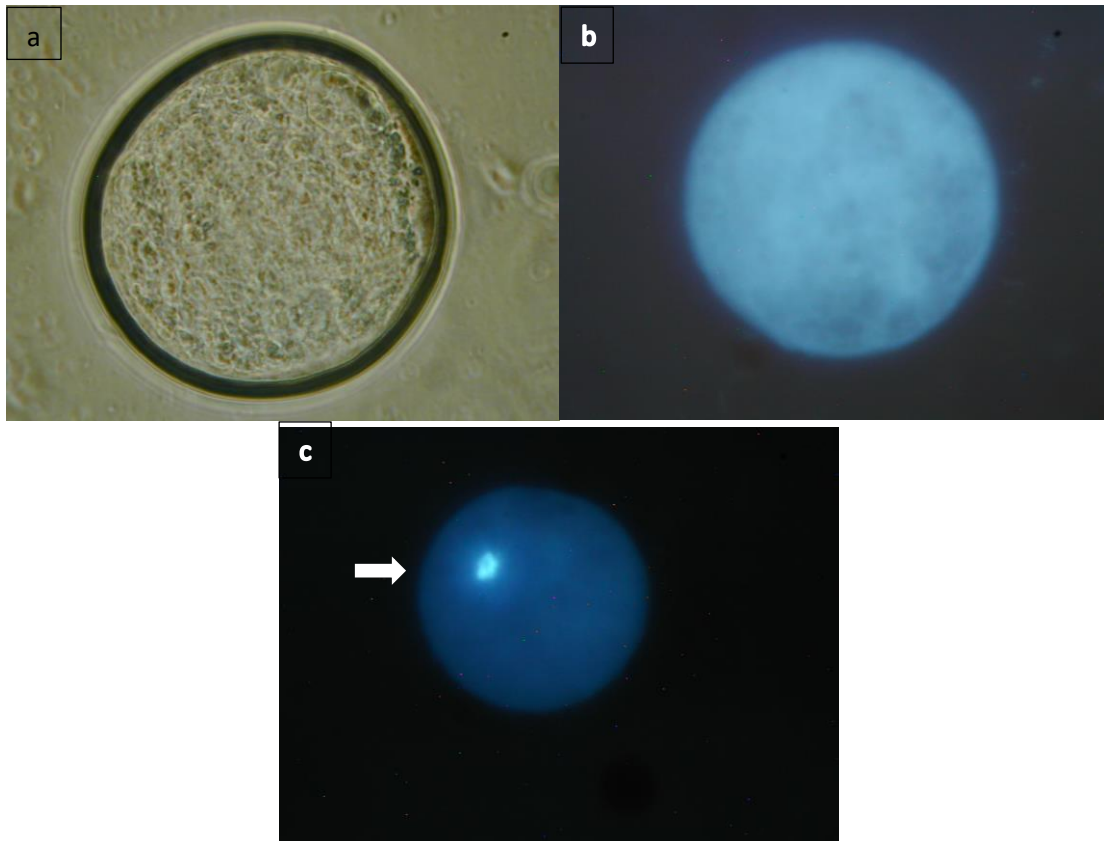


Figura 6. Ovocitos reconstituidos de gata enucleados manualmente (Citoplastos). a. Ovocito sin cromatina en campo claro. b. Ovocito teñido con DAPI sin cromatina bajo epifluorescencia . c. Ovocito con restos de cromatina. Aumento 40X.

12. DISCUSIÓN

12.1 Deriva de fibroblastos de piel y de células de la granulosa de ovocitos de gata doméstica, en cultivos primarios

En este estudio fue posible derivar fibroblastos de piel de gata doméstica en cultivos primarios, llevándolos hasta el 5to pasaje. Resultados superiores a los obtenidos por Kitiyanant *et al.* (2003) en la misma especie, quienes solo lograron llevarlos al 4to pasaje. Sin embargo, son similares a lo reportado por Moro (2015), quien obtuvo fibroblastos de chita, tigre y bengala, y por Veraguas (2018), quien llevó al 5to y 6to pasajes, fibroblastos de güina (*Leopardus guigna*), aunque en nuestro estudio sólo propusimos llegar hasta el 5to pasaje según la metodología utilizada.

Respecto a las células de la granulosa provenientes de ovocitos de gata doméstica, en este estudio fue posible su deriva a partir de cultivos primarios llevándolos al segundo pasaje celular, similar a lo reportado por Cortez *et al.* (2017) en bovino,

quienes también lograron sólo el 2do pasaje, ya que en el 3er pasaje no hubo fijación de las células al fondo de la caja con el consecuente reducido crecimiento celular. Estos resultados son similares a lo reportado por Kitiyanant *et al.* (2003), utilizando células del cúmulo de ovocitos de gata, las que también llegaron sólo al 2do pasaje; las células de la granulosa son multipotenciales y pueden diferenciarse en condrocitos, neuronas, células musculares, cardiomiocitos y osteoblastos, si bien se ha comprobado que con un medio específico con el factor inhibidor de la leucemia, que se utiliza en el cultivo de células madre pueden vivir hasta por cuatro meses en condiciones *in vitro* (Dompe *et al.*, 2021), es posible que en las condiciones de nuestro medio de cultivo no muestren su multipotencia sino que se comporten más como en su función natural de crecimiento, teniendo en cuenta que una vez ocurre la ovulación estas células dejan de dividirse, mientras algunas células de la granulosa acompañan la atresia folicular, otras acompañan al ovocito ovulado hasta la fecundación, siendo su vida y función limitada a cada ovulación y ovocito ovulado, razón por la cual no podrían sobrevivir más allá del segundo pasaje a diferencia de los fibroblastos que en su función natural pueden diferenciarse a diferentes tipos celulares de la piel, además de tener una vida más prolongada.

