

# Clonación de embriones de *Ovis aries* utilizando fibroblastos criopreservados durante 14 meses

María del Carmen Navarro Maldonado<sup>1</sup>, Sarahí Hernández Martínez<sup>1</sup>, José Martínez Ibarra<sup>1</sup>, Roberto Vázquez Avendaño<sup>1</sup>, Demetrio Alonso Ambríz García<sup>1</sup>, Raymundo Rangel Santos<sup>2</sup> y Gábor Vajta<sup>3</sup>

Departamento de Biología de la Reproducción<sup>1</sup>, Departamento de Zootecnia<sup>2</sup>, Deputation Vice-Chancellery Academic & Research<sup>3</sup>

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa<sup>1</sup>, Universidad Autónoma Chapingo<sup>2</sup>, Central Queensland University of Australia<sup>3</sup>

Ciudad de México<sup>1</sup>, Méx., México<sup>2</sup>; Queensland, Australia<sup>3</sup>.

carmenavarr2006@yahoo.com.mx, dbr@xanum.uam.mx, neverblackland@hotmail.com, luisjose02@hotmail.com, robertmizer@gmail.com, deme@xanum.uam.mx, rangelsr@correo.chapingo.mx, gabor.vajta@hotmail.com

**Abstract** — Handmade cloning is a relatively simple methodology for somatic nuclear transfer and with low investment cost. The objective of this work was to produce domestic sheep (*Ovis aries*) embryos by handmade cloning, using ear skin fibroblasts cryopreserved during 14 months, corresponding to the 6th cellular passage. Oocytes were *in vitro* matured in supplemented TCM-199, incubated 20 hours at 38°C, 5% CO<sub>2</sub> in air, manually enucleated and electrically fused with fibroblasts. Fourteen morulae were transferring to seven ewes hormonally induced as recipients. Although the embryos failed to implantation, it was possible to obtain domestic sheep embryos by handmade cloning, using somatic cells cryopreserved for more than one year, for the very first time in Mexico.

**Key words:** Handmade cloning, sheep embryos, *Ovis aries*, nuclear transfer.

**Resumen** — La clonación manual es una metodología relativamente sencilla para la transferencia de núcleos somáticos y de bajo costo de inversión. El objetivo de este trabajo fue producir embriones de oveja doméstica (*Ovis aries*) mediante clonación manual, utilizando fibroblastos de piel de oreja criopreservados durante 14 meses, correspondientes al 6° pasaje celular. Los ovocitos fueron madurados *in vitro* en TCM-199 suplementado, incubados 20 horas a 38 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, enucleados manualmente y fusionados eléctricamente con los fibroblastos. Catorce mórulas fueron transferidas a siete ovejas inducidas hormonalmente como receptoras. Aunque los embriones no lograron implantarse, fue posible obtener embriones de ovino doméstico mediante clonación manual, utilizando células somáticas criopreservadas más de un año, por primera vez en México.

**Palabras clave:** Clonación manual, embriones de oveja, *Ovis aries*, transferencia nuclear.

## I. INTRODUCCIÓN

La transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) es un método para obtener clones (individuos genéticamente similares entre sí) y puede aplicarse en animales domésticos o en fauna silvestre, con fines de conservación. Para obtener clones es necesaria una célula somática donadora de núcleo (carioplasto), que será fusionada con un ovocito enucleado (citoplasto) [1].

La TNCS puede hacerse por dos métodos, el método convencional y por clonación manual (Handmade cloning). El primero se basa en el uso de dos micromanipuladores: uno controla una pipeta de sujeción con la que se sujetará por presión negativa al ovocito que se va a enuclear, en tanto que el otro micromanipulador controla el movimiento de otra micropipeta de succión con la que se va a enuclear el ovocito, para después transferir la célula somática (carioplasto) dentro del ovocito enucleado (citoplasto) [2].

Con respecto al segundo método de TNCS, Vajta *et al.* [3] desarrollaron la clonación manual, caracterizada por no requerir del uso de micromanipuladores para enuclear al ovocito, ni para transferir el carioplasto dentro de éste. El proceso de enucleación se hace manualmente utilizando una

micronavaja que corta y separa la porción del ovocito que contiene la placa metafásica y el primer cuerpo polar que contienen el material genético. El citoplasto resultante se fusiona con un carioplasto y con un segundo citoplasto, formando un triplete de células fusionadas entre sí que, activadas químicamente producirán y desarrollarán *in vitro* al embrión clonado. Éste podrá después ser transferido al tracto reproductor de una hembra sincronizada hormonalmente para recibir los embriones clonados y continuar el desarrollo embrionario *in vivo* [4].

Entre los mamíferos que se han clonado de manera exitosa por ambos métodos se encuentran animales domésticos, de laboratorio y mascotas como: bovinos (*Bos taurus*) [4, 5, 6], ovinos (*Ovis aries*) [7], murinos (*Mus musculus*) [8], porcinos (*Sus scrofa domestica*) [9], caprinos (*Capra aegagrus hircus*) [10], felinos (*Felis silvestris catus*) [11], leporinos (*Oryctolagus cuniculus*) [12], equinos: mulas (*Equus mulus*) [13] y caballos (*Equus ferus caballus*) [14] y caninos (*Canis lupus familiaris*) [15]. En especies silvestres se ha clonado: gaur asiático (*Bos gaurus*) [16], banteng (*Bos javanicus*) [17], hurón (*Mustela putorius furo*) [18], búfalo (*Bubalus bubalis*) [19], lobo gris (*Canis lupus*) [20], camello (*Camelus dromedarius*) [21], muflón (*Ovis orientalis musimon*) y argali (*Ovis ammon*) [22], utilizando los fibroblastos de estas especies como carioplastos [22, 23].

Las células somáticas y los embriones producidos por clonación, pueden ser resguardados en bancos de germoplasma, los cuales son una solución eficaz y próxima para resguardar material genético valioso para la producción animal y para hacer frente al panorama crítico que sufre la fauna silvestre amenazada [24].

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue producir embriones clonados de oveja doméstica mediante clonación manual a partir de fibroblastos de piel de oreja que habían sido criopreservados durante 14 meses. Si bien el ovino doméstico es una especie de importancia económica, en este estudio se utilizó principalmente como un modelo sobre del cual estandarizar la clonación manual para aplicarla más adelante en especies de ovino silvestre y coadyuvar así en los programas de conservación de especies endémicas.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Químicos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA) a menos que se indique lo contrario.

### B. Obtención de carioplastos

De acuerdo con la metodología descrita por Amores *et al.* [25] y Kragh *et al.* [26] con algunas modificaciones, se recolectó una muestra de 0.5 cm<sup>2</sup> de piel del borde inferior de la oreja de una hembra de ovino doméstico (*Ovis aries*) tipo criollo de 3 meses de edad, previa antisepsia con agua, jabón, yodo y anestesia con xilocaína al 2%. El manejo para la colecta se apegó a las normas del Comité de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. El tejido de piel se transportó al laboratorio en un tubo Eppendorf con 1 mL de DPBS (por sus siglas en inglés Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Microlab) suplementado con 2% de Antibac-Antifun 10,000 unidades de penicilina, 10 mg de sulfato de estreptomicina y 25 µg de anfotericina B por mL (In Vitro, S.A.). El tejido se desinfectó en alcohol al 70% y después se lavó en DPBS suplementado. Posteriormente fue sometido a disgregación mecánica y enzimática utilizando Colagenasa I (2 mg mL<sup>-1</sup>, Gibco) en un oscilador dentro de una estufa a 37 °C por 45 min. La acción enzimática se detuvo adicionando 5 mL de DMEM-suplementado (Dulbecco's Modified Eagles's Medium, por sus siglas en inglés) (88% DMEM, In Vitro, S.A., 10% Suero Fetal Bovino (SFB, Microlab), 2% Antibac-Antifun, a pH de 7.4). Se centrifugó 10 min a 125 x g descartando el sobrenadante. El botón celular ubicado en el

fondo del tubo fue recuperado, sembrado en caja de Petri de 35 mm y cultivado 7 días a 38 °C y 5% de CO<sub>2</sub> para la deriva de fibroblastos de piel (cultivo primario), hasta alcanzar la confluencia celular y posteriormente efectuar cinco pasajes celulares. Para obtener cada pasaje celular, los fibroblastos derivados se sometieron a la acción de la tripsina (700 µL de tripsina-verseno a razón de 0.05/0.05%) con la finalidad de que se desprendieran de la base de la caja de cultivo y recuperarlos, después se lavaron en DBPS mediante centrifugación a 100 x g para luego resembrarlos en cajas Petri de 35 mm que contenían DMEM-suplementado, a 38 °C por 7 días o hasta alcanzar la confluencia, para un primer pasaje celular. Esto se repitió las veces necesarias hasta completar 5 pasajes celulares. Los fibroblastos del 5° pasaje celular fueron criopreservados a -80°C. Para ello, se tripsinizaron y, una vez desprendidos de la caja de cultivo, se colocaron en criotubos conteniendo 1 mL de medio de congelación a base de DMSO 7% (Dimetilsulfóxido, In Vitro, S.A.). Los criotubos fueron enfriados 1 hora a 4 °C, congelados 24 horas a -20 °C y almacenados durante 14 meses a -80 °C.

Los fibroblastos de piel de oreja de hembra joven *O. aries* tipo criollo utilizados como carioplastos, provenientes del 5° pasaje celular, fueron descongelados después de 14 meses. Para lo cual se incubaron a 38 °C y se centrifugaron por 6 min a 100 x g en 0.5 mL de DMEM-suplementado. El sobrenadante se descartó y el botón celular se homogenizó nuevamente en 0.5 mL de DMEM-suplementado y se resembró en una caja de Petri de 35 mm para llevar las células al 6° pasaje celular.

#### C. Maduración *in vitro* de ovocitos

Setenta y cuatro ovarios fueron recolectados de 37 hembras *O. aries* adultas tipo criollo sacrificadas en un rastro en Nezahualcóyotl, Estado de México, México. Los ovarios se disecaron con tijeras estériles y posteriormente se transportaron al laboratorio en solución salina (0.9% NaCl Sigma-Aldrich y 1% de Antibac-Antifun) a 35 °C. Ahí los ovarios fueron lavados dos veces isotérmicamente en solución salina al 0.9 %. Siguiendo la metodología descrita por Robledo-Verduzco *et al.* [27] y Soberano-Martínez *et al.* [28], la obtención de los ovocitos se realizó mediante la aspiración de los folículos ováricos, con una jeringa desechable estéril de 10 mL que contenía 1 mL de TCM-199 (Tissue Culture Medium 199, por sus siglas en inglés) con Hepes (In Vitro, S.A.) y aguja estéril calibre 20. Los ovocitos recuperados fueron lavados en el mismo medio y posteriormente incubados en una caja de 4 pozos conteniendo medio de maduración a base de TCM-199 suplementado con 15% de SFB, 1% de EGF (por sus siglas en inglés Epidermal Growth Factor), 5 µg mL<sup>-1</sup> de FSH (por sus siglas en inglés Follicle Stimulating Hormone, Folltropin-V, Bioniche), 5 UI mL<sup>-1</sup> de CG (por sus siglas en inglés Chorionic Gonadotrophin, Loeffler) y 65 µL de Antibac-Antifun, cubierto con aceite mineral. El tiempo de maduración *in vitro* (MIV) fue de 20 horas a 38 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### D. Preparación de citoplastos

Los ovocitos madurados se evaluaron en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ61 a aumento 3 X) para determinar la expansión de las células del cúmulo, mismas que fueron retiradas utilizando 0.5 mg mL<sup>-1</sup> de hialuronidasa. Los ovocitos se incubaron por 30 min en 20 µL de demecolcina (10 UG/mL-1) y se lavaron en gotas de 10 µL de T2 (TCM-199 con Hepes y 2% de SFB). Para disgregar la zona pelúcida se colocaron en pronasa (2 mg mL<sup>-1</sup>) por 5 min, la reacción fue detenida con T20 (TCM-199 con Hepes y 20% de SFB). En una caja Petri se colocaron microgotas de T10 (TCM-199 con Hepes y 10% de SFB), en las cuales se colocaron alineados como máximo 5 ovocitos por gota para proceder a enuclearlos.

#### E. Enucleación

Para enuclear los ovocitos se realizó una bisección manual de acuerdo con lo descrito por Vajta *et al.* [4], utilizando una micronavaja (Ultra Sharp Splitting Blade, Bioniche). Los ovocitos fueron

orientados con el primer cuerpo polar hacia el norte de tal manera que, utilizando la micronavaja se eliminara la placa metafásica y el primer cuerpo polar que contenían el material genético (hasta casi una cuarta parte del volumen del ovocito). Los citoplastos (ovocitos enucleados) fueron recuperados en una microgota de 10  $\mu$ L de T20.

#### F. Fusión

Previo a la fusión celular, los carioplastos (fibroblastos del 5° pasaje descongelados y llevados al 6° pasaje celular) fueron tripsinizados, colocándolos en 0.5 mL de T20. Mientras tanto, se preparó la cámara de fusión y el electrofusor (Cell Fusioner Instrument BLS); en la cámara de fusión se adicionaron 800  $\mu$ L de medio de fusión (5.46 g de D-mannitol y 0.1 g de PVA en 98 mL de agua). En una caja Petri se colocaron microgotas de 10  $\mu$ L de: T20, fitohematoglutina (PHA, por sus siglas en inglés Phytohemagglutinin) (5 mg mL<sup>-1</sup>), T2, medio de fusión y T20. Alrededor de 40 carioplastos se colocaron en la gota de T2 y los citoplastos se colocaron en la gota de T20, de ahí se pasaron dos citoplastos a la gota de PHA, los cuales fueron colocados en la gota de T2 de modo que uno de ellos se uniera con un solo carioplasto. Dos citoplastos con un carioplasto unidos (tripletes), se colocaron en la gota de medio de fusión y se colocaron entre los electrodos de la cámara de fusión conectada al electrofusor. Cada triplete fue fusionado mediante un pulso con una corriente eléctrica de 100 Volts durante 9  $\mu$ s [4].

#### G. Activación

La activación se inició 28 horas después de la MIV, para lo cual los embriones reconstruidos (tripletes fusionados) se incubaron en T2 con 8  $\mu$ L de ionóforo de calcio (1 mg mL<sup>-1</sup>) durante 5 min. Después se lavaron 2 veces en T20 y se incubaron individualmente (para evitar que se aglutinaran) en gotas de 2  $\mu$ L de medio de cultivo SOF-1 [(Synthetic Oviductal Fluid, por sus siglas en inglés) (In Vitro, S.A.) suplementado con 5% de SFB] con 2 mM DMAP (6-dimethylaminopurina) a 38 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 h [4].

#### H. Cultivo

Posterior a la activación, los embriones producidos se retiraron del DMAP y se lavaron dos veces en medio de cultivo. Luego se transfirieron al sistema de micropozos o WOW (por sus siglas en inglés Well of the Well) con medio de cultivo SOF-1 cubierto bajo aceite mineral, donde se incubaron 6 d a 38 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> [4]. El desarrollo de los embriones clonados de *O. aries* se evaluó al día 7 de cultivo, determinándose la etapa de segmentación embrionaria.

#### I. Transferencia embrionaria

Según lo descrito por Killen y Caffery [29] y Li *et al.* [30], siete ovejas criollas de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), fueron utilizadas como receptoras de los embriones de oveja producidos por clonación manual. Para ello, fueron tratadas para sincronizar sus estros utilizando esponjas intravaginales con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA, Chronogest Intervet) insertadas por 12 días. Al retirar las esponjas se aplicaron 333 UI de Gonadotropina Coriónica Equina (eCG, Folligon Intervet) por vía intramuscular y la incidencia de estros se determinó del día 13 al 15.

Los estros fueron detectados cada 6 horas iniciando a las 24 horas posteriores a la remoción de las esponjas y hasta las 72 horas, con un macho ovino doméstico marcador, provisto de un mandil entintado, para evitar la cópula y para teñir la grupa de aquellas hembras que hubieran permitido la monta. En estas hembras se transfirieron los embriones clonados por vía intrauterina mediante laparoscopia, a los 6 días después de detectar el estro (día 0 = día del estro) [29, 30].

Cada hembra recibió dos embriones clones de *O. aries* en etapa de mórula. El diagnóstico de gestación se realizó 45 días después de la transferencia embrionaria, utilizando un ultrasonido de tiempo real (Sonovet 600, Madison, WI USA) equipado con un transductor sectorial de 3.5 MHz.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los fibroblastos de piel de oreja de hembra joven *O. aries* tipo criollo utilizados como carioplastos, fueron descongelados después de 14 meses de haber sido derivados en cultivo primario y correspondían al 5° pasaje celular. Después de 7 días más de cultivo (6° pasaje) alcanzaron una confluencia del 70%. En cuanto a la obtención de los citoplastos, se recolectaron 74 ovarios de los cuales se recuperaron 225 ovocitos (3 ovocitos por ovario) que se sometieron a MIV por 20 horas. Posteriormente se evaluaron considerando el criterio de expansión de las células del cúmulo y la extrusión del primer cuerpo polar. El 84.4% (190/225) de los ovocitos alcanzaron la Metafase II (maduraron *in vitro*) y fueron enucleados. De éstos, 140 (73.6%) fueron utilizados para ser fusionados con los fibroblastos. Después de la fusión, 35 tripletes (50%) fueron reconstruidos, de los cuales 24 (68.5%) lograron activarse químicamente produciendo embriones clonados y 14 (58.3%) alcanzaron la etapa de mórula (Figura 1). Estos últimos fueron transferidos al tracto reproductor de siete hembras *O. aries* criollas estimuladas hormonalmente para utilizarlas como receptoras de los embriones clonados (2 embriones por hembra) (Tabla 1).

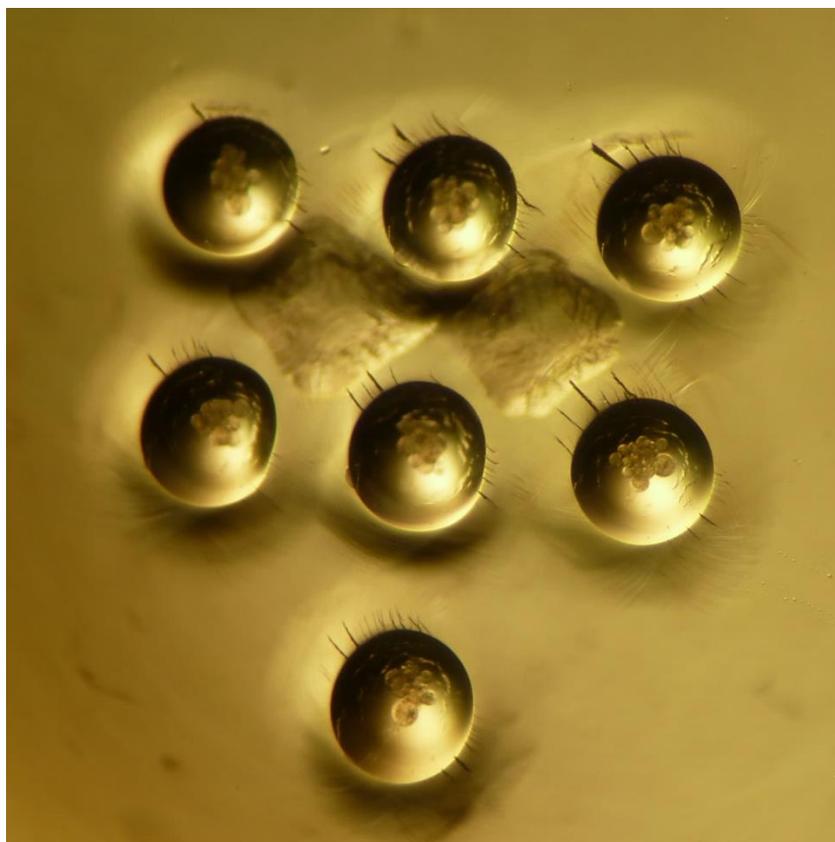


Figura 1. Embriones clonados de *Ovis aries* cultivados en sistema de micropozos (WOW) (40x).

Tabla 1. Resultados de la obtención de embriones clonados de *Ovis aries*

Pasos de la clonación manual	N (%)
Ovocitos recuperados	225
Ovocitos madurados	190/225 (84.4)
Citoplastos	140/190 (73.6)
Tripletes fusionados	70/140 (50)
Embriones reconstruidos	35/70 (50)
Activación	24/35 (68.5)
Embriones de 2-6 blastómeros	10/24 (41.7)
Mórulas	14/24 (58.3)
Mórulas transferidas	14
Gestación	0

Dada la importancia que cada paso involucrado en la clonación manual de embriones de mamífero, tiene sobre la producción *in vitro* de embriones, es que en este trabajo se discuten: la utilización de fibroblastos de piel criopreservados por 14 meses y posteriormente descongelados, la MIV y la fusión celular.

La maduración *in vitro* de los ovocitos de *O. aries* se realizó por un periodo de 20 horas como se describió para bovinos [31], demostrando que el proceso de MIV de los ovocitos de ovinos y bovinos es similar. En este estudio, el primer criterio para determinar la MIV de los ovocitos fue la expansión de las células del cúmulo. La maduración nuclear del ovocito se logra cuando alcanza la Metafase II observándose la placa metafásica y la extrusión del primer cuerpo polar [32]. De esta forma, solo los ovocitos que presentaron primer cuerpo polar se consideraron como efectivamente madurados y fueron los que se enuclearon. La enucleación se realizó biseccionando los ovocitos. De esta manera, los ovocitos no fueron sometidos a tinciones con Hoechst ni expuestos a rayos UV, como ocurre en la transferencia nuclear tradicional que utiliza micromanipuladores [33].

En la transferencia nuclear tradicional, la tinción con Hoechst se utiliza para visualizar el material genético del ovocito y así poder retirarlo. En la clonación manual, los ovocitos se exponen a demecolcina, un inhibidor del huso mitótico que provoca que el material genético se mantenga próximo al primer cuerpo polar [34]. De tal forma que, al realizar la bisección manual retirando aproximadamente una cuarta parte del citoplasma del ovocito que está próximo al primer cuerpo polar, también se retira el material genético, obteniendo así un citoplasto [35].

La fusión de dos citoplastos con el carioplasto, se realizó sometiendo a las células a un pulso con una corriente eléctrica de 100 Volts durante 9  $\mu$ s. Adicionalmente, para favorecer la fusión celular, las células fueron expuestas a PHA, proteína que presenta actividad mitogénica y con capacidad de aglutinar distintos tipos de células [36].

Los resultados de MIV (84.4%) son superiores a lo encontrado por Mukherjee *et al.* [37] quienes lograron 72.6% de maduración *in vitro* en ovocitos de cabra. Por otro lado, si consideramos los 70 tripletes fusionados, en este estudio se obtuvieron 14 mórulas (20%), similar a lo reportado por Mukherjee *et al.* [37] quienes obtuvieron un 22.3% de mórulas, y a lo reportado por Lee *et al.* [38] quienes obtuvieron de 11 a 24% de embriones en etapa de más de 9 blastómeros, en un antílope.

Los resultados demostraron que los fibroblastos derivados de una hembra joven de oveja doméstica y congelados por más de un año, tienen la capacidad para ser células donadoras de núcleos, lo que es de gran importancia ya que, como señalan León-Quinto *et al.* [39], ofrece la posibilidad de crear bancos de germoplasma con material biológico para producir clones de especies de importancia económica o ecológica. Aun cuando ninguno de los embriones transferidos a hembras receptoras en este estudio logró continuar su desarrollo *in vivo*, fue factible obtener por vez primera en México, embriones producidos por clonación manual en un modelo experimental (*O. aries*) hembra.

Dada la intensa manipulación a que son sometidas las células (ovocitos y fibroblastos) utilizadas en estos sistemas de producción de embriones, las eficiencias son bajas (3-6%). Sin embargo, comparado con el inicio de la clonación de mamíferos, la oveja doméstica “Dolly” cuya eficiencia fue de 0.3 % [40], es evidente que aumenta cada vez, lo cual se asocia con la introducción de alternativas innovadoras como la clonación manual. Con todo ello, la posibilidad de recuperación del material nuclear de células somáticas, la obtención de embriones y la posibilidad de transferirlos a hembras receptoras, abre caminos prometedores para numerosos campos del conocimiento.

En este estudio se documentan los resultados preliminares sobre la que es la primer clonación de embriones lograda en México en ovino doméstico (*O. aries*) como un modelo experimental, a partir del cual producir embriones de especies silvestres endémicas como el borrego cimarrón mexicano (*Ovis canadensis*), una especie sujeta a protección especial. Con ello se coadyuvará con los programas Nacionales de reproducción y conservación de mamíferos silvestres en algún nivel de riesgo.

#### RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de PROMEP-SEP Fortalecimiento de Cuerpos Académicos Dictamen IDCA 3881, para desarrollar parte de la metodología para la clonación manual. A su vez, se agradece al Sr. Luis Alberto Guarneros Maldonado del rastro del Estado de México, por facilitar el material biológico para la realización del presente trabajo.

#### REFERENCIAS

- [1] Navarro-Maldonado, M. C., A. Rosado-García, H. F. Serrano. 2003-4. “Técnicas de clonación de embriones”. En: R. Moreno Chan (ed). Ciencia Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México. 9: 35-74.
- [2] Bosch, P. 2005. “Clonado de animales mediante transferencia nuclear, aplicaciones en ganadería y biomedicina”. En: C. González-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds). Manual de Ganadería Doble Propósito. Astro Data, S.A. (Ed). Maracaibo-Venezuela. VIII. 5: 620-625.
- [3] Vajta, G., I. M. Lewis, P. Hyttel, G. A. Thouas, and A. O. Trounson. 2001. “Somatic cell cloning without micromanipulators”. Cloning 3: 89–95.
- [4] Vajta, G., I. M. Lewis, A. O. Trounson, S. Purup, P. Maddox-Hyttel, M. Schmidt, H. G. Pedersen, T. Greve, and H. Callesen. 2003. “Handmade somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*”. Biol. Reprod. 68: 571-578.
- [5] Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. J. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F. A. Ponce de Leon and J. M. Robl. 1998. “Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts”. Science 280: 1256-1258.
- [6] Vajta, G., I. M. Lewis, and R. T. Tecirlioglu. 2006. “Handmade somatic cell cloning in cattle”. Methods Molecular Biol. 348: 183–196.
- [7] Zhang, P., P. Liu, H. Dou, L. Chen, L. Lin, P. Tan, G. Vajta, J. Gao, Y. Du, and Z. Runlin. 2013. “Handmade cloned transgenic sheep rich in Omega-3 fatty acids”. Plos One 8: 1-9.

- [8] Wakayama, T., A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson, and R. Yanagimachi. 1998. "Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei". *Nature* 394: 369-374.
- [9] Polejaeva, I. A., S. H. Chen, T. D. Vaught, R. L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dal, J. Boone, S. Walker, D. L. Ayares, A. Coleman, and K. H. S. Campbell. 2000. "Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells". *Nature* 407: 86-90.
- [10] Baguisi, A., E. Behboodi, D. T. Melican, J. S. Pollock, M. M. Destrempes, C. Cammuso, J. L. Williams, S. D. Nims, C. A. Porter, P. Midura, M. J. Palacios, S. L. Ayres, R. S. Denniston, M. L. Hayes, C. A. Ziomek, H. M. Meade, R. A. Godke, W. G. Gavin, E. W. Overstrom, and Y. Echelard. 1999. "Production of goats by somatic cell nuclear transfer". *Nature Biotechnol.* 17: 456-461.
- [11] Shin, T., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons, and M. Westhusin. 2002. "A cat cloned by nuclear transplantation". *Nature* 425: 859.
- [12] Chesne, P., P. G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger and J. P. Renard. 2002. "Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells". *Nature Biotechnol.* 20: 366-369.
- [13] Woods, G. L., K. L. White, D. K. Vanderwall, G. P. Li, K. I. Aston, T. D. Bunch, L. N. Meerdo, and B. J. Pate. 2003. "A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer". *Science* 301: 1063.
- [14] Galli, C., I. Lagutina, G. Crotti, S. Colleoni, P. Turini, N. Ponderato, R. Duchi, and G. Lazzari. 2003. "Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin". *Nature*: 424: 635.
- [15] Lee, B. C., M. K. Kim, G. Jang, H. J. Oh, F. Yuda, H. J. Kim, M. S. Hossein, J. J. Kim, S. K. Kang, G. Schatten, and W. S. Hwang. 2005. "Dogs cloned from adult somatic cells". *Nature*: 436: 641.
- [16] Lanza, P. R., J. B. Cibelli, F. Diaz, C. T. Moraes, P. W. Farin, C. E. Farin, C. J. Hammer, M. D. West, and P. Damiani. 2000. "Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer". *Cloning* 2: 79-90.
- [17] Sansinena, M. J., D. Hylan, K. Hebert, R. S. Denniston, and R. A. Godke. 2005. "Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer". *Theriogenology* 6: 1081-1091.
- [18] Li, Z., X. Sun, J. Chen, X. Liu, S. M. Wisely, Q. Zhou, J. P. Renard, G. H. Leno, and J. F. Engelhardt. 2006. "Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer". *Develop. Biol.* 293: 439-448.
- [19] Shi, D., F. Lu, Y. Wei, K. Cui, S. Yang, J. Wei, and Q. Liu. 2007. "Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells". *Biol. Reprod.* 77: 285-291.
- [20] Oh, H. J., M. K. Kim, J. G. Jang, H. J. Kim, S. G. Hong, J. E. Park, K. Park, C. Park, S. H. Sohn, D. Y. Kim, N. S. Shin, and B. C. Lee. 2008. "Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem". *Theriogenology* 70: 638-647.
- [21] Wani, N., U. Wernery, F. A. H. Hassan, R. Werney, and J. A. Skidmore. 2010. "Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer". *Biol. Reprod.* 82: 373-379.
- [22] Pan, X., Y. Zhang, Z. Guo, and F. Wang. 2014. "Development of interspecies nuclear transfer embryos reconstructed with argali (*Ovis ammon*) somatic cells and sheep ooplasm". *Cell Biol. Int.* 38: 211-218.
- [23] Loi, P., G. Ptak, B. Barboni, J. Jr. Fulka, P. Cappai, and M. Clinton. 2001. "Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells". *National Biotechnol.* 19: 962-964.
- [24] Ávila-Portillo, L. M., J. I. Madero, C. López, M. F. León, L. Acosta, L. G. Delgado, C. Gómez, J. M. Lozano, y M. T. Reguero. 2006. "Fundamentos de criopreservación". *Rev. Colomb. Obst. Ginecol.* 57: 291-300.
- [25] Amores, S., J. Domenech, H. Colom, A. C. Calpena, B. Clares, A. Gimeno, and J. Lauroba. 2014. "An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells". *Eur. J. Pharmaceutical Sci.* 60: 49-54.
- [26] Kragh, P. M., G. Vajta, T. J. Corydon, S. Purup, L. Bolund, and H. Callesen. 2004. "Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning". *Reprod. Fertility Develop.* 16: 315-318.

- [27] Robledo-Verduzco, J. M., J. Herrera-Camacho, M. Cajero-Juárez, M. C. Navarro-Maldonado, y A. García-Valladares. 2009. "Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos". *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 10: 95-99.
- [28] Soberano-Martínez, A., A. Bravo Patiño, I. Olivo-Zepeda, I. Toscano-Torres, M. Cajero-Juárez, J. Herrera-Camacho, M. C. Navarro-Maldonado, y J. C. Segura-Correa. 2011. "Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo". *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 14: 301-307.
- [29] Killen, I. D. and G. J. Caffery. 1982. "Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope". *Austr. Vet. J.* 59: 95.
- [30] Li, S., Y. Li, W. Du, L. Zhang, S. Yu, Y. Dai, C. Zhao, and N. Li. 2005. "Aberrant gene expression in organs of bovine clones that died within two days after birth". *Biol. Reprod.* 72: 258-265.
- [31] Neglia, G., M. Marino, R. Di Palo, M. Wilding, V. Caracciolo Di Brienza, B. Dale, B. Gasparrini, and L. Zicarelli. 2001. "A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy". *Theriogenology* 55: 488.
- [32] Collado-Fernandez, E., H. M. Picton, and R. Dumollard. 2012. "Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals". *Int. J. Develop. Biol.* 56: 799-808.
- [33] Smith, L. C. 1993. "Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*". *J. Reprod. Fertility* 99: 39-44.
- [34] Moro, L. N., G. Vichera, R. Olivera, and D. Salamone. 2010. "Evaluación de la enucleación asistida por demecolcina como método para evitar la exposición a luz UV en la producción de embriones bovinos por técnica de clonación". *Investigación Vet.* 12: 195-204.
- [35] Vajta, G. 2007. "Handmade cloning: the future way of nuclear transfer". *Trends Biotechnol.* 25: 250-253.
- [36] Fuliang, D., S. Perng-Chih, X. Jie, S. Li-Ying, J. B. Seon, L. N. Tshimangadzo, J. Riesen, X. C. Tian, T. K. C. Winston, S. N. Lee, and X. Yang. 2006. "The cell agglutination agent, phytohemagglutinin-L, improves the efficiency of somatic nuclear transfer cloning in cattle (*Bos taurus*)". *Theriogenology* 65: 642-657.
- [37] Mukherjee, A., H. Malik, A. P. Saha, A. Dubey, D. K. Singhal, S. Boateng, S. Saugandhika, S. Kumar, S. De, S. K. Guha, and D. Malakar. 2014. "Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression". *J. Assisted Reproduc. Genet.* 31: 229-239.
- [38] Lee, B., G. G. Wirtu, P. Damiani, E. Pope, B. L. Dresser, W. Hwang, and B. D. Bavister 2003. "Blastocyst development after intergeneric nuclear transfer of mountain bongo antelope somatic cells into bovine oocytes". *Cloning Stem Cells* 5: 25-33.
- [39] León-Quinto, T., M.A. Simón, R. Cadenas, A. Martínez, and A. Serna. 2014. "Diferente cryopreservation requirements in foetal, versus adult skin cells from an endangered mammal, the iberian lynx (*Lynx pardinus*)". *Cryobiology* 68: 227-233.
- [40] Wilmut, L., A. E. Schnicke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. S. Campbell. 1997. "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells". *Nature* 385: 810-813.