

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“EFECTO DE LAS SECRECIONES OVIDUCTALES Y UTERINAS SOBRE EL
DESARROLLO *IN VITRO* DE EMBRIONES CLONES DE *Ovis aries*”

Tesis para obtener el grado académico de
Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud

QUE PRESENTA

M. en BRA. José Roberto Vazquez Avendaño

Matrícula: 2193802105

Correo: robertmizer@gmail.com

ORCID: 0000-0003-0285-933X

CO-DIRECTORA: Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

CO-DIRECTOR: Dr. César Cortez Romero

JURADO

PRESIDENTA

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

SECRETARIO

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

VOCAL

Dr. César Cortez Romero

VOCAL

Dr. Salvador Romo García

VOCAL

Dr. José Ernesto Hernández Pichardo

Iztapalapa, Ciudad de México, A 8 de agosto de 2024

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de “Reproducción Animal Asistida” del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Navarro Maldonado y del Dr. César Cortez Romero del Departamento de Biología de la Reproducción de la UAM-I y del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería del COLPOS, campus Montecillo, respectivamente. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Demetrio Alonso Ambríz García del Departamento de Biología de la Reproducción de la UAM-I.

El autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 763618, que comprendió del periodo de 01/enero/2020 al 31/12/2023. El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del CONAHCYT, con número de referencia 001480.

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó el MBRA José Roberto Vazquez Avendaño el día 8 de agosto del año 2024.

Jurado

Dra. María del Carmen Navarro Maldonado

Presidente

Dr. Demetrio Alonso Ambríz García

Secretario

Dr. César Cortez Romero

Vocal

Dr. Salvador Romo García

Vocal

Dr. José Ernesto Hernández Pichardo

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la vida y todo lo que tengo, los dones y virtudes que me permitieron desarrollar este trabajo, por darme lo que necesitaba y no lo que pedía, muchas gracias Padre eterno.

A mis padres **Florencia** y **Andrés**, por el amor y apoyo que nos dieron a mi y mis hermanos, este logro también es suyo.

A mis hermanos **Mario**, **Raúl**, **Gabriel**, **Andrés** y **Luz María**, por su apoyo incondicional, a pesar de las adversidades hemos salido adelante. A mi cuñado **Agustín**, por su gran apoyo siempre que lo requerí.

A **Mara**, por todo su valioso apoyo para continuar y dar lo mejor de mi, gracias por tu amor y ser parte de mi vida.

A la **Dra. María del Carmen Navarro Maldonado** y el **Dr. Demetrio Alonso Ambríz García**, por la confianza que han depositado en mi, por su apoyo en este proyecto, por sus consejos y más significativamente por su amistad.

Al **Dr. César Cortez Romero**, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo, por compartir su conocimiento y por darme ánimos cuando lo necesitaba.

Al **Dr. José Ernesto Hernández Pichardo** y el **Dr. José Luis Rodríguez Suástegui**, por siempre abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo en este proyecto, por su amistad que valoro mucho. A **Lupita** esposa del Dr. Ernesto, por su cálida manera de darme ánimos. A **Boris**, por compartir parte de su conocimiento conmigo y su amistad.

A la **Dra. Lleretny Rodríguez Álvarez**, el **Dr. Álvaro Efraín Domínguez Rebolledo** y el **Dr. Salvador Romo García**, por aceptar ser mis sinodales y revisar mi trabajo, sus observaciones mejoraron considerablemente mi escrito de tesis.

Al **Dr. Gerardo Blancas Flores**, la **Dra. Ángeles Fortis Barrera** y a la **Dra. Hilda Loza Rodríguez** del Laboratorio de Farmacología, por apoyarme en la identificación de las proteínas de mis muestras, así como proporcionarme todos los insumos necesarios para realizarlo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio **Esteban, Iván** y **Andrea** con quienes compartí gratos momentos en el laboratorio que hicieron más ameno el trabajo, esperó haberles enseñado algo de mi saber hacer y mucho más importante seguir contando con su amistad. A **Yenny**, por su apoyo y amistad, con quien he compartido buenos momentos.

A mis alumnas y compañeras de laboratorio **Viri, Michelle** y **Gaby**, por el gran apoyo en el laboratorio, han hecho un gran esfuerzo y les irá muy bien en su vida profesional.

A **Yei, Fernando, Ricardo** y **Camila** que conocí siendo mis alumnos y con quienes nunca me imaginé tener una amistad, gracias por su apoyo.

A **Martha** y **Diana**, por su apoyo y animo en nuestro corto tiempo de amistad, pero de gran calidad.

A **Hilda**, por su apoyo en este proyecto y sobre todo por su amistad sincera.

Al **Sr. Luís Alberto Guarneros**, por facilitar el material biológico y sin el cual no sería posible ninguno de nuestros experimentos.

A todos los que forman parte de la **Universidad Autónoma Metropolitana**, porque con su labor diario es posible alcanzar logros y metas como ésta.

DEDICATORIAS

A mis queridas sobrinas **María Fernanda, Dafne, Leslie y Aidee** a quienes quiero mucho y comparto este logro, para que así también logren sus metas en la vida, todo lo que se hace con amor y dedicación tiene frutos. También a mis sobrinas más pequeñas **Romina, Dayana y Keity** que apenas empiezan a vivir y tienen mucho camino por recorrer.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Declaración de originalidad

El que suscribe José Roberto Vazquez Avendaño, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, y autor de la tesis titulada: "Efecto de las secreciones oviductales y uterinas sobre el desarrollo *in vitro* de embriones clones de *Ovis aries*",

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para la obtención del grado de Doctor 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 no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o 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 ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 8 de agosto del 2024.

Atentamente

José Roberto Vazquez Avendaño

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco
186, Col. Leyes de Reforma 1a
Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Carta de Cesión de Derechos

En la Ciudad de México, el día 08 de agosto del año 2024, quien suscribe José Roberto Vazquez Avendaño, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autor intelectual de la tesis titulada “Efecto de las secreciones oviductales y uterinas sobre el desarrollo *in vitro* de embriones clones de *Ovis aries*”, bajo la dirección del Comité Tutorial conformado por la Dra. María del Carmen Navarro Maldonado, el Dr. César Cortez Romero y el Dr. Demetrio Alonso Ambríz García, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor o del Comité Tutorial del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico robertmizer@gmail.com; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

José Roberto Vazquez Avendaño
Matrícula: 21932105



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco
186, Col. Leyes de Reforma 1a
Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>

ÍNDICE

RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
1.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL OVIDUCTO	3
1.2 COMPOSICIÓN DEL FLUIDO OVIDUCTAL	4
1.2.1 <i>Aminoácidos</i>	4
1.2.2 <i>Lípidos</i>	5
1.2.3 <i>Proteínas</i>	5
1.3 CICLO ESTRAL DE LA OVEJA	7
1.4 DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO	8
1.5 TECNOLOGÍAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN OVINOS	10
1.6 GENERACIÓN DE EMBRIONES CLONES EN OVINOS	11
1.6.1 <i>Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS)</i>	12
1.6.2 <i>Eficiencia del desarrollo in vivo e in vitro de embriones por TNCS</i>	13
2. ANTECEDENTES	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	19
6.1. OBJETIVO GENERAL	19
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	20
8. MATERIALES Y MÉTODOS	21
8.1. REACTIVOS Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN	21
8.2. OBTENCIÓN DE FLUIDO OVIDUCTAL Y FLUIDO UTERINO.....	21
8.3. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS FO Y FU	22
8.3.1. <i>Evaluación de la Osmolaridad</i>	22
8.3.2. <i>Determinación de la concentración total de proteína</i>	23
8.4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS FO Y FU	23
8.4.1. <i>Separación de Proteínas</i>	23
8.4.2. <i>Tinción con azul de Coomassie</i>	23
8.4.3. <i>Estimación del peso molecular de las bandas</i>	23
8.4.4. <i>Western Blot</i>	24
8.5. LOS FO Y FU EN EL DESARROLLO Y LA CALIDAD DE EMBRIONES CLONES.....	25
8.5.1. <i>Deriva de fibroblastos de piel de oreja de ovino en cultivos primarios</i>	25
8.5.2. <i>Pasajes celulares</i>	25
8.5.3. <i>Criopreservación de fibroblastos</i>	26
8.5.4. <i>Maduración in vitro de ovocitos de oveja</i>	26

8.5.5. <i>Clonación manual de embriones</i>	26
8.5.5.1. Preparación de los citoplastos	27
8.5.5.2. Formación y fusión de tripletes	28
8.5.5.3. Activación.....	28
8.5.5.4. Cultivo in vitro de embriones clones en sistema WOW	29
8.6. PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS.....	29
8.7. INFLUENCIA DE FO Y FU EN NIVELES DE ERO Y GSH EN EMBRIONES CLONES	29
8.7.1. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO) Y GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) .	29
8.7.2. TINCIÓN DE NÚCLEOS CON DAPI.....	30
8.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
9. RESULTADOS.....	31
9.1. EVALUACIÓN DEL VOLUMEN, OSMOLARIDAD Y CONCENTRACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS DE LOS FLUIDOS REPRODUCTIVOS (FO Y FU)	31
9.2. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS FLUIDOS REPRODUCTIVOS (FO Y FU)	31
9.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MÁS ABUNDANTES EN LOS FO Y FU	33
9.4. RESULTADOS GENERALES DE MIV, ENUCLEACIÓN, FUSIÓN Y EMBRIONES RECONSTRUIDOS	33
9.5. EFECTO DE LOS FO Y FU EN EL DESARROLLO IN VITRO DE EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS Y CLONES	35
9.6. EFECTO DE LOS FO Y FU EN LOS NIVELES DE ERO Y GSH EN EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS Y CLONES	36
10. DISCUSIÓN	39
10.1. EVALUACIÓN DEL VOLUMEN, OSMOLARIDAD Y CONCENTRACIÓN TOTAL DE PROTEÍNAS DE LOS FLUIDOS REPRODUCTIVOS (FO Y FU).....	39
10.2. PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS FLUIDOS REPRODUCTIVOS (FO Y FU)	40
10.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LOS FO Y FU	40
10.4. EFECTO DEL FO Y FU EN EL DESARROLLO IN VITRO DE EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS Y CLONES	42
10.5. EFECTO DE LOS FO Y FU SOBRE EL NIVEL DE ERO Y GSH EN EMBRIONES PARTENOGENÉTICOS Y CLONES	44
11. CONCLUSIONES	46
12. CONSIDERACIONES A FUTURO	47
13. REFERENCIAS.....	48
14. ANEXOS	64
15. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL.....	66
15.1 ARTÍCULO DE REVISIÓN.....	66
15.2 ARTÍCULO BIBLIOMÉTRICO.....	76
15.3 ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN	91

Resumen

Introducción: La transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) es una biotecnología con aplicación en diferentes áreas tales, como la replicación de animales de interés zootécnico, especies silvestres amenazadas y animales transgénicos. No obstante, la TNCS no ha tenido la aplicación práctica como otras biotecnologías reproductivas, debido a factores intrínsecos de la propia técnica, tales como resistencia a la reprogramación de la célula somática, pobre potencial de reprogramación de los ovocitos, traumatismo por manipulación y condiciones subóptimas del cultivo embrionario *in vitro*. Por otra parte, se ha reportado que la adición de fluido oviductal (FO) y uterino (FU) en el medio de cultivo *in vitro* de embriones generados por FIV en diferentes especies domésticas, tiene un efecto positivo en el desarrollo y la calidad embrionaria; debido a que el FO y el FU contienen una amplia variedad de proteínas que cumplen diferentes funciones durante el desarrollo embrionario y de las cuales carecen los medios de desarrollo embrionario *in vitro*. El objetivo del presente estudio fue evaluar el volumen, la osmolaridad, la concentración y el patrón de distribución de las proteínas del FO y FU, e identificar las proteínas OVGPI, HSP70 y Ezrin que son importantes para la fisiología reproductiva. Una vez que se evaluaron dichas propiedades, se analizó el efecto del FO y FU en el desarrollo de embriones clones y partenogénicos de *Ovis aries*, así como en el balance de especies reactivas de oxígeno (ERO) y glutatión (GSH).

Resultados: Se obtuvo en promedio de 3.2 ± 1.5 μL de FO y 17 ± 0.5 μL de FU por aparato reproductor; la osmolaridad fue de 343 ± 20.8 mOsm kg^{-1} y 280 ± 96.2 mOsm kg^{-1} y la concentración de proteínas fue de 71.9 ± 23.8 g L^{-1} y 21.8 ± 1.1 g L^{-1} , respectivamente. En el patrón de distribución de proteínas se observaron 20 bandas en FO y 14 bandas en FU. De ellos, 14 y 8 fueron específicos de FO y FU y 6 comunes a ambas. El espectro de pesos moleculares de las proteínas fue de 24 a 324 y de 29 a 353 kDa para FO y FU. Se identificó la presencia de las proteínas OVGPI, HSP70 y Ezrin en ambos fluidos, encontrándose en mayor cantidad en el FO. No se observó efecto en el desarrollo de embriones partenogénicos y clones con 0.5% de FO y FU. Sin embargo, al 1 y 2% de FO y FU, se observó un efecto negativo en las primeras divisiones en los embriones partenogénicos y en la etapa de blastocisto para los embriones clones. Se observó una disminución de los niveles intracelulares de ERO y GSH en los blastocistos partenogénicos tratados con 1.0% de FO y FU, mientras que no se observó efecto alguno en los embriones clones. Sin embargo, los embriones clones presentaron mayor concentración de GSH que los embriones partenogénicos.

Conclusiones: El volumen recuperado de FU fue 5 veces mayor que el de FO. Tanto la osmolaridad como la concentración de proteínas fueron mayores en FO que en FU (1.2 y 3 veces mayores). El patrón de distribución de proteínas entre FO y FU fue diferente, siendo más complejo en FU. Las proteínas OVGPI, HSP70 y Ezrin fueron identificadas en el FO y FU, encontrándose en mayor

cantidad en el FO. No se observó efecto de los FO y FU sobre el desarrollo embrionario y el balance redox en los embriones clones de ovino generados por clonación manual.

Abstract

Introduction: Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is a biotechnology with different application fields such as replication of zootechnical interest animals, endangered wildlife and transgenic animals. However, SCNT has not had the practical application like other reproductive biotechnologies, due to intrinsic factors of the technique itself, such as resistance to somatic cell reprogramming, oocytes with poor reprogramming potential, handling trauma and suboptimal conditions of embryonic culture *in vitro*. Moreover, it has been reported that supplementing oviductal fluid (OF) and uterine fluid (UF) during *in vitro* culture of IVF embryos in different domestic species has a positive effect on embryo development and quality; because OF and UF contain a wide variety of proteins which perform different functions during embryonic development and which are lacking *in vitro* culture medium for embryo development. The aim of this study was to evaluate the volume, osmolarity, concentration and proteins distribution pattern of OF and UF, identify the proteins OVGP1, HSP70 and Ezrin which are important for reproductive physiology. Once these properties were evaluated, the effect of OF and UF on the development of clone and parthenogenetic embryos of *Ovis aries* was analyzed, as well as the balance of reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH).

Results: An average of $3.2 \pm 1.5 \mu\text{L}$ of OF and $17 \pm 0.5 \mu\text{L}$ of UF per reproductive system was obtained; osmolarity was $343 \pm 20.8 \text{ mOsm kg}^{-1}$ and $280 \pm 96.2 \text{ mOsm kg}^{-1}$ and protein concentration was $71.9 \pm 23.8 \text{ g L}^{-1}$ and $21.8 \pm 1.1 \text{ g L}^{-1}$, respectively. The protein distribution pattern, 20 bands in OF and 14 bands in UF were observed. Of these, 14 and 8 were specific to OF and UF and 6 were common to both. The molecular weight spectrum of proteins was 24 to 324 and 29 to 353 kDa for OF and UF. The presence of the proteins OVP1, HSP70 and Ezrin in both fluids was identified, being in greater quantity in the OF. No effect was observed in the development of parthenogenetic embryos and clones with 0.5% OF and UF. However, at 1 and 2% of OF and UF, a negative effect was observed in the first divisions in parthenogenetic embryos and in the blastocyst stage for clone embryos. A decrease in intracellular levels of ROS and GSH was observed in parthenogenetic blastocysts treated with 1.0% OF and UF, while no effect was observed in clone embryos. However, clone embryos had higher concentrations of GSH than parthenogenetic embryos.

Conclusions: The volume of UF recovered was 5 times greater than OF. Both osmolarity and protein concentration were higher in OF than in UF (1.2 and 3 times higher). The protein distribution pattern between OF and UF was different, being more complex in UF. The proteins OVGP1, HSP70 and Ezrin were identified in the OF and UF, being in greater quantity in the OF. No effect was observed of OF and UF on embryonic development and redox balance on sheep clone embryos by Handmade Cloning.

Lista de abreviaturas

FAO: Food and Agriculture Administration

IETS: International Embryo Technology Society

TRA: Técnicas de reproducción asistida

FIV: Fertilización *in vitro*

ICSI: Inyección intracitoplasmática del espermatozoide

TNCS: Transferencia nuclear de células somáticas

IA: Inseminación Artificial

LOS: Síndrome de crías grandes

AOS: Síndrome de crías anormales

FO: Fluido oviductal

FU: Fluido uterino

OVGP1: Glicoproteína específica del oviducto

HSP70: Proteína de choque térmico 70

ERO: Especies reactivas de oxígeno

GSH: Glutación reducido

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

FSH: Hormona folículo estimulante

LH: Hormona luteinizante

CL: Cuerpo lúteo

PGF_{2α}: Prostaglandina F_{2α}

MCI: Masa celular interna

ZP: Zona pelúcida

MOET: Transferencia de embriones por ovulación múltiple

MIV: Maduración *in vitro*

SOF: Synthetic oviductal fluid

UV: luz ultravioleta

HMC: Handmade cloning

LTE: Fase lútea temprana

LTA: Fase lútea tardía

SFB: Suero fetal bovino

BSA: Albúmina sérica bovina

1. INTRODUCCIÓN

Los ovinos fueron una de las primeras especies en ser domesticadas hace 8000 a 9000 años aproximadamente y presentan una amplia distribución geográfica debido a su gran adaptabilidad a diferentes tipos de climas (FAO, 2015). La población mundial de ovinos alcanzó los 1.2 billones de individuos para el año 2012 y se han registrado alrededor de 1400 razas (Romanov *et al.*, 2021). De acuerdo con datos de la Asociación Internacional de Tecnología de Embriones (IETS, por sus siglas en inglés), la producción de embriones *in vitro* de ovinos ha aumentado sustancialmente (340%) del año 2021 al 2022 (Viana, 2022), lo cual significa que existe una demanda de las técnicas de reproducción asistida (TRA) en esta especie.

Entre las técnicas de producción de embriones *in vitro*, tenemos a la fertilización *in vitro* (FIV), la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) y la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). Esta última consiste en transferir el núcleo de una célula somática, que donará su información genética (carioplasto), a un ovocito previamente enucleado, que será el receptáculo citoplasmático (citoplasto) del núcleo donado (Gurdon, 2013). A partir de la integración de estos elementos se forma una nueva célula que se desarrollará en un embrión clon, de la cual se obtendrá una cría genéticamente idéntica al individuo donde se obtuvo la información genética. No obstante, entre los clones pueden presentarse diferentes fenotipos regulados por mecanismos epigenéticos (Olsson *et al.*, 2022).

Debido al potencial de la TNCS tiene diferentes aplicaciones, por ejemplo: en la propagación de animales productivos de alto valor comercial (Selokar *et al.*, 2018), rescate de animales silvestres en peligro de extinción (Loi *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010) recuperación de animales de compañía (Loi *et al.*, 2021), animales genéticamente modificados con fines biomédicos (Li *et al.* 2016; Li *et al.*, 2020), editados genéticamente (Zhang *et al.*, 2018a) y en la producción de órganos para xenotrasplantes (Gao *et al.*, 2017). Sin embargo, a causa de su baja eficiencia su aplicación práctica es limitada en comparación con otras TRA, tales como la inseminación artificial (IA) y la FIV.

Esto se debe a que los embriones generados por TNCS presentan un bajo potencial de desarrollo *in vitro* e *in vivo* con un limitado número de crías recién nacidas sanas. En el caso de los rumiantes, se suele presentar el síndrome de crías grades (LOS, por sus siglas en inglés) o más recientemente denominado síndrome de crías anormales (AOS, por sus siglas en inglés), por la variedad de fenotipos anormales que presentan las crías al nacer (Loi *et al.*, 2006; Nava-Trujillo y Rivera, 2023). Esta serie de problemas son causados por factores intrínsecos de la técnica de TNCS, tales como el limitado potencial de reprogramación del citoplasto, la resistencia del carioplasto a la reprogramación nuclear,

el trauma ejercido a las células durante su manipulación y las condiciones subóptimas del cultivo *in vitro* de embriones (Simmet *et al.*, 2021).

En las últimas décadas se han empleado fluidos oviductales (FO) y uterinos (FU) durante el cultivo *in vitro* de embriones, con la finalidad de aportar una amplia variedad de proteínas y factores de crecimiento, de los cuales carecen los medios de desarrollo embrionario (Cajas *et al.*, 2021; Coy *et al.*, 2022). Se ha reportado en bovinos y cerdos que la suplementación de FO y FU durante el cultivo *in vitro* mejora la calidad de los embriones producidos por FIV. Presentan menor nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO), mayor número de células en la etapa de blastocisto, aumento de la viabilidad embrionaria postvitrificación y el nivel de marcas epigenéticas es muy similar al de embriones producido *in vivo* (Barrera *et al.*, 2017; Canovas *et al.*, 2017; Lopera-Vasquez *et al.*, 2017; Hamdi *et al.*, 2018).

Por lo tanto, la finalidad del presente estudio fue determinar el volumen, la osmolaridad, la concentración y el patrón de distribución de las proteínas, así como la identificación de las proteínas: Glucoproteína específica del oviducto u Oviductina (OVGP1), proteína de choque térmico 70 (en inglés Heat Shock Protein 70 o HSP70) y la Ezrin (proteína asociada a los microfilamentos de actina en el citoesqueleto de la célula, que sirve como regulador de membrana y señalizador (Neisch y Fehon, 2011) de los FO y FU de ovejas en la fase lútea temprana del estro. Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración de FO y FU sobre el desarrollo embrionario y la calidad de embriones clones de *O. aries* en términos de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y del antioxidante glutatión reducido (GSH).

2. MARCO TEÓRICO

1.1 Anatomía y Fisiología del Oviducto

El oviducto de los mamíferos es una estructura altamente especializada que además de conectar al ovario con el útero, interviene en procesos fundamentales de la reproducción de las hembras. Anatómicamente se divide en cuatro segmentos (Senger, 2015): a) el infundíbulo con sus correspondientes fimbrias se encarga de captar al ovocito recién ovulado, b) el ámpula que es el segmento más prominente es el sitio donde ocurren la fertilización y el inicio del desarrollo embrionario, c) el istmo que tiene un diámetro menor que el ámpula, sirve como reservorio de los espermatozoides y d) la unión útero-tubárica que comunica al oviducto con el útero (Figura 1).

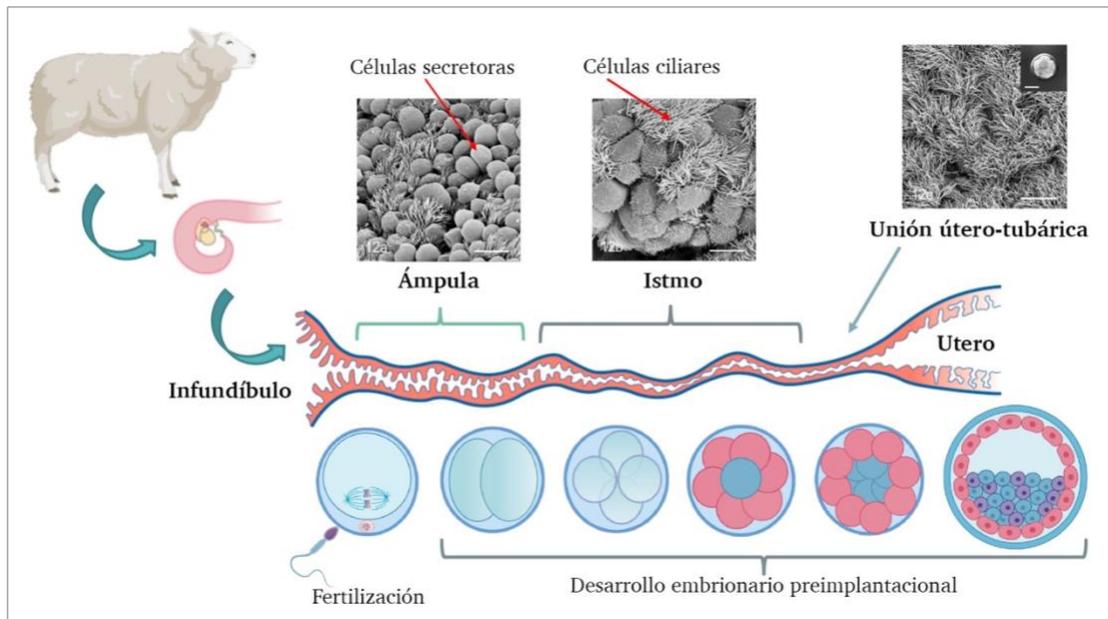


Figura 1. Anatomía del oviducto (Tomado y modificado de Hyttel *et al.*, 2010 y Kölle *et al.*, 2020).

De acuerdo a su anatomía microscópica, cada uno de estos segmentos se compone de cuatro capas, a) la capa más interna es la mucosa y se caracteriza por la presencia de pliegues primarios, secundarios y terciarios que varían dependiendo del segmento, b) después encontramos una capa de tejido conectivo ampliamente vascularizada e inervada, c) enseguida una capa de músculo liso, que a su vez está conformada por tres capas: una interna longitudinal, una intermedia circular y una externa longitudinal, d) finalmente está la capa serosa, conformada por mesotelio del peritoneo (Kölle *et al.*, 2020).

El epitelio del oviducto está constituido de células ciliares y células secretoras (no ciliares), cuyo número y proporción varían de una región a otra del oviducto (Figura 1). Se ha descrito tanto para el oviducto de hámster como el de vaca, que la población de células ciliares aumenta hacia las

áreas de las fimbrias del infundíbulo, mientras que la población de células secretoras aumenta en las áreas del ampulla y el istmo (Abe, 1996). La población de células secretoras es de aproximadamente del 65% y 50% en el ampulla del oviducto del hámster y de la vaca, respectivamente (Abe, 1996), denotando su papel fundamental durante la fecundación y en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

El movimiento coordinado de las células ciliares es importante para los procesos fisiológicos reproductivos tales como la capacitación espermática y el transporte de gametos y embriones. Por otra parte, la fisiología de las células secretoras está específicamente programada para la síntesis y secreción de diversas moléculas dentro del lumen oviductal (Binelli *et al.*, 2018).

1.2 Composición del Fluido Oviductal

El fluido oviductal es una mezcla compleja de sales inorgánicas y macromoléculas disueltas en agua, derivada de los componentes sintetizados de las células secretoras oviductales y del trasudado selectivo del plasma sanguíneo (Lee, 1988). Éste es el medio de transporte de gametos y embriones que suministra los componentes metabólicos necesarios y, a través del cual, se dará la comunicación e interacción con el oviducto (Li y Winuthayanon, 2017).

Se ha descrito que el FO contiene elevadas concentraciones de iones de potasio y bajas concentraciones de iones de calcio en comparación con el plasma; estas sales inorgánicas van a intervenir en los procesos de osmosis, así como también en la regulación del pH del FO en un rango de entre 7.5 a 8.0 (Lee, 1988). Por otra parte, el FO contiene varios componentes metabólicos tales como glucosa, lactato, piruvato y aminoácidos, cuyas respectivas concentraciones difieren del FU y el plasma sanguíneo (Avilés *et al.*, 2010).

1.2.1 Aminoácidos

Los aminoácidos son moléculas constituidas por un grupo amino, un grupo carboxilo y una cadena lateral o grupo R que es única para cada aminoácido. Teóricamente existen y pueden sintetizarse una gran variedad de aminoácidos, pero usualmente son 20 aminoácidos los involucrados en procesos biológicos, de los cuales nueve o diez son considerados esenciales y siete como no esenciales (Leese *et al.*, 2021). Los aminoácidos presentes en el FO actúan como precursores para la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos para el desarrollo embrionario, también funcionan como moléculas de señalización, osmolitos, antioxidantes, transportadores de electrones y son una fuente de energía (Saint-Dizier *et al.*, 2019).

Todos los aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, están presentes en el FO de los mamíferos, entre los cuales la alanina, glicina, glutamato y lisina se encuentran en mayor concentración que en el plasma sanguíneo (Saint-Dizier *et al.*, 2019). Por ejemplo, en el caso del FO

de la oveja, la alanina y la glicina representan el 45% del total de los aminoácidos (Wales, 1973). Otros aminoácidos que se encuentran en cantidades considerables son: la valina, lisina, glutamina, arginina, isoleucina y fenilalanina (Hill *et al.*, 1997).

Dentro de estos aminoácidos, la cisteína, glicina y el ácido glutámico son los precursores del tripéptido glutatión, cuya forma reducida es GSH, el cual es un antioxidante no enzimático que se encuentra en concentraciones de milimoles (1-10 mM) en las células de los mamíferos, incluyendo a los ovocitos (Averill-Bates, 2023).

1.2.2 Lípidos

A pesar de que los carbohidratos son la principal fuente de energía para los embriones, los lípidos acumulados en los ovocitos y embriones sirven como una fuente potencial de energía, además de su papel en la proliferación y diferenciación celular (Shi y Sirard, 2022). Las secreciones oviductales contienen una variedad de lípidos tales como el colesterol, triglicéridos y ácidos grasos. En el FO de la vaca se han identificado glicerofosfolípidos y esfingolípidos, que son lípidos comunes de la membrana plasmática y participan en diferentes vías de señalización. El FO además contiene L-carnitina que participa en la beta oxidación de los lípidos, así como también albumina y lipoproteínas de alta y baja densidad que son acarreadores de lípidos (Saint-Dizier *et al.*, 2019).

1.2.3 Proteínas

Con el surgimiento de la proteómica, que describe a todas las proteínas expresadas por un genoma (Wilkins *et al.*, 1996), se han identificado, cuantificado y separado las proteínas de diferentes organismos por medio de técnicas que van desde el Western Blot, y el ELISA, hasta técnicas más sofisticadas y complejas como la cromatografía y la espectrometría de masas. A partir de ellas se ha analizado el proteoma de los fluidos reproductivos en diferentes especies domésticas, enfocados principalmente a la regulación hormonal en las diferentes etapas del ciclo estral, la interacción gameto-maternal, la comunicación materno-embriónica, el desarrollo folicular y la fertilidad (Itze-Mayrhofer y Brem, 2020).

Las proteínas se clasifican en diferentes grupos: (i) factores de crecimiento, citocinas y receptores, (ii) hormonas y receptores, (iii) proteasas e inhibidores, (iv) agentes antioxidantes, (v) agentes de defensa, (vi) glicosidasas y glicosil-transferasas, (vii) otras enzimas, (viii) chaperonas y proteínas de choque térmico, (ix) otras proteínas, (x) proteoglicanos y glucosaminoglicanos y, (xi) otros componentes (Avilés *et al.*, 2010).

En el fluido cervical, uterino y oviductal de la oveja se han identificado 749, 827 y 624 proteínas, respectivamente (Figura 2A), las cuales se encuentran en diferentes compartimentos celulares (Figura 2B) y participan en diversas funciones celulares (Figura 2C). Durante el estro, las

proteínas más abundantes del FO son la Oviductina (OVGP1), la isocitrato deshidrogenasa que participa en el ciclo de Krebs, el factor de elongación 1- α 1 imprescindible para la biosíntesis de proteínas, la proteína de choque térmico de 71 kDa perteneciente a la familia de proteínas de respuesta al estrés, la proteína ϵ 14-3-3 y la anexina A8, que es una proteína de unión al Ca^{2+} relacionada con la organización y estructura de los fosfolípidos de la membrana plasmática y con las proteínas del citoesqueleto. Mientras que en la fase lútea, las proteínas con mayor abundancia son la macrobulina α -2, que funciona como anticoagulante y promueve la proliferación celular, la ceruloplasmina, que es una proteína transportadora de cobre, la gelsolina que es una proteína involucrada en el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, la transferrina que es una proteína transportadora de hierro y el factor B del complemento, que participa en la proliferación y pre-activación de los linfocitos B (Soleilhavoup *et al.*, 2016) (Tabla 1).

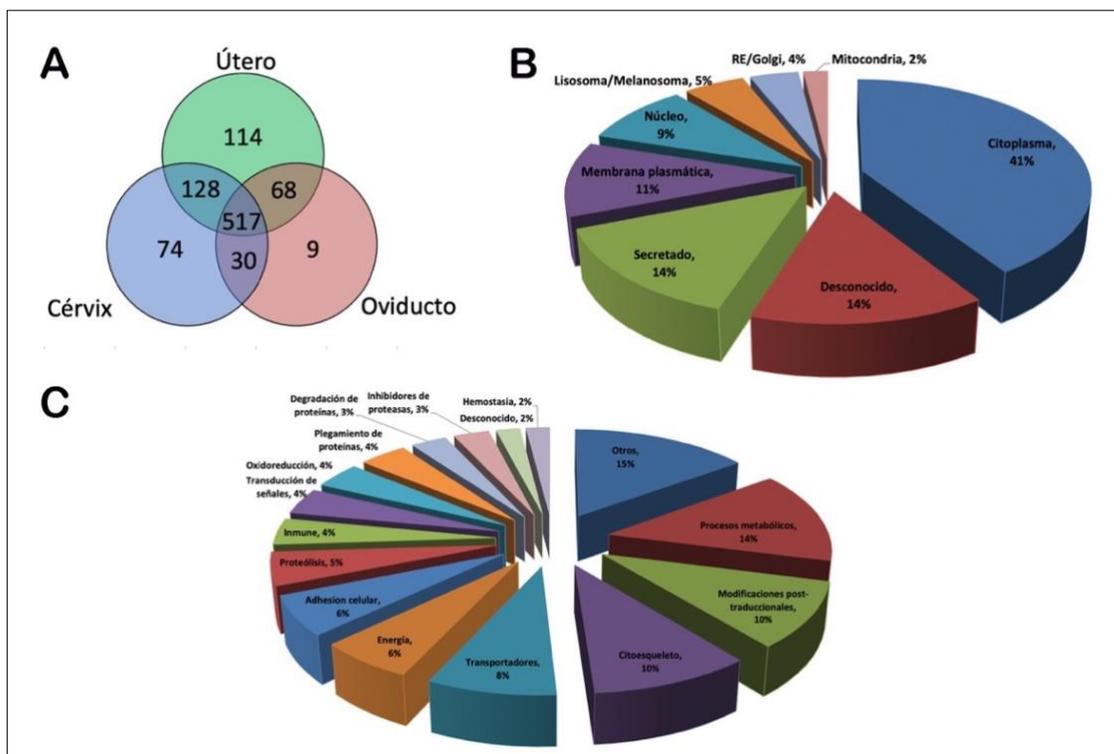


Figura 2. Clasificación de las proteínas más abundantes del cérvix, oviducto y útero de la oveja. A) Número de proteínas específicas y comunes entre el cérvix, oviducto y útero. B) Origen celular de las proteínas. C) Clasificación de la función celular de las proteínas (Tomado y modificado de Soleilhavoup *et al.*, 2016).

El oviducto de las hembras de los mamíferos está bajo cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos durante el ciclo estral. La secreción de algunas moléculas parece responder a la influencia cíclica de las hormonas, mientras que otras son secretadas a un ritmo constante. Ha sido sugerido que

existe un gradiente en la secreción de las proteínas oviductales, desde el infundíbulo a través del ámpula y hacia el istmo, incluso algunas claras distinciones en la misma región (Buhi *et al.*, 2000).

Tabla 1. Proteínas oviductales más abundantes durante el estro y la fase lútea en la oveja.

Proteínas más abundantes			
Estro		Fase lútea	
Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
OVGP1	Glucoproteína específica del oviducto	α 2M	Macroglobulina-2-Alpha
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa	CP	Ceruloplasmina
HSPA8	Proteína de choque térmico de 71 kDa	GSN	Gelsolina
EEFA1	Factor de elongación 1- α 1	TTR	Transtiretina
YWHAE	Proteína ϵ 14-3-3	CFB	Factor complejo B
ANXA8	Anexina A8	LTF	Lactotransferrina

(Soleilhavoup *et al.*, 2016).

1.3 Ciclo Estral de la Oveja

El ciclo estral es una secuencia de eventos endocrinos regulados por el hipotálamo que secreta GnRH, la adenohipófisis que produce FSH y LH, el ovario y sus respectivas estructuras como los folículos que producen estradiol (E2) e inhibina (INHA) y los cuerpos lúteos que secretan progesterona (P4) y oxitocina (OXT) y, finalmente el útero que es responsable de la secreción de las prostaglandinas F2 α y PGE2 (Cortez y Gallegos, 2014).

La oveja es una especie con mayor actividad sexual a finales del verano y en otoño, para que los partos tengan lugar en primavera, el momento más favorable para la supervivencia de los corderos. En este periodo de actividad reproductiva, la oveja presenta una sucesión de ciclos estrales (intervalo de tiempo entre dos celos consecutivos) con una duración media de 17 días, y una variación entre 16 y 19 días (Abecia y Forcada, 2010).

Tomando como día 0 el inicio del celo, el ciclo estral se puede dividir en dos fases, la fase lútea (días 1-12) y folicular (días 13-17) (Figura 3). Durante la fase lútea los niveles plasmáticos de P4 aumentan gradualmente hasta alcanzar niveles de entre 1 y 5 ng mL⁻¹ a partir de los días 6 y 7 del ciclo. Esto ocurre después de la ovulación, cuando el folículo de Graaf se llena de sangre para constituir el cuerpo hemorrágico que, por influencia de la LH, estimula la proliferación y la transformación de las células de la granulosa del folículo roto en células luteínicas que conformarán el cuerpo lúteo (CL), aproximadamente al 4^o día del ciclo. En esta fase se producen en promedio tres ondas de crecimiento folicular, las dos primeras concluirán con atresia folicular, mientras que la

última dará lugar al folículo que ovulará en el siguiente ciclo estral (Abecia y Forcada, 2010; Hernández y Fernández, 2010).

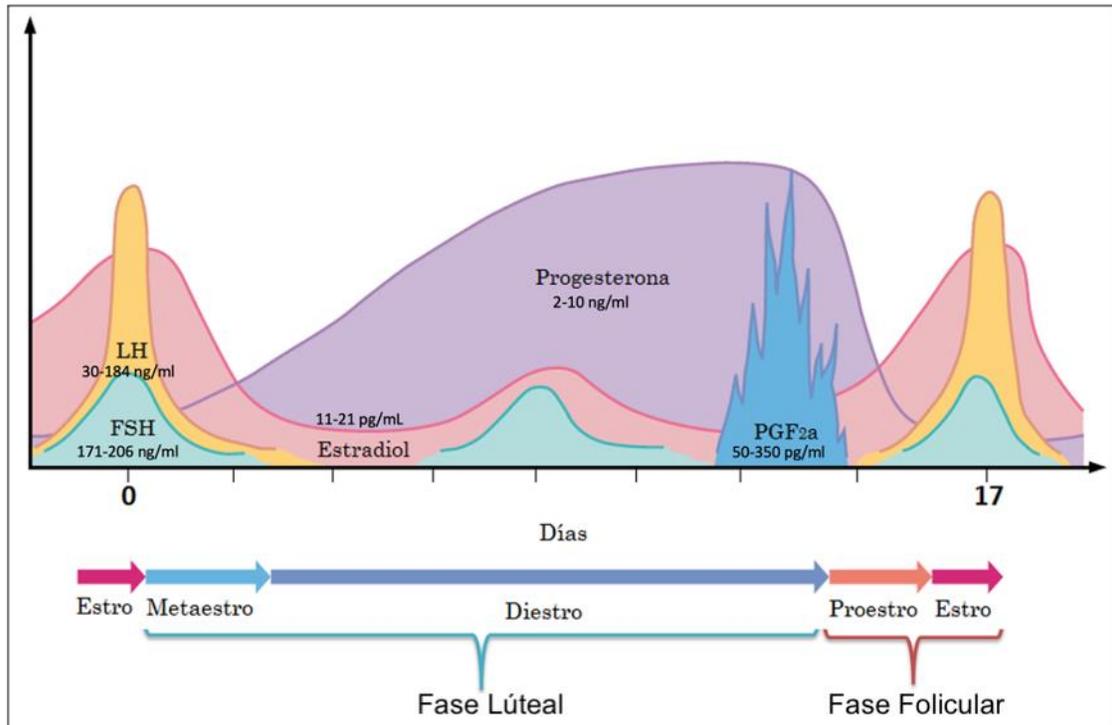


Figura 3. Ciclo estral de la oveja (Tomado y modificado de Hyttel *et al.*, 2010).

Si no se produce una gestación durante la fase lútea, el CL secretará OXT que provocará la descarga de $PGF2\alpha$ por el endometrio. Son necesarios al menos cinco pulsos de $PGF2\alpha$ para que se produzca la lisis del CL y así finalice la fase lútea, para iniciar la siguiente fase. Durante la fase folicular, se intensifica la frecuencia de los pulsos de GnRH y LH, debido a la caída de los niveles plasmáticos de P4 tras la lisis del CL, la frecuencia de los pulsos de GnRH y LH puede llegar hasta a 1 pulso/h. El aumento de la frecuencia pulsátil de LH, facilita la maduración final de los folículos en crecimiento con lo que a su vez incrementarán los niveles de E2 producidos por los mismos. Esto dará lugar a las manifestaciones externas del comportamiento de celo que preceden el pico preovulatorio de LH, el cual se asocia con un aumento notable del flujo sanguíneo al ovario y al folículo dominante, aumentando la presión folicular que culmina con la ovulación (Abecia y Forcada, 2010).

1.4 Desarrollo Embrionario Temprano

La reproducción de las especies es el resultado de una serie de procesos biológicos que involucran la fecundación del ovocito por el espermatozoide y la unión de ambos genomas para comenzar el desarrollo de un nuevo individuo. Las etapas del desarrollo entre la fecundación y el nacimiento reciben el nombre de embriogénesis, misma que se divide en dos principales etapas: el

desarrollo embrionario temprano o pre-implantacional y el desarrollo embrionario tardío o post-implantacional (Gilbert, 2023).

El desarrollo embrionario temprano comienza con la segmentación del cigoto, en mamíferos el plano de la primera división es meridional, mientras que, en la segunda división, uno de los blastómeros se divide meridionalmente y el otro ecuatorialmente (Gilbert, 2023). Durante la segmentación, las divisiones mitóticas no presentan fase de crecimiento celular, por lo cual, el tamaño de los blastómeros resultantes es cada vez menor, de tal forma que el volumen del embrión se mantiene, mientras que el número de células aumenta. El número de los blastómeros puede variar por las divisiones asincrónicas del embrión; es decir, no todos los blastómeros se dividen al mismo tiempo, por lo que se pueden encontrar embriones con un número de blastómeros impar (Hyttel *et al.*, 2010).

Después de algunos ciclos de división, los blastómeros forman una esfera llamada mórula, cuyos blastómeros externos comienzan a compactarse más que los blastómeros centrales, dividiéndose en blastómeros externos e internos. La compactación de los blastómeros externos es estabilizada por uniones estrechas que se forman a partir de moléculas de adhesión celular como la cadherina-E y complejos de proteínas tales como claudinas y ocludinas. Estas uniones sellan el interior del embrión, dejando confinados a los blastómeros internos, los cuales establecen comunicación entre ellos por medio de uniones GAP, que permiten el flujo de iones y pequeñas moléculas (Gilbert, 2023; Senger 2015).

El embrión en estadio de mórula compacta experimenta un proceso de cavitación, en donde las células externas transportan Na^+ al espacio intersticial de las células internas para crear un gradiente de concentración. Esto genera que al interior de la mórula compacta se almacene agua por ósmosis y se forme una cavidad denominada blastocele (Sanger, 2015).

En este momento el embrión recibe el nombre de blastocisto, el cual está conformado por dos tipos celulares: las células del trofoblasto que se encuentran en el exterior formando un epitelio y las células de la masa celular interna (MCI) que se forman en un polo dentro del embrión (Hyttel *et al.*, 2010). A partir de las células del trofoblasto se derivarán la mayoría de los tejidos extraembrionarios que forman a la placenta, mientras que las células de la MCI darán lugar al hipoblasto y epiblasto. A partir de este último se derivarán las tres capas germinales que darán origen a todos los tipos celulares que forman propiamente al embrión. También del epiblasto se derivarán las células germinales primordiales y parte de los anexos embrionarios (Sanger, 2015).

Las células del blastocisto siguen dividiéndose y el blastocele aumenta de tamaño conforme se llena de líquido hasta alcanzar un tamaño considerable, en esta etapa el blastocisto está listo para eclosionar de la ZP. El proceso de eclosión está regulado por diferentes mecanismos en donde las

células del trofoblasto secretan enzimas proteolíticas que debilitan y adelgazan la ZP, mientras que las células del blastocisto comienzan a expandirse y contraerse para hacer presión sobre la ZP, para generar una fisura a través de la cual saldrá el embrión (Hyttel *et al.*, 2010).

Por otro lado, el citoplasma del cigoto, derivado del ovocito, contiene todos los elementos necesarios (transcritos, proteínas, orgánulos, etc.) para iniciar con las primeras divisiones del embrión, las proteínas y transcritos son degradados gradualmente conforme avanza el desarrollo y en determinada etapa del desarrollo se activará el genoma del embrión y tomará el control de las subsecuentes etapas del desarrollo embrionario. El genoma del embrión inicia con una limitada transcripción que aumenta posteriormente, esto ocurre en dos fases que son específicas para cada especie, la activación menor y mayor del genoma embrionario (Hyttel *et al.*, 2010).

En los ovinos la activación del genoma embrionario ocurre en la etapa de 8-16 células, en esta etapa el embrión se encuentra en el oviducto y en etapa de mórula pasará al útero, en donde alcanzará la etapa de blastocisto, la cual se subdivide a su vez en temprano, expandido y eclosionado dependiendo de su progreso (Abecia y Forcada, 2010) (Tabla 2).

Tabla 2. Etapas de desarrollo embrionario preimplantacional en ovinos

Lugar de desarrollo	Etapas de desarrollo	Tiempo (horas)
Oviducto	Inicio del celo	0
	Ovulación	24-30
	2 blastómeros	56
	4 blastómeros	60
	8 blastómeros	72
Útero	16 células: mórula	96
	48 células (44-150): mórula	120
	100 células (44-150): blastocisto temprano	144
	200 células (138-308): blastocisto expandido	168
	400 células (150-550): blastocisto eclosionado	192
	400 células (250-650): blastocisto eclosionado	216

(Tomado y modificado de Abecia y Forcada, 2010)

1.5 Tecnologías de Reproducción Asistida en Ovinos

Las tecnologías de la reproducción asistida (TRA) tienen como finalidad incrementar la diseminación de animales genéticamente superiores, disminuir el intervalo generacional y aumentar la productividad (Falchi *et al.*, 2022). Entre los pequeños rumiantes tenemos a los ovinos, la cual es una especie rústica; es decir, está adaptada a condiciones climáticas adversas sin que éstas alteren su

función reproductiva y productiva (Simões *et al.*, 2021), lo cual ha permitido su diseminación en diferentes áreas geográficas del planeta. Las ovejas son poliéstricas estacionales, es decir, presentan varios ciclos estrales durante la estación reproductiva (otoño-invierno); debido a esta restricción reproductiva, las TRA han sido de gran utilidad para mejorar la ganancia genética en esta especie (Amiridis y Cseh, 2012).

Entre las TRA adaptadas a los ovinos, se encuentra la IA, así como la producción *in vivo* e *in vitro* de embriones. La producción *in vivo* de embriones conlleva el control hormonal del ciclo estral, la superovulación de las ovejas donadoras y la IA con semen congelado o fresco; con esta estrategia se induce una ovulación múltiple y la transferencia de los embriones (MOET, por sus siglas en inglés) (Amiridis y Cseh, 2012; Smith *et al.*, 2017; Falchi *et al.*, 2022).

La producción *in vitro* de embriones por FIV en ovinos se puede dividir en tres etapas, a) la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV); que implica la obtención de los complejos ovocitos-*cumulus* de hembras *in vivo* por ovum pick up (OPU), o a partir de ovarios *Post mortem*, b) la FIV; en la cual se utiliza semen fresco o descongelado y, finalmente, c) el cultivo *in vitro* de embriones; en el que se tiene la opción de emplear un medio permanente, o medios secuenciales entre los cuales se encuentra el fluido oviductal sintético (SOF, por sus siglas en inglés) (Zhu *et al.*, 2018, Falchi *et al.*, 2022).

El medio SOF puede emplearse como medio permanente si se utiliza la misma formulación durante todo el cultivo *in vitro*, o también puede ser un medio secuencial si se emplean dos formulaciones (SOF-1 y SOF-2), cada una aportará los requerimientos metabólicos de acuerdo a la etapa de desarrollo embrionario (Walker *et al.*, 1996; Gardner y Lane, 2014).

1.6 Generación de Embriones Clones en Ovinos

Entre estas biotecnologías, está también la clonación de embriones, que consiste en generar individuos genéticamente idénticos entre sí. Algo que ocurre en la naturaleza como estrategia reproductiva del armadillo (*Dasyus novemcinctus*) es que a partir de un sólo embrión (poli-embrión), se generan cuatro crías idénticas. En este sentido, lo que sucede en la naturaleza se ha tratado de imitar en el laboratorio. Es así como la clonación de embriones puede verse desde diferentes perspectivas, una vertical y otra horizontal (Navarro-Maldonado *et al.*, 2003). La primera comprende las técnicas de separación de blastómeros y bipartición de embriones en diferentes etapas del desarrollo embrionario temprano, para generar gemelos homocigóticos (Casser *et al.*, 2019). La segunda, implica un proceso de reprogramación nuclear y contempla la TNCS, a partir de la cual se generan individuos de manera asexual; para esto se requiere de una célula somática (diploide) que done la información genética contenida en su núcleo, esta se denominará “carioplasto”, y un ovocito desprovisto de núcleo, cuyo citoplasma sirva de receptáculo para el núcleo donado al que se le llamará “citoplasto” (Gurdon, 2013) (Figura 4).

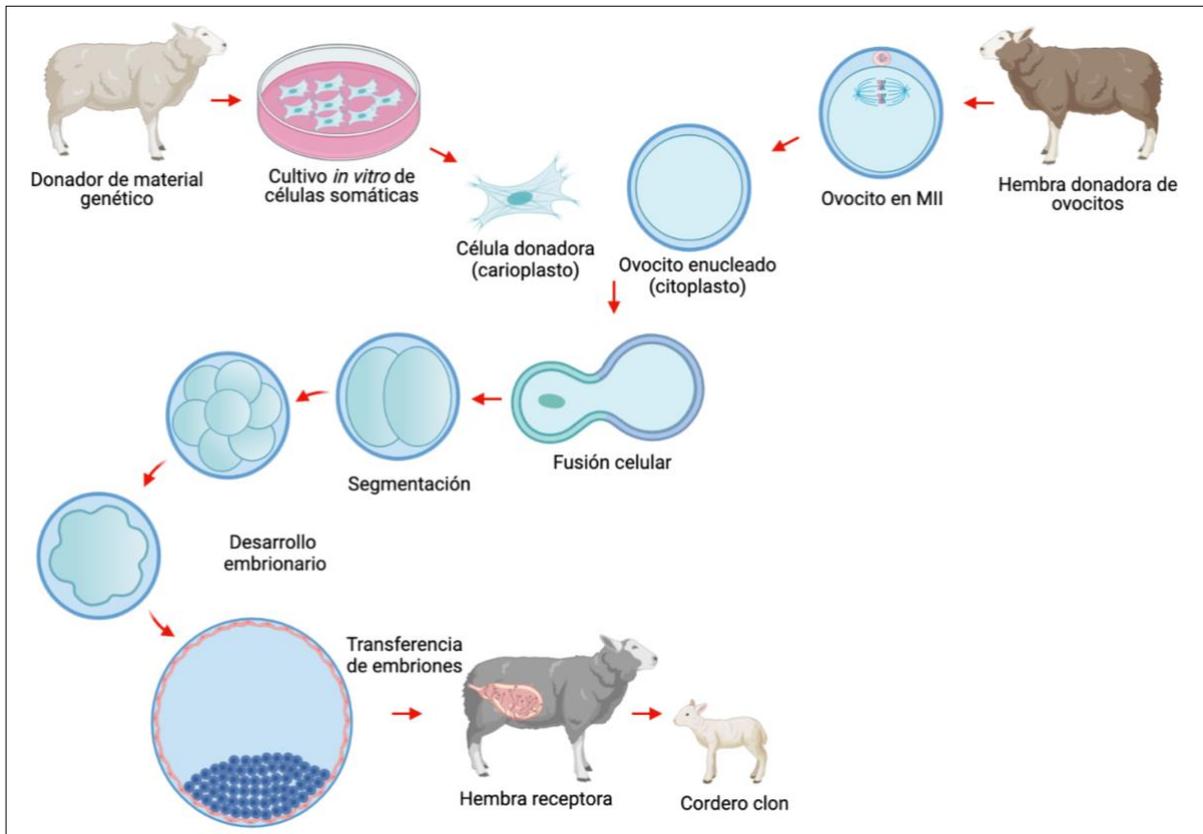


Figura 4. Proceso de transferencia nuclear de células somáticas en ovinos (Diseño propio).

1.6.1 Transferencia Nuclear de Células Somáticas (TNCS)

La manipulación de los ovocitos y de las células somáticas durante el proceso de TNCS se realiza de manera convencional con el uso de los micromanipuladores (Wilmot *et al.*, 1997), con la pipeta de sujeción e inyección se retira el material nuclear del ovocito y se coloca la célula somática dentro del espacio perivitelino o se inyecta directamente dentro del citoplasma del ovocito (Galli *et al.*, 2002). Sin embargo, se desarrollaron mejoras técnicas a la TNCS convencional; una de éstas es retirar la zona pelúcida (ZP) del ovocito después de la MIV (Lagutina *et al.*, 2007). La ZP es una matriz extracelular que cumple con diferentes funciones, entre las cuales está proteger al embrión, por lo cual, durante el proceso de enucleación y fusión, es necesario atravesar la ZP. Si ésta se elimina, facilita la manipulación del ovocito en un breve lapso (Oback *et al.*, 2003; Lagutina *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha implementado la enucleación asistida químicamente que consiste en utilizar agentes químicos como la demecolcina, que inhiben la polimerización de los microtúbulos del huso meiótico y, como consecuencia, induce la externalización de la placa metafásica en forma de protuberancia a nivel de membrana plasmática, de tal manera que se logra enuclear al ovocito sin la necesidad de utilizar tinciones como el Hoechst y exponerlo a luz UV, como sucede en el método convencional (Yin *et al.*, 2002).

A principios del año 2000, surgió la técnica de clonación manual (en inglés Handmade cloning o HMC), que prescinde del uso de micromanipuladores para la TNCS. Ésta se basa en utilizar ovocitos libres de ZP facilitando su enucleación asistida químicamente; en donde la porción de citoplasma con el material genético se elimina mediante un corte transversal con una micronavaja (Vajta *et al.*, 2001); o se puede retirar con una pipeta Pasteur alargada, aspirando la placa metafásica y aprovechando la tensión superficial que existe entre el medio de cultivo y el aceite mineral (Hosseini *et al.*, 2013). Con esta técnica el tiempo requerido para la enucleación es menor, lo cual permite procesar una cantidad mayor de ovocitos en un tiempo relativamente corto. Por otro lado, la fusión entre el carioplasto y el citoplasto es más eficiente (Khan *et al.*, 2018), de tal manera que se obtiene un mayor porcentaje de embriones reconstruidos (Liu *et al.*, 2015). Respecto a la eficiencia en la obtención de crías nacidas vivas, es igual o mejor en algunos casos que la TNCS convencional (Cortez *et al.*, 2018).

1.6.2 Eficiencia del desarrollo *in vivo* e *in vitro* de embriones por TNCS

Mediante la TNCS se han clonado diferentes especies de mamíferos domésticos y silvestres (Borges y Pereira, 2019); sin embargo, la eficiencia en términos de crías recién nacidas por embrión generado sigue siendo baja (Vajta, 2018). Loi *et al.* (2016) realizaron una revisión de los artículos publicados sobre la TNCS desde 1997 hasta 2015, los cuales reportan una eficiencia del 0.5 al 1% de nacimientos de crías vivas, en especies de granja. En este contexto, el ovino ha sido una de las especies de mamífero modelo para la investigación en TNCS, por su costo moderado de mantenimiento, fácil manejo y periodo de gestación relativamente corto (5 meses), en comparación con otras especies mayores de interés zootécnico (Loi *et al.*, 2013).

Desde la publicación del estudio del nacimiento de la oveja Dolly en 1997 hasta el 2023, se han publicado 124 artículos indexados en la web de las ciencias (WOS por sus siglas en inglés) sobre reproducción de ovinos mediante TNCS, de los cuales el 95% son artículos de investigación y el 5% restantes son artículos de revisión (Vazquez-Avendaño *et al.*, 2023).

Los estudios de TNCS en la especie ovina de los últimos años, reportan una eficiencia del 5.3 al 42%, desde el inicio de la segmentación hasta embriones en etapa de blastocisto (Tabla 3). En la mayoría de los estudios se utilizó la técnica convencional de clonación y solo en algunos se empleó la clonación manual. Los tipos celulares utilizados como carioplastos fueron células del *cumulus* y fibroblastos tanto de origen fetal como de individuos adultos (Tabla 3).

La mayoría de los estudios sobre TNCS en ovinos se han enfocado en mejorar el estado epigenético de los embriones clones (Tabla 3). Por ejemplo, se ha reportado que el tratamiento con scriptaid, un inhibidor de las deacetilasas de histonas (Su *et al.*, 2000), aumentó la tasa de blastocistos en un 17% (Wen *et al.*, 2014). En contraste, cuando se usaron células madre pluripotentes inducidas

(iPCs, por sus siglas en inglés) como carioplastos, afectó negativamente la tasa de blastocistos (-8%, German *et al.*, 2015). Mientras que otros tratamientos no tuvieron efecto alguno sobre la tasa de blastocistos.

Tabla 3. Eficiencia en la producción *in vitro* de embriones de oveja mediante TNCS.

Método de clonación	Tipo celular	Tratamiento	Tasa de blastocistos (%) N/ES		Cambio (%)	Referencia
			Antes	Después		
Convencional	FF	-	11.5 37/323	-	-	Li <i>et al.</i> (2021)
	FFT	-	13.1 31/236	-	-	
Convencional	FF	Agregación embrionaria	16 186/1192	13 703/5510	-3	McLean <i>et al.</i> (2021)
Convencional	CC	Zebularina y scriptaid	21.16 100/463	28.25 129/455	7.09*	Fang <i>et al.</i> (2020)
Convencional	FA ^D	Vitamina C	17.9 41/233	25.9 57/219	8*	Zhang <i>et al.</i> (2020b)
	FA ^{BM}	Vitamina C	32.3 39/114	42 52/122	7.7*	
Convencional	CC	Zebularina	11.8 12/101	25.4 30/117	13.2*	Cao <i>et al.</i> (2019)
Convencional	FF	Chaetocina	9.8 8/96	10.6 11/106	0.8	Zhang <i>et al.</i> (2018b)
Convencional	FFT	KDM4D	11.3 17/157	19.2 31/162	7.9*	Zhang <i>et al.</i> (2018c)
Convencional	FA	-	5.3 5/105	-	-	Khan <i>et al.</i> (2018)
HMC	FA	-	12.5 8/59	-	-	
Convencional	FF	iPSCs	10 17/178	2 3/158	-8*	German <i>et al.</i> (2015)
Convencional	FA	-	14.6 15/103	-	-	Ma <i>et al.</i> (2013)
Enucleación Manual	FA	-	11.2 323/36	-	-	Hosseini <i>et al.</i> (2013)
Convencional	CC	Scriptaid	8.6 5/59	25.7 17/66	17.1*	Wen <i>et al.</i> (2014)
Convencional	FF	BIX01294	18.7 10/53	18.3 11/63	-0.4	Fu <i>et al.</i> (2012)
Convencional	FF	-	22.6 83/367	-	-	Heidari <i>et al.</i> (2010)
	CC	-	23.6 27/114	-	-	

Número de blastocistos (N). Embriones segmentados (ES). Handmade cloning (HMC). Dorper (^D). Booroola Merino (^{BM}). Fibroblastos fetales (FF). Fibroblastos adultos (FA). Fibroblastos fetales transgénicos (FFT). Células del *cumulus* (CC). Diferencia estadísticamente significativa (*p < 0.05).

Para el caso de crías recién nacidas, la eficiencia es del 5.7 al 15% por blastocisto transferido, y del 7.1 al 19.5% por embrión segmentado (Tabla 4). Como se ha mencionado anteriormente, esta

baja eficiencia se debe a factores intrínsecos y extrínsecos de la técnica de clonación (Simmet *et al.*, 2021; Malin *et al.*, 2022).

Tabla 4. Eficiencia de corderos nacidos mediante TNCS.

Método de clonación	Tipo celular	Tratamiento	Corderos (%)		Incremento (%)	Referencia
			N	ET		
Convencional	FF	Agregación embrionaria	9 11/120 BT	15 21/138 BT	6*	McLean <i>et al.</i> (2021)
Convencional	CC	Reducción de suero e ionómicina	0 0/11 CE	7.1 1/14 CE	7.1**	Demir <i>et al.</i> (2019)
Convencional	FF	-	22 8/36 FR	-	-	Koroghli <i>et al.</i> (2018)
Convencional	FT	-	10 23/232 CE	-	-	Li <i>et al.</i> (2016)
Convencional	FF	-	19.5 16/82 CE	-	-	Rutigliano <i>et al.</i> (2015)
HMC	FT	-	5.7 3/53 BT	-	-	Zhang <i>et al.</i> (2013)
Convencional	FA	CR1aa vs SOFaa	0 0/24 FR	15.3 4/26 FR	15.3	Xue <i>et al.</i> (2011)
Convencional	FF	Extractos de ovocitos [§]	3.1 2/65 BT	14.7 10/68 BT	11.6**	Rathbone <i>et al.</i> (2010)

Número de embriones (N). Embriones transferidos (ET). Embriones segmentados (CE). Blastocistos (BT). Hembras receptoras (FR). Medio Charles Rosenkrans suplementado con aminoácidos (CR1aa). Medio fluido sintético oviductal suplementado con aminoácidos (SOFaa). [§]Extractos de ovocitos de *Xenopus laevis*. Fibroblatos fetales (FF). Fibroblastos adultos (FA). Fibroblastos transgénicos (FT). Células del *cumulus* (CC). Diferencia estadísticamente significativa (*p < 0.045 o **p < 0.05).

Entre estos posibles factores, las investigaciones de los últimos años se han centrado en la reprogramación incompleta del núcleo somático; es decir, al inadecuado silenciamiento de los genes específicos del tipo celular somático utilizado y la inadecuada activación en espacio y tiempo de los genes que coordinan el desarrollo embrionario temprano. Esto se basa en el hecho de que los embriones generados por TNCS presentan alteraciones a nivel epigenético y en consecuencia en la expresión de dichos genes, en comparación con los embriones producidos por FIV (Sood *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020), los cuales han alcanzado eficiencias mayores (59%) en el desarrollo a etapa de blastocisto (Zhu *et al.*, 2018) y en el nacimiento de crías, del 41.1% (Loi *et al.*, 2006).

Los corderos clones se han obtenido utilizando principalmente la técnica convencional de clonación y fibroblastos fetales como carioplastos (Tabla 4). La tasa de nacimientos de corderos clones ha mejorado cuando se aplican las siguientes mejoras: agregación embrionaria en etapa de mórula (McLean *et al.*, 2021), sincronización del ciclo celular por reducción de SFB y activación con

ionomicina (Demir *et al.*, 2019), medio SOF con aminoácidos durante el cultivo de embriones (Xue *et al.*, 2011) y la reprogramación del núcleo somático con extractos de ovocitos de rana (*Xenopus laevis*) (Rathbone *et al.*, 2010, Tabla 4).

2. ANTECEDENTES

Hasta el momento, la TNCS es la única biotecnología que tiene el potencial de generar nuevos individuos a partir de la unión de una célula somática terminalmente diferenciada con el citoplasma de un ovocito. Sin embargo, aun cuando en ovinos la eficiencia en la producción de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto es alta (5.3 al 42%), después de su transferencia, pocos son los embriones (5.7 al 15%) que llegan a término de la gestación (Vazquez-Avendaño *et al.*, 2022), comparada con la FIV (41%) (Loi *et al.*, 2006). Sin embargo, es más alta que con la inyección intracitoplásmica de espermatozoide (ICSI) (8.9%) (López-Saucedo *et al.*, 2012), lo cual se debe a problemas en la descondensación del núcleo del espermatozoide y la subsecuente formación del pronúcleo masculino (Hernández-Pichardo *et al.*, 2016).

Entre las posibles causas de la baja eficiencia de la TNCS, se encuentra la ineficiente reprogramación del núcleo celular somático. Para mejorar este proceso se han empleado diversos reguladores epigenéticos, tales como: inhibidores de las deacetilasas de histonas, la expresión exógena del gen que codifica para la protamina 1 en las células somáticas, la inyección de desmetilasas de histonas, incluso la adición de ácido ascórbico que también funciona como regulador epigenético, entre otros (Czernik *et al.*, 2019; Simmet *et al.*, 2021; Malin *et al.*, 2022).

Diferentes investigaciones han tenido éxito en la obtención de crías clones recién nacidas, cuando realizan la transferencia de embriones en etapas muy tempranas del desarrollo, de cigoto o de dos células (Williams *et al.*, 2000; Folch *et al.*, 2009). De tal manera que los embriones clones tienen una exposición temprana al medio oviductal y uterino, en donde se encuentran diferentes moléculas, las cuales favorecen el desarrollo embrionario.

Por otra parte, diferentes grupos de investigación han recuperado fluido oviductal (FO) y uterino (FU) a partir de tractos reproductivos de bovinos (Cebrian-Cerrano *et al.*, 2013; Lopera-Vasquez *et al.*, 2017; Barrera *et al.*, 2017; Hamdi *et al.*, 2018;) y porcinos (Canovas *et al.*, 2017), durante la fase lútea temprana (LTE) y tardía (LTA) del ciclo estral, y han evaluado su efecto en el desarrollo de embriones obtenidos por FIV.

Lopera-Vasquez *et al.* (2017) analizaron el efecto de diferentes concentraciones de FO (0.625, 1.25 y 2.5%), durante el cultivo *in vitro* de embriones de bovino obtenidos por FIV. Observaron que el grupo de embriones suplementado con bajas concentraciones de FO (0.625 y 1.25%), aumentó significativamente el porcentaje de embriones en etapa de blastocisto (27.5% a ambas concentraciones, $P < 0.05$) a los 9 días de cultivo, con respecto al grupo tratado con 2.5% de FO (22.7). Sin embargo, no fue diferente al grupo testigo (27.7%, $P > 0.05$).

La adición secuencial de FO y FU recuperado de la fase folicular tardía y de la fase lútea temprana, respectivamente, durante el cultivo *in vitro* de embriones de porcino producidos por FIV,

aumentó la proporción de embriones en etapa de blastocisto expandido y en proceso de eclosión (0 vs. 15.4%, respectivamente a $P<0.05$), así como de eclosionados (0 vs. 5.1%, respectivamente a $P<0.05$). También se observó que el porcentaje de metilación global de los blastocistos cultivados con FO y FU fue similar al de los blastocistos obtenidos *in vivo* (11.09 vs. 12.33%) (Canovas *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha observado que el FO tiene un efecto favorable sobre la criotolerancia de los blastocistos de bovino obtenidos por FIV y vitrificados. Después del calentamiento de los embriones vitrificados, los grupos tratados con concentraciones de 0.625 y 1.25% de FO, presentaron un mayor porcentaje de reexpansión (53.6 y 57.7%), con respecto al grupo tratado con 2.5% de FO (36.1%, $P<0.05$) (Lopera-Vasquez *et al.*, 2017). También se ha observado que la adición secuencial de FO y FU, tiene un efecto positivo a largo plazo sobre la sobrevivencia embrionaria después del calentamiento de embriones vitrificados. El 62.8% de los blastocistos del grupo experimental, se mantuvieron viables a las 48 y 72 h de cultivo, mientras que en los blastocistos de los grupos testigos (SFB y BSA), la viabilidad decayó paulatinamente conforme el tiempo de cultivo transcurría. El grupo con SFB pasó de 41.1 a 31.6% de viabilidad ($P<0.05$) y el grupo con BSA pasó de 73.3 a 64.8% de viabilidad ($P>0.05$) (Hamdi *et al.*, 2018).

Se ha observado que los embriones tratados con FO y FU, presentan un mayor número de células en su composición. Lopera-Vasquez *et al.* (2017) cultivaron embriones de bovino obtenidos por FIV en medio de desarrollo suplementado con 1.25 y 0.625% de FO. Observaron que el número de células de los blastocistos fue significativamente mayor (165.1 y 156.2, $P>0.05$), con respecto a los grupos testigos con y sin SFB (143.1 y 127.7). Además, se ha observado que los blastocistos de porcino obtenidos por FIV y tratados con FO y FU, presentan un número de células similar al de los blastocitos obtenidos *in vivo* (81.8 vs. 87) (Canovas *et al.*, 2016).

Hamdi *et al.* (2018) observaron que los embriones cultivados con FO y FU presentaron una disminución significativa ($P<0.001$) en la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) con respecto a los grupos testigos suplementados con SFB y BSA. Esto debido a la disminución de la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (CLIC1) y la enzima glutatión peroxidasa (GPX1).

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la TNCS permite obtener individuos genéticamente idénticos a otro, dándole un potencial en especies productivas de alto valor genético; sus tasas de éxito son bajas. En ovinos, el 42% de embriones alcanzan la etapa de blastocisto, el 46% logran implantarse y se obtienen 15% de crías nacidas. Este último resultado es inferior a lo que ocurre en FIV (41.4%).

Por lo anterior, la utilización de fluidos oviductales y uterinos durante el desarrollo *in vitro* ofrece una alternativa, para mejorar tanto el desarrollo embrionario temprano como la calidad embrionaria.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será la calidad de los embriones clones de *Ovis aries* cultivados en presencia de fluido oviductal y uterino?

5. HIPÓTESIS

Dado que los fluidos oviductal y uterino contienen elementos que favorecen el desarrollo y mejoran la calidad de los embriones producidos *in vitro*, la suplementación de éstos durante el cultivo *in vitro* de embriones clones de *Ovis aries*, mejorará la calidad embrionaria.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

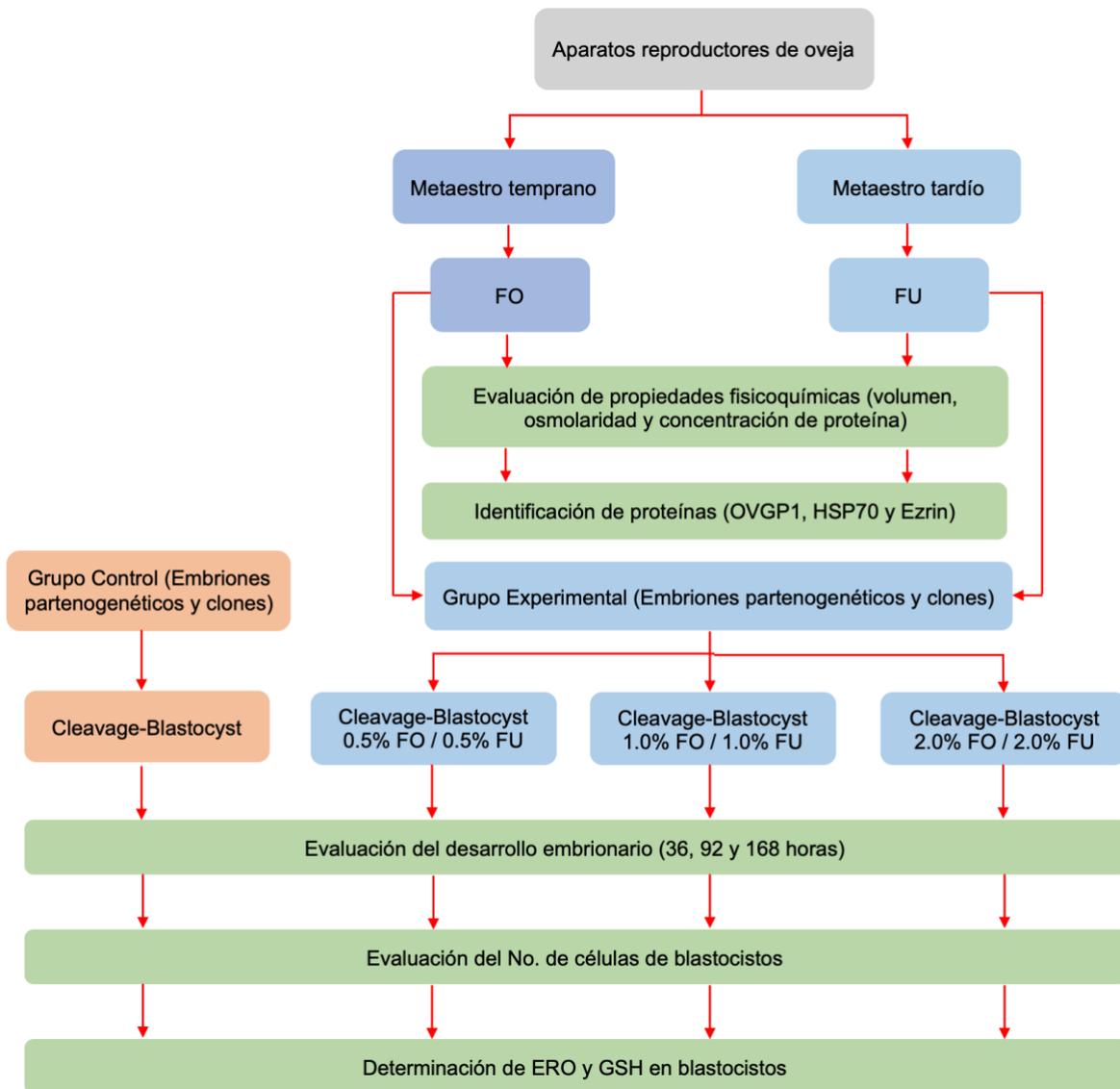
Determinar el efecto de los fluidos oviductal (FO) y uterino (FU) sobre la producción *in vitro* de embriones clones de *Ovis aries*.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar algunas propiedades fisicoquímicas de los FO y FU (volumen, osmolaridad y concentración total de proteínas).
- Identificar algunas proteínas presentes en los FO y FU.
- Determinar el efecto de los FO y FU sobre el desarrollo y la calidad de los embriones clones de *O. aries*.
- Evaluar el efecto de los FO y FU sobre la generación de ERO y GSH en los embriones clones de *O. aries*.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental consistió en cuatro grupos de embriones cultivados con diferentes concentraciones de FO y FU, a los cuales se les evaluó la tasa de desarrollo embrionario, el número de células en etapa de blastocisto y se determinó la concentración intracelular de ERO y GSH de acuerdo con el siguiente esquema.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Reactivos y condiciones de incubación

Todos los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma-Aldrich®, a menos que se indique lo contrario. En el presente estudio, las condiciones de incubación para los cultivos celulares, maduración *in vitro* de ovocitos y desarrollo embrionario *in vitro* fueron de 38.5 °C, 5% de CO₂ y humedad a saturación.

8.2. Obtención de fluido oviductal y fluido uterino

Los fluidos oviductales (FO) y uterinos (FU) se obtuvieron a partir de aparatos reproductores de ovejas adultas criollas (*Ovis aries*), recolectados en un rastro local del Estado de México. Siguiendo la metodología descrita por Carrasco *et al.* (2008), los aparatos reproductores se obtuvieron inmediatamente después de la apertura de la cavidad abdominal y se transportaron en bolsas de plástico desinfectadas, a temperatura de 8 °C. Una vez en el laboratorio, los aparatos reproductores se lavaron en medio DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline, In Vitro S.A., CDMX, México) estéril con 1% de antibiótico-antimicótico (10,000 UI de penicilina; 10,000 µg mL⁻¹ de estreptomina; 25 µg mL⁻¹ de anfotericina B en solución de NaCl al 0.85%, In Vitro S.A., CDMX, México) a 4 °C.

Posteriormente, se clasificaron con base en la morfología del ovario, para determinar la fase del ciclo estral (Figura 5). Se seleccionaron aquellos aparatos reproductores con ovarios con forma regular sin presencia de quistes. La fase lútea se dividió en metaestro temprano y tardío, la fase temprana se determinó por la presencia de cuerpos hemorrágicos, mientras que la fase tardía se determinó por la presencia de cuerpos lúteos en desarrollo (Senger, 2015).

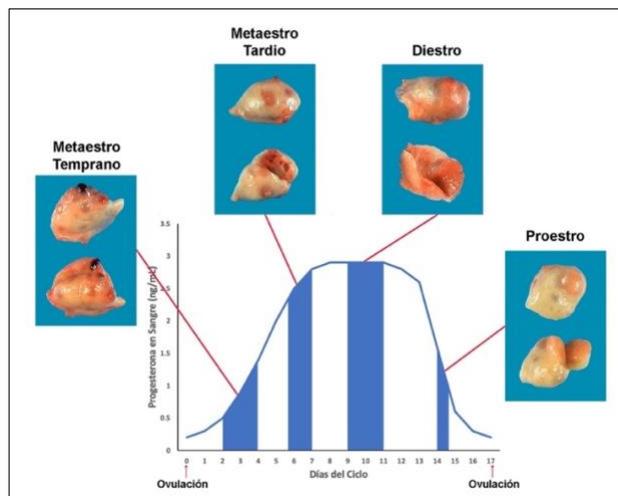


Figura 5. Ciclo estral de la oveja en función del incremento de progesterona por parte del cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Senger, 2015).

Los fluidos se recuperaron del oviducto y cuerno uterino ipsilateral al ovario con presencia de cuerpos hemorrágicos y cuerpos lúteos en desarrollo, respectivamente. Después de que se clasificaron los aparatos reproductores, los ligamentos suspensorios se diseccionaron y se seccionó la unión útero-tubal para separar al oviducto del cuerno uterino. Los oviductos y los cuernos uterinos se mantuvieron en PBS estéril con 1% de antibiótico-antimicótico a 4 °C.

Para la extracción del FO, se siguió la metodología descrita por Carrasco *et al.* (2008), con algunas modificaciones. Sobre una superficie plana previamente desinfectada, se colocó el oviducto y se comprimió con un portaobjetos desde la unión útero-tubal hacia el ámpula, colocando una pinza para evitar el regreso del fluido. Enseguida se introdujo una pipeta Pasteur pulida al fuego para recuperar el FO, el cual se depositó en un tubo de microcentrifuga de 300 µL. La muestra se centrifugó a 2000 x g por 5 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 7000 x g por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó y se almacenó a -80 °C hasta el momento de su utilización. Para la obtención del FU, se colocó el cuerno uterino verticalmente para que el fluido descendiera por gravedad hasta la unión útero-tubal, inmediatamente después se introdujo una pipeta Pasteur pulida al fuego y se recolectó el FU. Éste se colocó en un tubo de 300 µL y se procesó y almacenó de igual manera que el FO.

Se utilizaron 42 aparatos reproductores de ovejas domésticas, de los cuales 32 se encontraban en metaestro temprano y 10 en metaestro tardío. De cada experimento se mezclaron los FO (2-7 aparatos reproductores) y FU (1-6 aparatos reproductores) y se obtuvieron en total 10 muestras de FO y 3 muestras de FU. Todas las muestras de FO y FU se recolectaron de enero a mayo de 2022 (invierno-primavera), que corresponden a la temporada reproductiva en las ovejas, y se almacenaron durante 8 meses a -80 °C. Las características fisicoquímicas de cada fluido (osmolaridad, concentración de proteínas totales y proteínas OVGPI, HSP70, Ezrin) se determinaron después de su descongelación.

8.3. Evaluación de propiedades fisicoquímicas de los FO y FU

8.3.1. Evaluación de la Osmolaridad

Para determinar la osmolaridad de las muestras de FO y FU se utilizó un osmómetro Wescor (VAPRO-5520, Utah, EUA), previamente se calibró el equipo con tres soluciones estándar de 100, 290 y 1000 mmol kg⁻¹ (Wescor AO-010, 029 y 100, Utah, EUA). A continuación, se colocaron 10 µL de cada una de las muestras de FO y FU en el osmómetro (Pensyl y Benjamin, 1999).

8.3.2. Determinación de la concentración total de proteína

Se determinó la concentración total de proteína por ensayo de Bradford, mediante una curva de calibración con albumina sérica bovina (BSA) como estándar proteico, para lo cual se agregaron 500 μL de solución Bradford (Anexo) y 10 μL de cada concentración de la curva en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Para analizar los FO y FU, se hizo una dilución (1:10) con agua desionizada, se tomó 1 μL y se le agregaron 500 μL de solución Bradford y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se homogenizaron todas las muestras y se colocaron 200 μL de cada una de las concentraciones de la curva de calibración de BSA, así como de los FO y FU en las celdas de una placa de 96 pocillos (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Las muestras se analizaron con un espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm y los valores obtenidos se registraron para determinar la concentración total de proteína de los fluidos reproductivos (Bradford, 1976).

8.4. Identificación de proteínas presentes en los FO y FU

8.4.1. Separación de Proteínas

La separación de proteínas se realizó a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE por sus siglas en inglés), para lo cual se preparó un gel de poliacrilamida al 10% (Anexo). En un tubo de microcentrífuga se colocaron 10 μL de Buffer de corrimiento con 50 mg mL^{-1} de proteína de cada una de las muestras de FO y FU; se homogenizaron y se incubaron a 95 °C durante 5 min. Después se cargaron las muestras con buffer de carga (azul de bromofenol 0.1%, β -mercaptoetanol 2% v/v; Bio Rad) en cada pozo del gel de poliacrilamida junto con un marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa (Kaleidoscope, Bio Rad, California, EUA). Una vez colocada la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN, Bio Rad, California, EUA), se conectó a la fuente de poder (PowerPac 1645050, Bio Rad, California, EUA) y se compactaron las proteínas a 150 V por 15 min, posteriormente se dejaron correr a 120 V por 90 min.

8.4.2. Tinción con azul de Coomassie

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (Anexo) durante 1 h, en oscilación constante. Al finalizar el tiempo, se retiró el exceso de tinción mediante lavados con solución de metanol al 40% durante 15 min en oscilación hasta visualizar las bandas en el gel (Brunelle y Green, 2014).

8.4.3. Estimación del peso molecular de las bandas

Se tomaron fotografías de los geles con la ayuda de un fotodocumentador (Gel Logic 212 PRO, Carestream Health Inc. New Haven, EUA). Para el procesamiento de las imágenes, se utilizó

el software Gelanalyzer versión 19.1 (www.gelanalyzer.com, por Istvan Lazar Jr., PhD e Istvan Lazar Sr., PhD, CSc) para poder identificar el número de bandas en cada una de las muestras de FO y FU, así como la estimación del peso molecular (kDa) de cada una de las bandas presentes.

8.4.4. Western Blot

De cada una de las muestras de FO y FU se utilizaron 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de proteína en buffer de carga y se incubó a 95 °C por 5 min. Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (Anexo) a 120 V por 60 min. Posteriormente, se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore, IPVH00010, Darmstadt, Alemania) a 2.5 A, 25 V por 20 min en un dispositivo de transferencia (Trans-Blot Turbo, 1704155EDU, Bio Rad, California, EUA).

Una vez que se realizó la transferencia, la membrana fue bloqueada con una solución de leche con buffer TBS (Anexo) a una concentración de 0.08g/mL⁻¹ por 1 h en oscilación constante a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la membrana fue incubada con el primer anticuerpo (Ezrin: Cat. Sc-58758; HSP70: Cat. sc-66048; Oviductina: Cat. sc-377267, Santa Cruz Biotechnology, INC. Dallas, Texas, EUA) diluido en una solución de leche con buffer TBS (0.05g mL⁻¹) en oscilación constante durante toda la noche a 4 °C. Al término de la incubación, la membrana fue lavada con TBS Tween-20 (Anexo) (3 lavados por 10 min), y a continuación se incubó con el anticuerpo secundario (Anti-ratón IgG: Cat. 715-035-150; Jackson Immuno Research, Baltimore, EUA) durante 1.5 h en oscilación a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, la membrana fue lavada con TBS Tween-20 (3 lavados por 10 min). Al término de los lavados se agregó una mezcla de solución reveladora (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio Rad, California, EUA). La membrana se colocó en el fotodocumentador (Kodak Gel logic 200 Image System, Woodbridge, EUA), con una exposición de 3 min para su revelado. El programa que se utilizó fue Kodak 1D 3.6 Logic (Contreras *et al.*, 2018).

Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el software ImageJ (versión 1.53; Wayne Rasband, National Institute of Health, Kensington, MD, EUA). Este programa permite medir la intensidad de píxeles en una imagen, lo cual es especialmente útil en imágenes de Wester Blot, donde la intensidad de la señal puede correlacionarse con la cantidad de una sustancia específica. Se seleccionó una Región de Interés (ROI) alrededor de la región específica de la imagen en donde se desea analizar la intensidad de píxeles para generar un gráfico a partir de éstos, de tal manera que el programa proporcionó valores numéricos asociados con la ROI, los cuales están correlacionados con las proteínas de interés.

8.5. Los FO y FU en el desarrollo y la calidad de embriones clones

Para la TNCS por HMC de embriones de *O. aries*, se requieren de dos tipos celulares, las células somáticas que donarán su núcleo y de ovocitos enucleados que servirán de receptores citoplasmáticos. Para lo cual se efectuaron los siguientes métodos:

8.5.1. Deriva de fibroblastos de piel de oreja de ovino en cultivos primarios

Se obtuvo una muestra de piel de oreja de una oveja adulta (*Ovis aries*), proveniente de rastro, realizando un corte de 0.5 cm² del borde inferior de la oreja. La muestra se colocó en medio de transporte DPBS para su traslado bajo condiciones de refrigeración (10 °C). Una vez en el laboratorio, se eliminó la mayor cantidad de pelo de la muestra y fue desinfectada con una solución de cloro al 1% y alcohol al 70%. Posteriormente, el tejido se sometió a un proceso de disgregación enzimática, para lo cual se fragmentó el tejido con una hoja de bisturí (No. 22 Hergom CDMX, México) y se colocaron los fragmentos en un tubo cónico de 15 mL con una solución de 0.02% de colagenasas tipo I y II (17100-017 y 17101-015 Gibco, New York, EUA) y se incubaron a 38.5 °C durante 2 h en oscilación constante. Al finalizar, la solución obtenida se centrifugó a 500 x g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y el botón celular se sembró en una caja de Petri de 35 mm con 3 mL de DMEM-S (Dulbecco Modified Eagle Medium, In Vitro S.A., CDMX, México) suplementado con 2.3% de antibiótico-antimicótico, 10% de NCS (Newborn Calf Serum, por sus siglas en inglés, Biowest, S0750) y 13.6 mg de NaHCO₃. Las células se cultivaron durante 7 días o hasta alcanzar la confluencia (Navarro-Maldonado *et al.*, 2015).

8.5.2. Pasajes celulares

Una vez que los cultivos de fibroblastos alcanzaron la confluencia, se realizó un pasaje celular que consistió en retirar el medio de cultivo y lavar dos veces con 1 mL de DPBS, después se adicionó 1 mL de Tripsina (0.05/0.05% de Tripsina-Verseno, In Vitro, S.A., CDMX, México) a la caja de cultivo y se incubó por 5 min o hasta que las células se despegaron completamente. Después, se adicionó 1 mL de DMEM-S para inactivar la acción de la tripsina, la suspensión de células se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 500 x g por 5 min. Se decantó el sobrenadante y el botón celular se resembró en dos cajas de Petri con 3 mL de DMEM-S cada una, se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas. Cuando los cultivos alcanzaron el 4° pasaje celular, los fibroblastos fueron criopreservados de acuerdo con la técnica reportada por Navarro-Maldonado *et al.* (2015).

8.5.3. Criopreservación de fibroblastos

Se retiró el medio de cultivo a los fibroblastos y se lavaron con DPBS, siguiendo el mismo método que para los pasajes celulares hasta obtener el botón celular, el cual se resuspendió en 1 mL de medio de congelación de células (DMEM, 20% SFB, 10% de DMSO; In Vitro S.A., CDMX, México) y se congelaron a -80 °C por 24 h, después se almacenaron en tanques en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta el momento de su utilización.

8.5.4. Maduración *in vitro* de ovocitos de oveja

Los complejos ovocito-*cumulus* (COC) se obtuvieron a partir de ovarios de ovejas sacrificadas en un rastro local, trasladados al laboratorio en solución salina a base de 0.9% de NaCl a 38 °C. Una vez en el laboratorio, los folículos ováricos de 2 a 8 mm de diámetro se aspiraron con una aguja calibre 18 y una jeringa de 10 mL que contenía medio TCM-199 con Hepes (In Vitro S. A., CDMX, México) y suplementado con heparina (100 UI mL⁻¹). El líquido folicular aspirado se colectó en un tubo de fondo cónico de 15 mL, el cual se mantuvo a 38 °C, después se pasó a través de un filtro para células (100 µm, Biologix, Shandong, China) para separar los COC del resto del líquido folicular. Los COC se seleccionaron con base en su morfología y el número de capas de las células de la granulosa (Ward *et al.*, 2000).

Los COC seleccionados se colocaron en cajas de cultivo de 4 celdas (Nunc™) con 0.5 mL de medio de maduración *in vitro* (MIV), a base de TCM-199 (In Vitro S.A., CDMX, México) suplementado con cisteína (1.675x10⁻⁰⁴ g mL⁻¹), alcohol polivinílico (0.001 g mL⁻¹), D-glucosa (5.496x10⁻⁰⁴ g mL⁻¹), piruvato de sodio (1x10⁻⁰⁴ g mL⁻¹), 10% de FCS, eCG (5 UI mL⁻¹; Gonaforte Parfarm S.A., CDMX, México), FSH recombinante (0.1 UI mL⁻¹; Gonal-F Merck, Darmstadt, Alemania), EGF (10 ng mL⁻¹) y antibiótico-antimicótico (2%). Los COC se incubaron durante 20-21 h bajo las condiciones antes mencionadas.

8.5.5. Clonación manual de embriones

La HMC de embriones se llevó a cabo según lo descrito por Vajta *et al.* (2001 y 2006) con algunas modificaciones (Vazquez-Avendaño *et al.*, 2017; Hernández Martínez, *et al.* 2020). Una vez completada la MIV, los COC con las células del *cumulus* expandidas se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 500 µL de hialuronidasa (0.5 mg mL⁻¹ en TCM-199 con Hepes) por 8 min en incubación y los ovocitos se denudaron de las células del *cumulus*, por pipeteo suave con micropipeta (200 µL). Los ovocitos libres de ZP se colocaron en medio T2 (TCM-199 al 2% de NCS) y bajo el microscopio estereoscópico (Olympus, SZ61, Tokyo, Japón) se seleccionaron los ovocitos con primer cuerpo polar (CP), indicio de que se encontraban en la MII. Los ovocitos con CP se

incubaron en medio MIV con demecolcina ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 1 h bajo las condiciones antes mencionadas.

8.5.5.1. Preparación de los citoplastos

Sobre la tapa de una caja de Petri (60 mm), se colocaron gotas de 30 μL de T2, T10 (TCM-199 al 10% de NCS), T20 (TCM-199 al 20% de NCS) y de pronasa (2 mg mL^{-1} en T10). Las gotas se cubrieron con aceite mineral y en esta caja se obtuvieron los citoplastos. Una vez finalizada la incubación en demecolcina, los ovocitos se pasaron al medio T2, después a la pronasa por 5 min a 38°C , o hasta que la ZP fuera digerida por completo. Inmediatamente después, los ovocitos se colocaron en el medio T20 para inactivar la acción de la pronasa. Los ovocitos libres de ZP se distribuyeron en grupos de seis en cada una de las gotas de T10 y se enuclearon manualmente, utilizando una micronavaja (Professional Embryo Transfer Supply, Inc. Texas, EUA), bajo el microscopio estereoscópico. Para enuclearlos, los ovocitos se acomodaron en las gotas de manera que la extrusión de la placa metafásica y del CP quedaron orientados a las 9 h, de acuerdo con las manecillas del reloj (Figura 6A). Después se cortó la porción del citoplasma con el material genético del ovocito y los citoplastos así obtenidos, se colocaron en medio T20 para que recuperaran su forma esférica (Figura 6B).

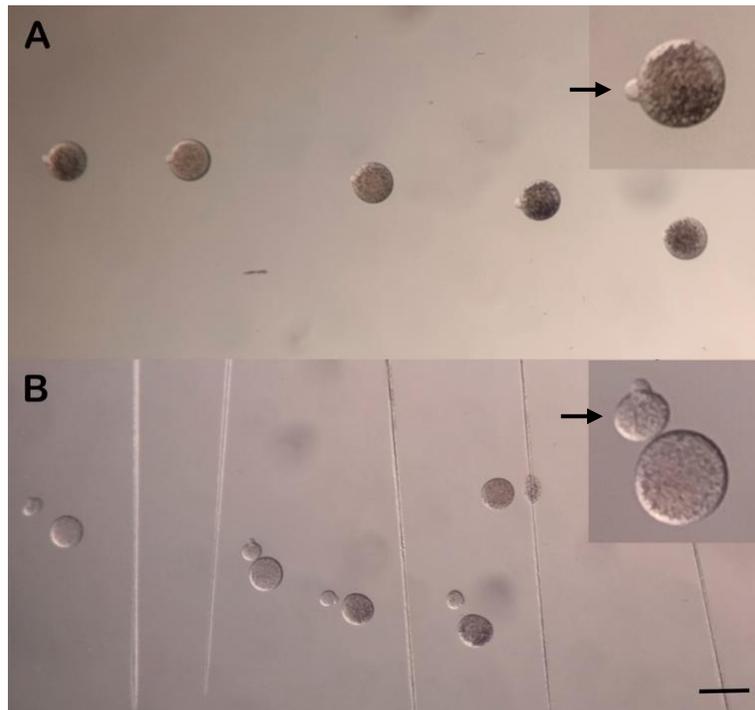


Figura 6. Enucleación de ovocitos en MII. A) Alineación de ovocitos para su enucleación. En la parte superior derecha se observa a detalle la orientación de la extrusión de la placa metafásica a las 9 h (flecha). B) Obtención de citoplastos por enucleación de ovocitos en MII, en la parte superior derecha se observa a detalle un citoplasto junto a la porción de citoplasma que contiene la placa metafásica (flecha). Aumento 45X. Barra de escala ($100 \mu\text{m}$).

8.5.5.2. Formación y fusión de tripletes

Sobre la tapa de una caja de Petri (35 mm) se colocaron gotas de 15 μL de T20, fitohemaglutinina (5 mg mL^{-1} en TCM-199 con HEPES), T2 y medio de fusión (0.3 M de D-manitol y 1 mg mL^{-1} de alcohol polivinílico, PVA) (Figura 7A). Los citoplastos y carioplastos se depositaron en las gotas de T20 y T2, respectivamente. Se tomaron grupos de cinco citoplastos y se depositaron en la gota de fitohemaglutinina por 3 s, después se colocaron en la gota T2 para formar parejas con los carioplastos (cario-citoplasto). Se formaron tripletes celulares con dos citoplastos y un carioplasto, colocando el carioplasto entre ambos citoplastos. Enseguida, se equilibraron en medio de fusión y se alinearon en el electrodo positivo de una cámara de fusión (0.5 mm de apertura, modelo 450, microslide, BTX, Massachusetts, EUA). Los tripletes se alinearon al electrodo mediante una corriente alterna (AC) constante de 5 V (Figura 7B), acto seguido se aumentó la AC a 9 V y los tripletes se fusionaron a través de un solo pulso de 2 kV/cm de corriente directa (DC) por 9 μseg , después se disminuyó la AC a 0 V. Los tripletes se colocaron en medio T20 para que formaran una sola célula (Figura 7C), mientras tanto, se repitió el proceso de fusión con los citoplastos restantes. Una vez que formaron una sola célula, se incubaron en medio para desarrollo embrionario (Cleavage, Cook Medical, Bloomington, EUA) por 1.5 h para dar tiempo a la reprogramación nuclear del carioplasto (Vajta *et al.*, 2006).

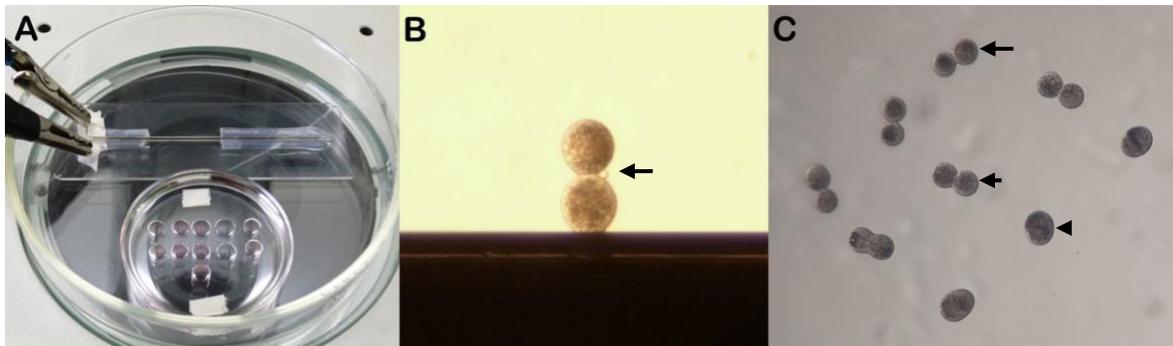


Figura 7. Fusión de tripletes. A) Sistema de fusión montado sobre un microscopio estereoscópico. B) Triplete celular alineado al electrodo positivo de la cámara de fusión. C) Reconstrucción de embriones clones después de la fusión, se puede apreciar diferentes progresos de la fusión de tripletes (triplete sin fusionar: flecha larga; triplete parcialmente fusionado; flecha corta; triplete completamente reconstituido: cabeza de flecha). Aumento 45X. Barra de escala (200 μm).

8.5.5.3. Activación

Las células fusionadas se trataron con una solución de ionóforo de Ca^{2+} A23187 (8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en T2 por 5 min bajo condiciones de incubación. Después se lavaron en T20 (3 lavados por 3 min). Finalmente, se incubaron individualmente en gotas de 2 μL de medio de desarrollo embrionario

(Cleavage) con 6-DMAP (2 mM) por 4 h. Finalizado el tiempo de incubación, los cigotos clones se lavaron 3 veces por 3 min en medio de desarrollo embrionario (Cleavage).

8.5.5.4. Cultivo *in vitro* de embriones clones en sistema WOW

De acuerdo con Vajta *et al.* (2008), los embriones clones libres de ZP se cultivaron en el sistema de micropozos (WOW, por sus siglas en inglés Well of the Well), que consistió en hacer micropozos con un punzón, dentro de una celda de una caja de 4 pozos y en cada uno de éstos se depositó un embrión (Figura 8). El medio de desarrollo embrionario fue Cleavage y al día 4 se cambiaron a medio Blastocyst (Cook Medical, Bloomington, EUA) y se cultivaron por 3 días más hasta la etapa de blastocisto. En el grupo experimental al medio Cleavage se le adicionó FO (0.5, 1.0 y 2.0%) y al medio Blastocyst se le agregó FU (0.5, 1.0 y 2.0%).

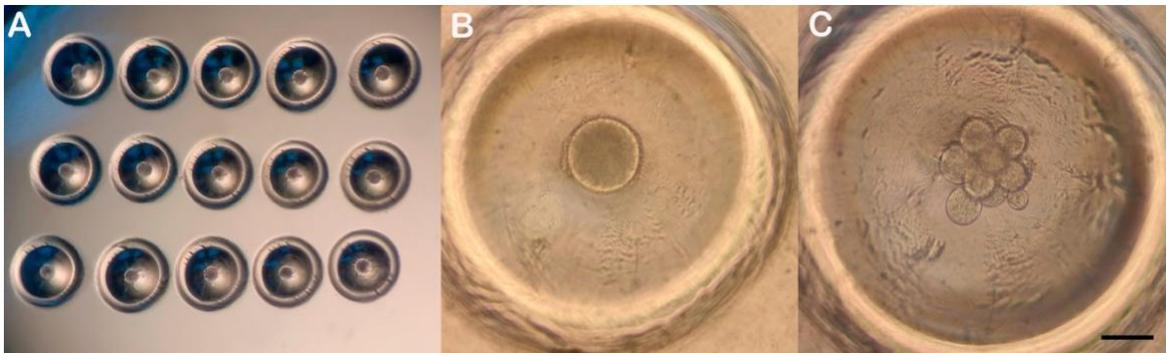


Figura 8. Cultivo *in vitro* de embriones A) Cultivo de cigotos clones en el sistema de micropozos o WOW. B) Cigoto dentro de un micropozo. C) Embrión de 8 células dentro de un micropozo. Aumento 200X. Barra de escala (100 μ m).

8.6. Producción *in vitro* de embriones partenogénéticos

Como control del sistema de cultivo, a la par de efectuar la TNCS por HMC, se produjeron embriones partenogénéticos, para lo cual, después de la MIV, se seleccionaron los ovocitos en MII y fueron activados siguiendo el mismo método descrito para los embriones clones. Los embriones partenogénéticos se dividieron en el grupo testigo (0.0% de FO y FU) y experimental (0.5, 1.0 y 2.0% de FO y FU) y se cultivaron con el mismo medio de desarrollo y bajo las mismas condiciones que los embriones clones.

8.7. Influencia de FO y FU en niveles de ERO y GSH en embriones clones

8.7.1. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y glutatión reducido (GSH)

Se efectuó un análisis cualitativo de los niveles de ERO y GSH en blastocistos de 7 días de cultivo, tanto de los embriones clones como partenogénéticos, de cada grupo tratado. Para ello se tiñeron utilizando 10 mM de 2',7'-dichlorodihydrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) para

determinar ERO, y 10 mM de Cell Tracker Blue 4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CMF₂HC Invitrogen, Eugene Oregon, EUA) para determinar GSH. Los blastocistos se lavaron en una solución de DPBS con PVA (1 mg mL⁻¹) y posteriormente se incubaron con H₂DCFDA y Cell Tracker Blue CMF₂HC a 38.5 °C por 30 min, en condiciones de oscuridad. Finalizado el tiempo, los blastocistos se montaron sobre cubreobjetos en solución de IMACEL (In Vitro S.A., CDMX, México), se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con barniz de uñas. Los blastocistos fueron observados bajo el microscopio de epifluorescencia y se utilizó un filtro de longitud de onda de 517-527 nm para observar la fluorescencia del compuesto 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que se produce por la oxidación del H₂DCFDA, de tal manera que entre más concentración de ROS mayor será la intensidad de fluorescencia. Para evaluar el GSH reducido se utilizó un filtro de 466 nm (Nadri *et al.*, 2022).

Para el análisis semicuantitativo se evaluó la intensidad de fluorescencia de los embriones teñidos, para lo cual se tomaron fotografías y se procesaron con el programa ImageJ de igual manera que las imágenes de Western Blot.

8.7.2. Tinción de núcleos con DAPI

Los blastocistos expandidos al día 7 de cultivo tanto de embriones clones como partenogénéticos y de cada uno de los grupos tratados, se lavaron en medio DPBS y se fijaron con paraformaldehído (4%) por 24 h a 8 °C. Al día siguiente, se permeabilizaron con Tritón X-100 (0.2%; Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) por 20 s y a continuación se incubaron con una solución (1 µg/mL) de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Los blastocistos se lavaron en TCM-199 con Hepes y BSA (3mg mL⁻¹) y se montaron sobre portaobjetos con solución de IMACEL, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con barniz de uñas. Los embriones se evaluaron bajo microscopio de epifluorescencia equipado con un filtro de longitud de onda de 460 nm para determinar el número de núcleos (Nadri *et al.*, 2022).

8.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como promedio ± error estándar (E.E.). Para determinar diferencias significativas entre las intensidades de color de las bandas de las muestras de FO y FU, se hizo un análisis de t-Student. La comparación entre las medias de las diferentes etapas del desarrollo embrionario, así como la media de la intensidad relativa de la fluorescencia de ERO y GSH, se analizó mediante una prueba de ANOVA de una sola vía. Para evaluar la posible relación entre ERO y GSH, se utilizó la prueba de correlación de Spearman. Las diferencias en todos los parámetros fueron consideradas significativas a un nivel de P<0.05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 9.5.1, Boston, EUA).

9. RESULTADOS

9.1. Evaluación del volumen, osmolaridad y concentración total de proteínas de los fluidos reproductivos (FO y FU)

Se recuperaron volúmenes de 135 μL (3.2 ± 1.5) de FO del metaestro temprano y 170 μL (17.0 ± 0.5) de FU del metaestro tardío de la fase lútea del ciclo estral de la oveja. La osmolaridad para el FO fue de 343 ± 20.8 mOsm kg^{-1} , mientras que para el FU fue de 280 ± 96.2 mOsm kg^{-1} . La concentración total de proteína del FO fue de 71.9 ± 23.8 g L^{-1} , mientras que la del FU fue de 21.8 ± 1.1 g L^{-1} .

9.2. Patrón de distribución de proteínas en los fluidos reproductivos (FO y FU)

En la Figura 6 se observa el patrón de distribución de proteínas de diez muestras de FO y dos de FU. El espectro de pesos moleculares de las bandas fue de 24 a 324 kDa para el FO y de 29 a 353 kDa para el FU. A partir de las muestras de FO, se identificaron 20 bandas, mientras que para el FU se identificaron 14 bandas, de las cuales 14 son específicas del FO y ocho bandas solo se presentaron en el FU. También se puede observar 11 bandas de proteínas que se presentan de manera consistente entre las muestras de FO, cuyos pesos moleculares corresponden a 375, 224, 94, 82, 70, 60, 38, 36, 30, 29 y 27 kDa. Finalmente se observaron seis bandas en común entre las muestras de FO y FU (Figura 7 y Tabla 5).

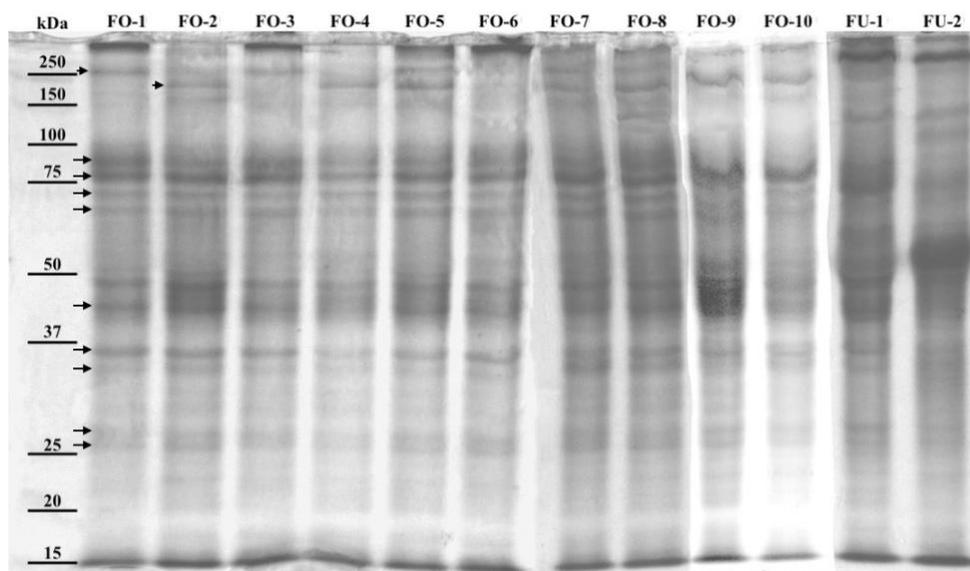


Figura 6. Patrón de distribución de las proteínas en los fluidos oviductales (FO-1 al FO-10) y uterinos (FU-1 y FU-2) de ovejas, obtenidas mediante SDS-PAGE. Se observan 10 bandas (señaladas con flechas) que se presentan de manera consistente en las 10 muestras de FO, cuyos pesos moleculares corresponden a 27, 29, 30, 36, 38, 60, 70, 82 y 94 kDa. Se observan dos bandas de 224 y 375 kDa que se presentan de manera alternada en las muestras de FO (señaladas con puntas de flecha).

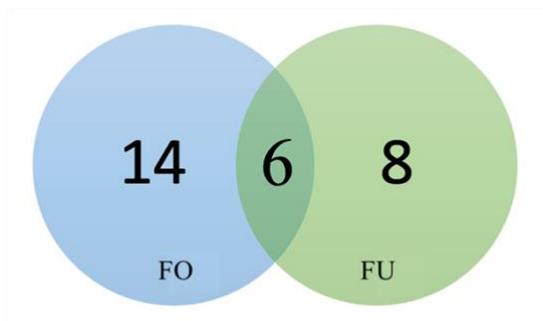


Figura 7. Diagrama de Venn de las bandas presentes en los FO y FU (Canela Morales y Ruiz Sosa, 2019).

Tabla 5. Pesos moleculares (PM) de las bandas de proteínas de los FO y FU.

No. de Bandas	Específicas del FO PM (kDa)	Específicas del FU PM (kDa)	En común PM (kDa)
1	324	353	73
2	315	284	37
3	306	138	34
4	228	111	28
5	200	47	27
6	188	42	26
7	83	39	
8	62	29	
9	54		
10	36		
11	35		
12	33		
13	32		
14	24		

FO: Fluido oviductal. FU: Fluido uterino. Peso molecular (PM), kiloDalton (kDa).

9.3. Identificación de las proteínas más abundantes en los FO y FU

El patrón de distribución de las proteínas del FO y FU (Figura 6), muestra diferentes tipos de proteínas, algunas de éstas son específicas para el FO y el FU, o comunes para ambos. Por lo tanto, se identificaron por Western Blot algunas proteínas que desempeñan un papel importante en el desarrollo embrionario, en donde las proteínas OVGPI, HSP70 y Ezrin se encontraron presentes en la mayoría de los FO y FU (Figura 8a). Sin embargo, dichas proteínas están en mayor concentración en el FO que en el FU (Figura 8b).

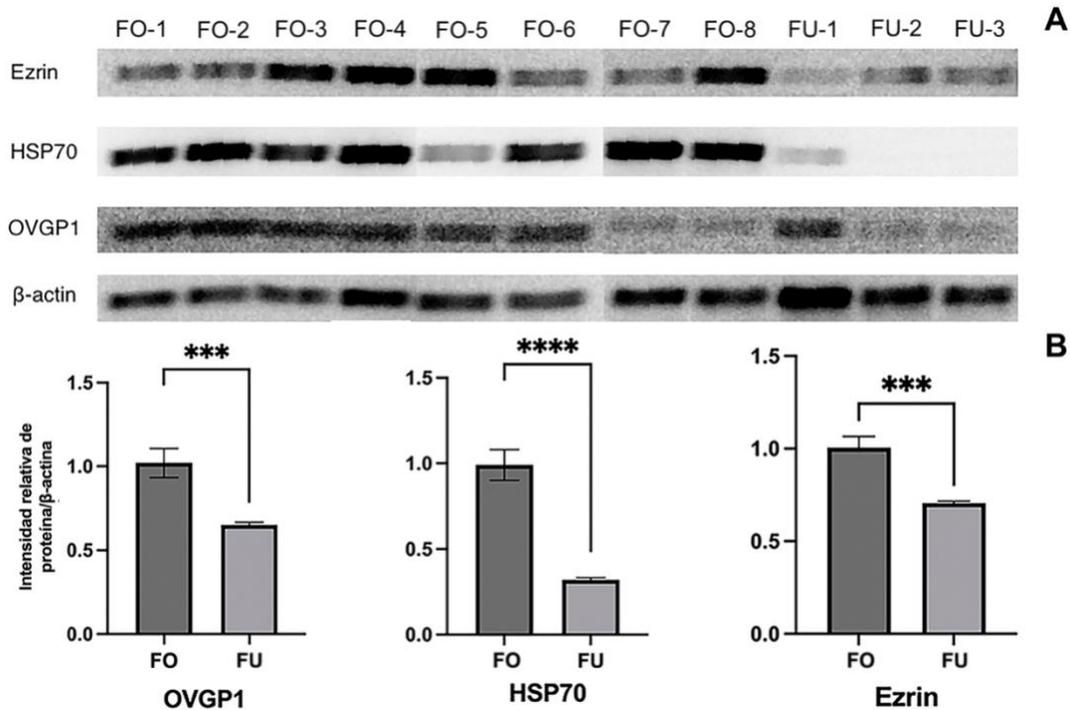


Figura 8. Presencia de proteínas OVGPI, HSP70 y Ezrin en muestras de fluido oviductal y uterino de oveja. a) Western Blot para la identificación de las proteínas de interés en muestras de FO (FO-1 al FO-8) y FU (FU-1 al FU-3), se utilizó β -actina como control positivo de la técnica. b) Evaluación de la concentración de OVGPI, HSP70 y Ezrin entre las muestras de FO y FU. ***($P \leq 0.0005$), ****($P = 0.0001$).

9.4. Resultados generales de MIV, enucleación, fusión y embriones reconstruidos

A partir de 632 ovarios de ovejas criollas colectados de rastro, se obtuvieron por aspiración folicular un total de 1417 complejos ovocitos-cumulus (COC) recuperándose en promedio 2.2 COC por ovario. Después de la MIV se obtuvieron 885 ovocitos viables, de los cuales 685 maduraron (77.9 %) y se utilizaron en el proceso de clonación (Tabla 6).

Tabla 6. Obtención y MIV de ovocitos

Exp.	COC	Ovocitos				
		No denudados	Dañados	Sin CP	Con CP	MIV %
1	243	7	153	19	64	77.1
2	205	0	79	3	123	97.6
3	169	2	68	21	78	78.8
4	170	0	38	34	98	74.2
5	179	0	44	39	96	71.1
6	211	0	94	30	87	74.4
7	240	15	32	54	139	72.0
Total	1417	24	508	200	685	
X ± E.E	202.4 ± 11.8	3.4 ± 2.2	72.6 ± 15.9	28.6 ± 6.2	97.9 ± 9.7	77.9 ± 3.4

Se realizaron 7 repeticiones. El porcentaje de MIV se obtuvo a partir de los ovocitos con y sin CP, sin considerar a los ovocitos dañados y no denudados.

Dentro de la técnica de clonación manual se encuentra la obtención de citoplastos que serán los receptores citoplasmáticos de las células somáticas. Se utilizaron 684 ovocitos madurados (CP) para la obtención de citoplastos, de los cuales 624 (91.2%) presentaron extrusión de la placa metafásica y fueron enucleados, se obtuvieron 494 (79.2%) citoplastos reconstituidos. Se formaron y fusionaron 238 (96.4%) tripletes y se obtuvieron 220 (92.4%) embriones reconstruidos (Tabla 7).

Tabla 7. Eficiencia de obtención de citoplastos, fusión de tripletes y embriones reconstruidos

Exp.	Ovocitos		Citoplastos reconstituidos n (%)	Tripletos fusionados n (%)	Embriones reconstruidos n (%)
	Con CP n	Enucleados n (%)			
1	64	60 (93.8)	46 (76.7)	22 (95.7)	19 (86.4)
2	123	109 (88.6)	63 (57.8)	31 (98.4)	26 (83.9)
3	78	73 (93.6)	54 (74)	26 (96.3)	24 (92.3)
4	97	90 (92.8)	77 (85.6)	37 (96.1)	34 (91.9)
5	96	92 (95.8)	71 (77.2)	34 (95.8)	33 (97.1)
6	87	80 (92)	77 (96.3)	36 (93.5)	34 (94.4)
7	139	120 (86.3)	106 (88.3)	52 (98.1)	50 (96.2)
Total	684	624 (91.2)	494 (79.2)	238 (96.4)	220 (92.4)
X ± E.E	97.7 ± 9.7	89.1 ± 7.8	70.6 ± 7.4	34 ± 3.6	31.4 ± 3.8

Se realizaron 7 repeticiones. Los ovocitos con CP y extrusión de la placa metafásica por acción de la demecolcina fueron enucleados para la obtención de citoplastos. El porcentaje de tripletes fusionados se obtuvo teniendo en consideración que por cada triplete se utilizaron dos citoplastos.

9.5. Efecto de los FO y FU en el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénéticos y clones

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo embrionario de los embriones partenogénéticos tratados con 0.5 y 1.0% de FO y FU con respecto al grupo testigo (Tabla 8). Si bien se observó que en la concentración de 2% hubo mayor tasa de embriones en etapa de 4 a 16 células en comparación con el grupo testigo (100 vs. 31.8%, $P > 0.05$), estos no continuaron su desarrollo a etapa de blastocisto (Tabla 8), por esta razón no se utilizó esta concentración en el desarrollo de embriones clones.

Tabla 8. Efecto de los FO y FU en el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénéticos de *O. aries*.

% FO-FU	n	Etapas del desarrollo embrionario (media ± E.E)				Fragmentados (media ± E.E)
		Segmentados	4-16 células	Mórulas	Blastocistos	
0.0	140	116 (81.6 ± 3.6) ^a	40 (31.8 ± 4.9) ^a	62 (52.7 ± 8.1) ^a	50 (44.9 ± 7.5) ^a	14 (18.6 ± 8.6) ^a
0.5	132	107 (81.1 ± 4.0) ^a	49 (45.4 ± 6.5) ^a	52 (46 ± 6.7) ^a	34 (35.7 ± 5.7) ^a	6 (10.3 ± 4.8) ^a
1.0	129	95 (71.5 ± 6.1) ^a	31 (37.6 ± 10.9) ^a	55 (54.9 ± 12.6) ^a	28 (28 ± 4.0) ^a	9 (9.3 ± 3.9) ^a
2.0	55	41 (67.3 ± 12.5) ^a	41 (100) ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^a

Se efectuaron seis repeticiones en cada tratamiento. La tasa de segmentación se determinó a las 36 h de cultivo *in vitro*. La tasa de embriones en las etapas de 4-16 células, mórulas y fragmentados se determinó a las 96 h. La tasa de blastocistos se determinó a las 168 h. Literales diferentes (^{a,b}) dentro de una misma columna, significan diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo embrionario de los embriones clones tratados con 0.5% de FO y FU con respecto al grupo testigo ($P > 0.05$, Tabla 9). En los embriones tratados con 1.0% de FO y FU se observó un aumento en la tasa de embriones en etapa de 4 a 16 células con respecto al grupo testigo (62.1 vs 27.9%, $P < 0.05$, Tabla 9). Sin embargo, se observó una disminución en la tasa de embriones en etapas de mórula y blastocisto con respecto al grupo testigo (27.9 vs 47.3% y 7.7 vs 28.1%, respectivamente; $P < 0.05$, Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de los FO y FU en el desarrollo *in vitro* de embriones clones de *O. aries*.

% FO-FU	n	Etapas del desarrollo embrionario (media ± E.E)				Fragmentados (media ± E.E)
		Segmentados	4-16 células	Mórulas	Blastocistos	
0.0	78	76 (97.1 ± 2.9) ^a	20 (27.9 ± 8.0) ^a	37 (47.3 ± 9.2) ^a	21 (28.1 ± 5.5) ^a	19 (24.8 ± 3.7) ^a
0.5	76	75 (99.1 ± 0.9) ^a	28 (36.8 ± 9.4) ^a	34 (45.1 ± 6.5) ^a	15 (21.2 ± 4.1) ^a	13 (18.1 ± 4.7) ^a
1.0	66	66 (100) ^a	41 (62.1 ± 7.0) ^b	18 (27.1 ± 7.0) ^b	5 (7.7 ± 3.0) ^b	7 (10.9 ± 4.0) ^a

Se efectuaron siete repeticiones en cada tratamiento. La tasa de segmentación se determinó a las 36 h de cultivo *in vitro*. La tasa de embriones en las etapas de 4-16 células, mórulas y fragmentados se determinó a las 94 h. La tasa de blastocistos se determinó a las 168 h. Literales diferentes (^{a,b}) dentro de una misma columna, significan diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

9.6. Efecto de los FO y FU en los niveles de ERO y GSH en embriones partenogénéticos y clones

En los blastocistos partenogénéticos tratados con 0.5% de FO y FU ($n = 8$) no se observaron diferencias significativas en los niveles de ERO y GSH con respecto al grupo testigo ($n = 8$) (Figura 9 y 10).

A 1.0% de FO y FU ($n = 11$), los niveles de ERO y GSH disminuyeron significativamente con respecto al grupo testigo ($P < 0.05$) (Figura 9, Figura 10A y 10C). A esta misma concentración, ambas variables presentaron una correlación positiva directamente proporcional ($r = 0.8727$; $P < 0.001$); es decir que, al aumentar los niveles de ERO también aumentan los de GSH y viceversa.

Como se mencionó anteriormente, a 2% de FO y FU, no hubo desarrollo de blastocistos en los embriones partenogénéticos.

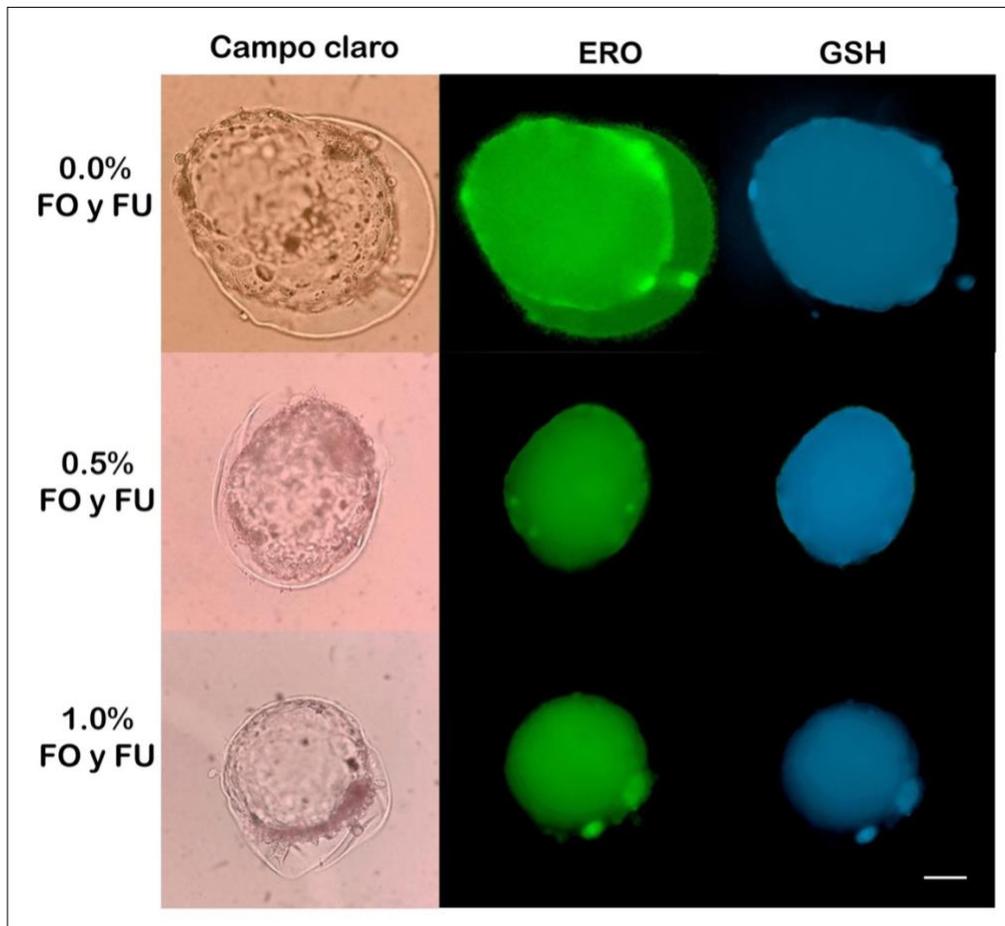


Figura 9. Evaluación de ERO y GSH en embriones partenogénéticos de *O. aries* tratados con FO y FU. Se observan fotografías en panel (campos claro y oscuro) de embriones en etapa de blastocisto.

Para las concentraciones de 0.0, 0.5 y 1.0% de FO-FU se evaluaron 8, 8 y 11 embriones. En fluorescencia verde presencia de ERO y en azul presencia de GSH. Aumento 100X. Escala de barra (200 μ m).

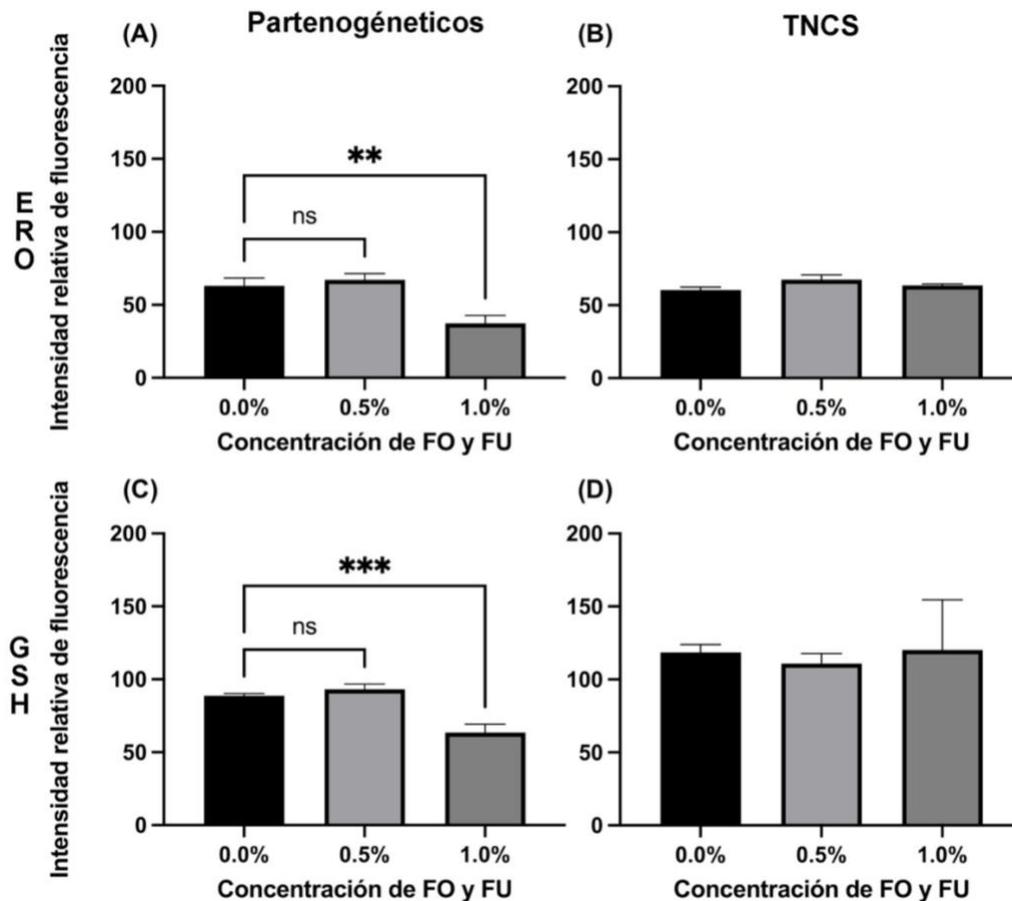


Figura 10. Análisis semicuantitativo del efecto de los FO y FU en los niveles de ERO y GSH en embriones partenogénéticos y clones de *O. aries* en etapa de blastocisto. Intensidad relativa de fluorescencia de ERO y GSH en blastocistos partenogénéticos (A y C) y Clones (B y D) (ImageJ). Las barras representan la media \pm E.E. *** P = 0.0009, ** P = 0.0032.

En los blastocistos clones no se observaron efectos en las diferentes concentraciones de FO y FU (0.5 y 1.0%, n =3) sobre los niveles de ERO y GSH, con respecto al grupo testigo (n =3) (Figura 11, Figura 10B y D). En los blastocistos del grupo testigo los niveles de ERO y GSH presentaron una correlación negativa inversamente proporcional ($r = -0.8095$; $P < 0.022$); es decir que, al aumentar los niveles de GSH, disminuyen los de ERO y viceversa.

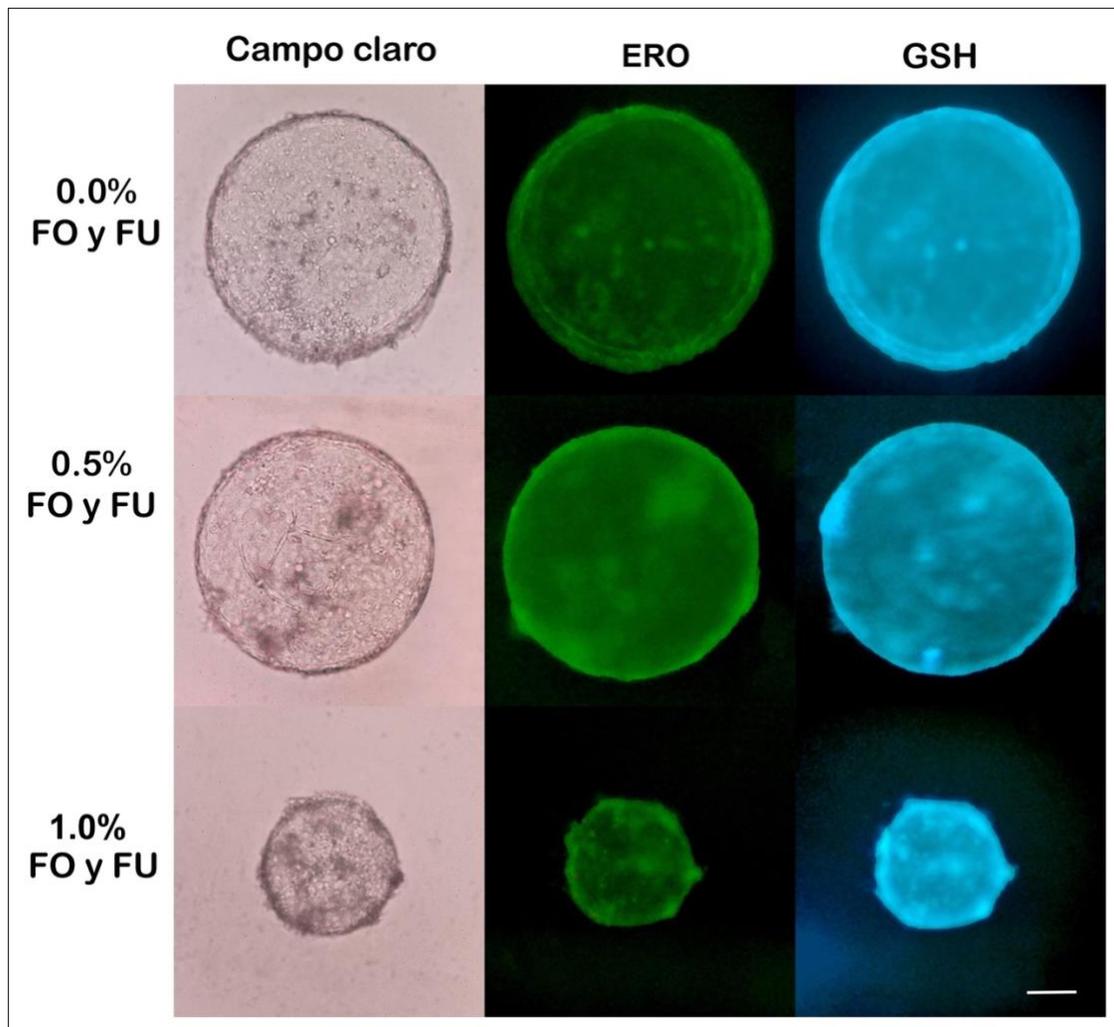


Figura 11. Evaluación de ERO y GSH en embriones clones de *O. aries*. Se observan fotografías en panel (campos claro y oscuro) de embriones en etapa de blastocisto. Se evaluaron 3 embriones por cada tratamiento. En fluorescencia verde presencia de ERO y en azul presencia de GSH. Aumento 100X. Barra de escala (200 μ m).

10. DISCUSIÓN

La transferencia nuclear de células somáticas tiene un gran potencial en la propagación de animales con características genéticas y fenotípicas de interés productivo, ecológico o biomédico. Sin embargo, su aplicación práctica ha sido limitada debido a factores intrínsecos de la propia técnica (Simmet *et al.*, 2021), que propician alteraciones a nivel genético y epigenético desde el comienzo del desarrollo embrionario preimplantacional, y continúan en el desarrollo fetal, por lo que, de llegar a término, pueden presentarse casos de LOS o AOS (Nava-Trujillo y Rivera, 2023).

Con base en los diferentes estudios donde se describe un efecto positivo de los FO y FU en el desarrollo y calidad de embriones generados por FIV, en primera instancia se evaluaron algunas propiedades fisicoquímicas de los FO y FU (volumen, osmolaridad, concentración total de proteínas y patrón de distribución de las proteínas). Posteriormente, se identificó la presencia de las proteínas OVGP1, HSP70 y Ezrin. Finalmente, se evaluó el efecto de la suplementación de FO y FU durante el cultivo *in vitro* de embriones clones de ovino.

10.1. Evaluación del volumen, osmolaridad y concentración total de proteínas de los fluidos reproductivos (FO y FU).

En el presente estudio, se obtuvieron diferentes muestras de FO y FU colectados de aparatos reproductores en la etapa temprana y tardía del metaestro, respectivamente. Las etapas se eligieron con base al tránsito del embrión por el oviducto y el útero en determinadas etapas de ciclo estral. El FO y FU se colectaron *Post mortem* de ovejas tipo criollo; con un volumen de FU cinco veces mayor que de FO, lo cual puede estar relacionado con el tamaño de los órganos de procedencia. En otros estudios, se analizó el volumen del FO y FU recolectados de ovejas *in vivo* mediante una sonda introducida en el *ostium* del oviducto y de manera continua durante 24 h. Los autores reportaron volúmenes superiores de FO y FU en comparación con los obtenidos en nuestro estudio; con 100 a 1,630 μL para FO (Perkins *et al.*, 1965; Restall, 1966b; Iritani *et al.*, 1969; Roberts *et al.*, 1976) y 480 a 5,210 μL para FU (Iritani *et al.*, 1969). Estos volúmenes dan cuenta de la intensa actividad secretora del oviducto y del útero, los cuales pueden estar influenciados por el sistema de recuperación, así como también por la acción hormonal. Por su parte, Iritani *et al.* (1969), observaron que a los dos días posteriores al estro, tanto el oviducto como el útero presentan una mayor actividad secretora, lo cual confirma que existen factores relacionados con la modulación del patrón secretor de los fluidos de estas regiones anatómicas. Además, existen otros factores que influyen en el volumen secretado de FO y FU; por ejemplo, la edad, raza y si las hembras son pre púberes, nulíparas o multíparas.

Otro aspecto fisiológico importante para considerar de los FO y FU es la osmolaridad, que va a depender de la concentración de solutos disueltos, tales como: sales inorgánicas, aminoácidos,

proteínas, entre otros componentes, porque estarán en contacto directo con los gametos y embriones en desarrollo, los cuales requieren de condiciones específicas de osmolaridad. El rango de variación de la osmolaridad oviductal y uterina, entre las diferentes especies domésticas es estrecho; por ejemplo, en la vaca, se ha reportado una osmolaridad de 350 a 353 mOsm kg⁻¹ (Olds y Vandemark., 1957), en la cerda es de 318 a 320 mOsm kg⁻¹ (Li *et al.*, 2007) y en la oveja se ha reportado una osmolaridad de 316 mOsm kg⁻¹ para el FO y de 349 mOsm kg⁻¹ para el FU (Wales, 1973). El valor obtenido en este estudio para el FO (343 mOsm kg⁻¹) es diferente a lo reportado para FO, pero similar para el FU. También es diferente el valor obtenido para el FU (280 mOsm kg⁻¹) a lo reportado; sin embargo, este último valor está dentro del rango normal para un sistema fisiológico. Esta variación en la osmolaridad del FU, probablemente se debió a la manipulación durante el proceso de colecta y procesamiento de las muestras; por ejemplo, se ha reportado que el método de colecta influyen en la osmolaridad del FU (Wales, 1973).

Por otro lado, la concentración total de proteína presente en el FO fue mayor (71.9 g L⁻¹) a lo reportado en otros estudios con concentraciones de 37.8 y 38.7 g L⁻¹ (Itze-Mayrhofer y Brem, 2020; Zhao *et al.*, 2022). La concentración total de proteína del FU (21.8 g L⁻¹) fue similar a lo reportado por otros autores (25.16 a 27.46 g L⁻¹) (Yahia *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*, 2016). Se ha descrito que la concentración total de proteína del FO puede estar influenciada por una condición de estrés metabólico derivado de la dieta (Tripathi *et al.*, 2016).

10.2. Patrón de distribución de proteínas en los fluidos reproductivos (FO y FU)

En una primera evaluación, se determinó el patrón de distribución de las proteínas presentes en las muestras de FO (20 bandas) y FU (14 bandas), así como los pesos moleculares de las bandas con mayor intensidad, tal y como se ha realizado en la Alpaca (Apichela *et al.*, 2015). A partir de esta primera evaluación hubo diferencias en el patrón de distribución de las proteínas presentes entre las muestras de FO y FU, observándose un mayor número de bandas para el FO, lo cual denota una mayor complejidad en su composición proteica. No obstante, otros estudios han identificado más proteínas en el FU que en el FO (827 vs. 624), la mayor parte de estas proteínas (585) se presenta en ambos fluidos (Soleilhavoup *et al.*, 2016).

10.3. Identificación de las proteínas en los FO y FU

El Western Blot permitió identificar las 3 proteínas: OVGPI, HSP70 y Ezrin, descritas en la literatura como parte de las principales proteínas presentes en los FO y FU con las que tienen contacto los embriones a su paso por el tracto reproductivo en ovejas (Soleilhavoup *et al.*, 2016). La OVGPI es una proteína sintetizada y secretada exclusivamente por las células no ciliares del epitelio oviductal, con peso molecular de entre 90 a 95 kDa para la mayoría de los animales domésticos; en

los rumiantes, presenta un peso de entre 57.23 a 57.75 kDa, esta variación es atribuida al grado de glicosilación de la proteína (Pradeep *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2022).

Por otra parte, la HSP70 pertenece a una familia de proteínas “chaperonas” con peso molecular de 70 kDa que cumplen una amplia variedad de actividades de mantenimiento celular, así como también para contrarrestar los efectos ocasionados por el estrés, tales como: prevenir la agregación de proteínas, la separación de agregados proteínicos, el repliegue de proteínas desnaturalizadas y la degradación de proteínas defectuosas (Rosenzweig *et al.* 2019).

En cuanto a Ezrin, es una proteína de un peso molecular de 87 kDa que funciona como un conector de microfilamentos de la membrana plasmática, la cual se encuentra distribuida en las microvellosidades, pliegues de la membrana plasmática y otras áreas de ésta, con una morfología particular (Xu *et al.* 2023).

En el presente estudio, la OVGPI se encontró en mayor cantidad en las muestras de FO, lo cual está en concordancia con lo que reportan Soleilhavoup *et al.* (2016), quienes evaluaron el proteoma del FO y FU en el estro y durante la fase lútea del ciclo estral de la oveja, mediante cromatografía líquida a nanoescala acoplado a espectrometría de masas en tándem. Los autores determinaron que la OVGPI es la principal proteína del FO durante el estro. Por el contrario, la OVGPI se presentó en menor cantidad en el FU, lo cual corresponde a lo reportado para este fluido (Soleilhavoup *et al.*, 2016). No obstante, se ha descrito que las vesículas extracelulares obtenidas del lumen uterino de ovejas son positivas a OVGPI (Burns *et al.*, 2014).

La OVGPI es una proteína que juega un papel preponderante durante la fertilización, ya que regula la polispermia al endurecer la ZP (Bragança *et al.*, 2021). También se ha reportado que aumenta la tasa de segmentación de mórulas y blastocistos en cabras (Pradeep *et al.*, 2011). Además, mediante inmunohistoquímica se ha detectado la interacción de la OVGPI con embriones bovinos en etapas de 4-8 células y en mórulas, encontrándose presente en el espacio perivitelino y dentro de los blastómeros, no así en la ZP (Banliat *et al.*, 2020).

En cuanto a la proteína HSP70, se observó su presencia en el FO, siendo casi nula para el FU, lo cual coincide con lo reportado para la oveja (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Sin embargo, existen reportes que la han identificado en el FU al día 16 del ciclo estral, no así en ovejas al día 16 de gestación (Köch *et al.* 2010). Por otra parte, se han identificado microvesículas del lumen uterino positivas a HSP70, tanto en ovejas ciclando como gestantes al día 14 (Burns *et al.*, 2014).

Como se había mencionado, la HSP70 desempeña actividades para contrarrestar los efectos del estrés; por ejemplo, bajo temperaturas subóptimas del cultivo *in vitro* (37 y 40 °C), la HSP70 se sobreexpresa tanto en los ovocitos como en las células de la granulosa (Pöhland *et al.*, 2020). También se ha reportado en bovinos observándose que, si se inhibe la función de la HSP70 durante el cultivo

de embriones de 2-células a temperatura fisiológica (38.5 °C), se reduce el porcentaje de blastocistos. Ello denota la importancia de la HSP70 en la función celular y no sólo en lo relacionado con el estrés calórico (Romero y Hansen, 2002).

Finalmente, la proteína Ezrin se encontró en mayor cantidad en el FO que en el FU, lo cual concuerda con lo reportado para la oveja (Soleilhavoup *et al.*, 2016). También se ha reportado su presencia en el FU durante los primeros días de gestación de la oveja (Köch *et al.*, 2010; Romero *et al.* 2017).

Xu *et al.* (2023) realizaron una revisión sobre la función de la proteína Ezrin desde un enfoque reproductivo, mencionando su importancia durante los cambios que ocurren en el epitelio uterino a lo largo del ciclo estral. Además, mencionan la participación de Ezrin para inducir la polarización de los embriones preimplantacionales, así como también en los procesos de migración celular e invasión durante la implantación del embrión y la embriogénesis.

10.4. Efecto del FO y FU en el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénéticos y clones

En el presente estudio, tanto en los embriones partenogénéticos como en los embriones clones, no hubo diferencias en la tasa de división entre las diferentes concentraciones de FO y FU y el grupo testigo. Lo cual concuerda con lo reportado en otros estudios para embriones de bovino generados por FIV (Lopera-Vasquez *et al.*, 2017; Barrera *et al.*, 2017; Hamdi *et al.*, 2017; Nina *et al.*, 2021).

A la concentración más baja de 0.5% de FO y FU no se observó efecto alguno en el desarrollo de los embriones partenogénéticos ni en los clones. No obstante, a la concentración de 1.0% de FO y FU, disminuyó el porcentaje de embriones clones en las etapas más avanzadas del desarrollo (mórula y blastocisto), y este mismo efecto se exacerbó a la concentración de 2.0% de FO y FU para los embriones partenogénéticos, que se bloquearon en etapa de 4 a 16 células.

Zhang *et al.* (2009) reportan para embriones clones de cerdo que concentraciones de 14 y 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de FO adicionado al medio PZM-5, aumentó significativamente el porcentaje de blastocistos (27 y 26%, respectivamente) con respecto al grupo testigo (14%). Pero a concentraciones más altas (56 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no se observó efecto alguno.

En este estudio se evaluó la concentración de proteína de las muestras de FO y FU, por lo cual, se puede determinar la concentración de proteína que se suplementó para cada concentración porcentual. Para 0.5, 1.0 y 2% de FO se utilizó en promedio 359.5, 719 y 1438 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína, respectivamente; mientras que para 0.5, 1.0 y 2.0 % de FU se suplementó 109, 218 y 436 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína, respectivamente.

Si comparamos estas concentraciones con las empleadas por Zhang *et al.* (2009), se puede apreciar que la concentración de 0.5, 1.0 y 2.0% de FO fueron 3.5, 7.1 y 14.3 veces mayor que la concentración más elevada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) que utilizaron, la cual no tuvo efecto sobre el desarrollo embrionario. No obstante, la concentración de 0.5% de FU ($109 \mu\text{g mL}^{-1}$) fue la más cercana a la empleada por Zhang *et al.* (2009). Las altas concentraciones de FO y FU que se emplearon en este estudio, propiciaron un ambiente tóxico a los embriones partenogenéticos y clones, debido a la generación de amonio como producto del metabolismo de las proteínas (Gardner y Lane, 2014; Kleijkers *et al.*, 2016).

Otros estudios en bovinos reportan que, concentraciones elevadas de FO (2.5%) o FU (5%) tienen un efecto negativo en el desarrollo de embriones de bovinos producidos por FIV en la etapa de blastocisto (Lopera-Vasquez *et al.*, 2017; Hamdi *et al.*, 2018). Efectos similares se observaron en el presente estudio para los embriones clones a concentraciones de 1% de FO y FU (7.7%), y para los embriones partenogenéticos que bloquearon su desarrollo desde las primeras divisiones a 2.0% de FO y FU (62.1%).

Por otra parte, Lopera-Vasquez *et al.* (2017) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de FO (0.625, 1.25 y 2.5%) en el desarrollo de embriones de bovino producidos por FIV, observando que el porcentaje de blastocistos al día 7 de cultivo fue significativamente menor para todas las concentraciones de FO (16, 17 y 13.9%, respectivamente) con respecto al grupo testigo (22.9%). Sin embargo, al día 9 de cultivo, a 0.625 y 1.25% de FO el porcentaje de blastocistos fue igual al del grupo testigo. Esto es similar a lo observado en el presente estudio, en cuanto al porcentaje de blastocistos clones tratados con 1.0% de FO y FU al día 7 de cultivo. Sin embargo, los embriones no se cultivaron más allá de este tiempo para observar su efecto en los días posteriores.

Como se observó en el presente estudio, el FO contiene elevadas concentraciones de las proteínas OVGP1, HSP70 y Ezrin en comparación con el FU. Si consideramos que para los grupos de 0.5, 1.0 y 2.0% de FO se agregaron concentraciones de 359.5, 719 y $1438 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína, así también de las proteínas identificadas. Se ha descrito que la suplementación de OVGP1 a concentraciones elevadas (50 y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) tiene un efecto detrimental para el desarrollo embrionario de caprinos durante la MIV, FIV y cultivo *in vitro* de embriones (Pradeep *et al.*, 2011). También este mismo efecto se ha observado cuando se adiciona concentraciones elevadas ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) de OVGP recombinante durante la FIV y los primeros 3.5 días del cultivo *in vitro* de embriones en bovinos, pero no así, cuando se utiliza de forma separada en cada paso. Los autores llegan a la conclusión que la suplementación de los componentes del FO deben de ser gradual en el sistema *in vitro* y en el momento apropiado (Algarra *et al.*, 2018).

Por lo tanto, el efecto de inhibición en el desarrollo de embriones clones y partenogénéticos a las concentraciones de 1.0 y 2.0% de FO y FU, se debió a las concentraciones elevadas de proteína presente en cada una de las concentraciones porcentuales, como lo han reportado otros autores (Pradeep *et al.*, 2011; Algarra *et al.*, 2018). Además la reducción a la mitad de las concentraciones de los nutrientes reportadas para el FO y FU durante el cultivo *in vitro* de embriones de bovino, mejora la tasa de conversión de morulas a blastocitos, la tasa de blastocistos y los parámetros morfo-fisiológicos (Santos *et al.*, 2021).

Por lo tanto, se deben probar concentraciones más bajas de FO y FU a las utilizadas, así como también evaluar su efecto en embriones con y sin ZP, considerando que los embriones clones por HMC carecen de ZP y esto los hace más susceptibles a los cambios en la concentración de proteínas y la interacción que puedan tener con éstas.

El efecto de los fluidos reproductivos sobre el desarrollo *in vitro* de los embriones, depende en gran medida de las características de tales fluidos que estarán condicionadas por variables intrínsecas a su obtención, tales como el origen de los fluidos, si son colectados *in vivo* o *post mortem*, si son *post mortem* el tiempo de obtención de las muestras, el método de recuperación, que puede ser por presión mecánica con fórceps, por compresión con portaobjetos, por aspiración con pipeta automática, por raspado con cureta o mediante lavado con solución fisiológica (Velazquez *et al.*, 2010; Itze-Mayrhofer y Brem, 2022).

Dependiendo del método de recuperación, los fluidos pueden contener mayor o menor cantidad de impurezas como eritrocitos, células oviductales y restos celulares que no siempre son eliminados de manera eficiente por centrifugación (Velazquez *et al.*, 2010).

Otra variable por considerar es, si los fluidos están puros y concentrados o diluidos, lo cual es importante ya que la mayoría de los estudios realizan una suplementación porcentual (v/v), sin considerar la concentración de sus componentes que pueden variar de una muestra a otra y no ser reproducibles. Lo más objetivo sería suplementarlos con base a su concentración (mg mL^{-1}).

10.5. Efecto de los FO y FU sobre el nivel de ERO y GSH en embriones partenogénéticos y clones

En el presente estudio se observó que los blastocistos partenogénéticos cultivados con 1.0% de FO y FU disminuyeron significativamente la concentración de ERO, así como también la de GSH. Este resultado está acorde con lo reportado por otros estudios, en donde las concentraciones de ERO, así como la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, disminuyeron en embriones de bovino producidos por FIV tratados con FO y FU (Cebrian-Serrano *et al.*, 2013; Hamdi *et al.*, 2018).

En el proteoma del aparato reproductor de la oveja se han identificado 940 proteínas, de las cuales el 4% están relacionadas con procesos de óxido-reducción (Soleilhavoup *et al.*, 2016) y el 5%

con estrés oxidativo (Köch *et al.*, 2010). Algunas de las proteínas más abundantes del FO en la fase lútea son la ceruloplasmina y lactotransferrina, mientras que en el FU son la peroxirredoxina-1 y la glutatión S-transferasa (Köch *et al.*, 2010; Soleilhavoup *et al.*, 2016). Estas proteínas forman parte del sistema antioxidante no enzimático de los fluidos reproductivos y probablemente fueron las responsables de reducir los niveles intracelulares de ERO en los embriones partenogénéticos, por lo tanto, los embriones no necesitaron aumentar la concentración de GSH intracelular para contrarrestar las ERO y, por consecuencia, también disminuyeron los niveles de GSH cuando se adicionó 1.0% de FO y FU.

En los embriones clones no se observó un efecto de las diferentes concentraciones de FO y FU sobre los niveles de ERO y GSH. Además, los niveles de ERO fueron similares entre los embriones clones y partenogénéticos, a pesar de la intensa manipulación a la que fueron sometidos al ser expuestos a una elevada concentración de oxígeno, a cambios de temperatura y a la exposición a la luz; factores que son generadores de ERO (Soto-Heras y Paramio, 2020; Deluao *et al.*, 2022). Por otra parte, también llama la atención que los niveles de GSH fueron diferentes entre los dos tipos de embriones, cerca de un 30% más en los embriones clones que en los partenogénéticos. Posiblemente esto se debió a que, por cada embrión clon, se utilizaron dos citoplastos, los cuales conservaron alrededor del 70% del volumen inicial de citoplasma después de la enucleación. Por lo tanto, cada embrión clon tuvo cerca de un 40% más de citoplasma que los embriones partenogénéticos, lo cual pudo aumentar la concentración intracelular de GSH y mantener en equilibrio los niveles de ERO en ellos.

Se ha descrito que, al aumentar el volumen citoplasmático de los embriones clones, se mejora su calidad y potencial de implantación, debido a la adición de mitocondrias y otros factores citoplasmáticos que ayudan a la reprogramación nuclear (Panda *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018; Raja *et al.*, 2019), pero no se ha descrito nada respecto a la concentración de GSH intracelular.

El GSH es un antioxidante no enzimático que se sintetiza principalmente en el citosol (80-85%), en las mitocondrias (10-15%), y en menor cantidad en el núcleo y el retículo endoplasmático. Su acción antioxidante puede ser directa o como cofactor de enzimas antioxidantes y desintoxicantes, actúa sobre diversos radicales libres y pro-oxidantes como el peróxido de hidrógeno que es un precursor de ERO (Averill-Bates, 2023).

La presente investigación ha sido una de las pocas que han evaluado el efecto de los FO y FU en el desarrollo y calidad de los embriones producidos *in vitro*, y el único en embriones clones de ovino generados por HMC ya que, por las características propias de la técnica, los embriones carecen de ZP y son más susceptibles al ser expuestos directamente a los componentes del FO y FU que embriones con ZP. No obstante, este estudio permitió conocer de manera general algunos efectos de

los FO y FU en el desarrollo de embriones clones de ovino, y brinda la posibilidad de investigar a mayor profundidad el impacto que puedan tener los fluidos reproductivos en la calidad de los embriones clones, en términos de número de células totales, expresión de genes y regulación epigenética.

11. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió determinar las características fisicoquímicas (volumen, osmolaridad y concentración total de proteínas), el perfil proteico (patrón de distribución de proteínas) y la presencia de las proteínas OVGPI, HSP70 y Ezrin en el FO y FU de las fases temprana y media del metaestro, del ciclo estral de ovejas domésticas adultas.

El volumen recuperado de FU fue 5 veces mayor que el de FO, lo que se relaciona con el tamaño y la superficie del oviducto y el útero. Tanto la osmolaridad como la concentración de proteínas fueron mayores en FO que en el FU (1.2 y 3 veces más, respectivamente), valores que están dentro del rango descrito para las ovejas. El patrón de distribución de proteínas entre FO y FU fue diferente, siendo más complejo en el FO. Las proteínas OVGPI, HSP70 y Ezrin fueron identificadas en los FO y FU, encontrándose en mayor concentración en las muestras de FO.

La suplementación con 0.5% de FO y FU durante el cultivo de embriones partenogénicos y clones, no tuvo efecto sobre el desarrollo embrionario, mientras que las concentraciones más elevadas de 1.0 y 2.0% de FO y FU, tuvieron un efecto negativo en el desarrollo de embriones clones y partenogénicos, respectivamente.

En cuanto al balance redox en embriones partenogénicos en la etapa de blastocisto, la concentración de 0.5% de FO y FU no tuvo efecto alguno en los niveles intracelulares de ERO y GSH, mientras que la concentración de 1.0% de FO y FU redujo los niveles de ERO y GSH. En el caso de los embriones clones en etapa de blastocisto, ni el FO ni el FU tuvieron efecto sobre los niveles intracelulares de ERO y GSH.

12. CONSIDERACIONES A FUTURO

El presente estudio fue uno de los primeros en analizar el efecto de los FO y FU en el cultivo de embriones clones de ovino producidos por HMC. Dado que no se observó efecto de los fluidos a la concentración de 0.5% en las variables estudiadas (desarrollo embrionario y estado redox) en los embriones clones y que, a 1.0 y 2.0% de FO y FU hubo un efecto negativo, hay algunos puntos importantes que considerar para posteriores estudios:

- Obtener FO y FU de ovejas *in vivo*.
- Si los FO y FU se obtienen de animales de rastro, debe de pasar el menos tiempo posible entre el sacrificio y su recuperación, obtenerlos mediante lavados con solución fisiológica y filtrarla antes de su utilización.
- Suplementar los FO y FU en función de la concentración total de proteína, evaluar cada fluido por separado durante todo el cultivo de los embriones clones y después de manera secuencial.
- Evaluar diferentes concentraciones de FO y FU tomando en consideración que los embriones clones por Handmade cloning carecen de ZP.
- Además de evaluar el efecto de los FO y FU a nivel morfológico en el desarrollo embrionario, también se debe evaluar la expresión de algunos genes importantes para el desarrollo embrionario.

13. REFERENCIAS

- Abe, H. (1996). The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histology and histopathology*, 11(3), 743-768.
- Abecia, A., & Forcada, F. (2010). *Manejo reproductivo en ganado ovino*, Zaragoza España, Editorial Servet.
- Algarra, B., Maillo, V., Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., & Jiménez-Movilla, M. (2018). Effects of recombinant OVGP1 protein on in vitro bovine embryo development. *The Journal of reproduction and development*, 64(5), 433-443. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-058>
- Amiridis, G. S., & Cseh, S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal reproduction science*, 130(3-4), 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009>.
- Apichela, S. A., Argañaraz, M. E., Zampini, R., Vencato, J., Miceli, D. C., & Stelletta, C. (2015). Biochemical composition and protein profile of alpaca (*Vicugna pacos*) oviductal fluid. *Animal reproduction science*, 154, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.013>.
- Averill-Bates, D. A. (2023). The antioxidant glutathione. *Vitamins and hormones*, 121, 109-141. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>.
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs?. *Molecular human reproduction*, 16(12), 896-906. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>.
- Banliat, C., Tsikis, G., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Com, E., Lavigne, R., Pineau, C., Guyonnet, B., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2020). Identification of 56 proteins involved in embryo-maternal interactions in the bovine oviduct. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 466. <https://doi.org/10.3390/ijms21020466>.
- Barrera, A. D., García, E. V., Hamdi, M., Sánchez-Calabuig, M. J., López-Cardona, Á. P., Balvís, N. F., Rizos, D., & Gutiérrez-Adán, A. (2017). Embryo culture in presence of oviductal fluid induces DNA methylation changes in bovine blastocysts. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(1), 1-12. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0651>.
- Binelli, M., Gonella-Díaz, A. M., Mesquita, F. S., & Membrive, C. M. B. (2018). Sex steroid-mediated control of oviductal function in cattle. *Biology*, 7(1), 15. <https://doi.org/10.3390/biology7010015>.

- Borges, A. A., & Pereira, A. F. (2019). Potential role of intraspecific and interspecific cloning in the conservation of wild mammals. *Zygote (Cambridge, England)*, 27(3), 111-117. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000170>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Bragança, G. M., Alcântara-Neto, A. S., Batista, R. I. T. P., Brandão, F. Z., Freitas, V. J. F., Mermillod, P., & Souza-Fabjan, J. M. G. (2021). Oviduct fluid during IVF moderately modulates polyspermy in in vitro-produced goat embryos during the non-breeding season. *Theriogenology*, 168, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.022>.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in enzymology*, 541, 151-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Burns, G., Brooks, K., Wildung, M., Navakanitworakul, R., Christenson, L. K., & Spencer, T. E. (2014). Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PloS one*, 9(3), e90913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090913>.
- Buhi, W. C., Alvarez, I. M., & Kouba, A. J. (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells, tissues, organs*, 166(2), 165-179. <https://doi.org/10.1159/000016731>.
- Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., de la Blanca, M. G. M., Sánchez, J. M., Fernandez-Fuertes, B., González, E. M., & Rizos, D. (2021). Role of reproductive fluids and extracellular vesicles in embryo–maternal interaction during early pregnancy in cattle. *Reproduction, fertility, and development*, 34(2), 117-138. <https://doi.org/10.1071/RD21275>.
- Canela Morales, Luis Alberto, & Ruiz Sosa, Francisco Gabriel. (2019). Aspectos generales del conocimiento simbólico y diagramático: el caso de los diagramas de Venn. *Andamios*, 16(41), 63-85. Epub 20 de mayo de 2020. <https://doi.org/10.29092/uacm.v16i41.715>.
- Canovas, S., Ivanova, E., Romar, R., García-Martínez, S., Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F. A., Saadeh, H., Andrews, S., Kelsey, G., & Coy, P. (2017). DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *eLife*, 6, e23670. <https://doi.org/10.7554/eLife.23670>.
- Cao, H., Li, J., Su, W., Li, J., Wang, Z., Sun, S., Tian, S., Li, L., Wang, H., Li, J., Fang, X., Wei, Q., & Liu, C. (2019). Zebularine significantly improves the preimplantation development

- of ovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Reproduction, fertility, and development*, 31(2), 357–365. <https://doi.org/10.1071/RD17357>.
- Carrasco, L. C., Coy, P., Avilés, M., Gadea, J., & Romar, R. (2008). Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reproduction, fertility, and development*, 20(7), 808-817. <https://doi.org/10.1071/rd08113>.
- Casser, E., Israel, S., & Boiani, M. (2019). Multiplying embryos: experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *The International journal of developmental biology*, 63(3-4-5), 143-155. <https://doi.org/10.1387/ijdb.190016mb>.
- Cebrian-Serrano, A., Salvador, I., García-Roselló, E., Pericuesta, E., Pérez-Cerezales, S., Gutierrez-Adán, A., Coy, P., & Silvestre, M. A. (2013). Effect of the bovine oviducal fluid on in vitro fertilization, development and gene expression of in vitro-produced bovine blastocysts. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 48(2), 331-338. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02157.x>.
- Contreras-Nuñez, E., Blancas-Flores, G., Cruz, M., Almanza-Perez, J. C., Gomez-Zamudio, J. H., Ventura-Gallegos, J. L., Zentella-Dehesa, A., Roberto-Lazzarini, Roman-Ramos, R., & Alarcon-Aguilar, F. J. (2018). Participation of the IKK- α/β complex in the inhibition of the TNF- α /NF- κ B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 102, 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.048>
- Cortez, R. C., Gallegos, S. J. (2014) *Bioteconologías reproductivas moleculares y génicas en ovinos*, Estado de México, México, Editorial Colegio de Postgraduados.
- Cortez, J. V., Vajta, G., Valderrama, N. M., Portocarrero, G. S., & Quintana, J. M. (2018). High pregnancy and calving rates with a limited number of transferred handmade cloned bovine embryos. *Cellular reprogramming*, 20(1), 4-8. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0024>.
- Coy, P., Romar, R., & Romero-Aguirregomezcorta, J. (2022). The embryo culture media in the era of epigenetics: is it time to go back to nature?. *Animal reproduction*, 19(1), e20210132. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0132>
- Czernik, M., Anzalone, D. A., Palazzese, L., Oikawa, M., & Loi, P. (2019). Somatic cell nuclear transfer: failures, successes and the challenges ahead. *The International journal of developmental biology*, 63(3-4-5), 123–130. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180324mc>.
- Deluao, J. C., Winstanley, Y., Robker, R. L., Pacella-Ince, L., Gonzalez, M. B., & McPherson, N. O. (2022). Oxidative stress and reproductive function: Reactive oxygen species in the

- mammalian pre-implantation embryo. *Reproduction (Cambridge, England)*, 164(6), F95–F108. <https://doi.org/10.1530/REP-22-0121>.
- Demir, K., Pabuççuoğlu, S., Cirit, Ü., Evecen, M., Karaman, E., Özdaş, Ö.B., Alkan, S.M., Atalla, H., & Birlir, S. (2019). Effects of serum starvation and ionomycin activation on the development of somatic cell nuclear transfer embryos in sheep. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 66: 37-42. DOI:10.1501/VETFAK_0000002885.
- Deng, M., Chen, B., Yang, Y., Wan, Y., Liu, Z., Fu, J., & Wang, F. (2021). Characterization of transcriptional activity during ZGA in mammalian SCNT embryo. *Biology of reproduction*, 105(4), 905–917. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab127>.
- Falchi, L., Ledda, S., & Zedda, M. T. (2022). Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 57(Suppl 5), 22-33. <https://doi.org/10.1111/rda.14127>.
- FAO, (2015). The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture, edited by B. D. Scherf & D. Pilling. FAO commission on genetic resources for food and agriculture assessments. Rome.
- Fang, X., Xia, W., Cao, H., Guo, Y., Wang, H., Zhang, X., Wan, P., Liu, C., Wei, Q., Sun, S., Tian, S., Li, J., & Wang, Z. (2020). Effect of supplementation of Zebularine and Scriptaid on efficiency of *in vitro* developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Animal biotechnology*, 31(2), 155-163. <https://doi.org/10.1080/10495398.2018.1559846>.
- Folch, J., Cocero, M. J., Chesné, P., Alabart, J. L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J. I., Sánchez, P., Echegoyen, E., Beckers, J. F., Bonastre, A. S., & Vignon, X. (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, 71(6), 1026-1034. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.005>.
- Fu, L., Zhang, J., Yan, F. X., Guan, H., An, X. R., & Hou, J. (2012). Abnormal histone H3K9 dimethylation but normal dimethyltransferase EHMT2 expression in cloned sheep embryos. *Theriogenology*, 78(9), 1929-1938. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.017>.
- Gardner, K. D., & Lane, M. (2014). Cap. 6 Culture of viable mammalian embryos *in vitro*. In Principles of cloning, Academic Press.
- Galli, C., Lagutina, I., Vassiliev, I., Duchi, R., & Lazzari, G. (2002). Comparison of microinjection (piezo-electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different

- cell types in cattle. *Cloning and stem cells*, 4(3), 189-196. <https://doi.org/10.1089/15362300260339476>.
- Gao, H., Zhao, C., Xiang, X., Li, Y., Zhao, Y., Li, Z., Pan, D., Dai, Y., Hara, H., Cooper, D. K., Cai, Z., & Mou, L. (2017). Production of α 1,3-galactosyltransferase and cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-deficient pigs by CRISPR/Cas9 and handmade cloning. *The Journal of reproduction and development*, 63(1), 17-26. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-079>.
- German, S. D., Campbell, K. H., Thornton, E., McLachlan, G., Sweetman, D., & Alberio, R. (2015). Ovine induced pluripotent stem cells are resistant to reprogramming after nuclear transfer. *Cellular reprogramming*, 17(1), 19-27. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0071>.
- Gilbert, S. & Barresi, M. (2023) *Developmental biology*, 13 edición, Sinauer Associates, Oxford University Press.
- Gómez, M.C., Pope, C.E., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Cole, R.A., Dresser, B.L. (2004). Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*, 6, 247–258. <https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.247>.
- Gurdon, J. B. (2013). The egg and the nucleus: a battle for supremacy. *Development (Cambridge, England)*, 140(12), 2449-2456. <https://doi.org/10.1242/dev.097170>.
- Hamdi, M., Lopera-Vasquez, R., Maillo, V., Sanchez-Calabuig, M. J., Núñez, C., Gutierrez-Adan, A., & Rizos, D. (2018). Bovine oviductal and uterine fluid support in vitro embryo development. *Reproduction, fertility, and development*, 30(7), 935-945. <https://doi.org/10.1071/RD17286>.
- Heidari, B., Shirazi, A., Tajic, P., Ahmadi, E., Nazari, H., Shams-Esfandabadi, N., & Ghasemzadeh-Nava, H. (2010). Effect of donor cell age on development of ovine nuclear transfer embryos in vitro. *Zygote (Cambridge, England)*, 18(4), 331-338. <https://doi.org/10.1017/S0967199409990360>.
- Hernández Martínez, S., Hernández Pichardo, J. E., Vazquez Avendaño, J. R., Ambríz García, D. A., & Navarro Maldonado, M. D. C. (2020). Developmental dynamics of cloned Mexican bighorn sheep embryos using morphological quality standards. *Veterinary medicine and science*, 6(3), 382–392. <https://doi.org/10.1002/vms3.242>
- Hernández P. J. E., Fernández R. F. (2010). *Reproducción de siete especies domésticas*, Editorial Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México. México.
- Hernández-Pichardo, J. E., Ducolomb, Y., Romo, S., Kjelland, M. E., Fierro, R., Casillas, F., & Betancourt, M. (2016). Pronuclear formation by ICSI using chemically activated ovine

- oocytes and zona pellucida bound sperm. *Journal of animal science and biotechnology*, 7, 65. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0124-6>.
- Hill, J. L., Wade, M. G., Nancarrow, C. D., Kelleher, D. L., & Boland, M. P. (1997). Influence of ovine oviducal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Molecular reproduction and development*, 47(2), 164-169. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199706\)47:2<164::AID-MRD6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199706)47:2<164::AID-MRD6>3.0.CO;2-K)
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M. (2010). *Essentials of domestic animal embryology*, Saunders Elsevier, China.
- Hosseini, S. M., Hajian, M., Moulavi, F., Asgari, V., Forouzanfar, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2013). Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled Pasteur pipette. *Cellular reprogramming*, 15(1), 15-23. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0033>.
- Iritani, A., Gomes, W. R., & Vandemark, N. L. (1969). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biology of reproduction*, 1(1), 72-76. <https://doi.org/10.1095/biolreprod1.1.72>.
- Itze-Mayrhofer, C., & Brem, G. (2020). Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. *Journal of proteomics*, 225, 103884. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103884>.
- Khan, S., Tali, M., Khan, A., Bhat, S., Ashraf, A., Bhat, M. H., Khan, F., & Shah, R. A. (2018). Comparison of efficiency of in vitro cloned sheep embryo production by conventional somatic cell nuclear transfer and handmade cloning technique. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 53(2), 512-518. <https://doi.org/10.1111/rda.13138>.
- Kim, M., Jang, G., Oh, H., Yuda, F., Kim, H., Hwang, W., Hossein, M., Kim, J., Shin, N., Kang, S., & Lee, B. (2007). Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, 9, 130-137. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.0034>.
- Köch, J. M., Ramadoss, J., & Magness, R. R. (2010). Proteomic profile of uterine luminal fluid from early pregnant ewes. *Journal of proteome research*, 9(8), 3878-3885. <https://doi.org/10.1021/pr100096b>.
- Kölle, S., Hughes, B., Steele, H. (2020) Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review, *Molecular Reproduction and Development*, 87(6): 650-662. <https://doi.org/10.1002/mrd.23352>.
- Koroghli, J. A., Floyd, E., Regouski, M., Rood, K., Gash, K., Panter, K., Stott, R., Davies, C. J., Polejaeva, I. A., & Rutigliano, H. M. (2018). Gene expression and lymphocyte

- population at the fetal-maternal interface in sheep pregnancies established by somatic cell nuclear transfer. *Reproduction, fertility, and development*, 30(7), 1011-1020. <https://doi.org/10.1071/RD17224>.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Colleoni, S., Crotti, G., & Galli, C. (2007) Comparison aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology*, 67(1): 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.011>.
- Leese, H. J., McKeegan, P. J., & Sturme, R. G. (2021). Amino acids and the early mammalian embryo: origin, fate, function and life-long legacy. *International journal of environmental research and public health*, 18(18), 9874. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189874>.
- Li, H., Wang, G., Hao, Z., Zhang, G., Qing, Y., Liu, S., Qing, L., Pan, W., Chen, L., Liu, G., Zhao, R., Jia, B., Zeng, L., Guo, J., Zhao, L., Zhao, H., Lv, C., Xu, K., Cheng, W., Li, H., ... Wei, H. J. (2016). Generation of biallelic knock-out sheep via gene-editing and somatic cell nuclear transfer. *Scientific reports*, 6, 33675. <https://doi.org/10.1038/srep33675>.
- Li, H., Chen, S., Piao, S., An, T., & Wang, C. (2021). Production of artificial synthetic spidroin gene 4S-transgenic cloned sheep embryos using somatic cell nuclear transfer. *Animal biotechnology*, 32(5), 616-626. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1737098>.
- Li, H., Song, M., Yang, W., Cao, P., Zheng, L., & Zuo, Y. (2020). A comparative analysis of single-cell transcriptome identifies reprogramming driver factors for efficiency improvement. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 19, 1053-1064. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.035>.
- Li, R., Whitworth, K., Lai, L., Wax, D., Spate, L., Murphy, C. N., Rieke, A., Isom, C., Hao, Y., Zhong, Z., Katayama, M., Schatten, H., & Prather, R. S. (2007). Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular reproduction and development*, 74(9), 1228-1235. <https://doi.org/10.1002/mrd.20682>.
- Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *The Journal of endocrinology*, 232(1), R1-R26. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>.
- Liu, T., Dou, H., Xiang, X., Li, L., Li, Y., Lin, L., Pang, X., Zhang, Y., Chen, Y., Luan, J., Xu, Y., Yang, Z., Yang, W., Liu, H., Li, F., Wang, H., Yang, H., Bolund, L., Vajta, G., & Du, Y. (2015). Factors determining the efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer:

- data analysis with over 200,000 reconstructed embryos. *Cellular reprogramming*, 17(6), 463-471. <https://doi.org/10.1089/cell.2015.0037>.
- Liu, X., Luo, C., Deng, K., Wu, Z., Wei, Y., Jiang, J., Lu, F., & Shi, D. (2018). Cytoplasmic volume of recipient oocytes affects the nucleus reprogramming and the developmental competence of HMC buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *The Journal of veterinary medical science*, 80(8), 1291-1300. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0043>.
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Jr, Cappai, P., & Clinton, M. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature biotechnology*, 19(10), 962-964. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-962>.
- Loi, P., Clinton, M., Vackova, I., Fulka, J., Jr, Feil, R., Palmieri, C., Della Salda, L., & Ptak, G. (2006). Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology*, 65(6), 1110-1121. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.016>.
- Loi, P., Czernik, M., Zacchini, F., Iuso, D., Scapolo, P. A., & Ptak, G. (2013). Sheep: the first large animal model in nuclear transfer research. *Cellular reprogramming*, 15(5), 367-373. <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0032>.
- Loi, P., Toschi, P., Zacchini, F., Ptak, G., Scapolo, P., Capra, E., Stella, A., Ajmone, P., Williams, J. (2016) Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics, *Genetics Selection Evolution*, 48(1): 53. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0231-z>.
- Loi, P., Palazzese, L., Scapolo, P. A., Fulka, J., Fulka, H., & Czernik, M. (2021). 25th Anniversary of cloning by somatic-cell nuclear transfer: Scientific and technological approaches to improve SCNT efficiency in farm animals and pets. *Reproduction (Cambridge, England)*, 162(1), F33-F43. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0653>.
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Lloreda, V., Coy, P., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., & Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction, fertility, and development*, 29(3), 621-629. <https://doi.org/10.1071/RD15238>.
- López-Saucedo, J., Paramio-Nieto, M. T., Fierro, R., & Piña-Aguilar, R. E. (2012). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in small ruminants. *Animal reproduction science*, 133(3-4), 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.003>.
- Ma, L. B., He, X. Y., Wang, F. M., Cao, J. W., & Cheng, T. (2014). The development and expression of pluripotency genes in embryos derived from nuclear transfer and *in vitro* fertilization. *Zygote (Cambridge, England)*, 22(4), 540-548. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000129>.

- Malin, K., Witkowska-Piłaszewicz, O., & Papis, K. (2022). The many problems of somatic cell nuclear transfer in reproductive cloning of mammals. *Theriogenology*, *189*, 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.030>.
- McLean, Z. L., Appleby, S. J., Fermin, L. M., Henderson, H. V., Wei, J., Wells, D. N., & Oback, B. (2021). Controlled cytoplasm arrest and morula aggregation enhance development, cryoresilience, and *in vivo* survival of cloned sheep embryos. *Cellular reprogramming*, *23*(1), 14-25. <https://doi.org/10.1089/cell.2020.0078>.
- Nadri, P., Ansari-Mahyari, S., Jafarpour, F., Mahdavi, A. H., Tanhaei Vash, N., Lachinani, L., Dormiani, K., & Nasr-Esfahani, M. H. (2022). Melatonin accelerates the developmental competence and telomere elongation in ovine SCNT embryos. *PloS one*, *17*(7), e0267598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267598>.
- Nava-Trujillo, H., & Rivera, R. M. (2023). Review: Large offspring syndrome in ruminants: current status and prediction during pregnancy. *Animal: an international journal of animal bioscience*, *17* (Suppl 1), 100740. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100740>.
- Navarro-Maldonado, M. C., Rosado-García, A., Serrano, H. F. Técnicas de clonación de embriones. In: Moreno CR. Ciencia Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2003-4. México. 9: 35-74.
- Navarro-Maldonado, M. C., Hernández-Martínez, S., Vázquez-Avendaño, J. R., Martínez-Ibarra, J. L., Zavala-Vega, N. L., Vargas-Miranda, B., Rivera-Rebolledo, J. A., Ambríz-García, D. A. (2015) Deriva de células epiteliales de tejido de piel descongelado de *Ovis canadensis mexicana* para la formación de un banco de germoplasma, *Acta Zoológica Mexicana*, *31*(2): 275-282. <https://doi.org/10.21829/azm.2015.312983>.
- Neisch, A. L., & Fehon, R. G. (2011). Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. *Current opinion in cell biology*, *23*(4), 377-382. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.011>.
- Nina, M, Ayala, C, & Susaño, R. (2021). Fluido uterino de llama (*Lama glama*), como medio para potenciar el desarrollo embrionario de vacas (*Bos taurus*) en cultivos *in vitro*. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, *8*(3), 138-145. <https://doi.org/10.53287/usqf5670af22u>.
- Oback, B., Wiersema, A. T., Gaynor, P., Laible, G., Tucker, F. C., Oliver, J. E., Miller, A. L., Troskie, H. E., Wilson, K. L., Forsyth, J. T., Berg, M. C., Cockrem, K., McMillan, V., Tervit, H. R., & Wells, D. N. (2003). Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning and stem cells*, *5*(1), 3-12. <https://doi.org/10.1089/153623003321512111>.

- Olds, D., & Vandemark, N. L. (1957). Composition of luminal fluids in bovine female genitalia. *Fertility and sterility*, 8(4), 345-354. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)32764-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)32764-9).
- Olsson, P. O., Jeong, Y. W., Jeong, Y., Kang, M., Park, G. B., Choi, E., Kim, S., Hossein, M. S., Son, Y. B., & Hwang, W. S. (2022). Insights from one thousand cloned dogs. *Scientific reports*, 12(1), 11209. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15097-7>.
- Pensyl, C. D., & Benjamin, W. J. (1999). Vapor pressure osmometry: minimum sample microvolumes. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 77(1), 27-30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0420.1999.770106.x>
- Perkins, J. L., Goode, L., Wilder, W. A., Jr, & Henson, D. B. (1965). Collection of secretions from the oviduct and uterus of the ewe. *Journal of animal science*, 24, 383-387. <https://doi.org/10.2527/jas1965.242383x>.
- Raja, A. K., Sahare, A. A., Jyotsana, B., Priya, D., Palta, P., Chauhan, M. S., Manik, R. S., & Singla, S. K. (2019). Reducing the cytoplasmic volume during hand-made cloning adversely affects the developmental competence and quality and alters relative abundance of mRNA transcripts and epigenetic status of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Animal reproduction science*, 208, 106136. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106136>.
- Rathbone, A. J., Fisher, P. A., Lee, J. H., Craigon, J., & Campbell, K. H. (2010). Reprogramming of ovine somatic cells with *Xenopus laevis* oocyte extract prior to SCNT improves live birth rate. *Cellular reprogramming*, 12(5), 609-616. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0015>.
- Restall, B. J. (1966). The fallopian tube of the sheep. II. The influence of progesterone and oestrogen on the secretory activities of the fallopian tube. *Australian journal of biological sciences*, 19(1), 187-197.
- Roberts, G. P., Parker, J. M., & Symonds, H. W. (1976). Macromolecular components of genital tract fluids from the sheep. *Journal of reproduction and fertility*, 48(1), 99-107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0480099>.
- Romanov, M. N., Zinovieva, N. A., & Griffin, D. K. (2021). British sheep breeds as a part of world sheep gene pool landscape: looking into genomic applications. *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(4), 994. <https://doi.org/10.3390/ani11040994>.
- Romero, Y. M., & Hansen, P. J. (2002). Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Molecular reproduction and development*, 62(2), 174-180. <https://doi.org/10.1002/mrd.10122>.

- Romero, J. J., Liebig, B. E., Broeckling, C. D., Prenni, J. E., & Hansen, T. R. (2017). Pregnancy-induced changes in metabolome and proteome in ovine uterine flushings. *Biology of reproduction*, 97(2), 273-287. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox078>.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(11), 665-680. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>.
- Panda, S. K., George, A., Saha, A. P., Sharma, R., Manik, R. S., Chauhan, M. S., Palta, P., & Singla, S. K. (2011). Effect of cytoplasmic volume on developmental competence of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos produced through hand-made cloning. *Cellular reprogramming*, 13(3), 257-262. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0096>.
- Pradeep, M. A., Jagadeesh, J., De, A. K., Kaushik, J. K., Malakar, D., Kumar, S., Dang, A. K., Das, S. K., & Mohanty, A. K. (2011). Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on *in vitro* embryo development. *Theriogenology*, 75(6), 1005-1015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.007>.
- Rutigliano, H. M., Wilhelm, A., Hall, J., Shi, B., Meng, Q., Stott, R., Bunch, T. D., White, K. L., Davies, C. J., & Polejaeva, I. A. (2017). Cytokine gene expression at the maternal-fetal interface after somatic cell nuclear transfer pregnancies in small ruminants. *Reproduction, fertility, and development*, 29(4), 646-657. <https://doi.org/10.1071/RD15103>.
- Saint-Dizier, M., Schoen, J., Chen, S., Banliat, C., & Mermillod, P. (2019). Composing the Early Embryonic Microenvironment: Physiology and Regulation of Oviductal Secretions. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 223. <https://doi.org/10.3390/ijms21010223>.
- Kleijkers, S. H., van Montfoort, A. P., Bekers, O., Coonen, E., Derhaag, J. G., Evers, J. L., & Dumoulin, J. C. (2016). Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2-8°C and during incubation at 37°C. *Human reproduction (Oxford, England)*, 31(6), 1192-1199. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew059>.
- Santos, É. C. D., Fonseca Junior, A. M. D., Lima, C. B., Ispada, J., Silva, J. V. A. D., & Milazzotto, M. P. (2021). Less is more: Reduced nutrient concentration during *in vitro* culture improves embryo production rates and morphophysiology of bovine embryos. *Theriogenology*, 173, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.010>.
- Selokar, N. L., Sharma, P., Krishna, A., Kumar, D., Kumar, D., Saini, M., Sharma, A., Vijayalakshmy, K., & Yadav, P. S. (2018). Establishment of a Somatic Cell Bank for

- Indian Buffalo Breeds and Assessing the Suitability of the Cryopreserved Cells for Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cellular reprogramming*, 20(3), 157-163. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0066>.
- Senger, P. L. (2015) Pathways to Pregnancy and Parturition, Current Conceptions, Washington.
- Shi, M., & Sirard, M. A. (2022). Metabolism of fatty acids in follicular cells, oocytes, and blastocysts. *Reproduction & fertility*, 3(2), R96–R108. <https://doi.org/10.1530/RAF-21-0123>.
- Simmet, K., Wolf, E., & Zakhartchenko, V. (2020). Manipulating the Epigenome in Nuclear Transfer Cloning: Where, When and How. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 236. <https://doi.org/10.3390/ijms22010236>.
- Simões, J., Abecia, J. A., Cannas, A., Delgado, J. A., Lacasta, D., Voigt, K., & Chemineau, P. (2021). Review: Managing sheep and goats for sustainable high yield production. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 15 (Suppl 1), 100293. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100293>.
- Smith, M. F., Geisert, R. D., & Parrish, J. J. (2018). Reproduction in domestic ruminants during the past 50 year: discovery to application. *Journal of animal science*, 96(7), 2952-2970. <https://doi.org/10.1093/jas/sky139>.
- Soleilhavoup, C., Riou, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P., Reynaud, K., de Graaf, S. P., Gerard, N., & Druart, X. (2016). Proteomes of the female genital tract during the oestrous cycle. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 15(1), 93-108. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052332>.
- Sood, T. J., Lagah, S. V., Mukesh, M., Singla, S. K., Chauhan, M. S., Manik, R. S., & Palta, P. (2019). RNA sequencing and transcriptome analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer and in vitro fertilization. *Molecular reproduction and development*, 86(9), 1149-1167. <https://doi.org/10.1002/mrd.23233>.
- Soto-Heras, S., & Paramio, M. T. (2020). Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in veterinary science*, 132, 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>.
- Su, G.H., Sohn, T.A., Ryu, B., Kern, S.E. (2000). A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. *Cancer Research*, 60 (12): 3137-42.
- Tripathi, S.K., Farman, M., Nandi, S., Girish, Kumar, V., & Gupta P.S.P. (2016). Oviductal and uterine fluid analytes as biomarkers of metabolic stress in ewes (*Ovis aries*). *Small Ruminant Research*, 144, 225-228. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.09.022>.

- Vajta, G., Lewis, I. M., Hyttel, P., Thouas, G. A., & Trounson, A. O. (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*, 3(2), 89-95. <https://doi.org/10.1089/15204550152475590>.
- Vajta, G., Lewis, I. M., & Tecirlioglu, R. T. (2006). Handmade somatic cell cloning in cattle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 348, 183-196. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-154-3_12.
- Vajta, G., Korösi, T., Du, Y., Nakata, K., Ieda, S., Kuwayama, M., & Nagy, Z. P. (2008). The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reproductive biomedicine online*, 17(1), 73-81. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60296-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60296-9).
- Vajta, G. (2018). Cloning: A sleeping beauty awaiting the kiss?. *Cellular reprogramming*, 20(3), 145-156. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0058>.
- Viana, J. H. M. (2022). 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: Embryo Technology Newsletter, v. 40, n.4, 2022 Consultado en https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf.
- Vazquez-Avenidaño, J., Ambriz-García, D. A., Trejo-Cordoba, A., Cortez-Romero, C., Navarro-Maldonado, M. C. (2022) Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer, *Small Ruminant Research*, 212: 106702. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106702>.
- Vazquez-Avenidaño, J. R., Cortez-Romero, C., Bravo-Vinaja, Á., Ambríz-García, D. A., Trejo-Córdova, A., & Navarro-Maldonado, M. D. C. (2023). Reproduction of sheep through nuclear transfer of somatic cells: A bibliometric approach. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(11), 1839. <https://doi.org/10.3390/ani13111839>.
- Vazquez-Avenidaño, J. R., Hernández-Martínez, S., Hernández-Pichardo, J. E., Rivera-Rebolledo, J. A., Ambriz-García, D. A., & Navarro-Maldonado, M. del C. (2017). Efecto del uso de medio secuencial humano en la producción de blastocistos de hembra ovis canadensis mexicana por clonación manual. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 33(2), 328–338. <https://doi.org/10.21829/azm.2017.3321068>
- Velazquez, M. A., Parrilla, I., Van Soom, A., Verberckmoes, S., Kues, W., & Niemann, H. (2010). Sampling techniques for oviductal and uterine luminal fluid in cattle. *Theriogenology*, 73(6), 758-767. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.004>.

- Wales, R. G. (1973). The uterus of the ewe. II. Chemical analysis of uterine fluid collected by cannulation. *Australian journal of biological sciences*, 26(4), 947-959. <https://doi.org/10.1071/bi9730947>.
- Walker, S. K., Hill, J. L., Kleemann, D. O., & Nancarrow, C. D. (1996). Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biology of reproduction*, 55(3), 703-708. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.3.703>.
- Wang, X., Qu, J., Li, J., He, H., Liu, Z., & Huan, Y. (2020). Epigenetic reprogramming during somatic cell nuclear transfer: Recent progress and future directions. *Frontiers in genetics*, 11, 205. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00205>.
- Ward, F. A., Lonergan, P., Enright, B. P., Boland, M. P. (2000) Factor affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology, *Theriogenology*, 54(3): 433-446. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00360-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00360-5).
- Wen, B. Q., Li, J., Li, J. J., Tian, S. J., Sun, S. C., Qi, X., Cai, W. T., & Chang, Q. L. (2014). The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves in vitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology*, 81(2), 332-339. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.032>.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L., & Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 14(1), 61-65. <https://doi.org/10.1038/nbt0196-61>.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (2007). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning and stem cells*, 9(1), 3-7. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.0002>.
- Williams, J. B., Shin, T., Liu, L., Flores-Foxworth, G., Romano, J., Blue-McClendon, A., Kraemer, D., & Westhusin, M. E. (2006). Cloning of exotic/endangered species: Desert bighorn sheep. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 348, 169-182. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-154-3_11.
- Xu, W. T., Shi, L. L., Xu, J., Qian, H., Zhou, H., & Wang, L. H. (2023). Ezrin expression in female reproductive tissues: A review of regulation and pathophysiological implications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1125881. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1125881>.

- Xue, L., Cheng, L., Su, G., Kang, F., Wu, X., Bai, C., Zhang, L., & Li, G. P. (2011). Nuclear transfer procedures in the ovine can induce early embryo fragmentation and compromise cloned embryo development. *Animal reproduction science*, *126*(3-4), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.05.015>.
- Yahia, M., Laanani, I., Benbia, S., Hachemi, M., & Massinissa, Y. A. (2013). Study of the cyclic variations of the enzyme and the electrolyte activity in uterine and oviducal secretions during an estrous cycle of the ewe. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, *7*(3), 230-233. doi: doi.org/10.5281/zenodo.1327973.
- Yang, B. Z., Yang, C. Y., Li, R. C., Qin, G. S., Zhang, X. F., Pang, C. Y., Chen, M. T., Huang, F. X., Li, Z., Zheng, H. Y., Huang, Y. J., & Liang, X. W. (2010). An inter-subspecies cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) obtained by transferring of cryopreserved embryos via somatic cell nuclear transfer. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, *45*(5), e21-e25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01510.x>.
- Yin, X. J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y., & Tsunoda, Y. (2002). Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biology of reproduction*, *67*(2), 442-446. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.442>.
- Zhang, P., Liu, P., Dou, H., Chen, L., Chen, L., Lin, L., Tan, P., Vajta, G., Gao, J., Du, Y., & Ma, R. Z. (2013). Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 Fatty acids. *PLoS one*, *8*(2), e55941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055941>.
- Zhang, Y., Wang, Y., Yulin, B., Tang, B., Wang, M., Zhang, C., Zhang, W., Jin, J., Li, T., Zhao, R., Yu, X., Zuo, Q., & Li, B. (2019). CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sMSCs differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, *120*(2), 1794-1806. <https://doi.org/10.1002/jcb.27474>.
- Zhang, Y.H., Song, E.S., Kim, E.S., Cong, P.Q., Lee, S., Lee, J.I., Yi, Y., & Park, C. (2009). Effects of oviductal fluid, culture media and zona pellucida removal on the development of porcine embryos by nuclear transfer. *Asian-australasian Journal of Animal Sciences*, *22*, 962-968. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.80693>.
- Zhang, Y. M., Gao, E. E., Wang, Q. Q., Tian, H., & Hou, J. (2018b). Effects of histone methyltransferase inhibitor chaetocin on histone H3K9 methylation of cultured ovine somatic cells and development of preimplantation cloned embryos. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *79*, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.006>.

- Zhang, Y., Wang, Q., Liu, K., Gao, E., Guan, H., & Hou, J. (2018c). Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology*, 70(5), 1469-1477. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0224-6>.
- Zhang, Y., Gao, E., Guan, H., Wang, Q., Zhang, S., Liu, K., Yan, F., Tian, H., Shan, D., Xu, H., & Hou, J. (2020). Vitamin C treatment of embryos, but not donor cells, improves the cloned embryonic development in sheep. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 55(3), 255-265. <https://doi.org/10.1111/rda.13606>.
- Zhao, Y., Vanderkooi, S., & Kan, F. W. K. (2022). The role of oviduct-specific glycoprotein (OVGP1) in modulating biological functions of gametes and embryos. *Histochemistry and cell biology*, 157(3), 371-388. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02065-x>.
- Zhu, J., Moawad, A. R., Wang, C. Y., Li, H. F., Ren, J. Y., & Dai, Y. F. (2018). Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International journal of veterinary science and medicine*, 6(Suppl), S15-S26. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.02.003>.

14. ANEXOS

Solución Bradford

Para preparar 1L de solución Bradford se disuelven los siguientes componentes en un vaso de precipitado, después se agrega agua destilada hasta completar 1L de volumen y se homogeniza con ayuda de un agitador magnético, posteriormente se filtra en papel filtro (Whatman No.4) y se almacena a 4 °C protegiéndolo de la oscuridad.

Reactivo	Cantidad
Azul de Coomassie G-250	100 mg
Etanol al 95%	50 mL
Ácido fosfórico 85%	100 mL

Geles de poliacrilamida

Gel de corrimiento o separador

Para preparar gel de poliacrilamida al 10% se mezclan los siguientes reactivos en un vaso de precipitado de 10 mL. Inmediatamente después de homogenizar la solución se coloca en el cartucho donde se deja polimerizar el gel.

Reactivo	Volumen
Agua destilada	4.01 mL
Tris (trisaminometano)-HCl (1.5 M, pH 8.8)	2.5 mL
Bis-acrilamida (30%)	3.32 mL
Sodium dodecylsulfate (SDS; 10%)	100 µL
Persulfato de amonio (10%)	50 µL
Tetramethylethylenediamina (TEMED)	10 µL

Gel concentrador

Para preparar el gel concentrador se mezclan los siguientes reactivos en un vaso de precipitado de 5 mL. Inmediatamente después de homogenizar la solución se coloca sobre el gel de corrimiento y se coloca el peine de 10 pozos, se dejar polimerizar.

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1.52 mL
Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8)	620 μ L
Bis-acrilamida (30%)	3.32 mL
SDS (10%)	25 μ L
Persulfato de amonio (10%)	25 μ L
TEMED	1.25 μ L

Azul de Coomassie

Para preparar 100 mL de solución, se disolvió 0.1g de azul de Coomassie en una solución de Metanol al 50% y Ácido acético glacial al 10%, se filtró y se guardó en un frasco ámbar.

TBS

Para preparar 1L de TBS (10X) se pesa 24.2 g de Tris-HCl y 80.0 g de NaCl, se disuelve en 1 L de agua destilada y se ajusta el pH a 7.6. A partir de esta solución stock se prepara la solución de trabajo haciendo una disolución 1:10.

TBS-tween

Se adiciona a 1L de TBS 1X, 1 mL de Tween 20.

15. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

15.1 Artículo de revisión



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Small Ruminant Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/smallrumres



Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer

José Roberto Vazquez-Avendaño^{a,b}, Demetrio Alonso Ambríz-García^b, César Cortez-Romero^c, Alfredo Trejo-Córdova^b, María del Carmen Navarro-Maldonado^{b,*}

^a Doctorate in Biological and Health Science, Universidad Autónoma Metropolitana, C.P. 3855 Ciudad de México, Mexico

^b Department of Biology of Reproduction, Biological and Health Sciences Division, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, C.P. 09310 Ciudad de México, México

^c Program in Genetic Resources and Productivity-Livestock, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, C.P. 56230 Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
SCNT
Sheep
Embryos
Efficiency

ABSTRACT

Embryo production through somatic cell nuclear transfer (SCNT) is a powerful tool to produce elite sheep and preserve endangered wild species. However, the rate of newborns produced using this technique remains low. Embryos produced through SCNT exhibit abnormal gene expression, often regulated by epigenetic mechanisms, such as DNA methylation and post-translational histone modifications, which establish the genome imprinted for the ontogenetic development of mammals. The objective of the present review was to describe the current state of the efficiency of sheep embryo production and newborn lamb generation through SCNT to offer an up-to-date reference. The primary strategy to improve SCNT in sheep is nuclear reprogramming. As such, the supplementation of vitamin C, scriptaid, zebularine, and oocyte extracts during somatic cell and embryo culture could improve nuclear reprogramming in cloned sheep embryos. Further, the modification of somatic cell chromatin and substitution of histones with protamines have been explored as additional strategies to improve SCNT. Elucidating the complexity of these processes will allow for the application of treatments or strategies aimed at improving the efficiency of SCNT and ensuring the quality of the produced offspring.

1. Introduction

There are different reproductive biotechnologies, including artificial insemination (AI), multiple ovulation and estrus synchronization, in vitro oocyte maturation (IVM), in vitro embryo production through in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and gamete and embryo cryopreservation. These techniques are aimed at obtaining the maximum number of offspring in the reproductive life of a livestock or wild individual, which may not be possible naturally (Loi et al., 2016).

Among these biotechnologies, embryo cloning can be viewed from a vertical or horizontal perspective (Navarro-Maldonado et al., 2003). The vertical perspective includes blastomere separation and embryo bisection techniques at different stages of early embryonic development for the generation of monozygotic twins (Casser et al., 2019). The horizontal perspective includes somatic cell nuclear transfer (SCNT), through which individuals are generated asexually; this requires a

somatic cell (diploid) that donates the genetic information contained within its nucleus-called the “karioplast”-and a nucleus-free oocyte, whose cytoplasm serves as the receptacle for the donated nucleus-called the “cytoplast” (Gurdon, 2013) (Fig. 1).

Somatic cell nuclear transfer serves different applications, including the propagation of animals with high genetic value (Selokar et al., 2018), generation of transgenic (Zhang et al., 2013; Li et al., 2016; Li et al., 2020) and gene-edited (Zhang et al., 2018) animals, production of organs for xenotransplantation (Gao et al., 2017), and conservation of endangered (Loi et al., 2001; Gómez et al., 2004; Kim et al., 2007; Yang et al., 2010) and extinct wildlife (Folch et al., 2009).

The effectiveness of generating ovine and other mammalian embryos and progeny by SCNT is determined by a wide variety of biological, molecular and epigenetic factors. The provenance and molecular quality of nuclear donor cells seem to largely affect the efficiency of somatic cell cloning (Ma et al., 2015; Samiec and Skrzyszowska, 2010a; Wiater et al., 2021a; Zhang et al., 2018a). It is also worth noting that the quality of

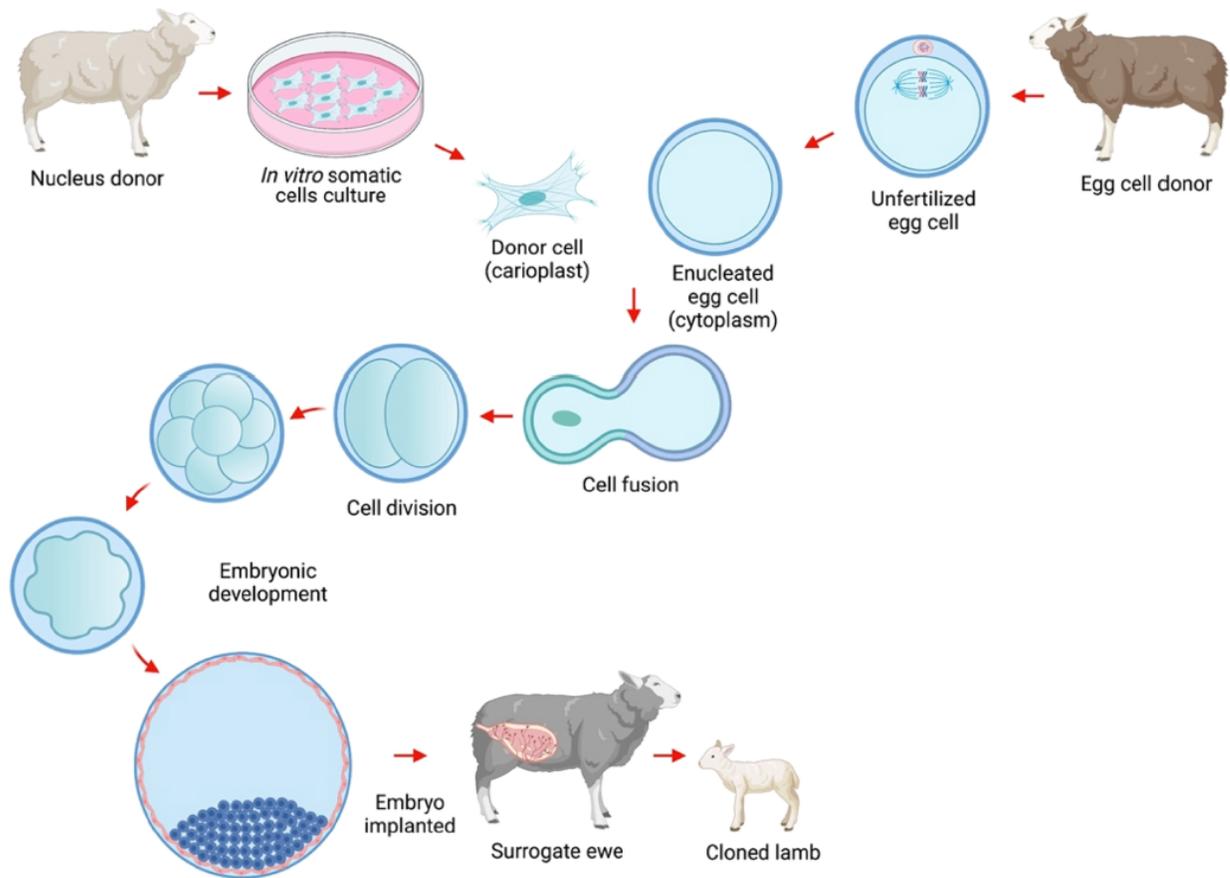


Fig. 1. Schematic process of somatic cell nuclear transfer.

nuclear recipient oocytes, which is dependent on the parameters related to their meiotic, cytoplasmic and epigenomic maturity, appears to be of great importance for determination of SCNT-based cloning (McLean et al., 2021; Gupta et al., 2019; Yuan et al., 2019). It is beyond any doubt that the strategies applied to extrinsically stimulate the embryo-specific developmental program of nuclear-transferred oocytes remarkably bias the developmental outcome of somatic cell-cloned embryos (Hajian et al., 2013; Samiec and Skrzyszowska, 2010b; Xue et al., 2011; Skrzyszowska et al., 2008). Furthermore, one of the most important factors determining the effectiveness of somatic cell cloning are genomic interrelations between nuclear and mitochondrial compartments in nuclear-transferred oocytes and corresponding embryos (Lloyd et al., 2006; Samiec, 2005; Lee et al., 2010; Samiec and Skrzyszowska, 2021). Finally, estimating the extent of epigenetic reprogrammability of donor cell nuclear genomes in embryos generated by SCNT enables to highly predict the efficacy of somatic cell cloning in sheep and other mammalian species (Al-Ghadi et al., 2020; Samiec and Skrzyszowska, 2005; Wiater et al., 2021b; Zhang et al., 2018b, 2020).

To this end, the objective of the present review was to illustrate the current state of the efficiency of sheep embryo production and newborn lamb generation through SCNT to offer an updated reference. The relevance and application of this literature review lie in viewing the future direction of SCNT in sheep and the associated limitations in the efficiency of this technique. The review also discusses perspectives on improving the efficiency of SCNT and addressing the current limitations in the future.

2. SCNT

Conventionally, the manipulation of oocytes and somatic cells during SCNT has been performed using micromanipulators (Wilmot et al., 1997). The nuclear material is removed from the oocyte and somatic cells and placed within the perivitelline space or injected directly into the oocyte cytoplasm (Galli et al., 2002). Some improvements have been made to the conventional method, one of which is the removal of zona pellucida (ZP) from oocytes following IVM. ZP is the extracellular glycoprotein matrix that protects the embryo; therefore, during enucleation and fusion, it is necessary to cross the ZP. Moreover, ZP removal facilitates the handling of oocytes within a short time (Oback et al., 2003; Lagutina et al., 2007).

Furthermore, chemically assisted enucleation has been implemented, in which chemical agents, such as demecolcine, inhibit microtubule polymerization of the meiotic spindle. As a result, the metaphase plate is externalized at the level of the plasma membrane, forming a protuberance such that the oocyte can be enucleated without Hoechst staining or UV exposure, as in the conventional method (Yin et al., 2002).

At the beginning of the 2000 s, the handmade cloning (HMC) technique emerged, which did not require the use of micromanipulators. This technique is based on the use of ZP-free oocytes and their subsequent chemically assisted enucleation, in which the cytoplasm portion with the genetic material is removed through a cross-section with a microblade (Vajta et al., 2001). Alternatively, it can be removed using a pulled Pasteur pipette, aspirating the metaphase plate and taking advantage of the surface tension between the culture medium and

Table 1
In vitro efficiency of sheep embryos produced through somatic cell nuclear transfer.

Cloning method	Cell type	Treatment	Blastocyst rate (%) N/C		Change (%)	Reference
			Before	After		
Conventional	Fetal fibroblasts	–	11.5	–	–	Li et al. (2021)
	Transgenic fetal fibroblasts	–	37/323 13.1	–	–	
Conventional	Fetal fibroblasts	Aggregates embryos	31/236 16	13	-3	McLean et al. (2021)
Conventional	Cumulus cells	Zebularine and scriptaid	186/1192 21.16	703/5510 28.25	7.09 *	Fang et al. (2020)
Conventional	Adult fibroblasts ^D	Vitamin C	100/463 17.9	129/455 25.9	8 *	Zhang et al. (2020)
	Adult fibroblasts ^{BM}	Vitamin C	41/233 32.3	57/219 42	7.7 *	
Conventional	Cumulus cells	Zebularine	39/114 11.8	52/122 25.4	13.2 *	Cao et al. (2019)
Conventional	Fetal fibroblasts	Chaetocin	12/101 9.8	30/117 10.6	0.8	Zhang et al. (2018)
Conventional	Transgenic fetal fibroblasts	KDM4D	8/96 11.3	11/106 19.2	7.9 *	Zhang et al. (2018a)
Conventional	Adult fibroblasts	–	17/157 5.3	31/162	–	Khan et al. (2018)
HMC	Adult fibroblasts	–	5/105 12.5	–	–	
Conventional	Fetal fibroblasts	iPSCs	8/59 10	2	-8 *	German et al. (2015)
Conventional	Adult fibroblasts	–	17/178 14.6	3/158	–	Ma et al. (2013)
Manual Enucleation	Adult fibroblasts	–	15/103 11.2	–	–	
Conventional	Cumulus cells	Scriptaid	323/36 8.6	25.7	17.1 *	Wen et al. (2014)
Conventional	Fetal fibroblasts	BIX01294	5/59 18.7	17/66 18.3	-0.4	Fu et al. (2012)
Conventional	Fetal fibroblasts	–	10/53 22.6	11/63	–	Heidari et al. (2010)
	Cumulus cells	–	83/367 23.6	–	–	
			27/114			

Number of blastocysts (N). Cleaved embryos (CE). Handmade cloning (HMC). Dorper (D). Booroola Merino (BM). Statistically significant differences at *p < 0.05.

mineral oil (Hosseini et al., 2013). HMC reduces the time required for enucleation, which allows for processing more oocytes within a shorter period. Furthermore, the fusion between the karioplast and cytoplasm is more efficient with HMC than with the conventional method (Khan et al., 2018), allowing for obtaining a greater number of reconstructed embryos (Liu et al., 2015). Regarding the efficiency in producing pregnancies to term, however, HMC is either comparable or occasionally superior to conventional SCNT (Cortez et al., 2018).

3. In vitro and in vivo efficiency of sheep embryo development through SCNT

Different species of domestic and wild mammals have been cloned through SCNT (Borges and Pereira, 2019); however, the efficiency of newborn offspring per generated embryo remains low (Vajta, 2018). Studies on SCNT published during 1997–2015 have reported an efficiency of 0.5–1% live offspring in livestock animals (Loi et al., 2016). In this context, sheep (*Ovis aries*) is one of the model mammalian species for SCNT research because of its moderate cost of maintenance, easy

Table 2
Efficiency of newborn offspring produced through somatic cell nuclear transfer.

Cloning method	Cell type	Treatment	Lambs (%) N/ET		Increase (%)	Reference
			Before	After		
Conventional	Fetal fibroblasts	Aggregates embryos	9	1521/138 BT	6 *	McLean et al. (2021)
Conventional	Cumulus cells	Serum starvation and ionomycin	11/120 BT 00/11 CE	7.11/14 CE	7.1 **	Demir et al. (2019)
Conventional	Fetal fibroblasts	–	228/36 FR	–	–	Koroghli et al. (2018)
Conventional	Transgenic fibroblasts	–	1023/232 CE	–	–	Li et al. (2016)
Conventional	Fetal fibroblasts	–	19.516/82 CE	–	–	Rutigliano et al. (2015)
HMC	Transgenic fibroblasts	–	5.73/53 BT	–	–	Zhang et al. (2013)
Conventional	Adult fibroblasts	CR1aa vs SOFaa	00/24 FR	15.34/26 FR	15.3	Xue et al. (2011)
Conventional	Fetal fibroblasts	Oocyte extracts [§]	3.12/65 BT	14.710/68 BT	11.6 **	Rathbone et al. (2010)

Number of embryos (N). Embryo transfer (ET). Cleavage embryos (CE). Blastocysts (BT). Female receptor (FR). Charles Rosenkrans medium supplemented with amino acids (CR1aa). Synthetic oviductal fluid supplemented with amino acids (SOFaa). §Oocyte extracts from *Xenopus laevis*. Statistically significant differences at *p < 0.045 or **p < 0.05.

Table 3
Efficiency of wild sheep embryos produced through interspecies somatic cell nuclear transfer.

Species	Cloning method	Cell type	<i>In vitro</i> outcome	<i>In vivo</i> outcome	Reference
<i>Ovis ammon</i>	Conventional	Fibroblast	91.7% 16–32 cells	3.6% pregnancies, none term	White et al. (1999)
<i>Ovis orientalis musimon</i>	Conventional	Granulosa cells	30.4% Blastocyst	14.3% live birth, 1 lamb	Loi et al. (2001)
<i>Ovis canadensis mexicana</i>	Conventional	Somatic cells	87.8% 1-cell	1.8% pregnancies, none term	Williams et al. (2006)
<i>Ovis orientalis isphahanica</i>	Conventional Zona Free	Fibroblast	7.6% Blastocyst	16.7% live birth, 2 lambs*	Hajian et al. (2011)
<i>Ovis ammon</i>	Conventional	Fibroblast	15.7% Blastocyst	–	Pan et al. (2014)
<i>Ovis canadensis mexicana</i>	Handmade Cloning	Fibroblast	15% Blastocyst	–	Vázquez et al. (2017)
<i>Ovis canadensis mexicana</i>	Handmade Cloning	Fibroblast	14.3% Blastocyst	–	Hernández et al. (2020)

* None survived

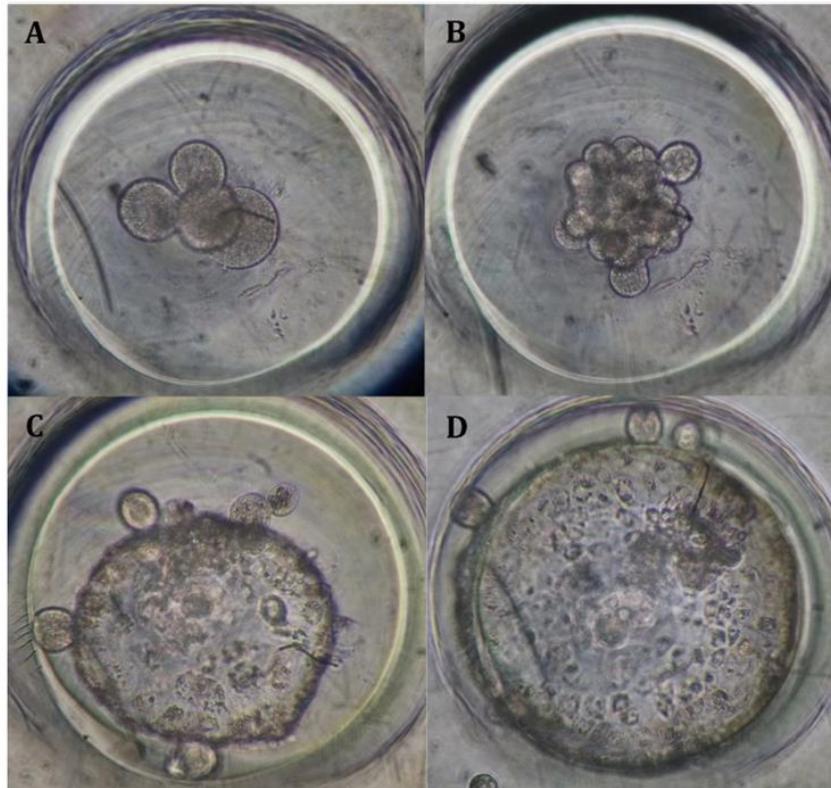


Fig. 2. Development of sheep embryos generated through somatic cell nuclear transfer. (A) Four-celled embryos at 24 h of culture. (B) Morula at 96 h of culture. (C) Early blastocysts at 144 h of culture. (D) Expanded blastocysts at 168 h of culture.

handling, and relatively short gestation period compared with that of other species of zootechnical interest (Loi et al., 2013).

Recent studies on SCNT in sheep have reported an efficiency of 5.3–42% from the beginning of segmentation to the blastocyst stage (Table 1). Conventional SCNT is commonly used for sheep cloning. The cells used as karyoplasts are mainly fibroblasts of both fetal and adult origin. Most studies on SCNT in sheep have focused on improving the epigenetic status of cloned embryos. Specifically, treatment with scriptaid has been reported to increase the blastocyst rate by 17.1% (Wen et al., 2014). In contrast, when used as karyoplasts, induced pluripotent stem cells (iPSCs) negatively affected the blastocyst rate (–8%; German et al., 2015). Meanwhile, some treatments produced no effect on the blastocyst rate.

Although the number of embryos that reach the blastocyst stage is an important factor, the quality of the obtained embryos is more relevant, as most treatments positively affect the total cell number and epigenetic status of the cloned embryos. For newborns, the reported efficiency

ranged from 5.7% to 15% per transferred blastocyst and from 7.1% to 19.5% per segmented embryo (Table 2). The cloned lambs were primarily generated by conventional SCNT, using fetal fibroblasts as karyoplasts. Some treatments, such as embryo aggregation in the morula stage (McLean et al., 2021), cell cycle synchronization through fetal bovine serum (FBS) reduction and ionomycin activation (Demir et al., 2019), use of different culture media for embryonic development (Xue et al., 2011), and somatic cell nuclear reprogramming with *Xenopus laevis* oocyte extract (Rathbone et al., 2010), have been reported to positively affect the birth of lambs.

In these studies, embryo transfer was performed at different stages of embryonic development, and newborn efficiency depends on the stage at which the embryo was transferred. Therefore, it is difficult to determine the actual efficiency of cloned embryos that reach the newborn stage and to evaluate the effects of applied treatments on achieving the blastocyst stage *in vitro*.

Furthermore, the efficiency of the transgenic lambs ranged from

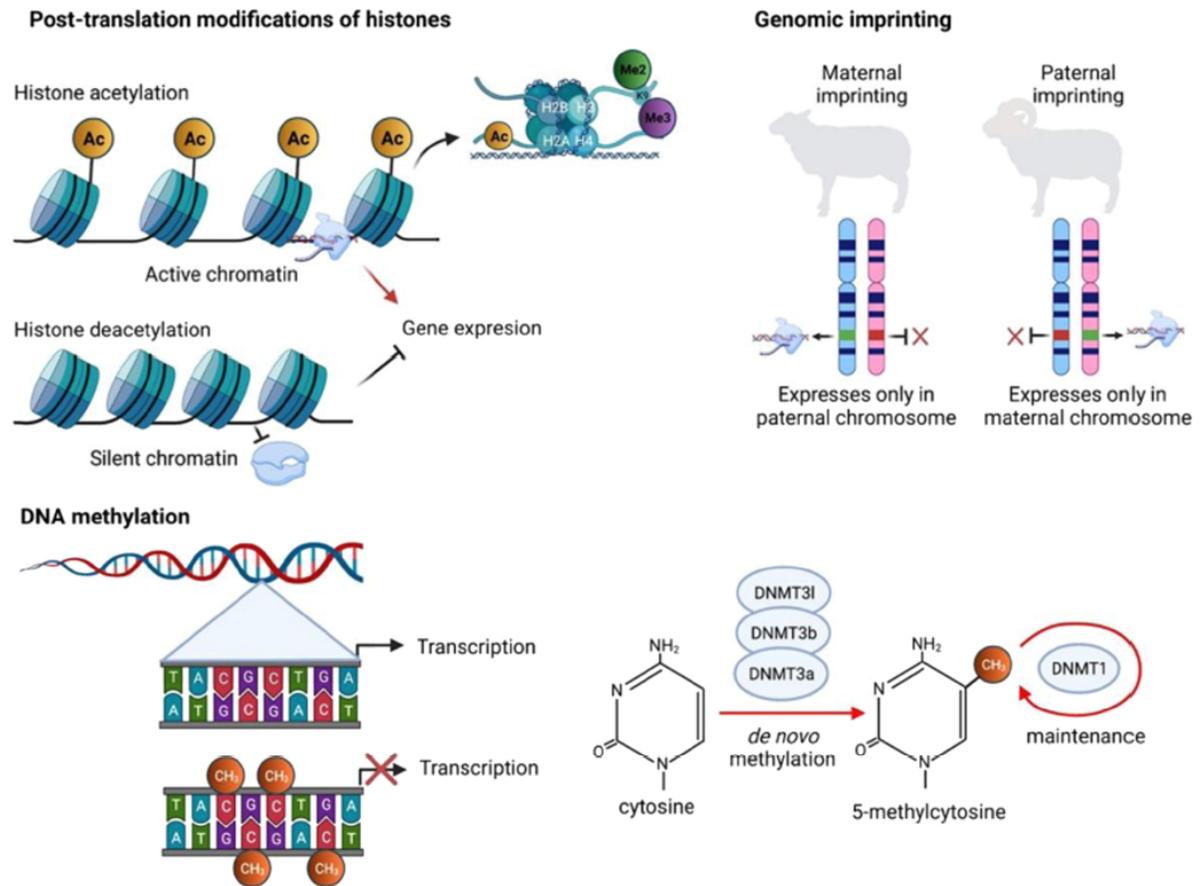


Fig. 3. Epigenetic markers. Histone acetylation, DNA methylation, and genomic imprinting.

5.7% to 10% (Table 2). Some studies focused on cytokine production during the gestation of cloned embryos and its association with the placentation process, with the objective of establishing the highest number of pregnancies.

The data presented belong to reports of intraspecific cloning in sheep, that is, the karyoplast and cytoplast come from the same species (*Ovis aries*). Regarding interspecific cloning in sheep, which is when the karyoplast and cytoplast used are from different species but evolutionarily close, there is little information (Table 3). In this, the karyoplast comes from a wild species usually in danger of extinction and is applied for conservation purposes. The percentage of cloned embryos that reach the blastocyst stage ranges between 7.6% and 30.4% (Table 3), like that reported for intraspecific cloning from 5.3% to 42% (Table 1). Denoting a high variability in both types of cloning.

There are only two studies that report the birth of wild sheep by interspecific cloning, one European mouflon (14.3%) and two Esfahan mouflons (16.7%), although the latter did not survive (Table 3).

In our laboratory, we could achieve the blastocyst rate of 43.8% using SCNT in domestic sheep (unpublished data; Fig. 2) and 14–15% using interspecific SCNT in wild sheep (Vázquez et al., 2017; Hernández et al., 2020).

In horses and cattle, the efficiency in obtaining live-born clones is very similar (9% and 9.2%, respectively) (Akagi et al., 2013; Gambini and Maserati, 2018); while in pigs this efficiency is highly variable (from 1% to 12%) (Gruppen, 2014).

4. Placental abnormalities in sheep pregnancy established through SCNT

In ruminants, implantation begins with the elongation of the *conceptus*, where trophoblast cells rapidly proliferate. In sheep, this process starts from day 12–17 post-mating and placentation starts on days 24–26, where the trophoblast begins to closely associate with the endometrium. Consequently, the cotyledons and specialized structures of the placenta interdigitate the endometrial caruncles to form the placentomes (Spencer and Hansen, 2015).

At this time, many sheep pregnancies established through SCNT are lost (22–41%), and this percentage is much greater than the loss of pregnancies established through IVF (5%) and natural mating (3.5%) (Loi et al., 2006; Rutigliano et al., 2015).

Fewer placentomes are formed during the placentation of sheep embryos through SCNT than through natural mating (49 vs. 70). Moreover, the mean placentome weight (12.32 g) and total placental weight (631.33 g) obtained through SCNT were higher than those obtained through natural mating (8.72 and 523.51 g, respectively; Ni et al., 2016). In addition, sheep placentae obtained through SCNT present extensive macroscopic degeneration and numerous histopathological abnormalities of the cotyledonary structures, such as the absence of binucleated and multinucleated cells (Loi et al., 2006). In a review of placental abnormalities in sheep pregnancies established through SCNT, Palmieri et al. (2008) noted placentomes with abnormal shape; reduced vascularization; immaturity of vessels of the placental villi; reduced

vasculogenesis, apoptosis, and hypoplasia of trophoblastic epithelial cells; reduced number of binucleate cells derived from trophoblasts; and increased thickness of the sub-trophoblastic basement membrane and capillary basal lamina to be the major anomalies.

Furthermore, comprehensive analysis of SCNT placentae using transmission electron microscopy revealed various mitochondrial defects, such as swollen, fragmented, and devoid of cristae, as well as anomalies of other organelles, such as expanded endoplasmic reticulum and swollen autophagosome membranes. These defects are related to dysfunctions in the fusion of mitochondria, regulated by mitofusin 2 protein, which was downregulated in SCNT placentas, leading to apoptosis. In addition, damaged mitochondria were not promptly eliminated through autophagy and mitophagy (Czernik et al., 2017).

Gene expression analysis of specific placental structures, such as the cotyledonary and intercotyledonary region, revealed the upregulation of immune response-related genes, such as cytotoxic T-lymphocyte associated protein (CTLA4), interleukin 2 receptor alpha (IL2RA), cluster of differentiation 28 (CD28), interleukin 6 (IL6), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), interleukin 1 alpha (IL-1 α), chemokine (C-X-C) motif ligand (CXCL8), and interleukin 10 (IL10), as well as genes associated with gestational failure, such as interferon-gamma (INF- δ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Rutigliano et al., 2015).

In pregnancies established through natural mating, the expression levels of these genes were similar between sheep and goats. However, in pregnancies established through SCNT, these genes are dysregulated and markedly overexpressed in sheep, which can explain the higher rate of pregnancy loss through SCNT in sheep (41%) than in goats (0%; Rutigliano et al., 2015). In addition, the lower rate of embryonic and fetal survival in sheep generated through SCNT may partly be attributed to the disruption of mechanisms that regulate immunity, leaving the fetus unprotected from the maternal immune system (Rutigliano et al., 2015).

Another comprehensive study revealed alterations in the expression of genes related to apoptosis (B-cell lymphoma 2 [BCL2] and BCL2-associated X protein [BAX]), growth factors (growth differentiation factor 9 [GDF9], bone morphogenetic protein 15 [BMP15], fibroblast growth factor 2 [FGF2], and insulin-like growth factor 1 [IGF1]), and immune response-related genes (TNF- α , IFN- γ , interleukin 1 beta [IL-1 β], and major histocompatibility complex class I [MHC-I]) in sheep pregnancies established through SCNT. During the first 45 days of pregnancy, these genes were slightly dysregulated only in some placental structures, although this dysregulation further extended to the endometrial structures and worsened at the end of pregnancy (Koroghli et al., 2018).

5. Epigenetic alterations in sheep cloned embryos

During embryonic development, blastomeres diverge into different cell lineages, implying that they pass through totipotent, pluripotent, and multipotent states until the different cell types that constitute an adult organism are obtained. The differential expression of genome depends on the activation and suppression of specific genes through epigenetic modifications, such as DNA methylation and post-translational histone modifications, which regulate different biological processes, including genomic imprinting (Wang et al., 2020).

5.1. DNA methylation patterns

DNA methylation involves the insertion of a methyl group, predominantly at carbon 5 of the nitrogenous bases of cytosine (5-mC) via covalent bonding (Fig. 3). DNA methyltransferases (DNMTs) are responsible for DNA methylation (Turek-Plewa et al., 2005). Through this mechanism, differential expression of genome is achieved, and the methylation patterns vary across cell types. For instance, the state of DNA methylation considerably differs between gametes: the sperm is subjected to a higher degree of methylation than the oocyte in

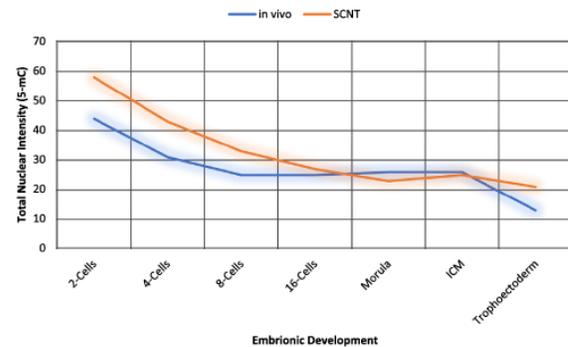


Fig. 4. DNA methylation pattern during the development of in vivo and somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos in sheep. Adopted and modified from Beaujean et al. (2004).

metaphase II (73% vs. 30%). Following fertilization, the male and female pronuclei undergo marked demethylation, which erases the DNA methylation patterns. Once the embryo genome activation begins in the 8- and 16-celled stages, new DNA methylation patterns are established (Duan et al., 2020).

In contrast, embryos produced through SCNT obtain genetic information from somatic cells unique DNA methylation patterns according to the cell types. These embryos have been reported to exhibit abnormal DNA methylation patterns, as opposed to embryos obtained in vivo. Trophoblast cells from sheep cloned embryos showed a higher degree of DNA methylation than those from in vivo embryos (Fig. 4; Beaujean et al., 2004), which is related to the abovementioned placental alterations in cloned fetuses (Rutigliano et al., 2015; Ni et al., 2016; Czernik et al., 2017; Koroghli et al., 2018).

5.2. Post-translational histone modifications

The nucleosome is the basic unit of chromatin, and it comprises pairs of histones H2A, H2B, H3, and H4, forming an octamer on which the DNA is anchored. Histones are the targets of different post-translational modifications. While some of these modifications directly affect the electrostatic charge of chromatin and alter the DNA-histone interaction, others act indirectly by recruiting effector proteins to activate diverse signaling pathways. The acetylation of lysine residues present in histones, which plays a fundamental role in the regulation of gene expression (Lawrence et al., 2016), is among the most studied histone modifications (Fig. 3).

Sheep embryos generated through SCNT present a higher degree of methylation at lysine 9 of histone 3 (H3K9me2 and H3K9me3) at the zygote and 2-celled stages (Fu et al., 2012; Zhang et al., 2018b) than embryos generated through IVF. This degree of methylation is inherent to somatic cells used as karyoplasts, and as embryonic development advances, the degree of methylation remains stable. At the morula and blastocyst stages, the elevated degree of H3K9 methylation has been reported (Fu et al., 2012; Zhang et al., 2018a) despite the low levels of the associated histone methyltransferases encoded by the euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 (EHMT2) gene (Fu et al., 2012). This abnormal pattern may be attributed to inadequate somatic cell nuclear reprogramming following embryonic genome activation (EGA).

5.3. Genomic imprinting

The embryonic and fetal development of mammals requires the proper expression of genome, which constitutes genes of both paternal and maternal origin. Although most genes are expressed regardless of their parental origin, a few are expressed in a mono-allelic manner. In other words, these genes are imprinted, and their expression depends on

their parental origin (Reig and Concha, 2012).

In cloned sheep, different degrees of methylation at the *locus* of the imprinted insulin-like growth factor 2 receptor (*IGF2R*) gene, which controls embryonic growth, have been observed. In ruminants, the alteration of the methylation status of this imprinted gene is linked to large offspring syndrome (LOS), which is characterized by overgrowth (Young et al., 2003). In sheep, LOS incidence ranges from 31.3% to 58.33% (Rutigliano et al., 2015; Ni et al., 2016). Presumably, the TRIM28 protein acts as a transcriptional corepressor in the regulation of the imprinted gene during preimplantation through different mechanisms. During sheep embryonic fibroblast proliferation, Trim28 maintains the *DLK-GTL2* methylation pattern and regulates *IGF2-H19* imprinted gene expression by modulating PEG3 expression without affecting the DNA methylation *loci*. The *DLK-GTL2* imprinting domain is associated with embryonic development and postnatal growth. These observations paved the way for understanding the mechanics of genomic reprogramming during SCNT in sheep (Luo et al., 2017).

Overexpression of miRNA-127, miRNA-21, and miRNA-16 has been reported in placentae recovered from SCNT pregnancies, in which lambs died within a few days of birth. Among these, miRNA-127, which negatively regulates retrotransposon-like 1 (*Rtl1*), was markedly overexpressed. Consequently, *Rtl1*, an important imprinted gene for placental development, was downregulated in the placentae of the lambs that died but not in the placentae of lambs that survived. Therefore, these alterations in gene expression were implicated in placental defects, compromising the survival of transgenic lambs produced through SCNT (Ni et al., 2016).

6. Advances in sheep embryo production through SCNT

The research group led by Ian Wilmut and Keith Campbell conducted 277 SCNT attempts that resulted in the formation of 29 sheep cloned embryos following transfer to recipient females, although only one of them resulted in the birth of the sheep “Dolly.” The efficiency of live birth was 0.36%, considering the total number of attempts (277) and the number of embryos transferred (3.4%) (Wilmut et al., 1997). Since then, various approaches have been employed to improve the efficiency of SCNT in different animal species, including sheep.

Some strategies were focused on determining the most suitable cell type for SCNT. To date, different cell types, including granulosa cells, cumulus cells, and fibroblasts derived from adult, young, newborn, and fetuses, have been explored. Both fetal fibroblasts and *cumulus cells* present great potential to generate cloned embryos at the blastocyst stage, with slightly but significant variations among different cell passages (Heidari et al., 2010). Mesenchymal stem cells were successfully isolated from adipose tissue, cultured in vitro, and differentiated into other cell types, demonstrating their potential for use in SCNT programs (Zhao et al., 2020).

However, one of the shortcomings of using adult animal cells for SCNT is their limited proliferative capacity in vitro. In this context, the induction of *hTERT* expression in adult sheep fibroblasts enhanced their proliferative capacity in vitro, without leading to phenotypic transformation or compromising their ability to generate cloned embryos while increasing the blastocyst rate (Zhang et al., 2019). Nevertheless, it has been demonstrated that fetal development has no progress beyond 40 days from embryos generated with immortalized sheep fibroblast through telomerase, therefore they are not suitable for SCNT (Cui et al., 2003).

McLean et al. (2021) showed that the aggregation of sheep cloned embryos in the morula stage not only mitigated the adverse effects of the vitrification process on embryo quality but also favored the subsequent in vivo development with a higher percentage of newborns.

Typically, embryos generated through SCNT exhibit restricted early development and low efficiency of obtaining newborns, due primarily to inadequate epigenetic reprogramming of the somatic cell nucleus. Therefore, much effort has been dedicated to elucidate the mechanisms

involved in cell reprogramming for establishing strategies that substantially improve the efficiency of SCNT (Table 3).

Various epigenetic regulators, such as trichostatin A (TSA), chaetocin, vitamin c, zebularine, and scriptaid, have been used to improve nuclear reprogramming in somatic cells and cloned embryos in sheep. Among these, vitamin C enhanced the blastocyst rate, improved the embryonic quality in terms of total cell number, promoted DNA demethylation, and upregulated Krüppel-like factor 4 (*KLF4*) and SRY-box transcription factor 2 (*SOX2*) (Zhang et al., 2020).

In SCNT using *cumulus cells* used as karyoplasts, zebularine, a DNMT inhibitor, improved the percentage of sheep cloned embryos reaching the morula and blastocyst stages and reduced the degree of DNA methylation in the promoter region of octamer-binding transcription factor 4 (*OCT-4*), *NANOG*, and sex determination region Y (*SOX2*) (Cao et al., 2019). Scriptaid, a histone deacetylase inhibitor, increased the blastocyst rate by promoting histone acetylation (acH4K12 and acH3K9) in cloned embryos, similar to that in IVF embryos (Wen et al., 2014).

Furthermore, the combination of some of these epigenetic regulators substantially improved the expression of pluripotent and imprinted genes and, to a lesser extent, of genes regulating DNA methylation in cloned embryos (Fang et al., 2020). While the beneficial effects of these regulators have been demonstrated, their concentration, exposure time, and target (i.e., somatic cells, embryos, or both) must be taken into account. If these variables are not considered, a toxic and detrimental environment can be generated for embryos (Fu et al., 2012; Zhang et al., 2018b; Al-Ghadi et al., 2020).

The human KDM4D protein has been successfully used for somatic cell reprogramming. Specifically, KDM4D reduced the methylation degree of histone 3 (H3K9me2 and H3K9me3) in embryos generated through SCNT, improved embryonic development at the blastocyst stage, increased the total number of cell, and upregulated the expression of *SOX2*, *NANOG*, and caudal type homeobox 2 (*CDX2*) genes (Zhang et al., 2018a). Similarly, *Xenopus laevis* oocyte extract promoted embryonic development and increased the number of embryos reaching term and leading to the birth of a newborn. Specifically, the use of *Xenopus laevis* oocyte extract in sheep fibroblast reprogramming resulted in 10 newborn lambs (14.7%), although only four of them survived (Rathbone et al., 2010) and reached adulthood in good health (Sinclair et al., 2016).

In addition to the above strategies, modification of the chromatin structure of somatic cells, such as sperm, has been proposed as another approach based on the notion that the sperm nucleus possesses the perfect organization to be reprogrammed by the oocyte. This can be achieved by inducing changes in the somatic cell chromatin similar to the ones occurring in spermatid chromatin during spermiogenesis. For example, substitution of histones with protamine through the exogenous expression of protamine 1 gene and bromodomain testis-specific protein, together with histone hyperacetylation via TSA, facilitates the formation of spermatid-like structures, which after being injected into the oocytes, begin histone substitution by protamines and develop until the blastocyst stage (Iuso et al., 2015; Palazzese et al., 2018; Kotlarska et al., 2019).

Most of the strategies reviewed here were focused on improving somatic cell nuclear reprogramming during SCNT, either through the supplementation of chemical agents, enzymes, and extracts or through the modulation of specific epigenetic regulators. Although these strategies achieved the expected changes in different epigenetic signatures of sheep cloned embryos, their potential to establish viable pregnancies remains to be examined and the presence of adequate placentation and fetal development warrant evaluation. Only four studies to date (Rathbone et al., 2010; Xue et al., 2011; Demir et al., 2019; McLean et al., 2020) have evaluated the efficiency of these strategy until the generation of lambs to determine whether complete somatic nucleus reprogramming was achieved.

Our research group is also interested in improving the quality of sheep embryos produced through SCNT using oviductal and uterine

Table 4
Methods for nuclear reprogramming of sheep embryos through somatic cell nuclear transfer (SCNT).

Method	Description	Reference
Oocyte extract	The oocytes contain different cytoplasmic molecules that can reprogram the somatic cell nucleus to a pluripotent state before SCNT.	Rathbone et al. (2010)
Scriptaid	It acts as a histone deacetylase inhibitor, which promotes HK9 and HK12 acetylation in cloned embryos.	Wen et al. (2014), Al-Ghadi et al. (2020), Fang et al. (2020)
Vitamin C	It induces DNA demethylation and regulates gene expression in clone embryos.	Zhang et al. (2020)
Zebularine	Its acts as an inhibitor of DNA methyl transferases and promotes embryonic development.	Cao et al. (2019),Fang et al. (2020)
Kdm4	It is an enzyme responsible for eliminating the methyl group from H3K9; it regulates gene expression, promotes embryonic development, and improves embryo quality.	Zhang et al. (2018a)
Modification of chromatin organization	This technique involves the alteration of chromatin organization in the somatic cell nucleus to obtain spermatid-like cells.	Iuso et al. (2015), Palazzese et al. (2018), Kotlarska et al. (2019).

Table 5
Most abundant sheep oviduct proteins during the estrus and luteal phases.

More abundant estrus proteins		More abundant luteal proteins	
Symbol	Name	Symbol	Name
OVGP1	Oviduct-specific glycoprotein	α2M	Alpha-2-macroglobulin
IDH1	Isocitrate dehydrogenase	CP	Ceruloplasmin
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	GSN	Gelsolin
EEFA1	Elongation factor 1-α1	TTR	Transthyretin
YWHAE	14-3-3 Protein epsilon	CFB	Complex factor B
ANXA8	Annexin A8	LTF	Lactotransferrin

fluids during in vitro embryo culture. Oviductal fluid is a complex mixture derived from oviductal cell secretions and blood plasma transudation. It serves as a carrier for the transport of gametes and embryos and a source of essential metabolites for communication and interaction with the oviduct (Li and Winuthayanon, 2017).

Sheep were among the first species in which the chemical composition of the oviductal fluid was analyzed. Specifically, osmolarity, electrolyte concentration, phosphorus, carbohydrates, proteins, lactate, glucose, albumin, globulins, ammonia, urea, and some amino acids were determined at different stages of the estrous cycle (Restal and Wales, 1966; Wales, 1972).

The oviduct proteome of the sheep has been characterized, and 624 proteins have been identified in the oviductal fluid. The most abundant proteins during the estrous and luteal phases are listed in Table 4 (Sol-eilhavoup et al., 2016). Among these, oviductin is one of the most abundant proteins that is highly conserved across mammals. The supplementation of low concentrations of oviductin during maturation, fertilization, and in vitro embryonic development increased the segmentation rate and promoted embryonic development at the morula and blastocyst stages in goats (Praddep et al., 2011).(Table 5).

Overall, oviductal fluid contains different proteins that regulate embryonic development at the epigenetic and genetic levels, promoting embryonic development and enhancing their quality; therefore, we propose the use of oviductal fluid during the development of sheep embryos generated through SCNT to counteract the inadequate

reprogramming inherent to somatic cells.

7. Conclusions

Embryo production through SCNT shows great potential in the production of sheep with high genetic value, generation of genetically modified sheep, and conservation of endangered wild sheep. Since the birth of the first cloned mammal, a low percentage of sheep embryos with the ability to establish viable pregnancies has been reported, due partly to the epigenetic dysregulations that result in the formation of a dysfunctional placenta. In addition, the fetus usually presents with alterations such as LOS, which is characteristic to ruminants obtained through SCNT.

Different approaches have been employed to increase the percentage of embryos that reach the blastocyst stage and the number of embryos that give birth to healthy newborn lambs.

Despite noted advances, however, SCNT is not as efficient as other reproductive biotechnologies. Nonetheless, it remains the only technique through which nuclear reprogramming of somatic cells terminally differentiated to a totipotent state can be accomplished to generate a complete individual, explaining why the technique prevails as one of the most interesting research areas.

To date, most strategies have focused on improving somatic cell nuclear reprogramming. Elucidating the complexity of these processes can allow for the application of treatments and strategies that not only improve the efficiency of SCNT but also ensure the quality of the offspring.

Acknowledgements

Authors would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, for the scholarship number 570413 granted to the mai author. Also, to Universidad Autónoma Metropolitana for the facilities granted for the development of the study.

References

Akagi, S., Geshi, M., Nagai, T., 2013. Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. *Anim. Sci.* 84, 191–199. <https://doi.org/10.1111/asj.12035>.

Al-Ghadi, M., Alhimaidi, A.R., Iwamoto, D., Al-Mutary, M.G., Ammari, A.A., Saeki, K.O., Aleissa, M.S., 2020. The in vitro development of cloned sheep embryos treated with scriptaid and trichostatin (A). *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 2280–2286. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.04.039>.

Beaujean, N., Taylor, J., Gardner, J., Wilmut, I., Meehan, R., Young, L., 2004. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 71, 185–193. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026559>.

Borges, A.A., Pereira, F.A., 2019. Potential role of intraspecific and interspecific cloning in the conservation of wild mammals. *Zygote* 27, 111–117. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000170>.

Cao, H., Li, J., Su, W., Li, J., Wang, Z., Sun, S., Tian, S., Li, L., Wang, H., Li, J., Fang, X., Wei, Q., Liu, C., 2019. Zebularine significantly improves the preimplantation development of ovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Reprod. Fert.* 31, 357–365. <https://doi.org/10.1071/RD17357>.

Casser, E., Israel, S., Boiani, M., 2019. Multiplying embryos: experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *Int. J. Dev. Biol.* 63, 143–155. <https://doi.org/10.1387/ijdb.190016mb>.

Cortez, V.J., Vajta, G., Valderrama, M.N., Portocarrero, S.G., Quintana, M.J., 2018. High pregnancy and calving rates with a limited number of transferred handmade cloned bovine embryos. *Cell Reprod.* 20, 4–8. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0024>.

Cui, W., Wylie, D., Aslam, A., Dinnyes, A., King, T., Wilmut, I., Clark, J.A., 2003. Telomerase-immortalized sheep fibroblasts can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development. *Biol. Reprod.* 69, 15–21. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013250>.

Czernik, M., Toschi, P., Zacchini, F., Iuso, D., Ptak, E.G., 2017. Dysregulated expression of mitochondrial proteins Mfn2 and Bcl3L in placentae from sheep somatic cell nuclear transfer (SCNT) conceptus. *PLoS One* 12, e0169579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169579>.

Demir, K., Pabuccuoglu, S., Cirit, Ü., Evcec, M., Karaman, E., Özdas, Ö.B., Alkan, S., Atalla, H., Birlir, S., 2019. Effects of serum starvation and ionomycin activation on the development of somatic cell nuclear transfer embryos in sheep. *Vet. J. Ank. Univ.* 66, 37–42. <https://doi.org/10.1501/Vetfak.0000002885>.

Duan, J.E., Jiang, Z.C., Alqahtani, F., Mandou, I., Dong, X., Zheng, X., Marjani, L.S., Chen, J., Tian, X.C., 2020. Methylome dynamics of bovine gametes and in vivo early embryos. *Front. Genet.* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00512>.

- Fang, X., Xia, W., Cao, H., Guo, Y., Wang, H., Zhang, X., Wan, P., Liu, C., Wei, Q., Sun, S., Tian, S., Li, J., Wang, Z., 2020. Effect of supplementation of zebularine and scriptaid on efficiency of in vitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Anim. Biotechnol.* 31, 155–163. <https://doi.org/10.1080/10495398.2018.1559846>.
- Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J.L., Sánchez, B.A., Vignon, X., 2009. First birth of animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology* 71, 1026–1103. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.005>.
- Fu, L., Zhang, J., Yan, F.X., Guan, H., An, X.R., Hou, J., 2012. Abnormal histone H3K9 dimethylation but normal dimethyltransferase EHMT2 expression in cloned sheep embryos. *Theriogenology* 78, 1929–1938. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.017>.
- Galli, C., Lagutina, I., Vassiliev, I., Duchi, R., Lazzari, G., 2002. Comparison of microinjection (piezo electric) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell types in cattle. *Cloning Stem Cells* 4, 189–196. <https://doi.org/10.1089/1536230026039476>.
- Gambini, A., Maserati, M., 2018. A journey through horse cloning. *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 8–17. <https://doi.org/10.1071/RD17374>.
- Gao, H., Zhao, C., Xiang, X., Li, Y., Zhao, Y., Li, Z., Pan, D., Dai, Y., Hara, H., Cooper, K. C., Cai, Z., Mou, L., 2017. Production of $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase and cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-deficient pigs by CRISPR/Cas9 and handmade cloning. *J. Reprod. Dev.* 63, 17–26. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-079>.
- German, D.S., Campbell, H.S.K., Thornton, E., McLachlan, G., Sweetman, D., Alberio, R., 2015. Ovine induced pluripotent stem cells are resistant to reprogramming after nuclear transfer. *Cell Reprogram.* 17, 19–27. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0071>.
- Gómez, M.C., Pope, C.E., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Cole, R.A., Dresser, B.L., 2004. Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 6, 247–258. <https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.247>.
- Grupe, C.G., 2014. The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology* 81, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.022>.
- Gupta, M.K., Heo, Y.T., Kim, D.K., Lee, H.T., Uhm, S.J., 2019. 5-Azacytidine improves the meiotic maturation and subsequent in vitro development of pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 208, 106118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106118>.
- Gurdon, J.B., 2013. The egg and the nucleus: a battle for supremacy. *Development* 140, 2449–2456. <https://doi.org/10.1242/dev.097170>.
- Hajian, M., Hosseini, S.M., Forouzanfar, M., Abedi, P., Ostadhosseini, S., Hosseini, L., Moulavi, F., Gourabi, H., Shahverdi, A.H., Vosough Taghi Dizaj, A., Kalantari, S.A., Fotouhi, Z., Iranpour, R., Mahyar, H., Amiri-Yekta, A., Nasr-Esfahani, M.H., 2011. "Conservation cloning" of vulnerable esfahan mouflon (*Ovis orientalis isphahanica*): in vitro and in vivo studies. *Eur. J. Wildl. Res.* 57, 959–969. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0510-5>.
- Hajian, M., Kiani, M., Hosseini, M.S., Ostadhosseini, S., Forouzanfar, M., Afrough, M., Nasr-Esfahani, M.H., 2013. Specific activation requirements of zona-free sheep oocytes before and after somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.* 15, 247–257. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0089>.
- Heidari, B., Shirazi, A., Tajic, P., Ahmadi, E., Nazari, H., Shams-Esfandabadi, N., Ghasezadeh-Nava, H., 2010. Effect of donor cell age on development of ovine nuclear transfer embryos in vitro. *Zygote* 18, 331–338. <https://doi.org/10.1017/S0967199409990360>.
- Hernández, M.S., Hernández, P.J.E., Vazquez, A.J.R., Ambrós, G.D.A., Navarro, M.M.C., 2020. Developmental dynamics of cloned Mexican bighorn sheep embryos using morphological quality standards. *Vet. Med. Sci.* 6, 382–392. <https://doi.org/10.1002/vms3.242>.
- Hosseini, S.M., Hajian, M., Moulavi, F., Asgari, V., Forouzanfar, M., Nasr-Esfahani, M.H., 2013. Cloned sheep blastocysts derived from oocytes enucleated manually using a pulled Pasteur pipette. *Cell Reprogram.* 15, 15–23. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0033>.
- Iuso, D., Czernik, M., Toschi, P., Fidanza, A., Zacchini, F., Feil, R., Curlet, S., Buchou, T., Shiota, H., Khochbin, S., Ptak, G.E., Loi, P., 2015. Exogenous expression of human protamine 1 (hPrm1) remodels fibroblast nuclei into spermatid-like structures. *Cell Rep.* 13, 1765–1771. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.066>.
- Khan, S., Tail, Khan, A., Bhat, S., Ashraf, A., Bhat, M.H., Khan, F., Shan, R.A., 2018. Comparison of efficiency of in vitro cloned sheep embryo production by conventional somatic cell nuclear transfer and handmade cloning technique. *Reprod. Domest. Anim.* 53, 512–518. <https://doi.org/10.1111/rda.13138>.
- Kim, M., Jang, G., Oh, H., Yuda, F., Kim, H., Hwang, W., Hossein, M., Kim, J., Shin, N., Kang, S., Lee, B., 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9, 130–137. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.0034>.
- Koroghli, A.J., Floyd, E., Regouski, M., Rood, K., Gash, K., Panter, K., Stott, R., Davies, J. C., Polejaeva, A.I., Rutigliano, M.H., 2018. Gene expression and lymphocyte population at the fetal-maternal in sheep pregnancies established by somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Fertil. Dev.* 30, 1011–1020. <https://doi.org/10.1071/RD17224>.
- Kotlarska, M., Czernik, M., Iuso, D., Winiarczyk, D., Szyszka-Peczkwicz, J., Greda, P., Loi, P., Modlinski, J.A., 2019. Improvement of mouse and sheep cloned blastocysts quality upon nuclear transfer of BRDT expressing somatic cells. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 37, 297–309.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Colleoni, S., Crotti, G., Galli, C., 2007. Comparison aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* 67 (1), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.011>.
- Lawrence, M., Daujat, S., Schneider, R., 2016. Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. *Trends Genet.* 32, 42–56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>.
- Lee, J.H., Peters, A., Fisher, P., Bowles, E.J., St John, J.C., Campbell, K.H., 2010. Generation of mtDNA homoplasmic cloned lambs. *Cell. Reprogram.* 12, 347–355. <https://doi.org/10.1089/cell.2009.0096>.
- Li, H., Wang, G., Hao, Z., Zhang, G., Qing, Y., Liu, S., Weirong, P., Cheng, L., Liu, G., Zhao, R., Jia, B., Wei, H.J., 2016. Generation of biallelic knock out sheep via gene editing and somatic cell nuclear transfer. *Sci. Rep.* 6, 33675. <https://doi.org/10.1038/srep33675>.
- Li, H., Chen, S., Piao, S., An, T., Wang, 2021. Production of artificial synthetic spidroid gene 3S-transgenic cloned sheep embryos using somatic cell nuclear transfer. *Anim. Biotechnol.* 32, 616–626. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1737098>.
- Li, S., Winuthayanon, W., 2017. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J. Endocrinol.* 232, R1–R26. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>.
- Liu, T., Dou, H., Xiang, X., Li, L., Li, Y., Lin, L., Pang, X., Zhang, Y., Chen, Y., Luan, J., Xu, Y., Yang, Z., Yang, W., Liu, H., Li, F., Wang, H., Yang, H., Bolund, L., Vajta, G., Du, Y., 2015. Factor determining the efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer: data analysis with over 200,000 reconstructed embryos. *Cell Reprogram.* 17, 463–471. <https://doi.org/10.1089/cell.2015.0037>.
- Lloyd, R.E., Lee, J.H., Alberio, R., Bowles, E.J., Ramalho-Santos, J., Campbell, K.H., St John, J.C., 2006. Aberrant nucleocytoplasmic cross-talk results in donor cell mtDNA persistence in cloned embryos. *Genetics* 172, 2515–2527. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.055145>.
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., Clinton, M., 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962–964. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-962>.
- Loi, P., Clinton, M., Vackva, I., Fulka, J., Feil, R., Palmieri, C., Salda, D.L., Ptak, G., 2006. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology* 65, 1110–1121. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.016>.
- Loi, P., Czernik, M., Zacchini, F., Iuso, D., Scapolo, P.A., Ptak, G., 2013. Sheep γ : the first large animal model in nuclear transfer research. *Cell Reprogram.* 15, 367–373. <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0032>.
- Loi, P., Toschi, P., Zacchini, F., Ptak, G., Scapolo, P., Capra, E., Stella, A., Ajmone, P., Williams, J., 2016. Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. *Genet. Sel. Evol.* 48, 53. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0231-z>.
- Luo, J., Zhang, Y., Guo, Y., Tang, H., Wei, H., Liu, S., Wang, X., Wang, L., Zhou, P., 2017. TRIM28 regulates igf2-h19 and Dlk-Gtl2 imprinting by distinct mechanisms during sheep fibroblast proliferation. *Gene* 637, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.048>.
- Ma, L., Liu, X., Wang, F., He, X., Chen, S., Li, W., 2015. Different donor cell culture methods can influence the developmental ability of cloned sheep embryos. *PLoS One* 10, e0135344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135344>.
- Ma, L.B., He, X.Y., Wang, F.M., Cao, J.W., Cheng, T., 2013. The development and expression of pluripotency genes in embryos derived from nuclear transfer and in vitro fertilization. *Zygote* 22, 540–548. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000129>.
- McLean, Z., Appleby, S.J., Fermin, L.M., Henderson, H.V., Wei, D., Wells, D.N., Oback, B., 2021. Controlled cytoplasmic arrest and morula aggregation enhance development, cryoresilience, and in vivo survival of cloned sheep embryos. *Cell Reprogram.* 23, 14–25. <https://doi.org/10.1089/cell.2020.0078>.
- Navarro-Maldonado, M.C., Rosado-García, A., Serrano, H.F., 2008. Técnicas de clonación de embriones. In: Moreno CR. *Ciencia Veterinaria*, 9. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, pp. 35–74. -4.
- Ni, W., You, S., Cao, Y., Li, C., Wei, J., Wang, D., Qiao, J., Zhao, X., Hu, S., Quan, R., 2016. Aberrant expression of miR-127, miR-21 and miR-16 in placentas of deceased cloned sheep. *Res. Vet. Sci.* 105, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.017>.
- Oback, B., Wiersema, A.T., Gaynor, P., Laible, G., Tucker, F.C., Oliver, J.E., Miller, A.L., Troskie, H.E., Wilson, K.L., Forsyth, J.T., Berg, M.C., Cockrem, K., McMillan, V., Tervit, H.R., Wells, D.N., 2003. Cloned cattle derived from a novel zona free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* 5, 3–12. <https://doi.org/10.1089/153623003321512111>.
- Palazese, L., Czernik, M., Iuso, D., Toschi, P., Loi, P., 2018. Nuclear quiescence and histone hyper acetylation jointly improve protamine mediated nuclear remodeling in sheep fibroblasts. *PLoS One* 13, e0193954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193954>.
- Palmieri, C., Loi, P., Ptak, G., Salda, D.L., 2008. A review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep and mice. *Vet. Pathol.* 45, 865–880. <https://doi.org/10.1354/62Vp.45-6-865>.
- Pan, X., Zhang, Y., Guo, Z., Wang, F., 2014. Development of interspecies nuclear transfer embryos reconstructed with argali (*Ovis ammon*) somatic cells and sheep ooplasm. *Cell Biol. Int.* 38, 211–218. <https://doi.org/10.1002/cbin.10191>.
- Praddep, M.A., Jagadeesh, J., De, A.K., Kaushik, J.K., Malakar, D., Kumar, S., Dang, A.K., Das, S.K., Mohanty, A.K., 2011. Purification. Sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on in vitro embryo development. *Theriogenology* 71, 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.007>.
- Rathbone, A.J., Fisher, P.A., Lee, J.H., Craigon, J., Campbell, K., 2010. Reprogramming of ovine somatic cells with *Xenopus laevis* oocyte extracts prior to SCNT improves live birth rate. *Cell Reprogram.* 12, 609–616. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0015>.
- Reig, G., Concha, L.M., 2012. Imprinta genómica y desarrollo embrionario. *Int. J. Morphol.* 30, 1453–1457. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400029>.

- Restal, B.J., Wales, R.G., 1966. The fallopian tube of the sheep, the chemical composition of the fluid from the fallopian tube. *Aust. J. Biol. Sci.* 19, 687–698. <https://doi.org/10.1071/B19660687>.
- Rutigliano, M.R., Wilhelm, A., Hall, J., Shi, B., Meng, Q., Stott, R., Bunch, D.T., White, L. K., Davies, J.C., Polejaeva, A.I., 2015. Cytokine gene expression at the maternal-fetal interface after somatic cell nuclear transfer pregnancies in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 29, 646–657. <https://doi.org/10.1071/RD15103>.
- Samiec, M., 2005. The effect of mitochondrial genome on architectural remodeling and epigenetic reprogramming of donor cell nuclei in mammalian nuclear transfer-derived embryos. *J. Anim. Feed Sci.* 14, 393–422. <https://doi.org/10.22358/jafs/67034/2005>.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2005. Molecular conditions of the cell nucleus remodelling/reprogramming process and nuclear-transferred embryo development in the intraooplasmic karyoplast injection technique: a review. *Czech J. Anim. Sci.* 50, 185–195. <https://doi.org/10.17221/4142-cjas>.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2010a. Preimplantation developmental capability of cloned pig embryos derived from different types of nuclear donor somatic cells. *Ann. Anim. Sci.* 10, 385–398.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2010b. The use of different methods of oocyte activation for generation of porcine fibroblast cell nuclear-transferred embryos. *Ann. Anim. Sci.* 10, 399–411.
- Samiec, M., Skrzyszowska, M., 2021. Inheritance of mitochondrial genome and epigenetic reprogrammability of chromosomal telomeres in somatic cell cloning of mammals. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3099. <https://doi.org/10.3390/ijms22063099>.
- Selokar, L.N., Sharma, P., Krishna, A., Kumar, D., Kumar, D., Saini, M., Sharma, A., Vijayalakshmy, K., Yadav, S.P., 2018. Establishment of a somatic cell bank for Indian buffalo breeds and assessing the suitability of the cryopreserved cells for somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprod.* 20, 157–163. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0066>.
- Sinclair, K.D., Corr, S.A., Gutierrez, C.G., Fisher, P.A., Lee, J.-H., Rathbone, A.J., Choi, I., Campbell, K.H.S., Gardner, D.S., 2016. Healthy ageing of cloned sheep. *Nat. Commun.* 7, 12359. <https://doi.org/10.1038/ncomms12359>.
- Skrzyszowska, M., Samiec, M., Słomski, R., Lipiński, D., Maly, E., 2008. Development of porcine transgenic nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells transfected by the novel technique of nucleofection or standard lipofection. *Theriogenology* 70, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.007>.
- Soleilhavou, C., Riou, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P., Reyaud, K., de Graaf, S.P., Gerard, N., Druart, X., 2016. Proteomes of the female genital tract during the oestrous cycle. *Mol. Cell. Proteom.* 15, 93–108. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052332>.
- Spencer, T.E., Hansen, T.R., 2015. Implantation and establishment of pregnancy in ruminants. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 216, 105–135. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3_7.
- Turek-Plewa, J., Jagodziński, P.P., 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 631–647. PMID: 16341272.
- Vajta, G., 2018. Cloning: a sleeping beauty awaiting the kiss? *Cell Reprod.* 20, 145–155. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0058>.
- Vajta, G., Lewis, I., Hyttel, P., Thouas, G., Trounson, A., 2001. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning* 3, 89–95. <https://doi.org/10.1089/15204550152475590>.
- Vázquez, A.J., Hernández, M.S., Hernández, P.J., Rivera, R.J., Ambríz, G.D., Navarro, M. M., 2017. Effect of sequential human medium use in the production of blastocysts of female *Ovis canadensis mexicana* by interspecies handmade cloning. *Acta Zool. Mex.* 33 (2), 328–338.
- Wales, R.G., 1972. The uterus of the ewe, chemical analysis of uterine fluid collected by cannulation, 947–059. *Aust. J. Biol. Sci.* 26. <https://doi.org/10.1071/B19730947>.
- Wang, X., Qu, J., Li, J., He, H., Liu, Z., Huan, Y., 2020. Epigenetic reprogramming during somatic cell nuclear transfer: recent progress and future directions. *Front. Genet.* 11, 205. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00205>.
- Wen, B.Q., Li, J., Tian, J.S., Sun, C.S., Qi, X., Cai, W.T., Chang, Q.L., 2014. The histone deacetylase inhibitor scriptaid improves in vitro development competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology* 81, 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.032>.
- White, K.L., Bunch, T.D., Mitalipov, S., Reed, W.A., 1999. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 1, 47–54. <https://doi.org/10.1089/15204559950020085>.
- Wiater, J., Samiec, M., Wartalski, K., Smorag, Z., Jura, J., Słomski, R., Skrzyszowska, M., Romek, M., 2021a. Characterization of mono- and bi-transgenic pig-derived epidermal keratinocytes expressing human FUT2 and GLA genes - in vitro studies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9683. <https://doi.org/10.3390/ijms22189683>.
- Wiater, J., Samiec, M., Skrzyszowska, M., Lipiński, D., 2021b. Trichostatin A-assisted epigenomic modulation affects the expression profiles of not only recombinant human α 1,2-fucosyltransferase and α -Galactosidase an enzyme but also Gal α 1 \rightarrow 3Gal epitopes in porcine bi-transgenic adult cutaneous fibroblast. *Cells. Int. J. Mol. Sci.* 22, 1386. <https://doi.org/10.3390/ijms22031386>.
- Williams, J., Shin, T., Liu, L., Flores-Foxworth, G., Romano, J., Blue-McClendon, A., Kraemer, D., Wethusin, M.E., 2006. Cloning of exotic/endangered species: desert bighorn sheep. *Methods Mol. Biol.* 348, 169–182. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-154-3_11.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, J., Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>.
- Xue, L., Cheng, L., Su, G., Kang, F., Wu, X., Bai, C., Zhang, L., Li, G.P., 2011. Nuclear transfer procedures in the ovine can induce early embryo fragmentation and compromise cloned embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* 126, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.05.015>.
- Yang, B.Z., Yang, C.Y., Li, R.C., Qin, G.S., Zhang, X.F., Pang, C.Y., Chen, M.T., Huang, F. X., Li, Z., Zheng, H.Y., Huang, Y.J., Liang, X.W., 2010. An inter-subspecies cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) obtained by transferring of cryopreserved embryos via somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Domest. Anim.* 45, e21–e25. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01510.x>.
- Yin, J.X., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y., Tsunoda, Y., 2002. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67, 442–446. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.442>.
- Young, L.E., Schnieke, A.E., McCreath, K.J., Wieckowski, S., Konfortova, G., Fernandes, K., Ptak, G., Kind, A.L., Wilmunt, I., Loi, P., Feil, R., 2003. Conservation of IGF2-H19 and IGF2 imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech. Dev.* 120, 1433–1442. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2003.09.006>.
- Yuan, Y., Liu, R., Zhang, X., Zhang, J., Zheng, Z., Huang, C., Cao, G., Liu, H., Zhang, X., 2019. Effects of recipient oocyte source, number of transferred embryos and season on somatic cell nuclear transfer efficiency in sheep. *Reprod. Domest. Anim.* 54, 1443–1448. <https://doi.org/10.1111/rda.13546>.
- Zhang, N., Zhang, S., Guan, H., Hou, J., 2019. The proliferative lifespan of adult sheep fibroblasts can be conditionally extended by tetracycline-inducible expression of human telomerase reverse transcriptase. *Cytotechnology* 71, 117–125. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0271-z>.
- Zhang, P., Liu, P., Dou, H., Chen, L., Chen, L., Lin, L., Tan, P., Vajta, G., Gao, J., Du, Y., Ma, R.Z., 2013. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids. *PLoS One* 8, e55941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055941>.
- Zhang, Y., Wang, Y., Yulin, B., Tang, B., Wang, M., Zhang, C., Jin, J., Li, T., Zhao, R., Yu, X., Zuo, Q., Li, B., 2018. CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sMSCs differentiation. *J. Cell Biochem.* <https://doi.org/10.1002/jcb.27474>.
- Zhang, Y., Wang, Q., Liu, K., Gao, E., Guan, H., Hou, J., 2018a. Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology* 70, 1469–1477. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0224-6>.
- Zhang, Y., Gao, E., Wang, Q., Tian, H., Hou, J., 2018b. Effects of histone methyltransferase inhibitor chaetocin on histone H3K9 methylation of cultured ovine somatic cells and development of preimplantation cloned embryos. *Reprod. Toxicol.* 79, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.06.006>.
- Zhang, Y., Gao, E., Guan, H., Wang, Q., Zhang, S., Liu, K., Yan, F., Tian, H., Shan, D., Xu, H., Hou, J., 2020. Vitamin C treatment of embryos, but not donor cells, improves the cloned embryonic development in sheep. *Reprod. Domest. Anim.* 55, 255–265. <https://doi.org/10.1111/rda.13606>.
- Zhao, R., Zhang, Q., Liu, K., Yang, P., Sun, Y., Zhang, Y., Liu, Z., 2020. Isolation, culture, and induced multiple differentiation of Mongolian sheep adipose-derived mesenchymal stem cells. *J. Histotechnol.* 43, 125–134. <https://doi.org/10.1080/01478885.2020.1744316>.

Article

Reproduction of Sheep through Nuclear Transfer of Somatic Cells: A Bibliometric Approach

José Roberto Vazquez-Avenidaño ^{1,2} , César Cortez-Romero ^{3,4} , Ángel Bravo-Vinaja ⁴ ,
Demetrio Alonso Ambríz-García ² , Alfredo Trejo-Córdova ²  and María del Carmen Navarro-Maldonado ^{2,*} 

- ¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México C.P. 3855, Mexico; robertmizer@gmail.com
 - ² Department of Biology of Reproduction, Division of Biological and Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México C.P. 09310, Mexico; deme@xanum.uam.mx (D.A.A.-G.); atrejo109@hotmail.com (A.T.-C.)
 - ³ Program in Genetic Resources and Productivity-Livestock, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco C.P. 56264, Mexico; ccortez@colpos.mx
 - ⁴ Program in Innovation in Natural Resources Management, Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí C.P. 78600, Mexico; abravo@colpos.mx
- * Correspondence: carmennavarro2006@yahoo.com.mx

Simple Summary: Different reproductive biotechnologies have been applied to sheep, such as cloning, which has been successfully applied in this species. In this context, the aim of the present study was to carry out a bibliometric analysis of the scientific literature on cloning applied to sheep reproduction, since the first report was published, to identify the most cited articles, main authors and collaboration among them, published journals, institutions with more published papers, most prolific countries and the network collaboration among them, and research topics. This study collected bibliographic data from 124 papers relating to cloning of sheep. The articles that were cited more often addressed topics related to the generation of transgenic animals, recovery of wild species, and xenotransplants. So far, no bibliometric studies have been conducted about cloning of sheep.



Citation: Vazquez-Avenidaño, J.R.; Cortez-Romero, C.; Bravo-Vinaja, Á.; Ambríz-García, D.A.; Trejo-Córdova, A.; Navarro-Maldonado, M.d.C. Reproduction of Sheep through Nuclear Transfer of Somatic Cells: A Bibliometric Approach. *Animals* **2023**, *13*, 1839. <https://doi.org/10.3390/ani13111839>

Academic Editors: Calogero Stelletta, Federica Turri and Koray Tekin

Received: 18 April 2023

Revised: 26 May 2023

Accepted: 28 May 2023

Published: 1 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is a reproductive biotechnology with great potential in the reproduction of different species of zootechnical interest, including sheep. This study aimed to carry out a bibliometric analysis of scientific papers published on the application of SCNT in sheep reproduction during the period 1997–2023. The search involved the Science Citation Index Expanded and Social Sciences Citation Index databases of the main collection of the Web of Sciences with different descriptors. A total of 124 scientific papers were analyzed for different bibliometric indicators using the VOSviewer software. Since 2001, the number of SCNT-related papers that have been published concerning sheep reproduction has increased and it has fluctuated in ensuing years. The main authors, research groups, institutions, countries, papers, and journals with the highest number of papers related to the application of SCNT in sheep reproduction were identified, as well as the topics that address the research papers according to the terms: somatic cell, embryo, oocyte, gene expression, SCNT, and sheep.

Keywords: SCNT; nuclear transfer; reproductive biotechnology; bibliometric analysis; sheep; VOSviewer

1. Introduction

Sheep are one of the first species to have been domesticated from about 8000 to 9000 years ago. The adaptability of this species to different types of weather has allowed their wide geographic distribution. The global population of sheep reached 1.2 billion by the year 2012. Sheep are among the top five most economically important domestic species in the world, and approximately 1400 discrete breeds have been registered [1]. Sheep are

easy to manage and maintain, and their pregnancy period is relatively short, which are advantageous for evaluating genetic improvement programs [2,3].

There are different reproductive biotechnologies that have focused on sheep which include artificial insemination (AI), in vitro fertilization (IVF), gamete and embryo cryopreservation, cloning, among others [4]. In vitro production of cloned embryos involves vertical and horizontal approaches [5]. The vertical approach includes the generation of monozygotic twins from blastomere separation and embryo bipartition in vivo or by IVF [6]. In contrast, the horizontal approach involves somatic cell nuclear transfer (SCNT). In SCNT, an oocyte devoid of its nucleus serves as a cytoplasmic receptor for donated genetic information from a somatic cell [7]. The first attempts to generate cloned embryos by blastomere separation and embryo bipartition were carried out in sheep, as was the generation of embryos by SCNT [8]. SCNT is a biotechnology with great potential to reproduce sheep with high genetic value [9], to conserve endangered wild sheep [10], and to generate transgenic sheep with biomedical purposes [11].

The scientific and technological advances in the past several decades have been reflected in an increase in scientific information in bibliographic databases for the dissemination of knowledge. This has enhanced the use of bibliometrics [12]. Bibliometrics is a method to help evaluate scientific information by evaluating a set of methodological knowledge in published papers through indicators, number of papers published, and citations of these papers, according to the region or country of origin, authors, working groups, and research centers [13]. Bibliometric studies have been used to quantify scientific output and to identify groups and areas of excellence, thematic and interdisciplinary emerging disciplines, and thematic collaboration networks [12]. Governments can use this information to implement policies that benefit the scientific and technological development of their nations [14].

An evaluation of the different elements of scientific papers can reveal different bibliometric indicators that measure the results of scientific and technological work. The choice of the database to be used in the analysis of scientific information will condition the bibliometric indicators that can be developed [12].

The aim of this study was to identify regularities of scientific information to provide an overview of scientific research published in mainstream journals on the application of SCNT in sheep reproduction. The study used several one-dimensional and multi-dimensional bibliometric indicators. The data were analyzed using the VOSviewer software.

2. Materials and Methods

The Science Citation Index Expanded (SCIE) and the Social Sciences Citation Index (SSCI) databases of the Web of Science were used to search for papers related to the application of SCNT in sheep reproduction that had been indexed in these databases and published in mainstream journals [15] from 1997 to 2023. The expressions used in the advanced search option in the search performed in January 2023 were TS = ("Somatic cell" "Nuclear transfer") OR SCNT) and TI = (Ewe OR Sheep OR Ovine OR "Lamb"). These words were searched for in the titles, abstracts, and keywords of the scientific papers. Only research and review papers were considered. The bibliographic records that were obtained were analyzed according to the one-dimensional and multi-dimensional indicators [16,17] shown in Table 1.

Table 1. Bibliometric indicators used to analyze scientific research on the application of SCNT in the production of sheep indexed in the Web of Science.

One-Dimensional Indicators	Multi-Dimensional Indicators
Growth of literature	Cooperation among countries
Most published authors	Cooperation among authors
Most cited papers	Identification of research topics
Country of publication	
Institutions with more published papers	
Publishing journals	

The bibliographic data were analyzed using Excel to obtain the “literature growth” indicator. Data obtained from the other indicators were analyzed using the VOSviewer software version 1.6.19 (Centre for Science and Technology Studies, Leiden University, Leiden, The Netherlands, 2023), which visualizes scientific landscapes. This bibliometric software was used, in the present study, to create and visualize maps by “visualization of similarities” (VOS), a method proposed by van Eck and Waltman [18]. This is an alternative to multi-dimensional scaling to visualize similarities between themes or objects. A co-occurrence analysis of the words related to sheep SCNT was performed in the titles and abstracts of the scientific papers [19]. The generated maps of science featured scientific thematic networks between teams of researchers, institutions, and countries concerning the application of SCNT in sheep. The terms were standardized before analysis. A joint word analysis was also performed, which was extracted from the titles and abstracts of the published papers. This co-occurrence of words reflects the conceptual relationship network of the views of scientists active in the field. The frequency of words was used to construct co-occurrence maps representing the intellectual content of an area of research through the analysis of groups and networks [20].

3. Results

3.1. Growth of Literature

The Science Web reference and citation database revealed 107 papers. In addition, 17 papers were included from the *Journal Citation Reports* (JCR) that had not been identified in the initial search. In total, there were 124 papers that comprised 118 research papers (95.2%) and 6 review papers (4.8%). The first paper on the application of SCNT in sheep, entitled “Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells”, was published in 1997 in the journal *Nature* [21]. In subsequent years from 2001, the number of published papers fluctuated from one to twelve papers every year, with an annual average of five papers. Most papers ($n = 12$) were published in 2013 (Figure 1).

3.2. Most Productive Author

Keith Henry Stockman Campbell published the most papers about SCNT in sheep. The 15 articles published have been cited 4868 times (H-index of 34) [22]. Dr. Campbell was affiliated with the University of Nottingham until his death in 2012. One aspect of his research was the application of SCNT in mammals, using sheep as a research model for the generation of cloned or transgenic lambs. The author with the highest scientific productivity is Professor Sir Ian Wilmut, who has published nine articles that have been cited 4992 times (H-index of 69). His research at the University of Edinburgh focused on cell reprogramming mechanisms and regenerative medicine (Table 2).

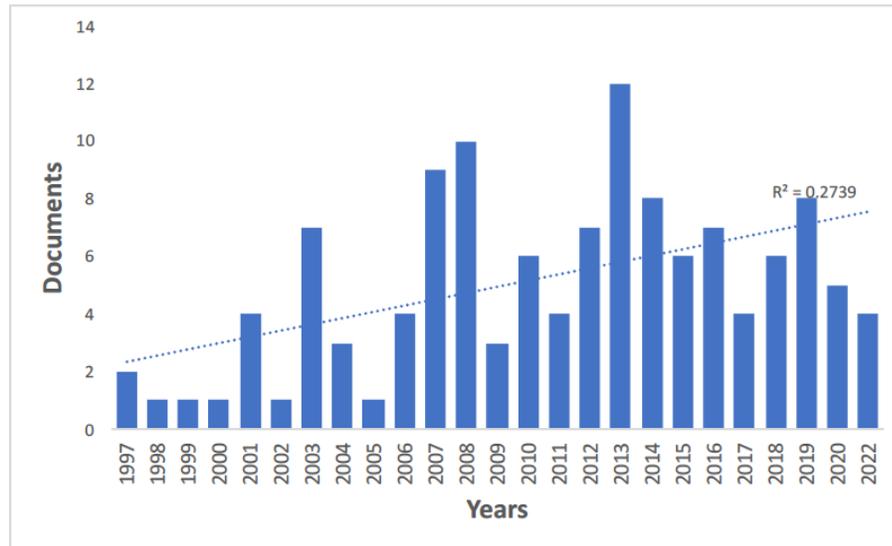


Figure 1. Distribution of papers about the application of SCNT in sheep, indexed in Web of Science from 1997 to 2022.

Table 2. List of leading authors and the number of citations in the scientific research of sheep production by using SCNT.

Author	Papers	Citations	H-Index	Institution	Research Interests
Campbell	15	4868	34	University of Nottingham	Cloning mammals, transgenic animals, and stem cells
Loi	13	610	19	University of Teramo	Developmental biology, reproductive biotechnologies, nuclear reprogramming, and epigenetic modifications
Ptak	11	595	25	Jagiellonian University	Mechanisms involved in the implantation and placentation of mammals, influence of the environment on the development of organisms
Wilmot	9	4992	69	The University of Edinburgh	Regenerative medicine and cellular reprogramming mechanisms
Hajian	8	139	18	Royan Institute for Biotechnology	Reproductive biotechnologies, mammalian cloning, genetics, and molecular biology
Hosseini	8	139	21	Royan Institute for Biotechnology	Reproductive biotechnologies in wild animals and mammalian cloning
Nasr-Esfahani	8	139	47	Royan Institute for Biotechnology	Reproductive biotechnologies in ruminants
Forouzanfar	7	123	16	Islamic Azad University	Reproductive biotechnologies, cloning of mammals and transgenic animals
Hou	7	57	16	Institute of Crops Sciences	Reproductive biotechnologies and cloning
Lee	7	233	18	Pusan National University	Cloning of mammals
Peura	7	139	20	Genea Biomedx	Reproductive biotechnologies
Walker	7	284	31	South Australian Research & Development Institute	Reproductive biotechnologies and embryonic development in ruminants
Czernik	6	48	15	University of Teramo	Assisted reproduction techniques and reproductive biology
Guan	6	45	13	Guangzhou Institute of Energy Conversion	Reproductive biotechnologies and cloning
Moulavi	6	119	14	Camel Advanced Reproductive Technologies Center	Reproductive biotechnologies in wild animals and mammalian cloning
Choi	5	82	13	University of Nottingham	Developmental biology, genome expression, embryonic development, and mammalian cloning
Iuso	5	41	9	National Institute for Biology	Assisted reproduction techniques and reproductive biology

The author list was ordered based on the number of papers published by each author.

3.3. Cooperation between Authors

There are five research groups that focused on the application of SCNT in sheep (Figure 2). The group with the largest number of researchers is composed of Samaneh Sadat Hosseini Farahabadi, Mehdi Hajian, Mohammad Hossein Nasr-Esfahani, Forouzafar Mohsen, and Fariba Moulavi. They belong to different institutions in Iran, including the Royan Institute for Biotechnology, the Islamic University of Azad, and the Camels Advanced Reproductive Technologies Center. This research group did not collaborate with others. The second research group is composed of four researchers: Pasqualino Loi, Marta Czernik, and Domenico Iuso from the University of Teramo in Italy and Grażyna Ptak from the Jagellonian University in Poland. The third research group includes the aforementioned Dr. Campbell, Joon Hee Lee, and Inchul Choi from the University of Nottingham in England. The fourth research group includes Teija Peura of Genea Biomedx (Box Hill, Australia), Simon Walker of the Turretfield Research Centre, (Rosedale, Australia), and the aforementioned Professor Sir Wilmut. Research groups from two to four collaborated with each other. The final research group includes Jian Hou and Hong Guan of the Chinese University of Agriculture, who have had no interaction with other research groups.

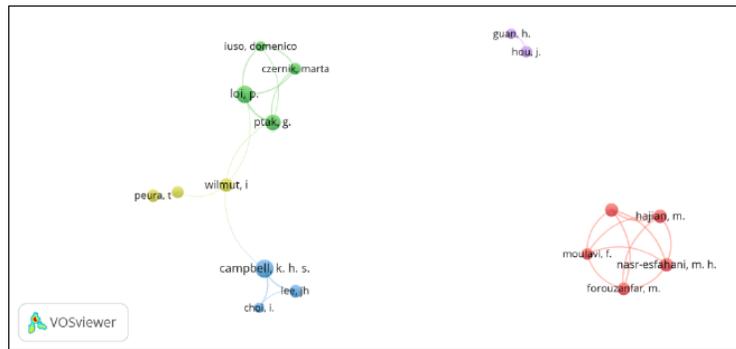


Figure 2. Visualization of research groups on the application of SCNT in sheep using the VOSviewer software.

3.4. Published Papers and Cooperation among Countries

The countries that have most intensively performed and published research on SCNT involving sheep are shown in Table 3. The collaboration among countries is shown in Figure 3. Scholars from China have collaborated mainly with colleagues from Iran, Australia, Canada, and United States. Scholars from England have collaborated with colleagues from Scotland and France. Finally, academics from Italy have collaborated with colleagues from Poland.

Table 3. Main countries with the most published papers concerning the application of SCNT in sheep production.

Country	Number of Published Papers
China	45
Italy	16
England	15
Scotland	15
United States	12
Iran	11
Australia	10
France	6
Poland	6
Canada	5

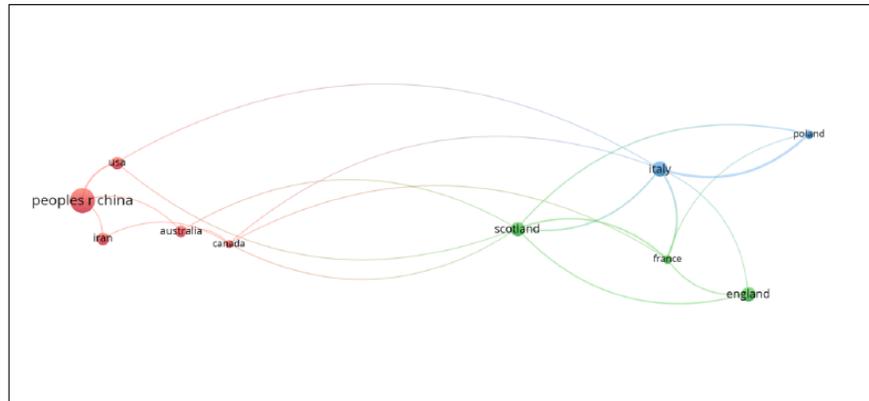


Figure 3. Visualization of countries with the greatest contribution of published papers about the application of SCNT in sheep and their collaborative relationships using the VOSviewer software.

3.5. Institutions with the Largest Contribution of Published Papers

The University of Nottingham has the highest number of published papers concerning the application of SCNT in sheep, with 14 papers. In accordance with the Academic Ranking of World Universities (ARWU) and the World Classification of Universities (QS), it is ranked 101–150th and 114th, respectively. The Roslin Institute of the University of Edinburgh holds the second position, with 13 published papers that have been cited 1844 times, seven papers have been cited more than 100 times each. The University of Edinburgh occupies position 35th in the ARWU and position 15 in the QS (Table 4).

Table 4. Top ten institutions that have contributed published papers on the application of SCNT in sheep production.

Institution	Country	P	TC	AC	>100	>30	<30	CP	ARWU	QS
1. University of Nottingham	United Kingdom	15	510	34	2	3	10	2	101–150	114
2. The Roslin Institute	United Kingdom	13	1844	141.8	7	3	3	2	-	-
3. Università Degli studi di Teramo	Italy	12	143	11.9	0	3	9	4	-	-
4. China Agricultural University	China	11	79	7.2	0	0	12	5	201–300	591–600
6. Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR)	Iran	8	132	16.5	0	2	6	1	-	-
5. Inner Mongolia Agricultural University	China	7	37	5.2	0	0	7	6	-	-
7. Shihezi University	China	6	88	14.6	0	1	5	3	-	-
8. Turretfield Research Centre	Australia	5	244	48.8	1	0	4	0	-	-
9. The University of Edinburgh	United Kingdom	5	253	50.6	1	0	4	3	35	15
10. Northwest A&F University	China	5	50	10	0	2	3	2	401–500	-

P, number of papers; TC, total citations; AC, average number of citations; >100, papers with more than 100 citations; >30, papers between 30 and 99 citations; <30, papers with fewer than 30 citations; CP, contemporary productivity (papers published in the last 10 years); ARWU, Academic Ranking of World Universities; QS, World University Rankings.

3.6. Journals

The eight main journals with papers dealing with SCNT-related topics in sheep are shown in Table 5. The information in the table includes bibliometric data and impact factor (IF) [23]. It also includes the positions of the journals in accordance with the thematic

category, which indicates the quartile according to the JCR. IF is used as an indicator of the relative importance of a journal within a particular area of study and it evaluates the frequency with which journal articles are cited during a given period [24]. The journal *Cellular Reprogramming* has published the most papers related to SCNT in sheep ($n = 11$, IF 2.257, JCR position in the fourth quartile of thematic categories). The next journal is *Theriogenology* ($n = 10$, IF 2.923, first quartile for the “Veterinary Sciences” category). The journal with the highest number of citations is *Biology of Reproduction* (second quartile of the “Reproductive Biology” category), followed by *Theriogenology* (first quartile in the “Veterinary Sciences” category).

Table 5. Main journals with greater contributions of SCNT-related articles on sheep.

Journal	Papers	Citations	Impact Factor	JCR Category	Rank, Quartile
<i>Cellular Reprogramming</i>	11	155	2.257	Biotechnology and Applied Microbiology	130/156, Q4
				Cell and Tissue Engineering	27/29, Q4
				Genetics and Inheritance	132/175, Q4
<i>Theriogenology</i>	10	267	2.923	Reproductive Biology	20/31, Q3
				Veterinary Sciences	21/145, Q1
<i>Reproduction Fertility and Development</i>	8	88	1.973	Developmental Biology	33/39, Q4
				Reproductive Biology	27/31, Q4
				Zoology	59/176, Q2
<i>Molecular Reproduction and Development</i>	6	110	2.812	Biochemistry and Molecular Biology	230/297, Q4
				Cellular Biology	159/195, Q4
				Developmental Biology	20/39, Q3
PLoS ONE	6	98	3.752	Reproductive Biology	22/31, Q3
				Multidisciplinary Sciences	29/74, Q2
<i>Reproduction in Domestic Animals</i>	6	42	1.858	Agriculture, Dairy and Animal Science	33/62, Q3
				Reproductive Biology	29/31, Q4
				Veterinary Sciences	55/145, Q2
<i>Animal Reproduction Sciences</i>	5	171	2.22	Agriculture, Dairy and Animal Science	22/62, Q2
				Reproductive Biology	23/31, Q3
				Veterinary Sciences	44/145, Q2
<i>Biology of Reproduction</i>	5	485	4.161	Reproductive Biology	10/31, Q2

3.7. Most Cited Articles

The citation structure of papers between 1997 and 2022 included five papers with ≥ 180 citations (Table 6). The most cited article referred to the first lamb cloned from adult cells obtained from mammary gland; this success demonstrated two facts, i.e., first, terminally differentiated cells preserve all their genetic information, and it can be restored; and second, the SCNT can be applied to superior vertebrates such as mammals [21].

The second most cited article focused on the generation of transgenic lambs from the transfection of fetal fibroblasts with the neomycin resistance marker gene and human coagulation factor IX, for protein coding in sheep’s milk [25]. This was followed by an article related to the generation of transgenic lambs. It focused on “gene targeting” in fetal fibroblasts to integrate a therapeutic transgene into the gene locus ((COL1A1) collagen type I, alpha 1 chain) in sheep [26]. The fourth most cited article was related to SCNT as a tool for the recovery of wild species at risk, in which the feasibility of using *Ovis aries* oocytes as receptors of *O. orientalis musimon* fibroblasts for interspecific SCNT. One of the embryos reached the term of gestation with the birth of a European mouflon [10].

Table 6. Most cited articles on SCNT concerning the reproduction of sheep.

Year	Authors	Title	PT	Source	Category	TC
1997	Wilmut I. et al.	Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [21]	Article	<i>Nature</i>	SCNT	3476
1997	Schnieke A. E. et al.	Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [25]	Article	<i>Science</i>	Transgenic	650
2000	McCreath K. J. et al.	Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells [26]	Article	<i>Nature</i>	Transgenic	450
2001	Loi P. et al.	Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells [10]	Article	<i>Nature Biotechnology</i>	SCNT interspecific	296
2004	Beaujean N. et al.	Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer [27]	Article	<i>Biology of Reproduction</i>	DNA methylation in embryos by SCNT	187
2001	Denning C. et al.	Deletion of the alpha (1,3) galactosyl transferase (ggta1) gene and the prion protein (prp) gene in sheep [28]	Article	<i>Nature Biotechnology</i>	Transgenic y Xenotransplants	185
1999	Evans M. J. et al.	Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer derived cloned sheep [29]	Article	<i>Nature Genetics</i>	Heteroplasmy in ovine	169
2001	De Sousa P. A. et al.	Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae [30]	Article	<i>Biology of Reproduction</i>	Placental insufficiency in clone fetuses	168
2004	Young L. E., Beaujean N.	DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep [31]	Review Article	<i>Animal Reproduction Sciences</i>	Methylation process in clone embryos	121
2003	Young Le. et al.	Conservation of igf2-h19 and igf2r imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer [32]	Article	<i>Mechanisms of development</i>	Genomic imprinting in sheep	94
2006	Lee J. H., Campbell K. H. S.	Effects of enucleation and caffeine on maturation promoting factor (mpf) and mitogen activated protein kinase (mapk) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer [33]	Article	<i>Biology of Reproduction</i>	Nuclear reprogramming	69
2018	Fan Z. et al.	A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene [34]	Article	<i>JCI Insight</i>	Genome Editing	67
2007	Lagutina I. et al.	Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep [35]	Article	<i>Theriogenology</i>	Modification to conventional SCNT technique	66
2006	Loi P. et al.	Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones [2]	Article	<i>Theriogenology</i>	Placental abnormalities	57
2008	Palmieri C. et al.	A review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep and mice [36]	Review Article	<i>Veterinary Pathology</i>	Placental abnormalities	56
2007	Bowles E. J. et al.	Contrasting effects of in vitro fertilization and nuclear transfer on the expression of mtDNA replication factors [37]	Article	<i>Genetics</i>	Mitochondrial DNA replication factors	47
2006	Alexander B. et al.	The effects of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos [38]	Article	<i>Molecular Reproduction and Development</i>	Activation of cario-cytoplasmic complexes	46

PT, publication type; TC, total citations.

Five articles were cited from 100 to 179 times. For example, Beaujean et al. [27] evaluated the dynamics of somatic nucleus methylation after SCNT at different stages of early embryonic development, showing that the demethylation process failed in the trophectoderm cells of blastocysts.

Six other articles were cited from 50 to 99 times. One study [32] evaluated the imprinting status of insulin-like growth factor 2 and H19 gene (IGF2-H19) and insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R) in lambs generated by SCNT. The authors observed that one lamb displayed deregulation in the imprint of the second loci intron of the IGF2R gene.

Three articles were cited from 40 to 49 times. One study [37] evaluated the expression of mitochondrial DNA replication factors encoded by the nucleus and expressed for the first time in the later stages of early embryonic development.

The nine articles with from 30 to 39 citations include Peura and Vajta [39] who described a new SCNT method for cattle and sheep (handmade cloning), characterized by using pelucide-zone-free oocytes and the absence of micromanipulators to enucleate them.

Seven articles were cited from 20 to 29 times. They included Zhang et al. [11] who described generating transgenic lambs with high levels of omega-3 fatty acids using handmade cloning. The authors concluded that handmade cloning efficiency was similar to the conventional technique for the generation of transgenic animals.

Twenty-six articles were cited between 19 and 10 times. Among them, Wen et al. [40] tested two inhibitors of histone deacetylases, trichostatin A, and scriptaid. The latter improved the epigenetic status of ovine embryos via SCNT.

Finally, 52 articles were cited ≤ 9 times. Choi et al. [41] combined calcium ionophore, strontium chloride, and cytochalasin B to activate cario-cytoplasmic complexes, improving embryo quality. Among these articles, 10 articles had no record of citations. The most recent article was by McLean et al. [42] who studied the effect of embryo aggregation during the vitrification process of cloned sheep embryos. They observed that the aggregated embryos had an *in vivo* survival rate similar to that of the group that was not vitrified. The oldest most cited published paper is that of Wilmut et al. [21]. Table 6 includes the articles with the highest number of citations between 1997–2022.

3.8. Identification of Research Topics

The results of the co-occurrence analysis revealed 553 words or terms that were used most frequently in scientific papers. Only those with more than five co-occurrences were considered. The resulting 52 terms were organized into five clusters. The 14 words or terms most frequently used in the published papers are listed in Table 7. This analysis clarified the main topics of interest in the study area.

Table 7. Main words used most frequently in published papers concerning the application of SCNT in sheep.

Keywords	Frequency	Keywords	Frequency
SCNT	90	Mice	19
Sheep	56	Oocyte	18
Gene Expression	36	Somatic Cell	16
Embryo	32	Transgenic	16
In Vitro	28	Oocyte Activation	15
Fetal	22	Fetal Fibroblasts	14
Cattle	20	Bovine Embryo	13

Figure 4 displays five clusters of words (a cluster is a group of words related to each other) and the relationships among the clusters. Each cluster is represented by one color, cluster one has 14 words (red), cluster two includes 13 words (bright green), cluster three involves 9 words (blue), cluster four contains 9 words (light green), and cluster five has five words (purple).

The most cited article reports the birth of Dolly [21], obtained from a somatic cell from the mammary gland of an adult sheep, an unusual fact that had not been achieved in an upper mammal and which was a watershed for science, and therefore, for this reason, this article is still widely cited today. The other two most cited articles address issues about the generation of transgenic lambs for the production of human proteins for therapeutic purposes, which means that cell lines expressing a specific gene in the SCNT can be used, and this ensures that a lamb is obtained with the desired modification [25,26].

The words “oocyte” and “somatic cell” were frequent, and both cell types were used for SCNT. Oocytes have been treated with caffeine, which increases the activity of the promoter factor of maturation and of mitogen-activated protein kinases that are important for the nuclear reprogramming process during SCNT embryo development [33,45,46]. Moreover, the words “embryo”, “gene expression”, and “in vitro” were used in connection with each other. Examples include studies that have evaluated the effect of different chemical agents on the state of DNA methylation [47,48] and inhibitors of histone acetyltransferases [40,49] in the development of in vitro cloned embryos, especially at the blastocyst stage.

A detailed analysis of Figure 4 shows that cluster one, in red, contains 14 words related to the competence of in vitro cloned embryos. Khan et al. [50] compared the efficiency of conventional SCNT and handmade cloning for generating cloned sheep embryos. Better rates of efficiency of enucleation and fusion were obtained with handmade cloning, as well as a higher percentage of segmented and blastocyst stage embryos.

Cluster two, in bright green, contains 13 words referring to the development efficiency of cloned embryos at the blastocyst stage using different types of cells as donors of genetic information, most commonly cumulus cells and fibroblasts. The cells were treated with egg extracts [51], zebularine [47], chaetocin [52], and histone demethylase enzymes [53] to promote nuclear reprogramming of somatic cells and to improve the epigenetic status of ovine cloned embryos.

Cluster three, in blue, contains nine words focusing on the fetal development of cloned sheep and their regulation of gene expression. Ni et al. [54] evaluated the pregnancies of transgenic lambs produced by SCNT. They observed that fetal weight, total placenta weight, and mean placentomes weight were greater in pregnancies with live-born lambs, but did not survive compared to pregnancies with live-born lambs that survived. Further deregulation was found in miR-21 and miR-16 in the placenta of non-surviving lambs, causing aberrant expression in their targets.

Cluster four, in light green, contains nine words referring to the epigenetic status of cloned sheep embryos. Morphological evaluation is routinely used as the main parameter of embryo quality. However, due to the limited information provided by its unique evaluation, other parameters have focused on evaluating epigenetics [27,55] and the genetic status of sheep embryos generated by SCNT [9,52].

Finally, cluster five, in purple, includes five words related to the generation of transgenic sheep mediated cloning. Zhang et al. [56] investigated the effect of suppressing the myostatin (MSTN) gene expression in sheep skeletal muscle satellite cell using CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)) technology, to generate lamb clones with better muscle conformation; it has been reported that MSTN gene is responsible for regulating the growth of muscle cells.

It has been 26 years since the first sheep was cloned by applying SCNT, and since then, it has been applied to different domestic and wild species, in some cases with viable newborns. However, SCNT is an inefficient biotechnology, for example, Sheep were one of the first species to be domesticated for newborns lambs have been reported to be from 5.7 to 15% per transferred blastocyst and from 7.1% to 19.5% per segmented embryo [57]. Although sheep are easy to handle and have a relatively short gestation period compared with that of the other species of zootechnical interest [58], their small value and limited potential, do not make them attractive for agricultural use as compared with other livestock species [59]. If we also take into account that the infrastructure used for SCNT is basically

the same for all species, nowadays, SCNT applied to sheep reproduction is not profitable. Therefore, the present bibliometric study shows the areas of research in which cloning research in sheep should be directed, which will help those regions where sheep are an important economic and food source.

5. Conclusions

Bibliometric studies on SCNT in sheep have not been conducted prior to now. This study collected bibliographic data from 124 papers relating to the application of SCNT in sheep. This amount of information about sheep is smaller than that for other species of zootechnical interest, such as cattle and pigs, although sheep were the first large mammal to be successfully cloned. Since 2001, the number of SCNT-related papers that have been published concerning ovine reproduction has increased and has fluctuated in ensuing years. The authors that have generated more knowledge in this area are (in alphabetical order) Campbell, Hajian, Hosseini, Loi, Nasr-Esfahani, Ptak, and Wilmut. Five research groups were identified, three of which mutually collaborated. The countries with the largest number of published papers were China, Italy, and England. The largest collaboration network among countries comprises China, Iran, Australia, Canada, and United States. The institutions with the highest productivity of SCNT in sheep are the University of Nottingham and the Roslin Institute at the University of Edinburgh. These two institutions are among the top 150 universities in the world. The principal journals where topics about SCNT in sheep are published have an IF ranging from 1.9 to 4.1, whose quartile position is most often in third and fourth place in the JCR thematic categories. These journals are the most suitable for publishing scientific advances in this area. The articles that have been cited more often have addressed topics related to the generation of transgenic animals, recovery of wild species, and xenotransplants. Five main themes were identified in sheep reproduction by SCNT. These themes focused on the competence of in vitro clone embryos, cells used as karyoplasts and their efficiency on embryo development, epigenetic status of clone embryos and their impact on post-implantation development, and generation of transgenic sheep with biomedical and genetic improvement purposes. Concerning the application of SCNT in sheep, these topics are the most relevant, and future studies should focus on solutions to the current challenges in this field of study.

Author Contributions: Conceptualization, C.C.-R.; methodology, J.R.V.-A.; software, J.R.V.-A.; formal analysis, J.R.V.-A.; investigation, J.R.V.-A.; data curation, J.R.V.-A.; writing—original draft preparation, J.R.V.-A.; writing—review and editing, C.C.-R., M.d.C.N.-M., D.A.A.-G., Á.B.-V. and A.T.-C.; supervision, C.C.-R., D.A.A.-G. and M.d.C.N.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The present study was a bibliometric analysis that consisted of the use of databases of scientific papers. The study did not involve humans or animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from first author José Roberto Vazquez-Avendaño (robertmizer@gmail.com) upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Romanov, M.N.; Zinovieva, N.A.; Griffin, D.K. British Sheep Breeds as a Part of World Sheep Gene Pool Landscape: Looking into Genomic Applications. *Animals* **2021**, *11*, 994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Loi, P.; Clinton, M.; Vackova, I.; Fulka, J.; Feil, R.; Palmieri, C.; Salda, L.D.; Ptak, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology* **2006**, *6*, 1110–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kalds, P.; Gao, Y.; Shiwei, Z.; Cai, B.; Huang, X.; Wang, X.; Chen, Y. Redesigning small ruminant genomes with CRISPR toolkit: Overview and perspectives. *Theriogenology* **2020**, *147*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Álvarez, M.; Anel-Lopez, L.; Boixo, J.C.; Chamorro, C.; Neila-Montero, M.; Montes-Garrido, R.; de Paz, P.; Anel, L. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *54*, 32–40. [CrossRef]
5. Navarro-Maldonado, M.C.; Rosado-García, A.; Serrano, H.F. Técnicas de clonación de embriones. *Ciencia Veterinaria* **2003**, *9*, 35–74. Available online: <https://fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c2.pdf> (accessed on 14 February 2023).
6. Casser, E.; Israel, S.; Boiani, M. Multiplying embryos: Experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *Int. J. Dev. Biol.* **2019**, *63*, 143–155. [CrossRef]
7. Gurdon, J.B. The egg and the nucleus: A battle for supremacy. *Development* **2013**, *140*, 2449–2456. [CrossRef]
8. Kalds, P.; Zhou, S.; Cai, B.; Liu, J.; Wang, Y.; Petersen, B.; Sonstegard, T.; Wang, X.; Chen, Y. Sheep and Goat: From random transgenesis to the CRISPR era. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 750. [CrossRef]
9. Zhang, Y.; Gao, E.; Guan, H.; Wang, Q.; Zhang, S.; Liu, K.; Yan, F.; Tian, H.; Xu, H.; Hou, J. Vitamin C treatment of embryos, but not donor cells, improves the cloned embryonic development in sheep. *Reprod. Domest. Anim.* **2019**, *55*, 255–265. [CrossRef]
10. Loi, P.; Ptak, G.; Barboni, B.; Fulka, J.; Cappai, P.; Clinton, M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 962–964. [CrossRef]
11. Zhang, P.; Liu, P.; Dou, H.; Chen, L.; Chen, L.; Lin, L.; Tan, P.; Vajta, G.; Gao, J.; Du, Y.; et al. Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55941. [CrossRef]
12. Filippio, D.; Fernández, M.T. *Bibliometría: Importancia de los Indicadores Bibliométricos, In El Estado de la Ciencia. Principales Indicadores de Ciencia y Tecnología Iberoamericanos/Interamericanos*; Albornoz, M., Ed.; RICYT: Montevideo, Uruguay, 2002; pp. 69–76.
13. Cortés, V.D. Medir la producción científica de los investigadores universitarios: La bibliometría y sus límites. *Rev. Educ. Super.* **2007**, *36*, 43–65. Available online: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-27602007000200003&lng=es&nrm=iso (accessed on 5 September 2021).
14. Okubo, Y. Bibliometric Indicators and Analysis of Research Systems: Methods and Examples. In *OECD Science, Technology and Industry Working Papers*; No. 1997/01; OECD Publishing: Paris, France, 1997. [CrossRef]
15. Salager-Zeyer, F. Peripheral scholarly journals: From locality to globality. *Ibérica* **2015**, *30*, 15–36. Available online: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=287042542002> (accessed on 16 January 2023).
16. Van Raan, A.J.F. Advanced bibliometric methods to assess research performance and scientific development: Basic principles and recent practical applications. *Res. Eval.* **1993**, *3*, 151–166. [CrossRef]
17. Sanz, C.E.; Martín, M.C. Técnicas bibliométricas aplicadas a los estudios de usuarios. *Rev. Gen. Inf. Doc.* **1997**, *7*, 41–68. Available online: <https://revistas.ucm.es/index.php/RGID/article/view/RGID9797220041A> (accessed on 21 March 2023).
18. Van Eck, N.J.; Waltman, L. VOS: A New Method for Visualizing Similarities Between Objects. In *Advances in Data Analysis. Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization*; Decker, R., Lenz, H.-J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; pp. 299–306. [CrossRef]
19. Van Eck, N.J.; Waltman, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics* **2010**, *84*, 523–538. [CrossRef]
20. Tijssen, R.J.W.; Van Raan, A.F.J. Mapping changes in sciences and technology: Bibliometric co-occurrence analysis of the R&D literature. *SAGE J.* **1994**, *18*, 98–115.
21. Wilmut, I.; Schnieke, A.E.; McWhir, J.; Kind, A.J.; Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **1997**, *385*, 810–813, Erratum in *Nature* **1997**, *386*, 200. [CrossRef]
22. Hirsch, J.E. An index to quantify and individual's scientific research output. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16569–16572. [CrossRef]
23. Garfield, E. The Agony and the Ecstasy: The history and Meaning of the Journal Impact Factor. Presented at International Congress on Peer Review and Biomedical Publication, Chicago, IL, USA, 16 September 2005; Available online: <http://www.garfield.library.upenn.edu/papers/jifchicago2005.pdf> (accessed on 18 May 2021).
24. Sharma, M.; Sarin, A.; Gupta, P.; Sachdeva, S.; Desai, A.V. Journal impact factor: Its use, significance and limitations. *World J. Nucl. Med.* **2014**, *13*, 146. [CrossRef]
25. Schnieke, A.E.; Kind, A.J.; Ritchie, W.A.; Mycock, K.; Scott, A.R.; Ritchie, M.; Wilmut, I.; Colman, A.; Campbell, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* **1997**, *278*, 2130–2133. [CrossRef] [PubMed]
26. McCreath, K.J.; Howcroft, J.; Campbell, K.H.; Colman, A.; Schnieke, A.E.; Kind, A.J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* **2000**, *405*, 1066–1069. [CrossRef] [PubMed]
27. Beaujean, N.; Taylor, J.; Gardner, J.; Wilmut, I.; Richard, M.; Young, L. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* **2004**, *71*, 185–193. [CrossRef] [PubMed]
28. Denning, C.; Burl, S.; Ainslie, A.; Bracken, J.; Dinnyes, A.; Fletcher, J.; King, T.; Ritchie, M.; Ritchie, W.A.; Rollo, M.; et al. Deletion of the alpha (1,3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 559–562. [CrossRef] [PubMed]
29. Evans, M.J.; Gurer, C.; Loike, J.D.; Wilmut, I.; Schnieke, A.E.; Schon, E.A. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat. Genet.* **1999**, *23*, 90–93. [CrossRef]
30. De Sousa, P.A.; King, T.; Harkness, L.; Young, L.E.; Walker, S.K.; Wilmut, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol. Reprod.* **2001**, *65*, 23–30. [CrossRef]

31. Young, L.E.; Beaujean, N. DNA methylation in the preimplantation embryo: The differing stories of the mouse and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* **2004**, *82–83*, 61–78. [CrossRef]
32. Young, L.E.; Schnieke, E.A.; McCreath, K.J.; Wieckowki, S.; Konfortova, G.; Fernandes, K.; Ptak, G.; Kind, A.J.; Wilmut, I.; Loi, P.; et al. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: Effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech. Dev.* **2003**, *120*, 1433–1442. [CrossRef]
33. Lee, J.-H.; Campbell, K.H.S. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biol. Reprod.* **2006**, *74*, 691–698. [CrossRef]
34. Fan, Z.; Perisse, I.V.; Cotton, C.U.; Regouski, M.; Meng, Q.; Domb, C.; Van Wettère, A.J.; Wang, Z.; Harris, A.; White, K.L.; et al. A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. *JCI Insight* **2018**, *3*, e123529. [CrossRef]
35. Lagutina, I.; Lazzari, G.; Duchi, R.; Turini, P.; Tessaro, I.; Brunetti, D.; Colleoni, S.; Crotti, G.; Galli, C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* **2007**, *67*, 90–98. [CrossRef]
36. Palmieri, C.; Loi, P.; Ptak, G.; Della Salda, L. Review paper: A review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice. *Vet. Pathol.* **2008**, *45*, 865–880. [CrossRef]
37. Bowles, E.J.; Lee, J.-H.; Alberio, R.; Lloyd, R.E.I.; Stekel, D.; Campbell, K.H.S.; John, J.C. Contrasting effects of in vitro fertilization and nuclear transfer on the expression of mtDNA replication factors. *Genetics* **2007**, *176*, 1511–1526. [CrossRef]
38. Alexander, B.; Coppola, G.; Di Berardino, D.; Rho, G.J.; Jhon, E.S.; Betts, D.H.; King, W.A. The effect of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and cycloheximide (CHX) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **2006**, *73*, 20–30. [CrossRef]
39. Peura, T.T.; Vajta, G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* **2003**, *5*, 257–277. [CrossRef]
40. Wen, B.Q.; Li, J.; Li, J.J.; Tian, S.J.; Sun, S.C.; Qi, X.; Cai, W.T.; Chang, Q.L. The histone deacetylase inhibitor scriptaid improves in vitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology* **2014**, *81*, 332–339. [CrossRef]
41. Choi, I.; Zhu, J.; Campbell, K.H.S. The combined treatment of calcium ionophore with strontium improves the quality of ovine SCNT embryo development. *Zygote* **2013**, *21*, 139–150. [CrossRef]
42. McLean, Z.L.; Appleby, S.J.; Fermin, M.L.; Henderson, H.V.; Wei, J.; Wells, D.N.; Oback, B. Controlled cytoplasm arrest and morula aggregation enhance development, cryoresilience, and in vivo survival of cloned sheep embryos. *Cell. Reprogram.* **2021**, *23*, 14–25. [CrossRef]
43. Loi, P.; Palazzese, L.; Scapolo, P.A.; Fulka, J.; Fulka, H.; Czernik, M. 25th Anniversary of cloning by somatic-cell nuclear transfer: Scientific and technological approaches to improve SCNT efficiency in farm animals and pets. *Reproduction* **2021**, *162*, F33–F43.
44. Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAOSTAT. Crops and Livestock Products. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (accessed on 21 December 2021).
45. Lee, J.H.; Campbell, H.S. Caffeine treatment prevents age-related changes in ovine oocytes and increases cell numbers in blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* **2008**, *10*, 381–390. [CrossRef]
46. Choi, I.; Campbell, H.S. Treatment of ovine oocytes with caffeine increases the accessibility of DNase I to the donor chromatin and reduces apoptosis in somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Fertil. Dev.* **2009**, *22*, 1000–1014. [CrossRef]
47. Cao, H.; Li, J.; Su, W.; Li, J.; Wang, Z.; Sun, S.; Tian, S.; Li, L.; Wang, H.; Li, J.; et al. Zebularine significantly improves the preimplantation development of ovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *31*, 357–365. [CrossRef]
48. Fang, X.; Xia, W.; Cao, H.; Guo, Y.; Wang, H.; Zhang, X.; Wan, P.; Liu, C.; Wei, Q.; Sun, S.; et al. Effect of supplementation of zebularine and scriptaid on efficiency of in vitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Anim. Biotechnol.* **2020**, *31*, 155–163. [CrossRef] [PubMed]
49. Al-Ghadi, M.Q.; Alhimaidi, A.R.; Iwamoto, D.; Al-Mutary, M.G.; Ammari, A.A.; Saeki, K.O.; Aleissa, M.S. The in vitro development of cloned sheep embryos treated with scriptaid and trichostatin (A). *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 2280–2286. [CrossRef] [PubMed]
50. Khan, S.; Tali, M.; Khan, A.; Bhat, S.; Ashraf, A.; Bhat, M.H.; Khan, F.; Shan, R.A. Comparison of efficiency of in vitro cloned sheep embryo production by conventional somatic cell nuclear transfer and handmade cloning technique. *Reprod. Domest. Anim.* **2018**, *53*, 512–518. [CrossRef] [PubMed]
51. Rathbone, A.J.; Fisher, P.A.; Lee, J.-H.; Craigon, J.; Campbell, K.H.S. Reprogramming of ovine somatic cells with *Xenopus laevis* oocyte extract prior to SCNT improves live birth rate. *Cell. Reprogram.* **2010**, *12*, 609–616. [CrossRef]
52. Zhang, Y.M.; Gao, E.E.; Wang, Q.Q.; Tian, H.; Hou, J. Effects of histone methyltransferase inhibitor chaetocin on histone H2K9 methylation of cultured ovine somatic cells and development of preimplantation cloned embryos. *Reprod. Toxicol.* **2018**, *79*, 124–131. [CrossRef]
53. Zhang, Y.; Wang, Q.; Liu, K.; Gao, E.; Guan, H.; Hou, J. Treatment of donor cells with recombinant KDM4D protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology* **2018**, *70*, 1469–1477. [CrossRef]
54. Ni, W.; You, S.; Cao, Y.; Li, C.; Wei, J.; Wang, D.; Qiao, J.; Zhao, X.; Hu, S.; Quan, R. Aberrant expression of miR-127, miR-21 and miR-16 in placentas of deceased cloned sheep. *Res. Vet. Sci.* **2016**, *105*, 200–204. [CrossRef]
55. Ma, L.B.; He, X.Y. The levels of dna methylation of sheep cloned embryos in different development stages. *Indian J. Anim. Res.* **2023**, *48*, 221–226. [CrossRef]

56. Zhang, Y.; Wang, Y.; Yulin, B.; Tang, B.; Wang, M.; Zhang, C.; Zhang, W.; Jin, J.; Li, T.; Zhao, R.; et al. CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *120*, 1794–1806. [[CrossRef](#)]
57. Vazquez-Avenida, J.R.; Ambríz-García, D.A.; Cortez-Romero, C.; Trejo-Cordova, A.; Navarro-Maldonado, M.C. Current state of the efficiency of sheep embryo production through somatic cell nuclear transfer. *Small Rumin. Res.* **2022**, *212*, 106702. [[CrossRef](#)]
58. Loi, P.; Czernik, M.; Zacchini, F.; Iuso, D.; Scapolo, P.A.; Ptak, G. Sheep: The first large animal model in nuclear transfer research. *Cell. Reprogram.* **2013**, *15*, 367–373. [[CrossRef](#)]
59. Galli, C.; Lazzari, G. 25th Anniversary of cloning by somatic-cell nuclear transfer: Current applications of SCNT in advanced breeding and genome editing in livestock. *Reproduction* **2021**, *162*, F23–F32. [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ORIGINAL ARTICLE

Physicochemical characteristics and protein profile of oviductal and uterine fluids from domestic sheep

José R. Vazquez-Avendaño^{1,3}, César Cortez-Romero², Demetrio A. Ambríz-García³, María de los Ángeles Fortis-Barrera⁴, Mara P. Chávez-Ortega⁴, Hilda Loza-Rodríguez⁵, Gerardo Blancas-Flores⁴, María del Carmen Navarro-Maldonado^{3*}

¹Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México

²Programa de Innovación en Manejo de Recursos Naturales, Campus San Luis Potosí, San Luis Potosí, México y Programa en Recursos Genéticos y Productividad - Ganadería, Campus Montecillo, Estado de México, Colegio de Postgraduados, México.

³Laboratorio de Reproducción Animal Asistida, Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México.

⁴Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México.

⁵Laboratorio de Microbiología Experimental, División de Tecnología Ambiental, Universidad Tecnológica de Nezahualcōyotl, Nezahualcōyotl, Estado de México, México.

Article History

Received: 05.09.2023

Accepted: 02.01.2024

Published: 13.06.2024

Corresponding author

*María del Carmen Navarro-Maldonado
carmennavarro2006@yahoo.com.mx

ABSTRACT. Oviductal (OF) and uterine (UF) fluids are a complex mixture of ions and macromolecules dissolved in water, derived from the secretions of secretory cells and transudates of the circulatory system. Through proteomics, OF and UF have been analyzed in different domestic species throughout the estrous cycle or during the first days of pregnancy. Therefore, the aim of this study was to evaluate the volume, osmolarity, concentration and distribution pattern of proteins, as well as the identification of OVGPI, HSP70 and ezrin proteins for their importance in reproductive physiology, in OF and UF from adult criollo type domestic sheep during the early luteal phase of the estrous cycle. An average of 3.2±1.5 µL OF and 17±0.5 µL UF per reproductive system were obtained; osmolarity was 343±20.8 mOsm kg⁻¹ and 280±96.2 mOsm kg⁻¹ and protein concentration was 71.9±23.8 g L⁻¹ and 21.8±1.1 g L⁻¹, respectively. In the protein distribution pattern, 20 bands were observed in the OF and 14 bands in the UF. Of these, 14 and 8 were specific for OF and UF, respectively, and 6 were common for both. The spectra of the protein molecular weights were 24–324 and 29–353 kDa for OF and UF, respectively. The presence of OVGPI, HSP70 and Ezrin proteins in both fluids was identified, being in greater quantity in the OF ($P < 0.0005$). The volume recovered from the UF was five times greater than that of the OF. Both osmolarity and protein concentration were higher in OF than in UF (1.2 and 3 times higher). The pattern of protein distribution between the OF and UF was different, being more complex in the OF. OVGPI, HSP70 and ezrin were identified in the OF and UF, and were found in greater quantities in the OF.

Keywords: OVGPI, HSP70, reproductive fluids, osmolarity, SDS-PAGE.

INTRODUCTION

The oviduct is divided into five anatomical regions: infundibulum, ampulla, isthmus-ampullar junction, isthmus, and uterus-tubal junction. Each region participates in gamete maturation, sperm capacitation, fertilization, and the beginning of preimplantation embryonic development (Kölle *et al.*, 2020), which ends in the uterus and leads to the implantation process and the beginning of fetal development (Bhusane *et al.*, 2016).

The oviductal epithelium and luminal and glandular epithelia from the endometrium are responsible for regulating the microenvironment of each oviductal segment and uterus, formed by populations of secretory and ciliary cells, whose proportion and function depend on the stage of the female estrous cycle or pregnancy (Restall, 1966a; Bhusane *et al.*, 2016). Secretory cells synthesize products that are discharged into the lumen and, together with the

transudate of the circulatory system, form the oviductal (OF) and uterine fluids (UF), complex mixtures of ions and macromolecules dissolved in water (Bhusane *et al.*, 2016; Li & Winuthayanon, 2017).

Sheep embryos remain in the oviduct for an average of three days from the developmental stage of the zygote to the 8 and 16-cells stage. In the uterus, they reach the blastocyst stage by days 6 and 7, the zona pellucida hatching occurs on days 8 and 9 (Abecia & Forcada, 2010), and elongation occurs until day 15. At this point, implantation of the conceptus occurs (Hyttel *et al.*, 2010). All of these processes can only be achieved in an environment where nutrients are produced by each structure of the reproductive tract.

Preimplantation embryo development concerning the stages of zygote to blastocyst development can be reproduced under *in vitro* conditions. This requires the use of

synthetic culture medium for embryo development, formulated based on the biochemical composition of the oviductal and uterine fluid (Tervit *et al.*, 1972), which corresponds to the early luteal phase of the estrous cycle (Restall & Wales, 1966; Restall, 1966b; Wales, 1973).

Although this type of medium has been widely used, it is known that embryos produced *in vitro* develop in a minor percentage and quality compared to those produced *in vivo*, and they present dysregulation in their genetic expression and an altered pattern of epigenetic marks (Rabaglino *et al.*, 2021). Therefore, this condition can be reversed when OF and UF are added to the culture medium (Barrera *et al.*, 2017; Canovas *et al.*, 2017; Lopera-Vasquez *et al.*, 2017; Hamdi *et al.*, 2018) as supplements that can supply molecules needed for the adequate development of embryos, such as certain proteins.

Proteomics has been used to describe all proteins expressed in a genome (Wilkins *et al.*, 1996), by which proteins from different organisms have been identified, quantified, and separated through techniques ranging from western blotting and ELISA to more sophisticated and complex techniques such as chromatography and mass spectrometry (Aslam *et al.*, 2017).

The proteome of reproductive fluids has been analyzed in different domestic species, focusing mainly on hormonal regulation at different stages of the estrous cycle, gamete-maternal interaction, embryonic-maternal communication, follicular development, and fertility (Itze-Mayrhofer & Brem, 2020).

However, in the sheep there are few studies related to the proteome of OF and UF, of which most have focused on determining the main proteins present in UF during the first days of pregnancy, but few have reported about OF (Köch *et al.*, 2010; Burns *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2017). Only one study has determined the proteome of the cervical, oviductal, and uterine fluids during the estrous and late luteal phases of the estrous cycle in sheep, whether spontaneous or induced (Soleilhavoup *et al.*, 2016). This study identified the main proteins present in OF and UF, including oviduct-specific glycoprotein (OVGP1), heat shock protein 70 (HSP70), and ezrin. Therefore, studies of proteomes in the early luteal phase could be of great interest as early embryo development occurs.

Thus, the objective of the present study was to determine the physicochemical characteristics (volume, osmolarity, and total protein concentration) and protein profile (distribution pattern of proteins) of oviductal and uterine fluids from domestic sheep, as well as to identify OVGP1, HSP70, and ezrin in OF and UF, in the early and middle luteal phases of the estrous cycle in sheep.

MATERIAL AND METHODS

Collecting of OF and UF

OF and UF were obtained from the reproductive systems of adult criollo-type domestic slaughtered sheep. The repro-

ductive systems were obtained immediately after opening the abdominal cavity and were transported at 8 °C in disinfected plastic bags. Once in the laboratory, within no more than 2 h, the reproductive systems were washed in sterile Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) with 1% antibiotic-antifungal (streptomycin 10,000 µg mL⁻¹, Amphotericin B 25 µg mL⁻¹, and 10,000 IU penicillin, *in vitro* S.A. de C.V.) at 4 °C.

Subsequently, they were classified based on the ovarian structures present (to determine the stage of the estrous cycle) (Senger, 2005) with regular size and shape. The luteal phase was divided into the early and middle luteal phases. The early luteal phase was determined by the presence of corpus hemorrhagicum, whereas the middle luteal phase was determined by the presence of corpus luteum (Senger, 2005). Thirty-two reproductive systems were in the early luteal phase and ten in the middle luteal phase.

Fluids were recovered from the ipsilateral oviduct and uterine horn of the ovary in the presence of corpus hemorrhagicum and corpus luteum. Once the reproductive systems were classified, the suspensory ligaments were dissected and the uterus-tubal junction was severed to separate the oviduct from the uterine horn. Oviducts and uterine horns were kept in sterile DPBS at 4 °C.

The method described for cattle was followed for OF extraction (Carrasco *et al.*, 2008), with some modifications. On a flat surface, the oviduct was placed and squeezed with a slide from the uterus-tubal junction toward the ampulla, and a clamp was placed to prevent the return of fluid. A fire-polished Pasteur pipette was then introduced to recover the OF and was deposited in a 300 µL tube. The sample was centrifuged at 2000 x g for 5 min at 4 °C, and the supernatant was recovered and centrifuged at 7000 x g for 10 min at 4 °C.

Finally, the supernatant was recovered and stored at -80 °C, until use. To obtain the UF, the reproductive system was placed vertically so that the fluid descended by gravity to the uterus-tubal junction, after which a polished Pasteur pipette was introduced, and the fluid was collected. It was placed in a 300 µL tube, processed, and stored in the same way as the OF. For each experiment, a pull of OF from the early luteal phase and a pull of UF from the middle luteal phase were applied (Carrasco *et al.*, 2008). Subsequently, the volume of each fluid was determined. The OF and UF samples were collected from January to May 2022 (winter-spring), which corresponds to the reproductive season in sheep, and then stored for 8 months at -80 °C. After thawing, the physicochemical characteristics were determined for each fluid (osmolarity, total protein concentration, and OVGP1, HSP70, Ezrin proteins).

Determination of physicochemical characteristics of OF and UF

Osmolarity. Eight months after the samples were collected, the physicochemical characteristics of OF and UF were determined. Osmolarity was determined by placing 10 µL of each sample (OF and UF) in an osmometer (Wescor model VAPRO-5520) (Pensyl & Benjamin, 1999).

Total protein. Total protein concentration was determined using the Bradford method. A calibration curve with bovine serum albumin (BSA) was used as a protein standard with a range of 0 to 1 mg mL⁻¹. 500 µL of Bradford solution (100 mg of Coomassie blue G-250 dissolved in 200 mL of 95% alcohol and 85% phosphoric acid), and 10 µL of each BSA concentration in a 1.5 mL tube, in duplicate. To analyze OF and UF, 500 µL of Bradford solution and 1 µL OF or UF were placed in 1.5 mL tubes, in duplicate. Finally, the calibration curve, as well as the OF and UF samples, were analyzed using a spectrophotometer at 595 nm, and the values obtained to determine the total protein concentration of reproductive fluids were recorded (Bradford, 1976).

Distribution pattern of proteins in reproductive fluids (OF and UF)

Protein separation by SDS-PAGE. Protein separation by molecular weight was performed using electrophoresis, and a 10% polyacrylamide gel was prepared. First, the separator gel was prepared using water, tris-hydroxymethyl-aminomethane (TRIS)-HCl (1.5 M, pH 8.8), bis-acrylamide (30%), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, 10%), ammonium persulfate (10%), and tetramethylethylenediamine (TEMED) and allowed to polymerize. The concentrator gel was then added with the same reagents and only the TRIS-HCl concentration was changed (0.5 M, pH 6.8). Buffer Laemmli was placed with 50 mg mL⁻¹ of protein from each sample of OF and UF for protein denaturing. The samples were then placed in each well of the polyacrylamide gel, together with a molecular weight marker of 10–250 kDa. The proteins were compacted at 150 V for 15 min and then left to run at 100 V for 180 min (Brunelle & Green, 2014).

Protein identification by molecular weight. After electrophoresis, the gel was stained with a solution of Coomassie blue (0.1% Coomassie blue, 50% methanol, and 10% glacial acetic acid) for 1 h under constant oscillation. Excess stain was removed using a 40% methanol solution for 15 min during oscillation. Several washes with a new methanol solution were performed until bands were visible in the gel (Brunelle & Green, 2014).

Estimation of molecular weight and band intensity. Images of the gels were taken using a photodocumentary. For image processing, Gelanalyzer (version 19.1; Istvan Lazar Jr.) was used to identify the number of bands in each of the OF and UF samples, as well as the estimation of the molecular weight (kDa) of each of the bands.

Identification of proteins in OF and UF

Western blot. To determine the presence of oviduct-specific glycoprotein (OVGP1), heat shock protein 70 (HSP70) and ezrin which are among the most abundant proteins in these fluids (Soleilhavoup et al., 2016), of each of the OF and UF samples, 50 µL mL⁻¹ protein was placed in load buffer and incubated at 95 °C for 5 min. Samples were separated on 10% polyacrylamide gels at 120 volts for 60 min. The proteins were then transferred to a PVDF membrane (Milli-

pore, VH00010) at 2.5 A and 25 V for 20 min on a transfer device (Trans-Blot Turbo).

The membrane was blocked with TBS buffer milk solution (0.08 g mL⁻¹) for 1 h, in constant oscillation at room temperature. The membrane was then incubated with the first antibody (Ezrin: Cat. Sc-58758; HSP70: Cat. sc-66048; OVGP1: Cat. sc-377267, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) diluted in a milk solution with TBS (0.05 g mL⁻¹) in constant oscillation all night at 4 °C. The next day, the membrane was washed with TBS Tween-20 and incubated with the secondary antibody (Anti-mouse IgG: Cat. 715-035-150; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 1.5 h oscillating at room temperature. The membrane was then washed with TBS Tween-20. Finally, a mixture of revealing solution (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad) was added, and the membrane was placed in a photo documenter (Kodak Gel Logic 200 Image System), with a 3 min exposure for its development. The program used was the Kodak ID 3.6 Logic.

ImageJ software was used for image processing. This program measures the intensity of the pixels in an image. This is especially useful in Western Blot images, where the signal intensity can be correlated with the amount of a certain protein. To do this, the program selects the Region of Interest (ROI) around a specific region of the image in which the analysis needs pixel intensity. This generated a graph that shows the pixel intensity of the ROI. ImageJ provides numerical values associated with the ROI, from which statistical analysis will be performed.

Statistical Analysis

The data obtained on volume, osmolarity, and total protein concentration of OF and UF samples are expressed as the mean ± standard deviation (S.D.). To determine significant differences between the color intensities OF and UF sample bands, Student's t-test was performed with a significance of P < 0.05. GraphPad Prism (version 9.5.1) was used for data analysis.

RESULTS

OF and UF were obtained from 42 reproductive systems of domestic sheep. Of these, 32 were in the early luteal phase and 10 were in the middle luteal phase. A pool of OF (2-7 reproductive systems) and UF (1-6 reproductive systems) was prepared for each experiment, and a total of 10 OF samples and 3 UF samples were obtained.

Physicochemical characteristics of OF and UF

Volume, osmolarity, and total protein concentration of the reproductive fluids (OF and UF). A total volume of 135 µL (3.2±1.5 µL on average) of OF from the early luteal phase and 170 µL (17.0±0.5 µL) from the middle luteal phase were recovered from the reproductive apparatus at the luteal phases of the estrous cycle in sheep. The osmolarity for OF was 343±20.8 mOsm kg⁻¹, and that for UF was 280±96.2

mOsm kg⁻¹. The total protein concentration of OF was 71.9±23.8 g L⁻¹, while that of UF was 21.8±1.1 g L⁻¹.

Distribution patterns of proteins in the reproductive fluids (OF and UF). Figure 1 shows the pattern of protein distribution in 10 OF and 2 UF samples. The molecular weights of the protein bands were 24–324 kDa for OF and 29–353 kDa for UF.

In the analysis of the OF and UF samples, two sets of bands were identified, with 20 bands present in the OF and 14 bands present in the UF. Of these, fourteen bands were unique to the OF samples, while eight were exclusive to the UF samples. Furthermore, six bands were identified as being

present in both the OF and UF samples (as shown in Figure 1 and detailed in Table 1).

Identification of proteins in OF and UF. In the distribution pattern of OF and UF proteins (Figure 1), different types of proteins are shown, some of which were identified by western blotting, where OVGPI (120 kDa), HSP70 (70 kDa), and ezrin (87 kDa) proteins were present in most OF and UF (Figure 2a). However, the levels of these proteins were significantly higher in the OF than in the UF (Figure 2b).

Table 1.
Molecular weight of proteins present in OF and UF samples.

No. of band	OF specific MW (kDa)	UF specific MW (kDa)	In common MW (kDa)
1	324	353	73
2	315	284	37
3	306	138	34
4	228	111	28
5	200	47	27
6	188	42	26
7	83	39	
8	62	29	
9	54		
10	36		
11	35		
12	33		
13	32		
14	24		

OF, Oviductal fluid; UF, Uterine fluid; MW, Molecular weight; kDa, kiloDaltons

DISCUSSION

Physicochemical characteristics of OF and UF. Two pools were created in this study. One was of OF from the early luteal phase and the other was a pool of UF from the middle luteal phase because embryos are in each one of these structures as luteal phases occur (Kölle et al., 2020). OF and UF were collected from *postmortem* adult Criollo type domestic sheep, with a volume of UF five times greater than OF, which may be related to the size of the organs of origin. In other studies, OF and UF volumes were collected from sheep *in vivo* and analyzed continuously for 24 h using a probe introduced into the ostium of the oviduct. The authors reported higher volumes of OF and UF compared to those obtained in our study, with 100 to 1,630 µL for OF (Restall, 1966b; Perkins et al., 1965; Iritani et al., 1969; Roberts et al., 1976) and 480 to 5,210 µL for UF (Iritani et al., 1969). These volumes account for the intense secretory activity of the

oviduct and uterus, which may be influenced by the probing recovery system, is also influenced by hormonal action. It has been observed that 2 days after estrous, both the oviduct and uterus present greater secretory activity (Iritani et al., 1969), which confirms that there are factors related to the modulation of the secretory pattern of the fluids in these anatomical regions. In addition, other factors influence the secreted amount of OF and UF, for example, such as age, breed, and whether the females are prepubertal, nulliparous, or multiparous.

Another important physiological aspect to consider is the osmolarity of OF and UF, which depends on the concentration of dissolved solutes, such as inorganic salts, amino acids, and proteins, among other components, which are in direct contact with gametes and developing embryos that require specific osmolarity conditions. The range of variation of oviductal and uterine osmolarity between different

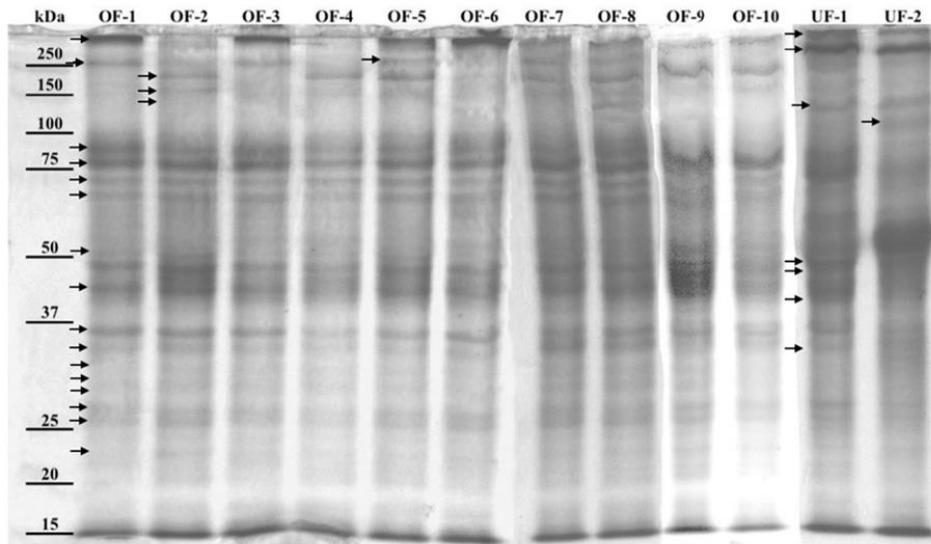


Figure 1. The allocation of proteins in the sheep oviductal fluids (OF-1 to OF-10) and uterine fluids (UF-1 and UF-2) was assessed through SDS-PAGE. Fourteen bands were unique to OF samples, eight were exclusive to UF samples, and six were present in both samples. Specific molecular weights of proteins are indicated in Table 1.

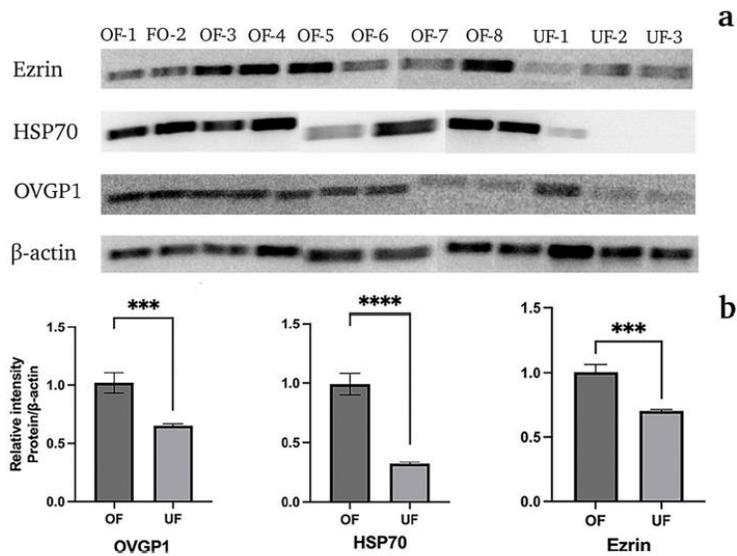


Figure 2. The presence of OVG1, HSP70, and ezrin proteins was examined in the OF and UF samples from sheep using Western blotting. β -actin was used as a positive control (a). The concentration of OVG1, HSP70, and ezrin was then assessed between the OF and UF samples, revealing a statistically significant difference between the two groups ($P = 0.0005$ and $P = 0.0001$, respectively) (b).

domestic species is narrow; for example, in cows, an osmolarity of 350–353 mOsm kg⁻¹ has been reported (Olds & Vandemark, 1957), in sows it is 318–320 mOsm kg⁻¹ (Li *et al.*, 2007), and in sheep, an osmolarity of 316–349 mOsm kg⁻¹ has been reported for OF and UF (Wales, 1973). These values are similar to those observed in this study for OF (343 mOsm kg⁻¹) but lower than that observed in UF (280 mOsm kg⁻¹). This variation in UF osmolarity was probably due to manipulation during the collection and processing of samples; for example, it has been reported that both the method and collection site influence the osmolarity of UF (Wales, 1973).

The total protein concentration present in OF was higher (71.9 g L⁻¹) than that reported in other studies with concentrations of 37.8 and 38.7 g L⁻¹ (Itze-Mayrhofer & Brem, 2020; Zhao *et al.*, 2022). The total UF protein concentration was similar (21.8 g L⁻¹) to that reported by other authors (25.16 to 27.46 g L⁻¹) (Tripathi *et al.*, 2016; Yahia *et al.*, 2013). The increase in total OF protein concentration could be due to metabolic stress conditions derived from the diet (Tripathi *et al.*, 2016).

In a first evaluation, the distribution pattern of the proteins present in OF (20 bands) and UF (14 bands) was determined, as well as the molecular weights of the bands with greater intensity, as has been done in Alpaca (Apichela *et al.*, 2015). From this first count, differences in the distribution pattern of the proteins present between the OF and UF samples were observed, a greater number of bands for OF being observed, which denotes a greater complexity in their protein composition. However, studies have identified more proteins in UF than in OF (827 vs. 624), a fraction of these proteins (585) occur in both fluids (Soleilhavoup *et al.*, 2016).

Identification of proteins in OF and UF. Subsequently, three proteins were identified using western blotting: OVGPI, HSP70, and ezrin. OVGPI is a protein synthesized and secreted exclusively by the non-ciliary cells of the oviductal epithelium, with a molecular weight between 90 and 95 kDa for most domestic animals; in ruminants, this is in the range of 57.23–57.75 kDa, which is attributed to the degree of glycosylation of the protein (Pradeep *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2022).

Moreover, HSP70 belongs to a family of “chaperones” proteins with a molecular weight of 70 kDa that perform a wide variety of cell maintenance activities, as well as to counteract the effects caused by stress, such as: preventing protein aggregation, the separation of protein aggregates, the replication of denatured proteins and the degradation of defective proteins (Rosenzweig *et al.*, 2019).

Ezrin is an protein of 87 kDa molecular weight that functions as a microfilament connector of the plasma membrane, which is distributed in the microvilli, folds of the plasma membrane, and other areas of this membrane, with a particular morphology (Xu *et al.*, 2023).

In the present study, OVGPI was found in greater numbers in OF samples, which is in accordance with Soleilhavoup *et al.* (2016), who evaluated the OF and UF proteome in estrous and during the luteal phase of the sheep estrous cycle, by

nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The authors determined that OVGPI was the main OF protein during estrous. In contrast, OVGPI was present in smaller quantities in UF, which corresponds to what was reported for UF (Soleilhavoup *et al.*, 2016). However, extracellular vesicles obtained from the uterine lumen of sheep have been described as positive for OVGPI (Burns *et al.*, 2014).

OVGPI plays a significant role during fertilization because it regulates polyspermy by hardening the pellucida zone (Bragança *et al.*, 2021). It has also been reported in goats that morulae and blastocysts rate increases (Pradeep *et al.*, 2011). Immunohistochemistry has detected the interaction of OVGPI with bovine embryos in stages of 4–8 cells and in morulae, in the perivitelline space, and within blastomeres, but not in the pellucida zone (Banliat *et al.*, 2020).

The presence of HSP70 protein was observed in the OF, but it was practically absent in the UF, which coincides with what has been reported in sheep (Soleilhavoup *et al.*, 2016). However, others have identified it in the UF on day 16 of the estrous cycle, but not in sheep on day 16 of pregnancy (Köch *et al.*, 2010). Microvesicles of the uterine lumen are positive for HSP70 on day 14 in both cycling and pregnant sheep (Burns *et al.*, 2014).

As mentioned, HSP70 performs activities to counteract the effects of stress. Under suboptimal temperatures of *in vitro* culture (37 and 40 °C), HSP70 is overexpressed in both oocytes and granulosa cells (Pöhländ *et al.*, 2020). This has also been reported in cattle, where inhibition of HSP70 function during culture of 2-cell embryos at physiological temperature (38.5 °C) reduces the percentage of blastocysts. This shows the importance of HSP70 in cellular functions, not only in relation to caloric stress (Romero & Hansen, 2002).

Finally, ezrin protein was found in greater quantities in OF than in UF, which is consistent with the results reported for sheep (Soleilhavoup *et al.*, 2016). It has also been reported in the UF of sheep during the first days of pregnancy (Köch *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2017).

Xu *et al.* (2023) reviewed the function of ezrin protein from a reproductive perspective, mentioning its importance during changes that occur in the uterine epithelium throughout the estrous or menstrual cycle. Ezrin induces polarization of preimplantation embryos as well as processes of cellular migration and invasion during embryo implantation and embryogenesis.

The volume recovered from UF was five times greater than that recovered from OF, which is related to the size and surface area of the oviduct and uterus. Both osmolarity and protein concentration were higher in OF than in UF (1.2 and 3 times higher, respectively), values that were within the range described for sheep. The pattern of protein distribution between the OF and UF was different, being more complex in the OF. OVGPI, HSP70, and ezrin were identified in OF and UF, and were found in greater numbers in OF samples.

CONCLUSIONS

The present study determined the physicochemical characteristics (volume, osmolarity, and total protein concentration), protein profile (distribution pattern of proteins), and the presence of OVGP1, HSP70, and ezrin proteins in the early and middle luteal phases of the estrous cycle of adult domestic sheep to determine its usefulness as a supplement to optimize *in vitro* culture media for embryo development by providing elements lacking commercial growing media.

Competing interest's statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contribution

Conception: D.A.A.G., G.B.F., M.A.F.B. and J.R.V.A. Execution of experiments: J.R.V.A., H.L.R., M.A.F.B., and M.P.C.O. Data analysis and interpretation: M.A.F.B., D.A.A.G., and J.R.V.A. Original draft: J.R.V.A. Revisions: D.A.A.G., C.C.R., G.B.F., M.A.F.B. and M.C.N.M. Disposition of funds, materials, and equipment: D.A.A.G., G.B.F., and M.C.N.M.

REFERENCES

- Abecia, A., & Forcada, F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino. Editorial Servet.
- Apichela, S. A., Argañaraz, M. E., Zampini, R., Vencato, J., Miceli, D. C., & Stelletta, C. (2015). Biochemical composition and protein profile of alpaca (*Vicugna pacos*) oviductal fluid. *Animal reproduction science*, 154, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.013>
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of chromatographic science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Bragança, G. M., Alcántara-Neto, A. S., Batista, R. I. T. P., Brandão, F. Z., Freitas, V. J. F., Mermillod, P., & Souza-Fabjan, J. M. G. (2021). Oviduct fluid during IVF moderately modulates polyspermy in *in vitro*-produced goat embryos during the non-breeding season. *Theriogenology*, 168, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.022>
- Banliat, C., Tsikis, G., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Com, E., Lavigne, R., Pineau, C., Guyonnet, B., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2020). Identification of 56 Proteins Involved in Embryo-Maternal Interactions in the Bovine Oviduct. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 466. <https://doi.org/10.3390/ijms21020466>
- Barrera, A. D., García, E. V., Hamdi, M., Sánchez-Calabuig, M. J., López-Cardona, Á. P., Balvis, N. F., Rizos, D., & Gutiérrez-Adán, A. (2017). Embryo culture in presence of oviductal fluid induces DNA methylation changes in bovine blastocysts. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(1), 1–12. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0651>
- Bhusane, K., Bhutada, S., Chaudhari, U., Savardekar, L., Katkam, R., & Sachdeva, G. (2016). Secrets of Endometrial Receptivity: Some Are Hidden in Uterine Secretome. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 75(3), 226–236. <https://doi.org/10.1111/aji.12472>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in enzymology*, 541, 151–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Burns, G., Brooks, K., Wildung, M., Navakanitworakul, R., Christenson, L. K., & Spencer, T. E. (2014). Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS one*, 9(3), e90913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090913>
- Canovas, S., Ivanova, E., Romar, R., García-Martínez, S., Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F. A., Saadeh, H., Andrews, S., Kelsey, G., & Coy, P. (2017). DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *eLife*, 6, e23670. <https://doi.org/10.7554/eLife.23670>
- Carrasco, L. C., Coy, P., Avilés, M., Gadea, J., & Romar, R. (2008). Glycosidase determination in bovine oviductal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reproduction, fertility, and development*, 20(7), 808–817. <https://doi.org/10.1071/rd08113>
- Hamdi, M., Lopera-Vasquez, R., Maillou, V., Sanchez-Calabuig, M. J., Núñez, C., Gutierrez-Adan, A., & Rizos, D. (2018). Bovine oviductal and uterine fluid support *in vitro* embryo development. *Reproduction, fertility, and development*, 30(7), 935–945. <https://doi.org/10.1071/RD17286>
- Hyttel P., Sinowatz F., & Vejlsted, M. (2010) Essential of domestic animal embryology. Saunders Elsevier.
- Iritani, A., Gomes, W. R., & Vandemark, N. L. (1969). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biology of reproduction*, 1(1), 72–76. <https://doi.org/10.1095/biolreprod1.1.72>
- Itze-Mayrhofer, C., & Brem, G. (2020). Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. *Journal of proteomics*, 225, 103884. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103884>
- Köch, J. M., Ramadoss, J., & Magness, R. R. (2010). Proteomic profile of uterine luminal fluid from early pregnant ewes. *Journal of proteome research*, 9(8), 3878–3885. <https://doi.org/10.1021/pr100096b>
- Kölle, S., Hughes, B., & Steele, H. (2020). Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. *Molecular reproduction and development*, 87(6), 650–662. <https://doi.org/10.1002/mrd.23352>
- Li, R., Whitworth, K., Lai, L., Wax, D., Spate, L., Murphy, C. N., Rieke, A., Isom, C., Hao, Y., Zhong, Z., Katayama, M., Schatten, H., & Prather, R. S. (2007). Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular reproduction and development*, 74(9), 1228–1235. <https://doi.org/10.1002/mrd.20682>
- Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *The Journal of endocrinology*, 232(1), R1–R26. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillou, V., Lloreda, V., Coy, P., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., & Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction, fertility, and development*, 29(3), 621–629. <https://doi.org/10.1071/RD15238>
- Olds, D., & Vandemark, N. L. (1957). Composition of luminal fluids in bovine female genitalia. *Fertility and sterility*, 8(4), 345–354. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)32764-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)32764-9)
- Pensyl, C. D., & Benjamin, W. J. (1999). Vapor pressure osmometry: minimum sample microvolumes. *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 77(1), 27–30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0420.1999.770106.x>
- Perkins, J. L., Goode, L., Wilder, W. A., Jr, & Henson, D. B. (1965). Collection of secretions from the oviduct and uterus of the ewe. *Journal of animal science*, 24(2), 383–387. <https://doi.org/10.2527/jas1965.242383x>
- Pohland, R., Souza-Cárceres, M. B., Datta, T. K., Vanselow, J., Martins, M. I. M., da Silva, W. A. L., Cardoso, C. J. T., & Melo-Sterza, F. A. (2020). Influence of long-term thermal stress on the *in vitro* maturation on embryo development and Heat Shock Protein abundance in zebu cattle. *Animal reproduction*, 17(3), e20190085. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2019-0085>
- Pradeep, M. A., Jagadeesh, J., De, A. K., Kaushik, J. K., Malakar, D., Kumar, S., Dang, A. K., Das, S. K., & Mohanty, A. K. (2011). Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on *in vitro* embryo development. *Theriogenology*, 75(6), 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.007>
- Rabaglino, M. B., O'Doherty, A., Bojsen-Møller Secher, J., Lonergan, P., Hyttel, P., Fair, T., & Kadarmideen, H. N. (2021). Application of multi-omics data integration and machine learning approaches to identify epigenetic and transcriptomic differences between *in vitro* and *in vivo* produced bovine embryos. *PLoS one*, 16(5), e0252096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252096>
- Restall B. J. (1966a). The fallopian tube of the sheep. I. Cannulation of the fallopian tube. *Australian journal of biological sciences*, 19(1), 181–186. <https://doi.org/10.1071/BI9660181>
- Restall B. J. (1966b). The fallopian tube of the sheep. II. The influence of progesterone and oestrogen on the secretory activities of the fallopi-

- an tube. *Australian journal of biological sciences*, 19(1), 187–197.
- Restall, B. J., & Wales, R. G. (1966). The fallopian tube of the sheep. 3. The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. *Australian journal of biological sciences*, 19(4), 687–698. <https://doi.org/10.1071/bi9660687>
- Roberts, G. P., Parker, J. M., & Symonds, H. W. (1976). Macromolecular components of genital tract fluids from the sheep. *Journal of reproduction and fertility*, 48(1), 99–107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0480099>
- Romero, Y. M., & Hansen, P. J. (2002). Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. *Molecular reproduction and development*, 62(2), 174–180. <https://doi.org/10.1002/mrd.10122>
- Romero, J. J., Liebig, B. E., Broeckling, C. D., Prenni, J. E., & Hansen, T. R. (2017). Pregnancy-induced changes in metabolome and proteome in ovine uterine flushings. *Biology of reproduction*, 97(2), 273–287. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox078>
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(11), 665–680. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3>
- Senger, P. L. (2005) *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2nd Edition, Current Conceptions, Inc., Pullman.
- Soleilhavoup, C., Riou, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P., Reynaud, K., de Graaf, S. P., Gerard, N., & Druart, X. (2016). Proteomes of the Female Genital Tract During the Oestrous Cycle. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 15(1), 93–108. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052332>
- Tervit, H. R., Whittingham, D. G., & Rowson, L. E. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of reproduction and fertility*, 30(3), 493–497. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0300493>
- Tripathi, S. K., Farman, M., Nandi, S., Girish, Kumar, V., & Gupta P. S. P. (2016). Oviductal and uterine fluid analytes as biomarkers of metabolic stress in ewes (*Ovis aries*). *Small Ruminant Research*, 144, 225–228. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.09.022>
- Wales, R. G. (1973). The uterus of the ewe. II. Chemical analysis of uterine fluid collected by cannulation. *Australian journal of biological sciences*, 26(4), 947–959. <https://doi.org/10.1071/bi9730947>
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L., & Hochstrasser, D. F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 14(1), 61–65. <https://doi.org/10.1038/nbt0196-61>
- Xu, W. T., Shi, L. L., Xu, J., Qian, H., Zhou, H., & Wang, L. H. (2023). Ezrin expression in female reproductive tissues: A review of regulation and pathophysiological implications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 11, 1125881. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1125881>
- Yahia, M., Laanani, I., Benbia, S., Hachemi, M., & Massinissa, Y. A. (2013). A Study of the Cyclic Variations of the Enzyme and the Electrolyte Activity in Uterine and Oviductal Secretions during an Estrous Cycle of the Ewe. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 6.0(3), 230–233. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1327973>
- Zhao, Y., Vanderkooi, S., & Kan, F. W. K. (2022). The role of oviduct-specific glycoprotein (OVGP1) in modulating biological functions of gametes and embryos. *Histochemistry and cell biology*, 157(3), 371–388. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02065-x>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00150

Matrícula: 2193802105

Efecto de las secreciones oviductales y uterinas sobre el desarrollo *in vitro* de embriones clones de Ovis aries.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 8 del mes de agosto del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA MARIA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO
- DR. CESAR CORTÉZ ROMERO
- DR. SALVADOR ROMO GARCIA
- DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO
- DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JOSE ROBERTO VAZQUEZ AVENDAÑO

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

Aprobar

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



JOSE ROBERTO VAZQUEZ AVENDAÑO
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA MARIA DEL CARMEN NAVARRO MALDONADO

VOCAL

DR. CESAR CORTÉZ ROMERO

VOCAL

DR. SALVADOR ROMO GARCIA

VOCAL

DR. JOSE ERNESTO HERNANDEZ PICHARDO

SECRETARIO

DR. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCIA