



1. 01673  
12ej  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS DE  
BOVINO UTILIZANDO CELULAS SOMATICAS**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN PRODUCCION: GENETICA**

**PRESENTADA POR**

**MARIA DE LOS ANGELES TORNER CAÑEDO**



**DIRECTORES DE TESIS**

**JAVIER VALENCIA**

**MANUEL BERRUECOS**

**ERNESTO GUERRERO**

**Ciudad Universitaria, México D.F. 1995**

**FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **C o n t e n i d o**

	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>2. Revisión de literatura</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Teorías genéticas sobre la constancia del genoma</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Análisis de procedimientos</b>	<b>17</b>
<b>3. Objetivo</b>	<b>25</b>
<b>4. Material y métodos</b>	<b>26</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>6. Discusión</b>	<b>32</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>37</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>51</b>

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		Página
<b>Cuadro 1</b>	<b>Ovocitos fusionados</b>	<b>31</b>
<b>Figura 1</b>	<b>Ovocito de bovino fusionado con célula de bazo</b>	<b>38</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Ovocito de bovino fusionado con células de la granulosa</b>	<b>39</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Blastocito expandido con desarrollo de 4 días</b>	<b>40</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Mórula obtenida de fusión celular después de 6 días</b>	<b>41</b>

## **R e s u m e n**

Se obtuvieron los ovarios de hembras bovinas inmediatamente después del sacrificio. Además se tomaron muestras de bazo, piel y oviducto. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio en PBS a 37°C. La obtención de ovocitos se realizó por aspiración de los folículos. Los ovocitos competentes se incubaron durante 24 h en microgotas del medio TCM 199 cubiertas por parafina, a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub>. Al mismo tiempo se realizó el cultivo de tejidos de células de la granulosa, de oviducto, de piel y bazo. Después de madurados, los ovocitos fueron desprovistos de la zona pelúcida y sus núcleos fueron inactivados con luz ultravioleta. Para la fusión celular, los ovocitos se colocaron en una solución de polietilenglicol (PEG AL 50 %) y se expusieron a diferentes tipos celulares ( granulosa, piel y bazo) durante 3 min, después de lo cual se lavó el PEG y mantuvieron durante 6 d en cocultivo con células de oviducto. Se obtuvieron 612 ovocitos, de los cuales 369 maduraron in vitro. De estos ovocitos 90 se contaminaron ( 24%) Y 45 (12%) no se fusionaron. De 294 ovocitos en los que ocurrió la fusión celular 32 (11%) sufrieron daño celular los 144 (49%) tuvieron fragmentación nuclear y 56 (19%) mostraron signos de degeneración. Dos ovocitos fusionados con células de la granulosa se desarrollaron hasta el estadio de mórula al sexto día de haber permanecido en cocultivo con células de oviducto. Se comprueba la posibilidad de fertilizar ovocitos con células somáticas (granulosa).

## I N T R O D U C C I O N

El desarrollo de técnicas de clonación, es decir que permitan producir en gran escala un número de animales idénticos es importante porque al multiplicarse un individuo superior en una población se obtiene un rápido progreso genético. Nicolas y Smith (1990) evaluaron la mencionada respuesta en un programa de mejoramiento a gran escala usando clones de ganado lechero. El progreso que se obtiene por selección de padres equivaldría a cuatro años de cambio genético y esos productos estarían después de tres años a la cabeza de la población obtenida por inseminación artificial.

Después de ocho años de constante selección las crías estarían 17 años adelante y la tasa anual de cambio genético podría continuar indefinidamente.

Las técnicas para lograr la clonación que actualmente se practican en forma comercial por lo general han utilizado la transferencia de núcleos totipotentes, como son los primeros 16 o 32 blastómeros de un embrión. Esta consiste en transferir el núcleo de un blastómero obtenido de un embrión temprano (12 a 32 células) a ovocitos receptores madurados in vitro a los que previamente se les ha extraído el núcleo (Bondioli et al. 1990).

Con la ayuda del micromanipulador se introduce en el ovocito un blastómero en el espacio perivitelino y posteriormente se induce la fusión membranal para que se integre el blastómero al citoplasma del óvulo.

El óvulo madurado in vitro y enucleado posee todas las órdenes necesarias para la multiplicación de las células del nuevo embrión y después de ser transferido a una hembra receptora, es capaz de ser gestado y llegar al nacimiento.

Generalmente la fusión membranal se logra a través de micropulsos eléctricos usando la cámara de Zimmerman ( Zimmerman y Vienken 1982), pero también se puede lograr a través de medios químicos usando el polietilenglicol (Davidson 1976).

La técnica de transferencia de embriones, transferencia de núcleos, así como la técnica de clonación con células somáticas iniciada en conejos, son de gran utilidad en especies de interés zootécnico y mamíferos silvestres en peligro de extinción

Hasta hoy, los esfuerzos para desarrollar la clonación en animales domésticos se han basado en el trasplante de núcleos de células embrionarias.

El objetivo de este trabajo fue fusionar el núcleo de una célula somática totalmente diferenciada en un ovocito maduro, en una especie de interés zootécnico.

## **Revisión de literatura.**

Se mencionan dos corrientes en la literatura, sobre la capacidad del núcleo de la célula para reprogramarse. La primera postula que en eucariotes el genoma es constante y la segunda que no es constante. A continuación se presentan las características y elementos de discusión en que se basan cada una de las corrientes mencionadas.

## **GENOMA CONSTANTE**

El mecanismo de división celular o mitosis es el proceso por el cual todas las células somáticas derivan del cigoto, lo que permite la producción de células con versiones equivalentes de su genoma. La mayor parte de los genes estructurales son representados en secuencias únicas. McCarthy y Hoyer (1965) demostraron que genomas de diferentes tipos celulares adultos poseen secuencias nucleotídicas homólogas al del ADN embrionario.

Hay determinados tipos celulares que tienen la capacidad para manifestar su actividad génica, diferente de otro tipo celular. Un ejemplo de esto ocurre en ciertas salamandras en donde la regeneración de la retina neural es a partir de células pigmentarias Bruce et. al. (1983).

Esta teoría se refuerza con los trabajos sobre fusión celular y trasplante nuclear, que aportan pruebas de la permanencia de genes no utilizados por ciertos tipos celulares y su capacidad para ser reactivados.

Gurdon (1963) confirmó esta reversibilidad en la actividad de ciertos genes eucarióticos utilizando marcadores protéicos, demostrando que los núcleos provenientes de células somáticas de un organismo en etapas iniciales de desarrollo pueden reprogramar su actividad génica por las condiciones impuestas del entorno citoplasmático.

Sin embargo, la equivalencia entre genomas de diferentes células de un mismo organismo sólo se podrá probar cuando el núcleo proveniente de una célula totalmente diferenciada, muestre que contiene toda la información del cigoto, lo que daría una copia idéntica del individuo donante.

Es importante hacer la diferenciación entre núcleos totipotentes que son capaces de promover el desarrollo de un individuo adulto y fértil y núcleos multipotentes que sólo son capaces de promover el desarrollo hasta etapas embrionarias.

Todos los experimentos llevados a cabo en insectos, peces, anfibios y mamíferos muestran que los organismos adultos obtenidos por trasplante nuclear siempre provienen de núcleos de células embrionarias o de células indiferenciadas. Puck, (1982) menciona que los núcleos provenientes de células diferenciadas de individuos adultos son multipotentes.

Briggs y King (1952) utilizaron núcleos provenientes de la célula de una blástula de Rana pipiens y demostraron que el trasplante nuclear es posible.

Gurdon (1963) utilizó al sapo sudafricano Xenopus laevis y obtuvo sapos adultos y fértiles mediante el trasplante de núcleos de células epiteliales de intestino de renacuajos.

González y Guerrero (1976) transplantan núcleos de células somáticas de riñón a óvulos de conejo y abren de esta manera los trabajos de investigación, al transferir células somáticas en mamíferos.

Illmense (1981) reportó la obtención de ratones a partir de óvulos fertilizados a los que se le retiró el pronúcleo masculino y lo sustituyó por un blastómero; esto no se puede clasificar como clonaje ya que los núcleos eran totipotentes y provenían de blastocitos (células del macizo celular interno). De ahí se han derivado diferentes trabajos de trasplante de núcleos al utilizar células embrionarias (Robl y Stice, 1989).

Es importante señalar que no se ha logrado obtener un individuo adulto a partir del trasplante de un núcleo de células somáticas. En la mayoría de los trabajos por lo general los animales no llegan a término. Esto puede deberse a varias causas: genes letales, a excesiva homocigosis, a que exista una contribución física o fisiológica extragenómica del semen, o a la manipulación humana.

Es evidente que a medida que la célula alcanza estados diferenciados terminales pierde totipotencialidad. Debido a esto, se estableció la hipótesis de la asincronía (Gurdon 1963), está se

basa en una falta de coordinación entre el núcleo donado y el citoplasma receptor.

Es evidente que aunque el núcleo de una célula somática tenga la capacidad de originar un organismo completo, el modelo de expresión genética que se desarrolla en dicha célula se tiene que modificar cuando es introducido en un óvulo, en donde es muy importante su capacidad para adaptarse al nuevo entorno citoplasmático.

Esto explica por qué los núcleos extraídos de embriones son totipotentes ya que la célula donante es menos diferenciada, la programación es menor, lo que le da al núcleo transplantado mayores posibilidades de coordinación con el citoplasma del óvulo.

Con base en esta hipótesis, Gurdon (1963) realizó trasplantes seriados con el fin de amortiguar el cambio del núcleo transplantado.

Una de las dificultades que se presentan es que existe un desfase entre el tiempo de replicación del material genético del núcleo y la velocidad a que transcurren las primeras mitosis durante el trasplante.

En el estadio del ciclo celular G1, el núcleo se adapta al citoplasma del ovocito, tal vez por que la síntesis del ADN se realizó antes de la meiosis y se dividieron los óvulos. Sin embargo esto no se observa cuando son núcleos tardíos ( Solter 1987).

Por otro lado Johnson y Rao (1970) demostraron que dependiendo del ciclo, las células presentan una relación de dominancia sobre otras células en fases diferentes, el núcleo en fase S puede inducir la síntesis de DNA en la fase celular G1.

La fusión de una célula en mitosis con otra célula en otra etapa de su ciclo causa una condensación prematura de cromosomas ( Williadsen 1991).

Davidson (1977) menciona que la cantidad de material genético y su organización estructural en los cromosomas es idéntica en todas las células del organismo y el estado de diferenciación es marcadamente estable.

Otra teoría es que la mayor parte del genoma de las células somáticas se encuentra reprimido de manera inespecífica por medio de las histonas, y es activado, por determinados genes a nivel transcripcional. Así Bruce et al (1983) empezaron a cuestionar la constancia del genoma eucariótico y proponen un modelo de inactivación o pérdida selectiva de genes como condición para la diferenciación celular, basandose en los estudios sobre fusión con células somáticas, ya que Ringetz y Savage (1976) demostraron que cuando se fusionan dos células somáticas, se forma un heterocariocito que puede morir o dividirse dando origen a dos células híbridas llamadas sincariocitos.

Los sincariocitos llevan a cabo una multiplicación nuclear sobre largos periodos y a menudo hay una reducción en el número cromosómico.

Los sincariocitos formados por fusión celular con células normales o células neoplásicas dan origen a tumores cuando se inyectan en animales en experimentación. En la mayoría de los casos parece que la malignidad de la célula está ligada a los cromosomas que ha retenido y a los que ha eliminado. Este concepto podría explicar por qué muchas de las fusiones de ovocitos con células somáticas no son exitosas Wartkins (1971).

Otro modelo está basado en la represión selectiva y parcialmente irreversible de ciertos genes como mecanismo de control del desarrollo embrionario. Esto implicaría la ausencia de un proceso de desdiferenciación o que no se ha logrado reconocer a las células indiferenciadas que, aunque en escaso número, serían las únicas causantes de dicho fenómeno.

## **GENOMA NO CONSTANTE**

En esta corriente se afirma que el genoma eucariótico no es constante y menciona que las modificaciones del genoma pueden ser de tipo cuantitativas y cualitativas.

Las de tipo cuantitativo responden a las modificaciones en el número de genes con respecto a los contenidos en el genoma del cigoto.

La presencia de fragmentos de ADN repetitivos insertados con una secuencia conocida como familias de genes, permiten pensar en un mecanismo de condensación de un cromosoma específico y su asociación con el corpúsculo de Barr. Johanson y Rao (1970) mencionan la existencia de un intrón TATA a los lados de la región codificada, mecanismo que podría inactivar segmentos específicos de ADN que tal vez deberían ser activados para obtener la fertilización.

La inactivación de uno de los cromosoma X durante el desarrollo ocurre al azar y es importante en la determinación del sexo en mamíferos, es un medio de dosificación de genes y compensación que sólo se desarrolla en esos animales, ya que el nivel de expresión de muchos genes no puede ser cambiado. Estos son muy sensibles a los cambios en la cantidad de material genético.

Las monosomías o trisomías son letales o perjudiciales en los mamíferos; esta dosificación, compensación o no compensación de genes ocurre durante el desarrollo.

Solter (1987) menciona que la inactivación del cromosoma paterno X ocurre al sexto día de la fertilización en el ratón y se replica al final de la fase S, por lo tanto no se transmite a la progenie. Este autor señala una posible activación de la impresión genética parenteral que implicaría un cambio en el nivel de expresión durante el desarrollo o la existencia

de genes ligados al sexo no reconocidos en el cromosoma X y Y.

También sugiere que los embriones androgénicos YY que no alcanzan el estado de blastómero, exhiben una compactación temprana y en ellos no hay componentes embrionarios.

En el caso de embriones XX, ginogénicos, estos dan lugar a molas hidatiformes, por lo que es probable que se requiera de una actividad genética específica para el desarrollo y diferenciación, desencadenada por un factor externo (Babinet, Barras y Renard 1989).

Al continuar con las modificaciones cuantitativas en algunos segmentos de heterocromatina del ovocito hay menor multiplicación, en tanto que en algunas bandas de ADN hay una sobreamplificación (puffs). Robl y Prather (1987) mencionan que existe amplificación genética localizada en los ovocitos.

Durante la ovogénesis se aprecia la acumulación de un ADN extracromosómico que excede al ADN del genoma original.

En los ovocitos parece imprescindible una ampliación para producir el número de ribosomas que requieren las etapas que siguen a la fertilización.

Otro factor a considerar son los genes mitocondriales que se presentan en niveles de poliploidía sobre  $10^3$  en células somáticas de bovino, de  $10^6$  en el citoplasma de los ovocitos de los bovinos, pero sólo

de  $10^2$  en los espermatozoides. Los genes mitocondriales son transmitidos sólo a través del citoplasma del ovocito, por medio de mecanismos de restricción desconocidos y dada la cantidad de material genético es probable que en el citoplasma del ovocito se encuentre el mecanismo para el desarrollo del embrión.

La velocidad a la que transcurren las mitosis durante la segmentación es elevada y los períodos interfásicos cortos, para que se puedan transcribir los cistrones ribosomales que necesita el genoma embrionario.

Por lo tanto el embrión sólo recibe los ribosomas, ya que el ADN extracromosómico se elimina antes de la fertilización; consecuentemente sólo el genoma original entra al proceso meiótico. Esto demuestra que el genoma materno, a través de los componentes citoplasmáticos obtenidos durante la ovogénesis, puede programar su influencia en el futuro embrión (Bruce et al .1983).

Existe ampliación génica localizada que corresponde a los genes ribosomales, no a genes que codifican para proteínas específicas. Sólo se conocen dos células que tienen genes ampliados, donde una pequeña región del genoma se duplica muchas veces durante una sola generación celular. Estas células son el ovocito, que almacena muchos ribosomas y las células del folículo ( Roni et al. 1989).

Este punto esta relacionado con los patrones de metilación; Christopher (1989) se basa en la

modificación de la estructura química de las bases nitrogenadas de ciertos nucleótidos, básicamente en la metilación de la citosina (a 5-metilcitosina).

Esta modificación podría condicionar el patrón de expresión génica de una célula y por ende su diferenciación.

El porcentaje de metilación del ADN varía de una especie a otra, observándose casi siempre que las citosinas metiladas van seguidas de una guanina en dirección 5'- 3'(MetCpG); sin embargo, el patrón de metilación varía en una misma especie y de un tipo celular a otro. La metilación se ha considerado como un posible mecanismo de impresión.

A este respecto, el nivel global de metilación observado en el genoma de un embrión es intermedio; en el ovocito el DNA esta muy disperso y el patrón de metilación en el espermatozoide es muy elevado. Este tiende a perpetuarse a su progenie, quien la replica al ADN de la cadena polinucleotídica hija.

En experimentación, utilizando agentes químicos, se puede promover la expresión de algunos genes al disminuir la metilación. Se especula que la metilación podría servir de señal para las diferentes proteínas que intervienen en la transcripción, mientras más metilado se encuentre el genoma hay más movilidad de segmentos génicos.

La dispersión del patrón de metilación en el ovocito puede estar relacionado con el ADN mitocondrial. Esto

apoya la teoría de Grant (1972) que establece que la distribución de los materiales del cigoto puede condicionar el destino de las células hijas y que éstas heredan diferentes sectores del citoplasma. Considera que la poca homogeneidad citoplasmática del cigoto es consecuencia de un proceso de prelocalización de diferentes moléculas durante la ovogénesis y que se da durante el período de crecimiento intraovárico.

No está claro cómo los procesos que alteran cuantitativamente el genoma pueden incidir en el proceso de diferenciación. Tal vez se trate de genes reguladores.

Desde el punto de vista cualitativo, la existencia de mutaciones en células somáticas se ha estudiado especialmente en células productoras de anticuerpos. No se ha descrito un sistema de mutación tan grande y selectivo que permita llevar a cabo el proceso de diferenciación. Para que una célula somática se modifique, se requiere la pérdida selectiva de segmentos de ADN. Este proceso se ha manifestado en diversos tipos celulares pero se desconoce la mecánica.

Una posibilidad mencionada por McClintock en 1950 (citado por Barahona 1995) sería que los genes, cambian de lugar lo que afectaría no solo la expresión del gen sino también la expresión de genes cercanos.

Esto explicaría el porqué los genes permanecen silenciosos al quedar próximos a la región

**cromosómica heterocromática después de una translocación o inversión.**

El mismo autor propuso la existencia de elementos de control que cambian de lugar en el genoma, genes que saltan en forma frecuente e inesperada y propuso el concepto de la transposición, que consiste en que pequeños segmentos (de inserción) saltan y se colocan en otro segmento.

Estos son capaces de codificar una proteína que promueve su transposición (transponasa) y provocan lo que se denomina recombinación ilegítima. Es importante considerar que estas tres posibilidades: mutación, supresión y transposición pueden actuar en forma conjunta.

## **Partenogénesis**

Dado que existe la partenogénesis, que es una forma de reproducción asexual bien documentada en abejas, moscas y en algunas aves, la existencia de este tipo de reproducción implica que no hay diferencias funcionales entre el genoma masculino y femenino en estas especies y por lo tanto la clonación es un proceso factible.

Babinet, Barras y Renard (1989) mencionan que el genoma materno y paterno se expresa en forma diferente ya que son responsables de la síntesis de diferentes ADN ligasas durante el desarrollo y las enzimas con la misma función se expresan de manera diferente en embriones androgénicos y ginogénicos.

El genoma paterno es secuestrado y sólo se localiza en el núcleo de los blastómeros tempranos. Esto se explica por una impresión específica del ADN del espermatozoide que no se propaga durante la subsecuente síntesis del ADN.

Solter (1987) menciona un posible efecto de reconocimiento del centrómero durante la división meiótica. La reproducción sexual da una ventaja reproductiva y evolutiva al enmascarar genes letales. Aparentemente la característica de la impresión del genoma funcional se da sólo en mamíferos; sin embargo, en especies como la rata y el conejo, el desarrollo de trasplante nuclear hasta llegar a mórula está determinada básicamente por su capacidad de desarrollarse partenogénicamente Graham (1974).

McGrath y Solter (1986) mencionan que aparentemente los cromosomas sexuales tienen diferentes funciones en el desarrollo temprano, ya que contienen genes que se comportan de manera diferente dependiendo de su derivación parenteral, al considerar la impresión genética de los cromosomas 2, 6, 7, 8, 11 y 17 .

Esto podría estar determinado por la expresión de un gen particular, que se debe mantener desde la gametogénesis hasta la fertilización.

## **Análisis de Procedimientos:**

### **1.1.Procedimientos para realizar la enucleación;**

**Bondioli et al.(1990), Hope e Illmense (1982)** describen el uso de la técnica de micromanipulación.

En esta se extrae el núcleo por aspiración y es la técnica más utilizada en la literatura; requiere mucha precisión ya que en algunos casos una pequeña cantidad del citoplasma adyacente al núcleo puede ser removido, y llevarse material citoplasmático asociado con el contenido de la membrana del ovocito que es indispensable para el desarrollo.

Schalten (1986) menciona que es posible que se afecte el aparato mitótico; como son los ásteres citoplasmáticos, que se requieren para la organización de los microtúbulos.

Kopac (1959) menciona que con esta técnica se puede presentar un efecto confundido, ya que al picar el ovocito se puede estimular el desarrollo y formarse un carioplasto que sólo se divide al principio. Williardsen (1991) dividió en forma rutinaria los ovocitos en mitades, una de las cuales era enucleada, la desventaja es la reducción del volumen citoplasmático del ovocito.

Otro procedimiento es mediante el uso de sustancias químicas como es el caso de Citochalasin B, ésta inhibe la citosíntesis sin detener la división celular.

Aunque se considera que la citochalasin es tóxica porque afecta la polimerización de los microtúbulos Schalten (1986), se ha reportado su uso después de la técnica de enucleación por aspiración.

Otra técnica de enucleación es por medio de la inactivación del núcleo con luz ultravioleta por 30 segundos (Gurdon 1968 ; Tsunoda et al.1988) estos últimos reportan en ovocitos de ratón una reducción en el potencial de desarrollo con el uso de esta técnica y menciona el uso de un colorante específico que se intercala entre la secuencia de ADN flurocrom. (Hoechst 33342) y que permite comprobar la enucleación.

## **1.2.La célula donadora**

Hall et al. (1988) introducen los métodos de cultivo de tejidos que permiten realizar las observaciones de fusión celular in vitro. En forma paralela observaron fusión celular frecuentemente en condiciones patológicas descritas en lesiones inflamatorias causadas por virus (Stemplewski y Koprowski (1970).

Para la formación de células híbridas es indispensable la fusión celular y a partir de estas se forman dos tipos, células híbridas con núcleo y citoplasma del mismo tipo y células híbridas con núcleo y citoplasma de diferente especie.

### 1.3. Métodos para producir fusión celular

Daniel (1972) reportó que la zona pelúcida del ovocito evita la fusión celular, por lo que la removieron en huevos de ratón utilizando pronasa sin provocar daño al ovocito.

Barski (1970), Rao y Johnson (1972) y Ringetz y Savage (1976) mencionan que se ha observado fusión celular espontánea in vivo e in vitro sin agente fusionante; depende de las barreras de tejido o especie y está en función de los constituyentes de la superficie externa. Esto ha permitido utilizar como célula donadora a células de diferentes tipos de tejido (bazo, hígado, riñón etc.).

Por otro lado se ha descrito el poder fusionante en varias familias de virus. Dentro de los virus que tienen capacidad fusionante y que no dañan a la célula, se encuentra el grupo de los Herpesvirus, Poxvirus, Mixovirus y Paramixovirus, el más utilizado es el virus Sendai y el virus de aglutinación del Japón (HVJ). Okada (1962), Wartkins (1971) y Rao y Johnson (1972) indican que la principal ventaja que presenta la manipulación del virus, es que no todas las células se fusionan tan fácilmente con ésta técnica.

Gordon (1990), y Diacumakos y Tatum (1972) iniciaron la fusión celular con microcirugía, cuando las células están en telofase; esta técnica requiere mucha experiencia y el daño celular es grande.

## **1.4. Fusión celular por inducción química**

### **1.4.1.-Lisolecitina**

La lisolecitina es una sustancia lipídica que se ha estudiado en relación a su capacidad de fusión. Por ser una enzima lisosómica tiene una gran estabilidad dentro de la célula y cuando se encuentra rodeada por una membrana no actúa como sustrato Bruce et al. (1983).

La lisolecitina induce la fagocitosis y por lo tanto incrementa la permeabilidad de la membrana celular Croce et al. (1971). Rao y Johnson (1972) mencionan que la lisolecitina en las células es muy tóxica, ya que da lugar a elongaciones irregulares .

### **1.4.2.-Polietilenglicol (PEG)**

El polietilenglicol y algunas proteínas que tienen peso molecular semejante pueden fusionar, el peso molecular va de 200 a 20000 MG. lo que facilita la fusión celular, con la ventaja que no involucra el riesgo de cáncer como sucede con los virus; además es más barato, no es tóxico y su actividad inductora depende de la concentración.

Davidson (1977) indica que el PEG de peso molecular 6,000 es efectivo para la fusión en protoplastos vegetales y animales. Pontecorvo (1975) probó que este agente se puede utilizar para fusionar células animales y Ahkong (1972) lo utilizó con buenos

**resultados para fusión interespecífica (fusión eritrocitos de gallina con protoplastos de levadura).**

**La hibridación de células somáticas de mamífero por medio de PEG ha conducido al establecimiento de procedimientos rápidos simples y efectivos de fusiones en monocapa y suspensión (Ahkong et al. 1972). El tratamiento con PEG debe tener un pH de 6, tratarse durante un minuto a 37°C, se debe hacer una dilución rápida del PEG y una serie de tres lavados rápidos para removerlo. La concentración es al 50%, siendo importante considerar el volumen medio residual al momento de adicionar el PEG (Davidson y Gerald 1977).**

## **2.-Fusión con electricidad.**

**Simons et al. (1989) utilizaron electroporación para realizar la fusión de un blastómero en un ovocito utilizando una solución no iónica (0.3M M. manitol) y dos electrodos con un rango de 2mm. La fusión membranal se consigue al administrar micropulsos eléctricos. Aparentemente este procedimiento ha dado buenos resultados aunque el aparato es costoso (Cámara de Zimmerman).**

## **Mecanismo de acción de la fusión celular.**

**Pontecorvo.(1975 describe el proceso de fusión celular. Menciona que aparece primero la aglutinación de células aisladas, surge un acercamiento entre una y otra membrana celular, se presenta alteración de cargas electrostáticas a nivel de membrana,**

formandose puentes citoplasmáticos entre las células, estas se alargan para que fluya libremente el citoplasma, los núcleos se fusionan formando un puente entre ellos, y la cromatina se trasmite de un núcleo a otro.

La estructura de la membrana citoplasmática, consiste en dos capas de lípidos que se encuentran en estado fluido entre las membranas (Modelo Mosaico Fluido) Bruce et al. (1983).

Dentro de la fusión del citoplasma se involucran los microfilamentos y estos establecen las condiciones morfológicas. Se abren puentes citoplasmáticos que crecen hacia mayores conexiones con la otra membrana citoplasmática, para finalmente lograr la fusión (Hall et al. 1988).

La técnica de fusión celular entre células somáticas se utiliza en biología del desarrollo, genética y virología para formar células híbridas (sincariocitos). Muchos de ellos llevan a cabo una multiplicación nuclear durante largos periodos, y entre los sincariocitos de larga vida a menudo hay una reducción en el número cromosómico (el sincariocito de humano y ratón ha retenido todos los cromosomas del ratón menos uno y perdido todos los humanos menos uno), lo que se considera ideal para marcar genes (Puck 1982).

Bruce et al (1983) mencionan que para inducir la fusión celular se requiere mantener en íntimo contacto a las células (aglutinación) y permitir la interacción

como uniones hidrofóbicas; en algunos tipos celulares es preciso utilizar las sales de calcio ya que son inductoras de fusión.

En el proceso de la fertilización, los carbohidratos superficiales están involucrados en la penetración del espermatozoide al ovocito. En la aglutinación, los carbohidratos no favorecen la fusión, por lo que después de la aglutinación se elimina la capa de carbohidratos para que las capas hidrofílicas estén unidas.

En los agentes divalentes o multivalentes, como son calcio, lecitinas, anticuerpos y virus que llevan a cabo la aglutinación de células, es importante considerar que la distribución de las glicoproteínas en la membrana plasmática depende de microtúbulos y microfilamentos; esto forma parte del citoesqueleto que proporciona la estabilización de la célula.

El proceso de fusión requiere de la presencia de cationes divalentes  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  ya que estabilizan la membrana e impiden la lisis celular (Gordon 1975).

### **Activación del citoplasma de los ovocitos enucleados.**

Es necesario inducir la activación de los ovocitos enucleados y su habilidad para formar pronúcleos está relacionada con su habilidad de dividirse de manera asexual (partenogénesis). Williardsen (1991) reportó el desarrollo de embriones obtenidos por

medio de transferencia nuclear usando un impulso eléctrico que induce la activación y la fusión.

Otro factor que determina la activación del ovocito es la edad, ya que éste adquiere la habilidad de responder a los estímulos al final del período de maduración. Estos cambios ocurren durante la maduración in vitro; la capacidad para formar el pronúcleo se incrementa entre las 24 a 30 horas después de iniciado el cultivo Ware et al. (1989).

## **OBJETIVO**

**El objetivo del presente trabajo es tratar de fusionar el núcleo de una célula somática con un ovocito de bovino por medio de polietilenglicol.**

## **HIPOTESIS**

**El núcleo de una célula somática tiene la información genética para reprogramarse al fusionarse en el citoplasma del ovocito y dar lugar a un embrión.**

## **MATERIAL Y METODOS.**

El trabajo se realizó en el laboratorio de Virología del Departamento de Cerdos de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el laboratorio de fertilización in vitro del Centro de Mejoramiento Genético y Transferencia de Embriones de Leche Industrializada CONASUPO (Liconsa), localizado el Tepozotlán, Estado de México.

### **Preparación del polietilenglicol.(PEG)**

El peso molecular del polietilenglicol que se utilizó para la fusión celular fue de 6000 se preparó de acuerdo a la técnica descrita por Davidson y Gerald (1977) a una concentración del 50% p/v .En un matríz de 20 ml se colocarán 5g de PEG, se cubrió el matríz con un tapon de gasa y se esterilizó en autoclave a 121C durante 15 min a 15 lbs de presión. Posteriormente se agregó solución salina de Hanks hasta un volumen de 10 ml .

### **Cultivo de tejidos**

Se realizaron cuatro diferentes cultivos utilizando el método de tripsinización (Bazo, Piel, Células de la Granulosa y Oviducto) a partir de bovinos sacrificados en el rastro. El material se transportó en PBS a 37°C en un recipiente estéril al laboratorio, donde nuevamente se lavaba con PBS y se cortaban pequeñas porciones con tijeras, eliminandose el exceso de sangre. El tejido se trituró lo más fino

posible y se lavó 10 veces con PBS para eliminar por completo la sangre.

Se realizó el cultivo de tejidos de bazo, piel, granulosa y oviducto por el método de tripsinización. Los fragmentos limpios, se colocaron en un matraz con mosca magnética en 150 ml de solución amortiguadora libre de Ca y Mg (ver anexo) . Se colocó 20 minutos en una estufa con temperatura controlada a 37°C y se utilizó un agitador magnético con el fin de disociar las células. Posteriormente se retiró el matraz del agitador, se desechó el sobrenadante y se agregó solución fresca de medio de cultivo.

La suspensión celular así obtenida se filtró a través de una malla de gasa agregando medio de cultivo en una cantidad aproximada de dos volúmenes iguales a la suspensión celular, se colocaron en un tubo de centrifuga a 600 revoluciones durante 10 minutos, se resuspendió el botón en 100 ml de medio de cultivo 199, tomándose 1.5 ml de la suspensión celular y se colocaron en cajas de cultivo de 4 pozos.

### **Obtención y limpieza de ovocitos**

Se obtuvieron los ovarios de vacas sacrificadas en el rastro de Ferrería de la Ciudad de México. Los ovarios y las muestras de tejido obtenidas a partir de animales adultos se transportaron en solución de PBS con antibiótico a 37°C. En el laboratorio se lavaron con solución PBS fresca y se extrajeron los ovocitos

por aspiración con una jeringa, puncionando folículos de 2-6 mm (Parris et al 1989).

El líquido folicular se colocó en tubos de policarbonato de donde posteriormente se sacaban los ovocitos para evaluarlos; estos se colocaron en microgotas de 50 µl cubiertas con aceite de parafina previamente preparado y se cultivaron por 24 h. (Bavister 1989).

Para determinar si la técnica de maduración de ovocitos era la adecuada se realizaron fertilizaciones in vitro obteniéndose de 8 ovocitos y 6 mórulas, esta técnica se utilizó como control.

### **Remoción de la zona pelúcida**

Para facilitar la fusión del ovocito con la célula somática se removió la zona pelúcida. Para esto, una vez madurados se colocaron durante un minuto en un medio 199 al que se le añadió tripsina (ver anexo).

Se lavaron nuevamente con medio fresco y se inactivó el núcleo del ovocito con radiación ultravioleta, para lo cual se expusieron a la luz UV utilizando una lámpara de 30 watts a una distancia de 15 cm durante 5 minutos (Johnson y Rao 1972). La suspensión se agitó suavemente cada 5 min para asegurar que todos los núcleos fueran inactivados.

### **Fusión**

A las 72 h después de haber hecho el cultivo, los ovocitos inactivados se pusieron en contacto con las

células, se agregó el polietilenglicol durante 3 min, se lavaron los óvulos 3 veces para remover el polietilenglicol y se sellaron las preparaciones con parafina, posteriormente se revisaron a las 24 y 48 h.

Se evaluaron los diferentes cultivos de células, En el caso de las células de bazo, piel y granulosa se utilizaron los cultivos al tercer día ya que en ese momento las células están en fase lag de crecimiento, buscando que el ADN se estuviera replicando. Las células de oviducto se utilizaron como cocultivo para apoyar el desarrollo de los ovocitos fusionados.

Para el desarrollo de los ovocitos madurados fusionados con células somáticas se transfirieron a las 24h un medio 199 al que se añadieron células de oviducto en cocultivo.

En el caso de los 2 ovocitos madurados in vivo, estos se obtuvieron de vacas superovuladas a las 15 horas de iniciado el celo. A través de una incisión en el hueso del flanco se visualizaron los ovarios y se realizó la aspiración de los folículos desarrollados; por lo tanto no se les dio tiempo de maduración, sino que se procedió a su inactivación y fusión.

## **RESULTADOS**

### **1.-Obtención de ovocitos**

A partir de 92 ovarios se obtuvieron 612 ovocitos competentes, de los cuales 369 habían madurado después de 24h de cultivo (70% de maduración). Se obtuvieron en promedio 6 ovocitos por ovario.

### **2.-Enucleación de ovocitos**

Se observó que los ovocitos sometidos a radiación UV durante 10 min cambiaban de forma, adquiriendo una forma de hongo aplanado y con una protuberancia, regresando a su forma original después de 24h de realizada la fusión.

### **3.-Fusión de ovocitos**

En el cuadro 1 se puede observar que al realizar la fusión celular con células de piel y células de bazo, esta si ocurrió, pero se presentó daño celular y fragmentación de núcleos, se mantenían sin cambio aparente después de la fusión durante una semana. En 6 de los casos, de ovocitos fusionados con células de piel se apreciaron núcleos fragmentados; estos ovocitos murieron a las 24h, el criterio para determinar esto es que se pegaban a la base de la caja de cultivo.

Dos ovocitos obtenidos in vitro fusionados con células de la granulosa se segmentaron e iniciaron su desarrollo llegando hasta la etapa de mórula después

de 6 días de cultivo(fig.4). No fue posible implantar estos embriones debido a que en ese momento no se disponía de hembras receptoras.

De los 612 ovocitos competentes 369 (60%) habían madurado después de 24 h de cultivo, 90 ovocitos se contaminaron (24%) y 45 no se fusionaron (células de bazo) (12%).

De 294 ovocitos en los que se observó que había ocurrido la fusión celular, 32(11%) sufrieron daño celular, 144 (49%) tuvieron fragmentación nuclear y de 56 (19%) degeneraron.Solamente 2 ovocitos se fusionaron y llegaron al sexto día.

## Cuadro I Ovocitos Fusionados

No.de Ovocitos	Tipo de cultivo	Observaciones
30	Bazo	Se contaminó
45	Bazo	No se fusionaron
40	Piel	Se fusionaron y contaminaron
20	Bazo	Se fusionaron y contaminaron
12	Piel	Fusión con daño celular.
20	Bazo	Fusión con daño celular
50	Piel	Fusión. Fragmentación de núcleos.
8	Bazo	Fusión Fragmentación de núcleos
42	Piel	Fusión. Fragmentación de núcleos
44	Piel	Fusión. Fragmentación de núcleos
56	Bazo	Fusión. Degeneración celular
2	Granulosa	Fusión y Segmentación

Total 369

## **DISCUSION**

### **1.-Obtención de ovocitos**

El promedio de ovocitos obtenido por ovario fue de 6. De los ovocitos cultivados el 70% alcanzó su maduración, estos promedios estan de acuerdo a los resultados obtenidos en la literatura (Lu y Gordon 1987).

Williadsen (1991) menciona que el período de viabilidad para la transferencia de núcleos va en relación con la edad del ovocito en cultivo y se requiere que haya expulsado el primer corpúsculo polar.

La inactivación del nucleo con luz ultravioleta es un método simple y rápido, permite anular el núcleo de los ovocitos al provocar cambios en el material genético que restringen la capacidad de desarrollo del núcleo. Tsunoda (1988) menciona el uso de UV para enuclear ovocitos de ratón con UV utilizando una lámpara de 100 watts exponiendo los ovocitos por 40 seg , menciona que el 5% desarrollaron a blastocisto. En este trabajo los óvulos se expusieron a la luz UV durante 5 min con una lámpara de 30 watts.

La supervivencia de los ovocitos sin cambios aparentes permite suponer que no se afectó la estructura citoplasmática y que el núcleo mantenía a la célula pero probablemente no pudo efectuar en algunos casos la reprogramación.

**Para resistir la reprogramación debe existir un balance entre el núcleo y el citoplasma (Smith 1990). Las células de la granulosa están muy relacionadas con el inicio de la activación del desarrollo, de hecho se utilizan para la maduración de los ovocitos y es probable que al estar en contacto con los ovocitos exista un balance entre el núcleo de la célula de la granulosa y el citoplasma del ovocito y le proporcione una mayor habilidad para retroceder el programa de desarrollo al tiempo de fertilización y al contar con una mayor cantidad de ribosomas puede replicar los cromosomas del ovocito en un período más corto.**

En las células de bazo y piel fusionadas con los ovocitos se presentó una condensación tardía (60 ovocitos fusionados) ya que las células diferenciadas tienen un período de interfase más largo que el de la replicación de los cromosomas por lo que probablemente estos ovocitos ya no siguieron desarrollándose.

Es importante considerar que las células de la granulosa juegan un papel importante en la maduración del ovocito ya que secretan proteínas específicas que pueden romper el bloqueo del desarrollo y que tal vez estén asociadas al factor que activa el genoma embrionario, mediante la activación de un gen que actúe como apagador vía pasador alternativo temprano en la cascada regulatoria (Christopher 1989).

Este mecanismo regulador del gen y generador de diversas proteínas tiene muchas ventajas para el

rearrreglo de genes y para la activación de muchas familias de genes. Christopher (1989) menciona un pasador alternativo para la diferenciación de la célula somática sexual, donde un pre-RNA con un idéntico transcriptor tiene diferentes RNAs mensajeros en un tipo celular o estado de desarrollo; de manera específica este pasador ambiental activa la transcripción de los genes responsables para la determinación de la identidad del segmento y con el pasador alternativo tiene un control específico en el desarrollo, las células de la granulosa pueden alterar esta secuencia específica y reprogramar al ovocito (Harris 1970)

La diferenciación celular del embrión se inicia al momento de la compactación cuando las células se polarizan para formar el trofodermo sin embargo aparentemente las células del trofodermo permanecen menos diferenciadas motivo por el cual se presentan diferencias en la viabilidad de los embriones transplantados dependiendo de la posición del embrión al momento de tomar las células, mostrando que hay diferente totipotencialidad en los núcleos derivados de mórulas compactas ya que es probable que no todas las células pierdan totipotencia al mismo tiempo.

En el caso de las clonaciones realizadas con genoma embrionario temprano, aparentemente hay una incompleta reprogramación en el núcleo donador que provocaría que fallara la síntesis y por lo tanto muere el embrión (Gandolfi y Moor 1989).

**Sin embargo para que éste se desarrolle, debe haber una sustancial reprogramación del genoma donado (Mc Grath y Solter 1986).**

**Un 80% de los clones obtenidos a través de fusión celular desarrollaron anomalías causadas por una restringida capacidad de desarrollo del núcleo transplantado, por lo que se fragmentaban los núcleos. Esto coincide con lo mencionado por Solter (1987) ya que solo el 4% de los embriones reconstituidos derivados de la transferencia nuclear se desarrollan normalmente y muy pocos llegan a término.**

**Los resultados fueron menos exitosos que los de otros autores que han usado Citochalasin B. esta sustancia inhibe la salida del segundo corpúsculo polar, salvando la pérdida de cromosomas. Williardsen (1991) menciona su uso después de dividir óvulos fertilizados**

**Williardsen (1991) Obtiene con el uso de Citochalasin 75% de los ovulos divididos contenían los cromosomas en Metafase II , los que no tenían estructura nuclear se fusionaron obteniendo un 2% de divisiones (ya que en la mayoría de los casos el desarrollo se limita a las 92 hrs. muchas células se compactan y hay asimetría y segmentación).**

## **C O N C L U S I O N E S**

En el caso de las fusiones realizadas se observó que no hay mecanismos intracelulares de reconocimiento de incompatibilidad ya que el ovocito de una vaca, con células de otro bovino fusionan sus citoplasmas.

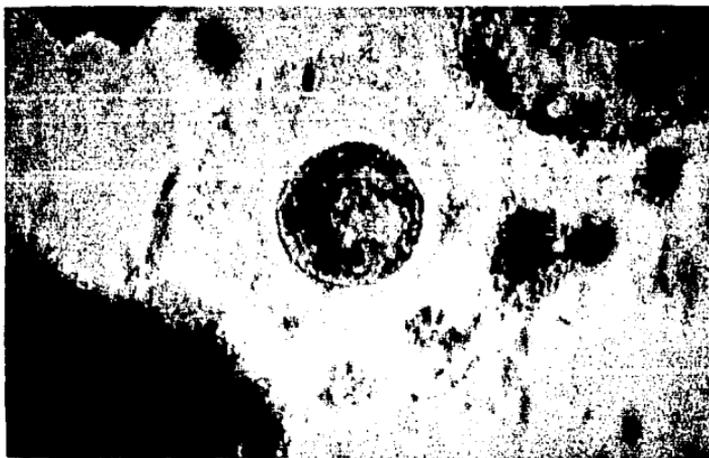
Se observó que la célula somática de la granulosa representa el estímulo suficiente para provocar la división del ovocito y se comprueba que el pronúcleo masculino no es esencial para la segmentación del ovocito, debido a que éste se dividió por estímulo de la célula somática de la granulosa.

El citoplasma del ovocito contiene material responsable de los cambios en la función de los cromosomas, las diferentes clases de actividad génica son inducidas por el material citoplasmático normal. Es probable que los genes de los núcleos de las células somáticas no se pierdan, sino que solamente inactiven aquellos que no se necesitan para la diferenciación.

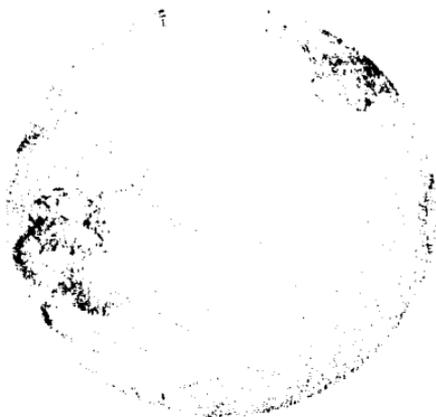
**Figura 1.- Ovocito de bovino fusionado con célula de bazo observados con contraste de fase a 250X**



**Figura 2.- Ovocito de bovino fusionado con célula de la granulosa X250 observado con contraste de fase a 250X**



**Figura 3.- Blastocito expandido con desarrollo de cuatro días de cultivo obtenido de la fusión de un ovocito con una célula de la granulosa observado con contraste de fase a 250X**



**Figura 4.- Mórula obtenida a través de fusión con célula de la granulosa observado con contraste de fase a 250X**



## LITERATURA CITADA

- 1.-Ahkong Q. F., Cramp D., Howell J.: Studies on chemically -induce cell fusion. J. Cell. Sci., 10:769-787. (1972).
- 2.-Babinet C., Barras J. and Renard J.P.: Genomic imprinting and differential expression of paternal and maternal genomas. Two essential factors for normal development of mouse embryos. Med.Sci.5 : 8-15 (1989).
- 3.-Barahona A.: La transposición y los genes saltarines de Barbara McClintoc Ciencia y Desarrollo. 20 :58-64 (1995).
- 4.-Barski G.: Cell asociation and somatic cell hibridization. Acad. Press. New York. (1970).
- 5.-Bavister B.: A consistently successful procedure for in vitro fertilization of Golden Hamster Eggs. Gamete Research 23:139-158. (1989).
- 6.-Bondioli K.R. Westhusin M.E. and Loony C.R.: Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. Theriogenology. 33 :165-174. (1990).

- 7.-Briggs R., and King,T.J.: Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frogs Eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. 38:455-463 (1952).
- 8.-Bruce A., Bray D. Lewis, J. Raff, M.Roberts, and K. Watson J.: Molecular Biology of the Cell. Gerland Publishing Inc.New York. 549-611(1983).
- 9.-Christophper W.J.: Alternative splicing in the control of genetic expression. Annu.Rev. Genet. 23:527-577 (1989).
- 10.-Croce C. M.,and Sawicki D.:Induction of homokaryocyte, heterokaryocyte and hibrid formation by lysolecithin Exp. Cell. Res. 67:427-435 (1971).
- 11.-Croce C.M.: Enucleation of somatic cells with cytochalasine B.Methods In Cell Biology 8:145-150 (1974).
- 12.-Daniel J. C.: Methods in mammalian embryology. W. H. Freeman and Co.New York pp.32-38 (1972).
- 14.-Davidson R. and Gerald P.: Induction of improvement technique for mammalian cell Hibridization by Polyethylene Glycol. Methods

in Cell Biology. Acad.Press.New York 325-338 (1977).

- 15.-Diacumakos E. G. and Tatum E. L.: Fusion of mammalian somatic cells by microsurgery. Proc. Nat.Acad. Sci. 69:2959-2962 (1972).
- 16.-Gandolfi F. and R. M. Moor.: Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cell. J.Reprod.Fert. 23-28 (1987).
- 17.-Garcia A.: Fusion de células animales y su posible aplicación a problemas de deficiencia genética utilizando la sustancia química Polietilen-Glicol (PEG).Tesis de Licenciatura. Universidad Autonoma de Puebla.(1980).
- 18.-Gonzalez M. G. Y Guerrero E.: Fusion celular de ovocito de coneja y célula somática de riñón del mismo animal Tesis de maestría Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autonoma de México .(1976).
- 19.-Gordon S.: Cell fusion and some subcelular properties of heterocaryons and hibrids. The Journal of Cell Biology 67:257-280. (1975).
- 20.-Gordon Y. and Lu H.: Production of embryos in vitro and its impact on livestock production . Theriogenology 33:77-88 (1990).

- 21.-Graham C. F.: The production of parthenogenic mammalian embryos and their use in biological research. Biol. Reprod. 49:399-422 (1974).
- 22.-Grant P.: Nuclear function in Embryogenesis. Devital. Biol. 29:11-15 (1972).
- 23.-Gurdon J.B.: Nuclear transplantation in amphibia and the importance of the staple nuclear changes in promoting celular differentiation. Quart. Rev. Biol. 38:54-78(1963).
- 24.-Gurdon J.B.: Transplanted nuclei and cell differentiation. Sci.Amer. 219:24-35 (1968)
- 25.-Hammerling J.: Nucleo-cytoplasmic relationships in the development of Acetabularia. Intern. Rev.Cytol. 2:475-498. (1953).
- 26.-Hall F.:Isolation and characterization of laminin binding protein from Rat and Chicken muscle. The Journal of Cell Biology 107:687-697. (1988).
- 27.-Harris S.: The expression of genetic information, a study with hibrid animal cell. Holme W. and Knight J.(edit).New York. 52-56 (1970).
- 28.-Hope P. and Illmense K.: Fullterm development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized Mouse Eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. 79: 1916-1926 (1982).

- 29.-Illmense K.: Nuclear transplantation in Mus Musculus developmental potencial of nuclei from preimplantation embryos Cell. 23:9-18 (1981).
- 30.-Johnson R.T.and Rao P.N.: Mamalian cell fusion induction of premature chromosoma condensation in inter-phase nuclei Nature 226:7117-7122 (1970).
- 31.-Kopac M. J.: Micrurgical studies of living cells. The Cell 1: 161-189 (1959).
- 32.-Lu,K.H.and Gordon S.:Effect of serum hormones and cumulus cells on the in vitro maturation of bovine oocytes.Proc.Soc. Study Fertility 81 : 1 (1987).
- 33.-McCarthy J. and Hoyer B.: The evolution of polinucleotide envolving genes and proteins V. Bryson y H.J.Vogel (Eds.) Academic Press, Nueva York. 581-590 .(1965)
- 34.-McGrath J. and Solter D.: Nuclear transplantation in the mouse embryos using microsurgery and cell fusion Science 220:1300-1302 (1983).
- 35.-McGrath J.and Solter D.®:1986 In Manipulation of mammalian development.J.Embryo Exp. Morph. 97: (Suppl) 277-289G.
- 36.-Nicolas F.W. and Smith C. :Increased rates of genetic changes in dairy cattle by embryo

transfer and splitting. Society of Animal production 5, 36:341-345 (1990).

- 37.-Okada Y.: Analysis of gran pounuclear cell formation caused by HJV virus from Ehrlich's Ascites tumor cell relationship between cell condition and fusion reaction of cell degeneration reaction. Exp. Cell Res. 26:119-128 (1962).
- 38.-Parris J.J. Rutledge L.Christer E. and First N.: In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes. Theriogenology .31 :1 61-73 (1989).
- 39.-Pontecorvo G.: Production of indefinity multipling mammalian somatic cells hibrids by polyethylen glycol (PEG) treatment. Somatic Cell Genet. 1:397-400 (1975).
- 40.-Puck T. Kao. F.: Somatic cell genetics and its application to medicine. Ann. Rev. Genet. 16:225-229. (1982).
- 41.-Rao P. N. and Johnson R. T. M.: Cell fusion and its application to studies on the regulation of the cell cicle. Methods in Cell Biology. 6:76-122 (1972).
- 42.-Rigetz N.R.and Savage R.E.: Mechanisms of cell fusion Acad. Press. Cell. Hibrids New York. cap.XIV 245-270 (1976).

- 43.-Robl J.M.Prather R. Barnes F. Eyestone W. Northey D. Gilligan B. and First N. :Nuclear transplantation in bovine embryos J.Anim.Sci. 64:642-648 (1987).
- 44.-Robl J.M.and Stice S.L.: Prospects for the comercial cloning of animals by nuclear transplantation. Theriogenology. 31: No.1 75-78 (1989).
- 45.-Roni J., Bollang A. Waldman S, and Michael Liskay M.: Homologous recombination in mammalian cell. Annu. Rev. Genet. 23:199-225 (1989).
- 46.-Simons Paul, Ian Wilmut A. Jhon Clark, Alan L. Archival. J. Bishop and Richard Lathe.: Gene transfer into sheep Biotechnology, 6: 179-183 (1989).
- 47.-Schalten H.: Organization of citoplasmatic asteres with microtubulos. Proc. Nat. Sci. USA. 83:105-109. (1986)
- 48.-Smith L. C.: Factors affecting the viability of Nuclear transplanted embryos. Theriogenology, 33 :1 (1990).
- 49.-Solter D.: Inertia of the embryonic genome in mammals cells hibridization by polyethylene Glycol. T.I.G. 3: 23-27(1987)

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 50.-Solter D.: Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes Annu. Rev. Genet. 22:127-146 (1988).
- 51.-Steplewski, Z. and Koprowski,H.: Somatic cell fusion and hybridization. Methods in Cancer Acad. Press.New York. 5:155-191 (1970).
- 52.Tsunoda,Y.,Shioda,Y.,Onodera,M.,Nakamura,K,Uchida,T. :Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. J.Reprod. Fertl. 82 :173-178 (1988).
- 53.-Ware C.B., Barnes F. L. Majai, Laurroa M., First N.L. :Age dependance of bovine oocyte activation. Gamete Res. 22:265-275 (1989).
- 54.-Watkins J.F.: Fusion of cell for virus studies production of cell hibrids. Methods in Virology 5:1-32 (1971).
- 55.-Willadsen S.M.: Micromanipulation of embryos of large domestic species: Adams.C. E. (Ed) Mamalian Eggs Transfer CRC. Press Boca Raton 185-210 (1982).
- 56.-Willadsen S. M.: Nuclear transplantation in sheep embryos.Nature Vo. 320 63-64(1982).
- 57.-Willadsen S.M., Jansen R.E., McAlister R. J., and Hea B. F. Hamilton G. and Mc.Bernard.: The viability of late morula and blastocyst produced

by nuclear transplantation in cattle  
Theriogenology 35: 78-81 (1991).

68..Zimmerman U. and Vienken J.: Electric field-induced cell-to-cell fusion J.Membrane Biol.  
67: 165 (1982).

## **Apendice 1**

### **Material :**

#### **1.- Sustancias Químicas :**

##### **1.1.- Solución PBS**

NaCl 8gr

KCl 2 gr.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 gr.

Agua destilada 1 lt.

Esterilizar a 121 OC 15 libras 20 min.

##### **1.2.-Polietilen Glicol PEG 6000**

##### **1.3.-Medios de maduración:**

Medio	Cantidad	ml/50ml.
TCM 199	90%	45
Suero Fetal Bovino	10%	5
Ajustar osmolaridad a 280-290 con NaCl pH 7.4		

Suplementar con:

Glucosa 1mg/ml.

Piruvato de Na. 0.25 mM.

LH 0.023 unidades (2ml/ml)

FSH 0.02 unidades (2ml/ml.)

Gentamicina 50mg./ml. ( 1ml.)

Estradiol 1mg./ml.

##### **1.4.- Mantener en almacén.**

Estradiol 1mg./1ml de etanol

**Piruvato de Na. (25 mM) 27.5 mg./10 ml. de  
solución salina  
Gentamicina 50 mg./ml de solución salina  
LH y FSH en solución salina con 0.5%  
LH 10 mg./ml.  
FSH 1 Mg./ml.  
BSA  
Lactato  
Sales**

**1.5.- Aceite de parafina**

**1.6.- Hialuronidaza sol. al 0.02 en PBS.**

**1.7.- Pronasa sol. al 0.0025 en PBS**

**1.8.-Tripsina sol. al 0.02 en PBS**

## **2.- Material General**

**2.1.- Campana de flujo laminar.**

**2.2.- Estufa de cultivo con Co<sub>2</sub>.**

**2.3.- Centrifuga.**

**2.4.- Tapabocas.**

**2.5.- Tijeras finas.**

**2.6.- Pinzas de disección de dientes de ratón.**

**2.7.- Baño Maria a 70 grados centígrados.**

**2.8.- Algodón.**

**2.9.- Gasas Estériles.**

**2.10.- Lampara de luz ultravioleta de arco de  
mercurio de 30 watts.**

**2.11.- Microscopio de contraste de fase con  
cámara fotográfica integrada.**

- 2.12.- Pelicula polaroid 200 X.
- 2.13.- Filtros milipore de 0.25.

### **3.- Material de vidrio:**

**Esterilizado durante 45 min. a 18 libras**

- 3.1.- Tres matraces de 250 ml.
- 3.2.- 10 tubos con tapones.
- 3.3.- 10 frascos de boca ancha para fragmentar.
- 3.4.- 5 vasos de precipitado de 25 ml. con gasa en la parte superior.
- 3.5.- Cajas de cultivo de base plana con 4 pozos.
- 3.6.- 5 jeringas estériles de 5 ml. con aguja del 20
- 3.7.- Portaobjetos y cubreobjetos.
- 3.8.- 10 tubos de policarbonato de centrifuga.