Así mismo estas células al ser obtenidas a partir de muestras de ovarios puede ser de gran importancia debido a la facilidad de obtención de muestras en gatas durante jornadas de esterilización, teniendo en cuenta que en felinos son muy pocos los estudios realizados en el área reproductiva y que los resultados obtenidos pueden ser extrapolados a felinos silvestres, además estas mismas células pueden ser obtenidas de felinos silvestres en cautiverio que presenten enfermedades reproductivas como piometra e incluso después de la muerte (Moro, 2015), por lo cual debido a la disponibilidad y la facilidad de obtención de las muestras a partir de gatas operadas (ovariohisterectomía), las células de la granulosa son una buena opción para la investigación de técnicas biotecnológicas reproductivas en felinos, además de la poca investigación existente alrededor de las mismas para la especie.

La viabilidad celular pre congelación y post congelación obtenida en este estudio para los fibroblastos de piel de gata, fue similar a lo reportado en el guazú (*Mazama gouazoubira*) (95% de viabilidad pre congelación) y superior a lo reportado por Magalhães *et al.* (2017) (80% de viabilidad post congelación). Por otro lado, en el camello de dos jorobas (*Camelus bactrianus*) la viabilidad pre congelación se reporta de 98% y post congelación de 89% (Sharma *et al.*, 2018). Para el elefante (*Elephas maximus*) la viabilidad pre congelación y post congelación no fue tan variable entre las dos 97.3% y 95.5%, respectivamente (Siengdee *et al.*, 2018), si bien en la comparación de nuestros resultados obtenidos no existen datos en felinos, los datos generados en este estudio no se aleja de los reportados en otras especies, esto demuestra la importancia de nuestro estudio y de futuros para

determinar la viabilidad celular de las células somáticas puesto que son un punto importante durante la TNCS.

En la TNCS se han utilizado diferentes tipos celulares como carioplastos, entre los que se encuentran los fibroblastos, las células epiteliales mamarias, las células del cúmulo y las células de la granulosa, así como células de órganos internos. Pero aún no ha sido posible determinar con precisión, el por qué un tipo de célula somática tiene un mejor comportamiento en la TNCS con respecto a otros (Wani y Hong, 2017). Se ha reportado que el ADN de las células del cúmulo puede reprogramarse de forma más eficaz después de la TNCS, teniendo un mejor comportamiento como células donadoras de núcleo al presentar menores anomalías en los animales clonados. Asimismo, más del 80% de las células del cúmulo se pueden encontrar detenidas en la fase G0/G1 del ciclo celular, razón por la cual son células idóneas para ser usadas como donantes de núcleo sin ningún criterio de selección y no requieren de un cultivo *in vitro* adicional para verificar la sincronización del ciclo celular (Gouveia *et al.*, 2020), esta característica es de vital importancia, teniendo en cuenta que la sincronización del ciclo celular entre el ovocito receptor y el núcleo de la célula donante es imprescindible para garantizar el éxito de la reprogramación epigenética y el desarrollo a término (Gouveia *et al.*, 2020).

En gatos, utilizando fibroblastos fetales y células del cúmulo como donadoras de núcleo en la TNCS, se observó que los primeros tuvieron una mejor eficiencia en la fusión (59.6%) con respecto a las segundas (45.4%), pero la tasa de división celular fue menor (62.6%) en comparación con las células del cúmulo (73.8%), al igual que el desarrollo de los embriones clonados con ellas (5.2% y 7.7% de blastocistos, respectivamente). Aunque no hubo diferencias estadísticas, las células del cúmulo tuvieron un mejor desarrollo con respecto a los fibroblastos fetales (Skrzyszowska *et al.*, 2002).

En el camello (*Camelus dromedarius*), utilizando los mismos tipos celulares no se observaron diferencias en la segmentación y el desarrollo embrionario a blastocistos, pero si se evidenció diferencia en los nacimientos de crías vivas. Al transferir blastocistos procedentes de las células del cúmulo en hembras subrogadas, se obtuvieron 3 crías vivas vs. 0 (solo se logró una gestación con aborto en el día 296) al utilizar fibroblastos. Por lo que, si bien el tipo celular no afectó el desarrollo embrionario *in vitro*, solo las células del cúmulo fueron capaces de lograr el desarrollo a término en esta especie (Wani y Hong, 2017).

En un estudio en monos macacos clonados se utilizaron células del cúmulo adultas y fibroblastos fetales, encontrando una menor eficiencia en las células del cúmulo que cuando se usaron fibroblastos fetales como células donantes de núcleo. Esto puede deberse a una menor eficiencia en la reprogramación de los núcleos adultos

en comparación con los fetales, lo que sugiere que la eficiencia de la clonación puede aumentar si se utilizan células donantes en un estado no diferenciado (Liu *et al.*, 2018).

Por otra parte los embriones producidos por TNCS, generalmente presente una expresión anormal de genes, que están controlados por mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, la cual varía dependiendo del tipo celular, y en embriones clones, estos patrones de metilación son dados por la célula somática, en este sentido se ha determinado que los ovocitos tienen un bajo porcentaje de metilación (Duan 2020; Vásquez *et al.*, 2022), aunque son necesarios futuros estudios que pudieran determinar el grado de metilación en las células de la granulosa comparado con los fibroblastos, podría existir la probabilidad de que las células de la granulosa al ser cercanas al ovocito y tener el mismo origen embrionario tuvieran un porcentaje de metilación bajo, lo que favorecería los patrones de metilación en el embrión clon, que se vería reflejado en el mejor comportamiento como células donadoras de núcleo en la TNCS; además se ha identificado que éstas células de la granulosa muestran una mayor actividad de la enzima telomerasa en comparación con otras células adultas (Dzafic *et al.*, 2013), lo cual podría influir en el acortamiento de los telómeros, por lo cual es de vital importancia seguir investigando estos aspectos que podría ayudar a mejorar la eficiencia de la clonación, y también aumentar el estudio de estas células puesto que la información existente aún sigue siendo baja.

12.2 Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de gata

La MIV es vital para que el ovocito logre la maduración nuclear y citoplasmática, y esto es esencial para el éxito en las técnicas de reproducción asistida como la FIV, y el desarrollo embrionario (Hernández *et al.*, 2021). Los mismos autores obtuvieron tasas de MIV de 32% a las 24 h y de 48% a las 48 h de cultivo en ovocitos de gata sin suplementación del medio de maduración con ITS. Prochowska *et al.* (2019) reportan tasas de MIV más altas, desde 52.7% hasta 58.9% a las 24 h sin ITS, aunque con diferentes concentraciones hormonales en el medio. En el presente estudio, la MIV de ovocitos de gata obtenida a las 24 horas de cultivo, fue superior a lo reportado, al suplementar el medio de maduración con ITS (59%).

El ITS ha sido poco estudiado en la gata doméstica, aunque ha sido utilizado con mayor frecuencia en otras especies como los cerdos y bovinos (Moro, 2015). En el presente estudio se observó que, el uso de ITS a 10 μ L/mL, mejora la MIV de ovocitos de gata doméstica. A bajas concentraciones (1 μ L/mL) no mostró diferencias de MIV con ITS (46.1%), en comparación al medio sin ITS (47.4%), pero sí tuvo un efecto positivo con baja tensión de oxígeno (5%O₂) en la tasa de

blastocistos del 36.7%, aunque con un aumento en la fragmentación del ADN de los embriones en un 67.6% (Moro, 2015).

Se ha descrito que la insulina en el medio suplementado favorece la captación de glucosa (Riley y Moley, 2006) y aminoácidos (Moro, 2015), al igual que la síntesis de RNA y proteínas (Santos *et al.*, 2008) y en embriones genera una respuesta mitogénica y anti-apoptótica que aumenta las tasas de desarrollo (Augustin *et al.*, 2003). Así mismo la transferrina controla la biodisnibilidad de hierro dentro de la célula, necesario para la síntesis de citocromos, enzimas y proteínas como la mioglobina y la hemoglobina, además por reacción de quelación disminuye los efectos toxicos de los iones Fe⁺³, de esta manera los mantiene disponibles para la célula, adicionalmente tiene propiedades antioxidantes restringiendo el hierro catalítico para reacciones que generan radicales libres de oxígeno y peróxido (Kell, 2009; Ciani *et al.*, 2021), por último, el selenio hace parte de diferentes moléculas biológicas con funciones antioxidantes, siendo co-factor para la peroxidasa del glutatión y proteínas como la tioredoxinas, ambas poseen propiedades antioxidantes reduciendo los peróxidos (Ebert *et al.*, 2006; Battin y Brumaghim, 2009).

En cabras prepúberes, el ITS, al ser suplementado junto con el ácido ascórbico, mejora la calidad de los blastocistos producidos *in vitro* (Hammami *et al.*, 2012). Mientras que, en perras, la administración de 1 µL/mL de ITS en el medio de MIV junto con una alta tensión de CO₂, mejora la tasa de MIV hasta en un 20%, reduciendo los niveles de ERO y favoreciendo una mayor integridad de la membrana citoplasmática (Duque *et al.*, 2021).

La enucleación manual de ovocitos de gata y la posterior reconstitución de los mismos observada en este estudio, demuestra la factibilidad de obtener citoplastos como receptores de núcleos en los programas de HMC en esta especie, lo que no había sido reportado previamente en esta especie.

13 CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que los fibroblastos de piel y células de la granulosa de gata doméstica pueden derivarse en cultivos primarios y congelarse sin perder su viabilidad post congelación. Así mismo, es posible crear bancos de germoplasma de células donadoras de núcleo para futuros programas de clonación de embriones en esta especie. Por otro lado, la eficiencia de la enucleación de ovocitos MII de gata doméstica demuestra la posibilidad de su utilización como receptores de núcleo (citoplastos) para la clonación de embriones, siendo este el primer reporte que se da, sobre la enucleación manual de ovocitos de gata doméstica. Además, se

demuestra que la utilización de ITS 10 µL/mL en el medio de maduración mejora considerablemente la tasa de MIV en la gata doméstica.

14 BIBLIOGRAFÍA

- Agca, Y. (2012). Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. *Theriogenology*. 78. 1653-1665.
- Augustin, R; Pocar, P; Wrenzycki, C; Niemann, H; Fischer, B. (2003). Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 126. 91-99. doi: 10.1530/rep.0.1260091
- Baumgarten, S; Stocco, C. 2018. Granulosa Cells. *Encyclopedia of Reproduction*. 2da Edición. Volumen 2. University of Illinois College of Medicine, Chicago, IL, United States. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64623-8>
- Battin E, Brumaghim J. (2009). Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metalbinding antioxidant mechanisms cell. *Cell Biochem Biophys* 55:1-23. doi:10.1007/s12013-009-9054-7
- Binder, C; Aurich, C; Reifinger, M; Aurich, J. (2019). Spontaneous ovulation in cats – uterine findings and correlations with animal weight and age. *Animal Reproduction Science*. 209. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106167.
- Briones Salas, M; Lavariega, M; Lira Torres, I. (2012). Distribución actual y potencial del jaguar (*Panthera onca*) en Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83(1), 246-257.
- Brown J. (2006). Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology*. 66. 25–36.
- Castaño Uribe, C; Ange, C; Rodríguez-Castellanos, P; Romero Rendón, J; Ramírez-Guerra, N. (2016). Diagnóstico sobre el conflicto entre grandes felinos y humanos y estrategias de manejo en la región Caribe de Colombia. 73-87. En C, Castaño-Uribe; C, Lasso; R, Hoogesteijn; A, Diaz-Pulido; E. Payán. (Editores). *II. Conflictos entre felinos y humanos en América Latina. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, D. C., Colombia. <https://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/2018-03-03-CONFLICTO-FELINOS-LIBRO-FINAL.pdf>
- Ciani, F; Maruccio, L; Cocchia, N; d'Angelo, D; Carotenuto, D; Avallone, L; Namagerdi, A; Tafuri, S. (2021). Antioxidants in assisted reproductive technologies: An overview on dog, cat, and horse. *Journal of advanced*

veterinary and animal research. 8(1). 173-184.
<http://doi.org/10.5455/javar.2021.h500>

- Conanp Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2021. Guía de felinos RB Marismas Nacionales de Nayarit 2021. Tomado de: https://www.conanp.gob.mx/documentos/GuiaFelinosRBMarismasNacionalesNayarit_2021.pdf
- Cordova, A; King, W; Mastromonaco, G. (2017). Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species. *Journal of Animal Science and Technology.* 59(24).
- Corrales Gutiérrez, D; Salom Pérez, R; Hoogesteijn, R. (2016) Convenio entre el gobierno de Costa Rica y Panthera: Unidad de Atención de Conflictos con Felinos (UACFel). 169-180. En C, Castaño-Uribe; C, Lasso; R, Hoogesteijn; A, Diaz-Pulido; E. Payán. (Editores). *II. Conflictos entre felinos y humanos en América Latina. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical.* Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, D. C., Colombia. <https://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/2018-03-03-CONFLICTO-FELINOS-LIBRO-FINAL.pdf>
- Cortez, J; Murga, N; Segura, G; Rodríguez, Ll; Vásquez, H; Maicelo, J. (2017). Capacidad de dos líneas celulares para la producción de embriones clonados mediante transferencia nuclear de células somáticas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 28(4). 928-938.
- Dell'Amore, C. (2017) Pequeños felinos, una vida en la sombra. Tomado de: https://www.nationalgeographic.com.es/naturaleza/grandes-reportajes/pequenos-felinos-una-vida-sombra_11294. 15 de Febrero 2022.
- Dompe, C; Kulus, M; Stefanska, K; Kranc, W; Chermuła, B; Bryl, R; Pienkowski, W; Nawrocki, M; Petite, J; Stelmach, B; Mozdziak, P; Jeseta, M; Pawelczyk, L; Jaskowski, J; Piotrowska, H; Spaczynski R; Nowicki, M; Kempisty, B. (2021). Human Granulosa Cells—Stemness Properties, Molecular Cross-Talk and Follicular Angiogenesis. *Cells.* 10. 1396. <https://doi.org/10.3390/cells10061396>
- Duan, J; Jiang, Z; Alqahtani, F; Mandoiu, I; Dong, X; Zheng, X; Marjani, L; Chen, J; Tian, X. (2020). Methylome dynamics of bovine gametes and in vivo early embryos. *Frontiers in Genetics.* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00512>.
- Duque Rodriguez, M; Cittadini, C; Teplitz, G; De Stefano, A; Lombardo, D; Salamone, D. (2021). Canine ivm with sof medium, insulin-transferrin-selenium, and low o2 tension improves oocyte meiotic competence and

- decreases reactive oxygen species levels. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9(694889). doi: 10.3389/fcell.2021.694889.
- Dzafic, E; Stimpfel, M; Virant-Klun, I. (2013). Plasticity of granulosa cells: On the crossroad of stemness and transdifferentiation potential. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 30. 1255–1261.
 - Ebert, R; Ulmer, M; Zeck, S; Meissner, J; Schneider, D; Stopper, H; Schupp, N; Kassem, M; Jakob, F. (2006). Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells *In vitro*. *Stem Cells*. 24. 1226–1235.
 - Folch, J; Cocero, M; Chesné, P; Aguilar, B; Domínguez, V; Cognié, Y; Alabart, J; Roche, A; Garbayo, A; Fernández-Arias, A; Echegoyen, E; Sánchez, P; Martí, J; González de Bulnes, A; García-García, R; Veiga-López, A; Vignon, X. (2003). Producción de embriones de bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*) mediante clonación por transferencia nuclear de fibroblastos a oocitos de cabra doméstica (*Capra hircus*). *!TEA 2003*. Volumen Extra N.24. Tomo I. 282-284. https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2003/comunicaciones/2003_Rep_08.pdf
 - Folch, J; Cocero, M; Chesné, P; Alabart, J; Domínguez, V; Cognié, Y; Roche, A; Fernández-Árias, A; Martí, J; Sánchez, P; Echegoyen, E; Beckers, J; Sánchez Bonastre, A; Vignon, X. (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*. 71. 1026–1034.
 - Gallo Santos, J. (2021). Hablemos de la conservación del jaguar. Tomado de: <https://divulgacion.minciencias.gov.co/inspirate/editoriales/hablemos-de-la-conservacion-del-jaguar>. 16 Septiembre 2023.
 - García, A; Ponce Santizo, G; Rodas, A; Cabrera, O; McNab, R; Polisar, J; Lepe, M. (2016). Jaguares y productores agropecuarios en la Zona de Amortiguamiento de la Reserva de la Biosfera Maya, Guatemala: herramientas para mejorar la coexistencia. 139-149. En C, Castaño-Uribe; C, Lasso; R, Hoogesteijn; A, Diaz-Pulido; E. Payán. (Editores). *II. Conflictos entre felinos y humanos en América Latina. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, D. C., Colombia. <https://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/2018-03-03-CONFLICTO-FELINOS-LIBRO-FINAL.pdf>
 - Gjørret, J; Wengle, J; Maddox-Hyttel, P; King, W. (2005) Chronological Appearance of Apoptosis in Bovine Embryos Reconstructed by Somatic Cell Nuclear Transfer from Quiescent Granulosa Cells. *Reproduction in Domestic Animals*. 40(3). 210–216.

- Gómez, M; Pope, C; Giraldo, A; Lyons, L; Harris, R; King, A; Cole, A; Godke, R; Dresser, B. (2004). Birth of African Wildcat Cloned Kittens Born from Domestic Cats. *Cloning and stem cells*. 6(3). 247-258.
- Gómez, M; Pope, C; Dresser, B. (2006) Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology*. 66. 72–81.
- Gómez, M; Pope, C; Kutner, R; Ricks, D; Lyons, L; Ruhe, M; Dumas, C; Lyons, J; López, M; Dresser, B; Reiser, J. (2008). Nuclear Transfer of Sand Cat Cells into Enucleated Domestic Cat Oocytes is Affected by Cryopreservation of Donor Cells. *Cloning and stem cells*. 10(4). 469-483.
- Gómez, M; Pope, C; Ricks, D; Lyons, J; Dumas, C; Dresser, B. (2009). Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. *Reproduction, Fertility, and Development*. 21(1). 76–82. doi: 10.1071/rd08222
- Gou, K; An, X; Guan, H; Yang, X; Hou, J; Zhu, S; Zeng, S; Tian, J; Chen, Y. (2003). Transgenic twin lambs cloned by granulosa cells. *Cloning and stem cells*. 5(1). 71-78.
- Gouveia, C; Huyser, C; Egli, D; Pepper, M. (2020). Lessons Learned from Somatic Cell Nuclear Transfer. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(2314). doi:10.3390/ijms21072314.
- Gudermuth, F; Newton, L; Daels P; Concannon, P. (1997). Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility*. 51. 177–184.
- Hammami, S; Morató, R; Romaguera, R; Roura, M; Catalá, M; Paramio, M; Mogas, T; Izquierdo, D. (2012). Developmental Competence and Embryo Quality of Small Oocytes from Pre-pubertal Goats Cultured in IVM Medium Supplemented with Low Level of Hormones, Insulin–Transferrin–Selenium and Ascorbic Acid. *Reproduction in Domestic Animals*. 48(2) 339-344 doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02160.x.
- Hernández Pichardo, J; Del Moral Reyes, M; Kjelland, M; Rodríguez Suastegui, J. (2021) Effect of Different Reproductive Stages and Culture Times on Domestic Cat *in Vitro* Oocyte Maturation. *Advances in Reproductive Sciences*. 9. 129-138.
- Hoogsteijn, A; López, C; Núñez, R; Rosas-Rosas, O; Flebes, J. (2016a). El jaguar y las comunidades rurales: uso de densidad humana y bovina para identificar zonas de conflicto a nivel nacional en México. 49-60. En C, Castaño-Uribe; C, Lasso; R, Hoogsteijn; A, Diaz-Pulido; E. Payán. (Editores). *II. Conflictos entre felinos y humanos en América Latina. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, D. C., Colombia.

<https://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/2018-03-03-CONFLICTO-FELINOS-LIBRO-FINAL.pdf>

- Hoogesteijn, R; Hoogesteijn, A; Corrales Gutiérrez, D; Salom Pérez, R; Payán, E; Valderrama Vásquez, C. (2016b). Uso del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) para controlar la depredación por grandes felinos en América Tropical: casos de estudio. 251-266. En C, Castaño-Uribe; C, Lasso; R, Hoogesteijn; A, Diaz-Pulido; E. Payán. (Editores). *II. Conflictos entre felinos y humanos en América Latina. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, D. C., Colombia. <https://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/2018-03-03-CONFLICTO-FELINOS-LIBRO-FINAL.pdf>
- Inoue, F; Matsuda, J; Ohkoshi, K; Furusawa, T; Takahashi, S; Sasada, H; Sato, E; Tokunaga, T. (2006). Differences in gene expression patterns between somatic cell nuclear transfer embryos constructed with either rabbit granulosa cells or their derivatives. *Animal Reproduction Science*. 93(1-2). 76-87.
- Jewgenow, K; Zahmel, J. (2020). Preservation of female genetic resources in feline species. *Theriogenology*. 156. 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.040>
- Jewgenow, K; Braun, B; Dehnhard, M; Zahmel, J; Goeritz, F. (2017). Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. *Reproduction in Domestic Animals*. 52. 18-23. DOI: 10.1111/rda.12836
- Johnson, A. (2022). Normal feline reproduction. The queen. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 24. 204–211.
- Kell, D. (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the etiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Medical Genomics* 2: 1-79. doi:10.1186/1755-8794-2-2
- Kitiyanant, Y; Saikhun, J; Pavasuthipaisit, K. (2003). Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology*. 59.1775-1786.
- Koroghli, A; Floyd, E; Regouski, M; Rood, K; Gash, K; Panter, K; Stott, R; Davies, J; Polejaeva, A; Rutigliano, M. (2018). Gene expression and lymphocyte population at the fetal-maternal in sheep pregnancies established by somatic cell nuclear transfer. *Reproduction, Fertility and Development*. 30, 1011–1020. <https://doi.org/10.1071/RD17224>

- Kossowska, K; De Geyter, C; De Geyter, M; Martin, I; Holzgreve, W; Scherberich, A; Zhang, H. (2009). The Multipotency of Luteinizing Granulosa Cells Collected from Mature Ovarian Follicles. *Stem Cells*. 27. 210–219.
- Leyva, H; Madley, T; Stabenfeldt, G. (1989) Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. *Journal of Reproduction Fertility*. 39. 125–133.
- Liu, Y; Wang, H; Lu, J; Miao, Y; Cao, X; Zhang, L; Wu, X; Wu, F; Ding, B; Wang, R; Luo, M; Li, W; Tan, J. (2016). Rex Rabbit Somatic Cell Nuclear Transfer with In Vitro–Matured Oocytes. *Cellular Reprogramming*. 18(3). 187-194.
- Liu, Z; Cai, Y; Wang, Y; Nie, Y; Zhang, C; Xu, Y; Zhang, X; Lu, Y; Wang, Z; Poo, M. (2018). Cloning of macaques by somatic cell nuclear transfer. *Cell Press* 172(4). 881–887.
- Magalhães, L; Bhat, M; Freitas, J; Melo, L; Teixeira, D; Pinto, L; Câmara, L; Duarte, J; Freitas V. (2017). The effects of cryopreservation on different passages of fibroblast cell culture in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Biopreservation and Biobanking*. 15(5). 463-468.
- Malandain, E; Rault, D; Froment, E; Baudon, S; Desquilbet, L; Begon, D; Chastant, S. (2011). Follicular growth monitoring in the female cat during estrus. *Theriogenology*. 76(7). doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.002
- Mestre-Citrinovitz, A; Sestelo, A; Ceballos, M; Baránao, J; Saragüeta, P. (2016). Isolation of Primary Fibroblast Culture from Wildlife: the *Panthera onca* Case to Preserve a South American Endangered Species. *Current Protocols in Molecular Biology*. 28(7). 28.7.1-28.7.14.
- Molpeceres de Diego, I. (2021). Plan Jaguar 2030: Unificando esfuerzos por el felino más grande de América. Tomado de: <https://waraca.org/plan-jaguar-2030-unificando-esfuerzos-por-el-felino-mas-grande-de-america/>
- Moreno, R; Valdés, S; Artavia, A; Young, N; Ortega, J; Brown, E; Sánchez, E; Meyer, N. (2016). Conflicto entre felinos y humanos en Panamá: avances en la resolución del conflicto, educación y conservación del jaguar. 61-72. En C, Castaño-Uribe; C, Lasso; R, Hoogesteijn; A, Diaz-Pulido; E. Payán. (Editores). *II. Conflictos entre felinos y humanos en América Latina. Serie Editorial Fauna Silvestre Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Bogotá, D. C., Colombia. <https://www.imasul.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/06/2018-03-03-CONFLICTO-FELINOS-LIBRO-FINAL.pdf>
- Moro, L. (2015). Clonación e ICSI interespecífica en felinos y reprogramación nuclear. (Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires). Argentina.
- Navarro Maldonado, M; Hernández Martínez, S; Martínez Ibarra, J; Vázquez Avendaño, J; Ambríz García, D; Raymundo Rangel, Santos; Vajta, G. (2016).

Clonación de embriones de *Ovis aries* utilizando fibroblastos criopreservados durante 14 meses. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 3(4).

- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 Tomado de: https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091. 26 Febrero 2022.
- ONU 2022. Tomado de: <https://www.un.org/es/observances/world-wildlife-day#:~:text=M%C3%A1s%20de%208.400%20especies%20de,especies%20est%C3%A1n%20amenazadas%20de%20extinci%C3%B3n>.
- Perego, C; Bellitto, N; Rio, E; Canoli, F; Spicer, L. (2021). Effects of selected hormones and their combination on progesterone and estradiol production and proliferation of feline granulosa cells cultured in vitro. *Theriogenology*. 168. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.017>
- Peura, T; Hartwich, K; Hamilton, H; Walker, S. (2003). No differences in sheep somatic cell nuclear transfer outcomes using serum-starved or actively growing donor granulosa cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 15(3) 157-65.
- Pesquisa Javeriana. (2021). El jaguar en Colombia: ¿por qué ataca y cómo solucionarlo?. Pontificia Universidad Javeriana Colombia. Tomado de: <https://www.javeriana.edu.co/pesquisa/el-jaguar-en-colombia-por-que-ataca-y-como-solucionarlo/>
- Pope, E. (2014). Aspects of *in vivo* oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology*. 81(1). 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.006>
- Prochowska Sylwia, Nizanski Wojciech, Partyka Agnieszka, Kochan Joanna, Młodawska Wiesława, Nowak Agnieszka, Skotnicki Józef, Grega Teresa, Pałys Marcin. The use of human and bovine commercial media for oocyte maturation and embryo development in the domestic cat (*Felis catus*). 2019. *Reprod Dom Anim*. 54:719–726.
- Riley, J; Moley, K. (2006). Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction*. 131. 823-835. doi: 10.1530/rep.1.00645
- Saadeldin Islam, M; Aziz Swelum, A; Noreldin Ahmed, E; Tukur Hamed, A; Abdelazim Aaser, M; Abomughaid Mosleh, M; Alowaimer Abdullah, N. (2019). Isolation and Culture of Skin-Derived Differentiated and Stem-Like Cells Obtained from the Arabian Camel (*Camelus dromedarius*). *Animals*. 9(6). 378. <https://doi.org/10.3390/ani9060378>
- Saint, M; Malandain, E; Thoumire, S; Remy, B; Chastant, S. (2007). Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptors during follicular growth in the domestic cat ovary. *Molecular reproduction and development*. 74. 989-996. <https://doi.org/10.1002/mrd.20676>.

- Santos, A; Ramin, N; Tonack, S; Fischer, B. (2008). Cell lineage-specific signalling of insulin and insulin like growth factor I in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 149. 515-524. doi: 10.1210/en.-2007-0821
- SEMARNAT. (2018). Programa de acción para la conservación del Ocelote (*Leopardus pardalis*), Margay (*Leopardus wiedii*) y Jaguarundi (*Puma yagouaroundi*). SEMARNAT/CONANP, México. Tomado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/443996/PACE_Peque_os_Felinos.pdf
- Sharma, R; Sharma, H; Ahlawat, S; Aggarwal, R; Vij, P; Tantia, M. (2018) First attempt on somatic cell cryopreservation of critically endangered *Camelus bactrianus* of India. *Gene Reports*. 10. 109-115.
- Sharma, R; Sharma, H; Ahlawat, S; Aggarwal, R; Vij P; Tantia, M. (2017). First attempt on somatic cell cryopreservation of critically endangered *Camelus bactrianus* of India. *Gene Reports*. 10. 109-115.
- Shille, V; Lundstrom, K; Stabenfeldt, G. (1979). Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*. 21. 953–963.
- Shin, T; Kraemer, D; Pryor, J; Liu, L; Rugila, J; Howe, L; Buck, S; Murphy, K; Lyons, L; Westhusin, Mark. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 415(6874). 859. doi: 10.1038/nature723.
- Siemieniuch, M; Jursza, E; Szostek, A. Skarzynski, D; Boos, A; Kowalewski, M. (2012). Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 10(89). doi: 10.1186/1477-7827-10-89.
- Siengdee, P; Klinhom, S; Thitaram, C; Nganvongpanit, K. (2018). Isolation and culture of primary adult skin fibroblasts from the Asian elephant (*Elephas maximus*). *PeerJ Publishing*. 24(6). e4302. DOI 10.7717/peerj.4302.
- Sierra, Y. (2018). Plan Jaguar 2030: la iniciativa que reúne a 14 países por el gran felino de América Latina.. Tomado de: <https://es.mongabay.com/2018/12/plan-jaguar-2030/>
- Skrzyszowska, M; Katska, L; Ryńska, B; Kania, G; Smorag, Z; Pieńkowski, M. (2002). In vitro developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology*. 58(8). 1615-21.
- Srirattana, K; Kaneda, M; Parnpai, R. (2022). Strategies to Improve the Efficiency of Somatic Cell Nuclear Transfer. *International Journal of Molecular Sciences*. 23. 1969. <https://doi.org/10.3390/ijms23041969>.
- Seok-Hwan, S; Kyeong-Lim, L; Lianguang, X; Myeong-Don, J; Ji-Yoon, H; Seon-Hwa, O; Il-Keun, K. (2019). Production of cloned cats using additional complimentary cytoplasm. *Animal Reproduction Science*. 208. 106125.

- Thongphakdee, A; Sukparangsi, W; Comizzoli, P; Chatdarong, K. (2020). Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. *Theriogenology*. 150. 360-373.
- Vajta, G; Lewis, I; Hyttel, P; Thouas, G; Trounson, A. (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 3(2). 89-95.
- Vajta, G; Lewis, I; Tercirlioglu, R. (2006). Handmade somatic cell cloning in cattle. *Methods in Molecular Biology*. 348. 183-196.
- Vázquez Avendaño, J. (2016). Reprogramación de carioplastos con extractos de ovocitos como estrategia de producción de embriones por handmade cloning en *ovis aries*. (Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana). México.
- Vázquez Avendano, J; Ambríz-García, D; Cortez-Romero, C; Trejo-Cordova, A; Navarro-Maldonado, M. (2022). Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer. *Small Ruminant Research*. 212. 1-10.
- Veraguas Dávila, D. (2018). Reprogramación de células somáticas de güiña (*Leopardus guigna*) mediante transferencia nuclear heteroespecífica utilizando ovocitos maduros de gata doméstica (*Felis silvestris catus*). (Tesis doctoral, Universidad de Concepción). Chile.
- Veraguas, D; Caamaño, D; Sáez, D; Vásquez, Y; Saravia, F; Castro, F; Rodríguez, LI. (2023). Zona pellucida removal modifies the expression and release of specific microRNAs in domestic cat blastocysts. *Zygote*. 1-13. doi: 10.1017/S0967199423000436
- Verstegen, J; Onclin, K; Silva, L; Wouters, P; Delahaut, P; Ectors, F. (1993). Regulation of progesterone during pregnancy in the cat: studies on the roles of corpora lutea, placenta and prolactin secretion. *Journal of Reproduction and Fertility*. 47. 165–173.
- Vien, L; Keisuke, H; Fuminori, T; Yoko, S; Lanh, D; Masayasu, T; Takeshige, O. (2013). The effect of relaxin supplementation of in vitro maturation medium on the development of cat oocytes obtained from ovaries stored at 4 8C. *Reproductive biology*. 13. 122-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2013.04.002>
- Wani Nisar, A; Hong Seung, B. (2017). Source, treatment and type of nuclear donor cells influences in vitro and in vivo development of embryos cloned by Somatic Cell Nuclear Transfer in camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*. 106. 186-191.
- Xi-Jun, Y; Hyo-Sang, L; Lyong-Ho, K; Hyoung-Doo, S; Nam-Hyung, K; Il-Keun, K. (2007). Effect of serum starvation on the efficiency of nuclear transfer using odd-eyed white cat fibroblasts. *Theriogenology*. 67. 816–823.

- Zhao, Q; Qiu, J; Feng, Z; Du, Y; Liu, Y; Zhao, Z; Sun, M; Cui, M; Zhao, X. (2021). Robotic label-free precise oocyte enucleation for improving developmental competence of cloned embryos. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 68. 2348–2359.
- Zheng, W; Zhang, H; Liu, K. (2014). The two classes of primordial follicles in the mouse ovary: their development, physiological functions and implications for future research. *Molecular Human Reproduction*, 20. 286–292.



Viabilidad de las células de la granulosa criopreservadas y la capacidad de enucleación de ovocitos, en gata doméstica (*Felis Catus*)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 16 del mes de mayo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA
- DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO
- DR. SALVADOR ROMO GARCIA
- DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: YAMID ESTEBAN VALENCIA TORRES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Yamid Valencia
YAMID ESTEBAN VALENCIA TORRES
ALUMNO

REVISÓ
[Signature]
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

[Signature]
DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

VOCAL

[Signature]
DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO

VOCAL

[Signature]
DR. SALVADOR ROMO GARCIA

SECRETARIA

[Signature]
DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS