

TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS INTERESPECIE EN FÉLIDOS SALVAJES: UNA REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS

Interspecies somatic cell nuclear transfer in wild felids: A systematic review and meta-analysis

Hernández-Navas, A.; González-Plaza, A; Cuello-Medina, C.

Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia

Autor de correspondencia: Hernández Navas, A; alicia.hernandezn@um.es

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Grado (Veterinaria)

Enviado: 25/07/2023

Aceptado: 16/10/2023

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión sistemática sobre la transferencia nuclear de células somáticas de félidos salvajes utilizando ovocitos maduros de gato doméstico (*Felis catus*). Además, se realizaron dos metaanálisis con el programa Comprehensive Meta-Analysis V4 para evaluar el efecto de la transferencia nuclear de células somáticas interespecie (TNCSi) en la división embrionaria y formación de blastocisto en comparación con la técnica intraespecie con células somáticas y ovocitos de gato (TNCSg-g). El metaanálisis se realizó con un modelo aleatorio y el tamaño del efecto se determinó mediante el riesgo relativo (RR). En la revisión sistemática se seleccionaron 16 artículos científicos de un total de 248 y 3230 referencias iniciales en PubMed y ScienceDirect, respectivamente. Los artículos publicaban tasas de división embrionaria del 27.5% al 96.7% y una tasa máxima de formación de blastocisto del 41.5%. Solo 2 de los 8 artículos obtuvieron descendencia viva, con una eficiencia del 1% aproximadamente sobre el total de embriones transferidos. El riesgo de sesgo de los 10 artículos seleccionados para el metaanálisis fue bajo. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la división embrionaria entre la TNCSi y la TNCSg-g. Sin embargo, se observó una menor ($p = 0.016$; $RR = 0.4$) probabilidad de formación de blastocistos en el grupo experimental de TNCSi en comparación con la TNCSg-g. En conclusión, la bibliografía sobre TNCSi en félidos salvajes es escasa y estudia especies muy distintas, lo que dificulta los metaanálisis. Aunque la división embrionaria hasta el estadio

de 2-4 células es similar en la TNCSi y la TNCSg-g, la formación de blastocisto es menor cuando la célula somática es de una especie de felido distinta al gato.

Palabras clave: interespecífico, ovocito, blastocisto, especies amenazadas, *Felis catus*.

ABSTRACT

The aim of this work was to systematically review scientific articles on interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT) in wild cats using domestic cat oocytes. In addition, two meta-analyses were performed using the Comprehensive Meta-Analysis V4 program to evaluate the effect of iSCNT on embryonic division and blastocyst formation compared to the intraspecies technique with somatic cells and oocytes from domestic cat (SCNTc-c). The meta-analysis was performed using a randomized model and the effect size was determined using the relative risk (RR). Sixteen scientific articles were selected from a total of 248 and 3230 initial references in PubMed and ScienceDirect, respectively. The articles report embryonic cleavage rates of 27.5% to 96.7% and a maximum blastocyst formation rate of 41.5%. Only 2 of the 8 articles obtained live offspring, with an efficiency of approximately 1% of the total number of embryos transferred. The risk of bias of the 10 articles selected for the meta-analysis was low. No significant differences ($p>0.05$) were found in the embryonic division between the iSCNT and the SCNTc-c. However, a lower ($p=0.016$; $RR=0.4$) probability of blastocyst formation was observed in the experimental group of iSCNT compared to SCNTc-c. In conclusion, the bibliography on iSCNT in wild cats is scarce and studies very different species, which makes meta-analyses difficult. Although embryonic division up to the 2-4 cell stage is similar in iSCNT and SCNTc-c, blastocyst formation is less when the somatic cell is from a felid species other than the cat.

Keywords: interspecific, oocyte, blastocyst, endangered species, *Felis catus*.

INTRODUCCIÓN

La disminución de la biodiversidad y el aumento de especies amenazadas ha llevado a un aumento de las investigaciones dirigidas al desarrollo de estrategias de conservación (Borges & Pereira, 2019). Las tecnologías reproductivas son fundamentales para conservar y expandir poblaciones amenazadas con un número crítico de individuos (Holt et al., 2004). Entre estas tecnologías destacan la criopreservación de gametos y embriones (León-Quinto et al., 2009), la inseminación artificial (Howard et al., 2016), la transferencia de embriones (Goeritz et al., 2012), la fecundación *in vitro* (Herrick et al., 2010) y clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) (Folch et al., 2009).

Aunque se ha demostrado el potencial de la TNCS para la conservación de la biodiversidad, esta técnica presenta algunas limitaciones en especies en peligro de extinción como la baja disponibilidad de ovocitos (Loi et al., 2001). En estos casos, la clonación mediante TNCS

interespecie (TNCSi), puede ser una alternativa (Beyhan et al., 2007), ya que es una técnica donde las células de la especie que se quiere clonar se transfieren a un ovocito enucleado de una especie diferente pero lo más relacionada filogenéticamente posible y con un número de individuos muy elevado (Beyhan et al., 2007). Los ovocitos receptores más utilizados han sido los de bovino y conejo por la demostrada capacidad de su citoplasma para reprogramar células somáticas, así como por su fácil disponibilidad (Seaby et al., 2013; Yamochi et al., 2013). El embrión resultante de la TNCSi se transfiere al útero de una hembra receptora adecuada, normalmente la misma especie donante del ovocito, para que se desarrolle hasta término (Beyhan et al., 2007; Moro et al., 2015a).

Sin embargo, existen numerosos factores técnicos y biológicos que afectan el éxito de la técnica y conducen a fallos en la implantación, anomalías fetales y mala salud posnatal (Trounson, 2001), lo que se traduce en una baja eficiencia de la TNCSi en términos de descen-

dencia. Algunos factores están asociados a la propia técnica como la maduración citoplasmática del ovocito, la reprogramación del núcleo del donante o unas adecuadas condiciones de cultivo (Cordova et al., 2017). Además, existen una serie de limitaciones asociadas a la distancia filogenética entre la célula donante y el citoplasma receptor, como la incompatibilidad entre ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN genómico (Mrowiec et al., 2020), el fallo en la activación del genoma embrionario (AGE) o la disponibilidad de hembras receptoras adecuadas para los embriones clonados (Loi et al., 2011). En la TNCSi, cuando se inyecta la célula somática completa en el ovocito, el embrión hereda ADN nuclear derivado de la célula donante y ADNmt derivado del ovocito y de la célula donante (Takeda et al., 2003), por lo que se produce el fenómeno de heteroplasma, en el que coexisten ADNmt de dos células diferentes. Esta situación produce un problema doble de incompatibilidad, por un lado, la incompatibilidad entre los genes del ADNmt del citoplasma y los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales, y por otro la incompatibilidad entre el ADNmt procedente de la célula receptora y el ADNmt transmitido por la célula donante (Mrowiec et al., 2020). Además, en los embriones producidos por TNCSi, el desarrollo se puede ver impedido por la ausencia de AGE o por una AGE parcial, porque los genes que desencadenan la transcripción del genoma embrionario, presentes en el citoplasma del ovocito, no se unen a la secuencia diana en el genoma de las células somáticas de una especie diferente (Loi et al., 2001), lo que conducirá a un desarrollo embrionario extremadamente pobre (Zuo et al., 2017). Otro inconveniente que considerar de la TNCSi como aplicación en programas de conservación es que la producción de poblaciones genéticamente idénticas pueda causar problemas de endogamia y, en consecuencia, las poblaciones presentarán alelos infrecuentes y deletéreos (Mrowiec et al., 2020), aunque se cuestiona si, llegado el

punto en el que solo quede un reducido número de animales, la inevitable endogamia de la población es preferible a la extinción. Recolectar líneas celulares, cuando una población cuenta aún un número de individuos elevado, haría que el nivel original de diversidad genética pudiera ser restaurado mediante clonación, lo cual respalda la importancia de la creación de bancos de células somáticas.

Entre las especies en peligro de extinción, la familia de los félidos destaca porque la mayoría de sus especies salvajes presentan poblaciones decrecientes según la Lista Roja de la IUCN (2022), debido a la caza furtiva y la pérdida de hábitat (Thongphakdee et al., 2020). Resulta interesante aclarar que la familia de los félidos, a diferencia de la subfamilia de los felinos (*Felinae*), incluye a los panterinos (*Pantherinae*) como el león (*Panthera leo*), el tigre (*Panthera tigris*), el leopardo (*Panthera pardus*) y el jaguar (*Panthera onca*). El uso de la técnica de TNCSi podría ser clave para la conservación y restauración de poblaciones de estas especies. Los gatos domésticos no sólo sirven como una especie modelo para el estudio de los félidos en peligro de extinción, sino que también proporcionan un citoplasma receptor adecuado para la transferencia de células somáticas de félidos salvajes, o una hembra receptora adecuada para la transferencia de embriones de estas especies (Kitiyant et al., 2003). En estos casos, a pesar de la distancia filogenética, se ha demostrado que el ovocito de gato doméstico (*Felis catus*) puede reprogramar los núcleos de diferentes félidos salvajes entre los que se encuentran el gato salvaje africano (*Felis silvestris lybica*; Gomez et al., 2003), gato jaspeado (*Pardofelis marmorata*; Thongphakdee et al., 2006), gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*; Yin et al., 2006a), gato de las arenas (*Felis margarita*; Gómez et al., 2008), gato de cabeza plana (*Prionailurus planiceps*; Thongphakdee et al., 2010), gato de patas negras (*Felis nigripes*; Gómez et al., 2011), guepardo (*Acinonyx jubatus*; Moro et al., 2015a), tigre (*Panthera tigris*; Moro et al.,

2015b), guepardo asiático (*Acinonyx jubatus venaticus*; Moulavi et al., 2017), güiña (*Leopardus guigna*; Veraguas et al., 2020) y leopardo de Persia (*Panthera pardus saxicolor*; Shahverdi et al., 2022). La mayoría de las investigaciones se han centrado en el desarrollo *in vitro* de los embriones obtenidos mediante TNCSi, con los que se han alcanzado tasas de división embrionaria (estadio de 2-4 células) de entre el 27.5% (guepardo asiático; Moulavi et al., 2017) y el 96.7% (guepardo; Moro et al., 2015a), y tasas máximas de formación blastocistos del 41.5% (gato de las arenas; Gómez et al., 2008). Sin embargo, algunos estudios han reportado el nacimiento de descendencia de embriones obtenidos mediante esta tecnología, siendo la tasa de nacidos con respecto al total de embriones transferidos del 1% aproximadamente. El primero de ellos fue el nacimiento de cachorros de gato salvaje africano descrito por Gómez et al. en 2004.

Actualmente existe poca bibliografía científica que recopile información, datos y resultados obtenidos mediante TNCSi en félidos (Gómez et al., 2006; Loi et al., 2011; Thongphakdee et al., 2020). Por otra parte, sería interesante comparar la eficiencia de la técnica de TNCS en gato doméstico y la TNCSi con félidos salvajes, con el fin de evaluar el impacto del empleo de una célula somática de una especie de felido distinta a la del ovocito receptor sobre el posterior desarrollo embrionario.

El primer objetivo de este trabajo de fin de grado fue realizar una revisión sistemática de artículos científicos sobre la TNCSi donde se utilicen células somáticas de félidos salvajes y ovocitos enucleados de gato doméstico. El segundo objetivo fue realizar un metaanálisis para evaluar el efecto de la TNCSi con células somáticas de félidos salvajes y ovocitos de gato, sobre la división embrionaria hasta el estadio de 2-4 células y sobre la formación de blastocisto, tomando como referencia embriones producidos mediante TNCS empleando células somáticas y ovocitos de gato (TNCSg-g).

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta revisión sistemática se realizó siguiendo los ítems recogidos en la declaración PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Metanalyses*) para la preparación y publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis, (Moher et al., 2009).

1. Estrategia de búsqueda y criterios de selección

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva en las bases de datos de *PubMed* y de *ScienceDirect* empleando las combinaciones de palabras clave “*interspecies and somatic cell nuclear transfer*” (A), “*interspecific and somatic cell nuclear transfer*” (B) y “*felis catus and nuclear transfer*” (C). La última búsqueda fue el 20 de marzo de 2023.

Para acotar los resultados de la búsqueda, se emplearon los siguientes criterios de selección: que los artículos estuvieran escritos en inglés; que tuvieran fecha de publicación a partir del año 2000 inclusive; que fuesen artículos científicos de investigación relativos a estudios de cohortes; que hicieran referencia a la tecnología TNCSi con células somáticas de especies de félidos salvajes y ovocitos receptores de gata y, por último, que presentaran datos sobre desarrollo embrionario *in vitro* y/o *in vivo*.

El proceso de selección de los artículos se muestra de forma esquemática en la Figuras 1 y 2.

2. Extracción de datos

Tras la selección de artículos, se procedió a su lectura y extracción de datos de interés de cada uno de los estudios seleccionados. La extracción de datos se llevó a cabo por dos revisores que trabajaron de forma independiente y por duplicado, resolviendo posteriormente los desacuerdos por consenso.

En cuanto a la información sobre el desarrollo *in vitro* de embriones (Tabla 1), durante la lectura de cada artículo se recopilaron datos

Tabla 1. Estudios sobre desarrollo *in vitro* de embriones obtenidos mediante transferencia nuclear de células somáticas de félidos salvajes a ovocitos de gata (*Felis catus*).

Especie de la célula somática	N	División N (%)	Blastocistos/ divididos N (%)	Blastocistos/ totales N (%)	Cita
Gato salvaje africano (<i>Felis silvestris lybica</i>)	79 ¹	68 (86.1)	15 (22.1)	15 (19)	Gómez et al., 2003
	55 ²	36 (65.5)	15 (41.7)	15 (27.3)	
Gato salvaje africano (<i>Felis silvestris lybica</i>)	511 ¹	435 (85.1)	no hay datos	no hay datos	Gómez et al., 2004
	1194 ²	944 (79.1)	no hay datos	no hay datos	
Gato jaspeado (<i>Pardofelis marmorata</i>)	119 ¹	53 (44.5)	0	0	Thongphakdee et al., 2006
Gato leopardo (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	218 ¹	147 (67.4)	16 (10.9)	16 (7.3)	Yin et al., 2006a
Gato leopardo (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	52 ¹	31 (59.9)	4 (12.9)	4 (7.6)	Yin et al., 2006b
Gato de las arenas (<i>Felis margarita</i>)	53 ^{2,3}	51 (96)	22 (43)	22 (41.5)	Gómez et al., 2008
Gato jaspeado (<i>Pardofelis marmorata</i>)	81 ¹	56 (69.1)	3 (5.4)	3 (3.7)	Thongphakdee et al., 2010
Gato de cabeza plana (<i>Prionailurus planiceps</i>)	76 ¹	58 (76.3)	5 (8.6)	5 (6.6)	Thongphakdee et al., 2010
Gato leopardo (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	217 ¹	123 (56.7)	15 (12.2)	15 (6.9)	Lee et al., 2010
Gato de patas negras (<i>Felis nigripes</i>)	199 ^{2,3}	179 (90)	6 (3.3)	6 (3)	Gómez et al., 2011
Gato jaspeado (<i>Pardofelis marmorata</i>)	130 ¹	84 (64.6)	0	0	Imsoonthornruksa et al., 2012
Gato de patas negras (<i>Felis nigripes</i>)	88 ²	82 (93.2)	10 (12.5)	10 (11.6)	Gómez et al., 2012
Guepardo (<i>Acinonyx jubatus</i>)	91 ¹	88 (96.7)	26 (29.5)	26 (28.6)	Moro et al., 2015a
Tigre (<i>Panthera tigris</i>)	66 ¹	63 (95.9)	8 (12.7)	8 (12.1)	Moro et al., 2015b
Guepardo asiático (<i>Acinonyx jubatus venaticus</i>)	567 ¹	156 (27.5)	0	0	Moulavi et al., 2017
Güiña (<i>Leopardus guigna</i>)	110 ¹	101 (91.8)	6 (5.9)	6 (5.5)	Veraguas et al., 2020
Leopardo de Persia (<i>Panthera pardus saxicolor</i>)	327 ¹	114 (34.9)	24 (21.1)	24 (7.3)	Shahverdi et al., 2022

¹ Se utilizan ovocitos madurados *in vitro*. ² Se utilizan ovocitos madurados *in vivo*. ³ Hace referencia al número de embriones fusionados, el artículo no proporciona el número total de embriones cultivados.

relativos a la especie donante de la célula de somática, el número de embriones cultivados, el número de embriones divididos (estadio de 2-4 células) y su correspondiente porcentaje sobre el total de embriones cultivados, el número de blastocistos, su correspondiente porcentaje sobre el número de embriones divididos, así como la tasa de formación de blastocistos sobre el total de embriones cultivados. En el caso de que los artículos no mostraran estos datos se

procedió a su cálculo a partir de los resultados aportados por los autores.

La información sobre el desarrollo *in vivo* de embriones se presenta en la Tabla 2. Se recopilaron datos relativos a la especie donante de la célula somática, el número total de embriones transferidos, el número de receptoras a las que se le transfirieron los embriones, el promedio de embriones transferidos por receptora, el número de receptoras gestantes, su correspondiente

Tabla 2. Estudios sobre desarrollo *in vivo* de embriones obtenidos mediante transferencia nuclear de células somáticas de félidos salvajes a ovocitos maduros enucleados de gata (*Felis catus*).

Especie de la célula somática	Embriones / receptora [promedio]	Receptoras gestantes N (tasa de gestación %)	Fetos N (% del total)	Gestantes a término n (%)	Nacidos vivos / nacidos totales	Observaciones	Cita
Gato salvaje africano (<i>Felis silvestris lybica</i>)	1086 ^{1,2} / 26 [41.8]	12 / 26 (46.2)	24 (2.2)	9 / 12 (75)	10 / 17	Fetos de 21-23 días.	Gómez et al., 2004.
Gato leopardo (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	435 ¹ / 7 [62.1]	4 / 7 (57.1)	6 (1.4)	0 ³	0 / 0	Fetos de 30-45 días.	Yin et al., 2006a.
Gato de las arenas (<i>Felis margarita</i>)	616 ² / 20 [32.1]	6 / 20 (30)	13 (2.1)	5 / 6 (83.3)	7 / 11	Fetos de 22-23 días.	Gómez et al., 2008.
Gato de cabeza plana (<i>Prionailurus planiceps</i>)	207 ¹ / 5 [41.4]	0	0	0	0		Thongphakdee et al., 2010.
Gato leopardo (<i>Prionailurus bengalensis</i>)	409 ¹ / 17 [24.1]	6 (35.3)	no hay datos	0	0		Lee et al., 2010.
Gato de patas negras (<i>Felis nigripes</i>)	213 ² / 7 [30.4]	4 / 7 (57.1)	9 (4.2)	0	0	Fetos de 21 días.	Gómez et al., 2011.
Gato jaspeado (<i>Pardofelis marmorata</i>)	461 ¹ / 12 [38.4]	0	0	0	0		Imsoonthornruksa et al., 2012.
Gato de patas negras (<i>Felis nigripes</i>)	135 ² / 2 [67.5]	1 (50)	1 (0.7)	0	0	El feto se reabsorbe a partir del día 45.	Gómez et al., 2012.

¹ Se utilizan ovocitos madurados *in vitro*.

² Se utilizan ovocitos madurados *in vivo*.

³ No se realiza diagnóstico de gestación. Siete de las 21 receptoras se sacrifican en el día 30-45 de gestación y se evaluó el número de fetos.

porcentaje sobre el número de receptoras totales (tasa de gestación), el número de fetos formados y su correspondiente porcentaje sobre el número de embriones transferidos totales, el número de hembras gestantes que llegan a término y su correspondiente porcentaje sobre el número de receptoras gestantes, el número de nacidos totales y el número de nacidos vivos. Los porcentajes que no aparecen en el texto se calcularon a partir de los datos proporcionados en los artículos.

3. Metaanálisis y evaluación del riesgo de sesgo

Para la realización de los metaanálisis se emplearon aquellos artículos científicos de la revisión sistemática que cumplieron los criterios de selección descritos en el apartado 3.1 y que además presentaban datos de desarrollo *in vitro* (tasas de división y formación de blastocisto) de embriones producidos mediante TNCSi (ovocito de gato doméstico y célula somática de un felido salvaje) y mediante TNCSg-g (ovocito y célula somática de gato doméstico).

Previamente al metaanálisis, se llevó a cabo una evaluación del riesgo de sesgo por dos evaluadores de forma independiente con la herramienta Cochrane (Higgins et al., 2022). Para el análisis del riesgo de sesgo se utilizaron los mismos estudios que los seleccionados para el metaanálisis y los aspectos que se tuvieron en cuenta fueron: a) generación de secuencias aleatorias (sesgo de selección); b) ocultamiento de la asignación (sesgo de selección); c) divulgación selectiva (sesgo de información); d) cegado de personal y participantes (sesgo de realización); e) cegado en la recogida de datos (sesgo de detección); f) datos incompletos (sesgo de desgaste) y g) otros sesgos.

Para el análisis estadístico se empleó el programa Comprehensive Meta-Analysis V4 (Biostat, Inc., Englewood, New Jersey, USA) con el modelo de Mantel-Haenszel para efectos aleatorios. Se realizaron dos metaanálisis, uno para evaluar el efecto de la TNCSi sobre la va-

riable dicotómica “división embrionaria” (embriones en estadio de 2-4 células), y otro para el efecto de la TNCSi sobre la variable dicotómica “formación de blastocisto”, utilizando en ambos casos como grupo control embriones producidos mediante TNCSg-g. Para determinar el tamaño del efecto se empleó el riesgo relativo (RR). El RR indica cuantas más veces tiende a producirse un evento (división o formación de blastocisto) en el grupo experimental (TNCSi) con respecto al grupo control (TNCSg-g). Se consideraron diferencias significativas para $p < 0.05$. La heterogeneidad de los estudios se determinó a partir de la prueba Q de Cochran y el cálculo del índice I^2 .

RESULTADOS

1. Resultados del proceso de búsqueda y selección de artículos de la revisión sistemática

En un principio, se trabajó por separado con los artículos resultantes de la búsqueda bibliográfica en cada una de las bases de datos (PubMed y ScienceDirect).

En la Figura 1 se muestra el esquema de búsqueda y selección de artículos usando la base de datos PubMed. En la búsqueda inicial de la combinación de palabras clave, se encontraron un total de 140 resultados para la combinación de palabras A, un total de 21 resultados para la combinación B y un total de 87 resultados para la combinación C. En una primera selección, se descartaron 2 (B) y 9 (C) artículos por estar publicados en fechas anteriores al 2000, y 22 (A), 8 (B) y 11 (C) artículos por ser revisiones u otro tipo de artículo diferente al artículo de investigación, quedando 118 (A), 11 (B) y 67 (C) artículos. Tras aplicar los criterios de selección, se excluyeron 4 (A), 4 (B) y 45 (C) artículos por no llevar a cabo la técnica de TNCS o hacerlo solo en la modalidad intraespecie, 109 (A), 6 (B) y 5 (C) artículos por no utilizar especies de felidos salvajes como donantes de células

somáticas y gato doméstico como especie receptora, y 1 (C) por no presentar datos sobre desarrollo embrionario *in vitro* y/o *in vivo*, quedando en definitiva 5 (A), 1 (B) y 16 (C) artículos seleccionados. Hay 6 artículos en común entre los seleccionados de la combinación

A, B y C, por lo que, de la base de datos de PubMed, se seleccionaron finalmente 16 artículos científicos.

En la Figura 2 se muestra el esquema de búsqueda y selección de artículos usando la base de datos ScienceDirect. En la búsqueda

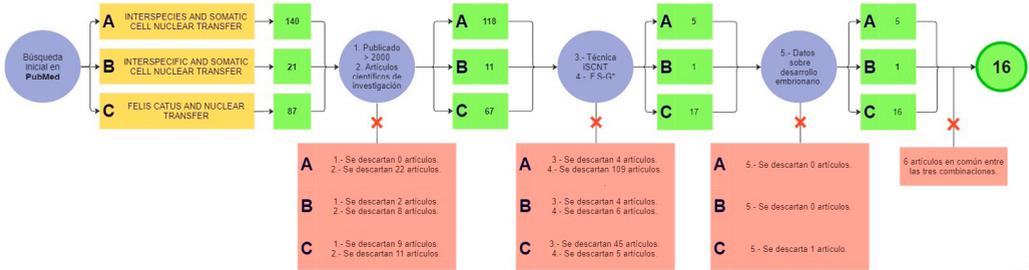


Figura 1. Esquema de búsqueda y selección de artículos usando la base de datos PubMed. Las letras A, B y C indican cada una de las combinaciones de palabras: “*interspecies and somatic cell nuclear transfer*” (A), “*interspecific and somatic cell nuclear transfer*” (B) y “*Felis catus and nuclear transfer*” (C). Los cuadrados verdes indican el número de artículos que hay para cada combinación de palabras, tras aplicar los diferentes criterios de selección. Los círculos azules indican los criterios de selección. Los cuadrados rojos indican el número de artículos que se descartan para cada criterio de selección. F.S–G: Artículos que lleven a cabo el estudio con especies de félidos salvajes como donantes de células somáticas y con gato doméstico como especie receptora.

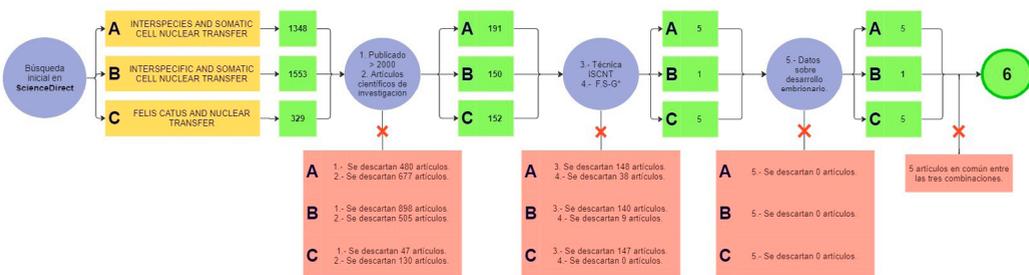


Figura 2. Esquema de búsqueda y selección de artículos usando la base de datos ScienceDirect. Las letras A, B y C indican cada una de las combinaciones de palabras: “*interspecies and somatic cell nuclear transfer*” (A), “*interspecific and somatic cell nuclear transfer*” (B) y “*Felis catus and nuclear transfer*” (C). Los cuadrados verdes indican el número de artículos que hay para cada combinación de palabras, tras aplicar los diferentes criterios de selección. Los círculos azules indican los criterios de selección. Los cuadrados rojos indican el número de artículos que se descartan para cada criterio de selección. F.S–G: Artículos que lleven a cabo el estudio con especies de félidos salvajes como donantes de células somáticas y con gato doméstico como especie receptora.

inicial de la combinación de palabras clave, se encontraron un total de 1348 resultados para la combinación A, un total de 1553 resultados para la combinación B y un total de 329 resultados para la combinación C. En una primera selección, se descartaron 480 (A), 898 (B) y 47 (C) artículos, por estar publicados en fechas anteriores al 2000, y 677 (A), 505 (B) y 130 (C) artículos por ser revisiones u otro tipo de artículo diferente al artículo de investigación, quedando 191 (A), 150 (B) y 152 (C) artículos. Tras aplicar los criterios de selección, se excluyeron 148 (A), 140 (B) y 147 (C) artículos por no llevar a cabo la técnica de TNCS o hacerlo solo en la modalidad intraespecie y 38 (A) y 9 (B) artículos por no utilizar especies de félidos salvajes como donantes de células somáticas y gato doméstico como especie receptora, quedando en definitiva 5 (A), 1 (B) y 5 (C) artículos seleccionados. Hay 5 artículos en común entre los seleccionados de la combinación A, B y C, por lo que, de la base de datos de ScienceDirect, se seleccionan 6 artículos científicos.

Entre los 16 artículos de PubMed y los 6 de ScienceDirect, se encontraron 6 en común, lo que da como resultado un total de 16 artículos finales una vez que se combinaron los resultados de la búsqueda en las dos bases de datos. Los datos más representativos de estos artículos se muestran en la Tabla 1 (datos de desarrollo *in vitro* de embriones) y Tabla 2 (datos de desarrollo *in vivo* de embriones).

2. Resultados del metaanálisis y análisis del riesgo de sesgo

Para la realización de los metaanálisis se utilizaron un total de 10 artículos científicos que cumplieron los criterios de selección y las condiciones previamente descritas en los apartados 3.1 y 3.3 del Material y Métodos, respectivamente. Uno de los artículos (Thongphakdee et al., 2010) describe la TNCSi con células somáticas de dos especies de félidos

salvajes diferentes, gato jaspeado y gato de cabeza plana, por lo que en el metaanálisis aparece este mismo estudio en dos comparaciones (Thongphakdee et al., 2010¹ y Thongphakdee et al., 2010²).

La herramienta utilizada para evaluar el riesgo de sesgo está diseñada para estudios clínicos, por lo que se ha intentado adaptar a los estudios incluidos en esta revisión sistemática. Los resultados obtenidos en la evaluación del riesgo de sesgos se representan en la Tabla 3. El riesgo de sesgo de selección resultó ser muy bajo. El sesgo por ocultamiento o cegado de los participantes no se produce en los estudios incluidos en este trabajo. De la misma manera, no se produce una divulgación selectiva porque las variables estudiadas son dicotómicas por lo que no hay sesgo de información. El sesgo por ocultamiento de la asignación o cegado de los participantes en este caso no contempla. El cegado en la recogida de datos no está garantizado por lo que el sesgo relativo al cegado en la recogida de datos es dudoso, ya que en estos casos el que recoge los datos de los estudios es el investigador que suele conocer el grupo experimental. El sesgo por datos incompletos tampoco existe en los estudios incluidos en el trabajo, ya que este sesgo hace referencia a los pacientes que abandonan un estudio clínico por diferentes causas.

El análisis estadístico se realizó con un modelo de efectos aleatorios que es el más indicado cuando los resultados de los diferentes estudios no son homogéneos. El peso relativo de cada estudio fue calculado teniendo en cuenta el tamaño muestral y el intervalo de confianza de cada estudio. El tamaño del efecto en los metaanálisis de este TFG se expresó con el parámetro RR que es una variable de asociación para variables nominales dicotómicas (división y desarrollo hasta blastocisto).

En la Figura 3 se presentan los resultados del metaanálisis que compara el RR de producirse la división hasta el estadio de 2-4 células en los

Tabla 3. Evaluación del riesgo de sesgo de los estudios seleccionados para el metaanálisis.

Estudios	a) Generación secuencias aleatorias	b) Ocultamiento de la asignación	c) Divulgación selectiva	d) Cegado de personal y participantes	e) Cegado en la recogida de datos	f) Datos incompletos	g) Otros sesgos	SESGO GENERAL
Gómez et al., 2003	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Thongphakdee et al., 2006	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Yin et al., 2006b	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Thongphakdee et al., 2010	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Gómez et al., 2011	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Imsoonthornruksa et al., 2012	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Moro et al., 2015a	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Moro et al 2015b	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Moulavi et al., 2017	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓
Veraguas et al., 2020	↓	↓	↓	↓	?	↓	-	↓

↓ : Riesgo bajo. ? : Riesgo dudoso.

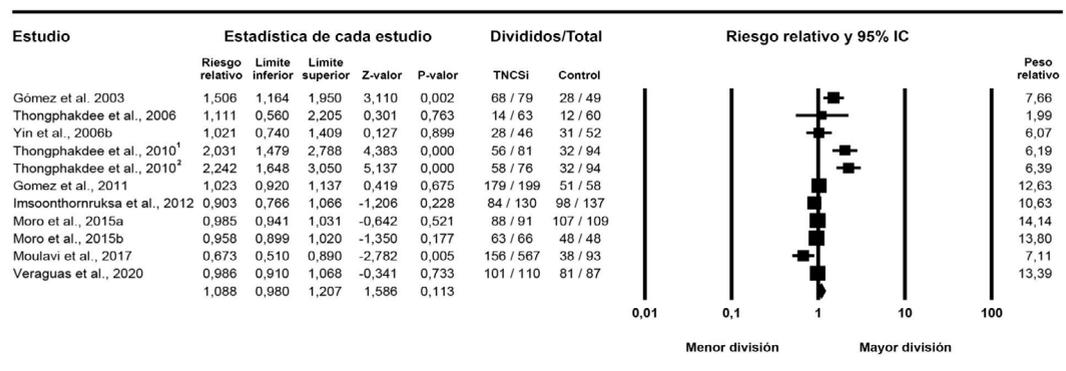


Figura 3. Resultados del metaanálisis que analiza el efecto de la técnica de transferencia nuclear interespecie (TNCSI) con células somáticas de félidos salvajes y ovocitos de gato sobre la división embrionaria hasta estadio de 2-4 células en comparación con la división embrionaria de embriones generados mediante transferencia nuclear de células somáticas de gato a ovocitos de gato (TNCSg-g).

embriones de los grupos TNCSi y TNCSg-g. El RR total fue 1.09, sin embargo, las diferencias entre grupos no fueron significativas ya que el valor de p del análisis fue 0.11.

En la Figura 4 se presentan los resultados del metaanálisis que compara el RR de la tasa de formación de blastocisto del grupo TNCSi y del grupo TNCSg-g. El análisis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos. Se estimó un RR total de 0.4, lo que indica que la probabilidad de que se formen blastocistos en el grupo TNCSi es menor que en el grupo TNCSg-g. En dos de los estudios (Gómez et al., 2003 y Thongphakdee et al., 2010b) se obtuvieron unos valores de $RR > 1$, en otros dos estudios (Yin et al., 2006 y Thongphakdee et al., 2010a) se obtuvieron unos valores de RR cercanos a 1 y en los 7 estudios restantes (incluyendo los 4 estudios de mayor peso) se obtuvieron valores de $RR < 1$.

En ambos metaanálisis la prueba Q de Cochran de heterogeneidad resultó ser significativa (p -valor: < 0.0001). El alto valor de I^2 en el primer ($I^2 = 85.08$) y segundo ($I^2 = 78.82$) metaanálisis indicaron una elevada heterogeneidad de los estudios.

DISCUSIÓN

1. Proceso de búsqueda y selección de artículos de la revisión sistemática

De los 16 artículos, 8 realizan tanto desarrollo de embriones *in vitro* como *in vivo* (Gómez et al., 2004; Yin et al., 2006a; Gómez et al., 2008; Lee et al., 2010; Thongphakdee et al., 2010; Gómez et al., 2011; Gómez et al., 2012; Imsoonthornruksa et al., 2012).

De las 11 especies de félidos salvajes que se estudian en los artículos seleccionados, hay 7 que son consideradas por la Lista Roja de la IUCN (2022) como especies amenazadas, por estar clasificadas como especies vulnerables (gato de patas negras: Gómez et al., 2011 y Gómez et al., 2012; guepardo: Moro et al., 2015a; guepardo asiático: Moulavi et al., 2017; güiña: Veraguas et al., 2020; leopardo de Persia: Shahverdi et al., 2022) o especies en peligro de extinción (gato de cabeza plana: Thongphakdee et al., 2010; tigre: Moro et al., 2015b). Se utiliza el concepto de félido y no el de felino ya que, entre las 11 especies estudiadas en los artículos seleccionados, aparecen 2 que pertenecen a la

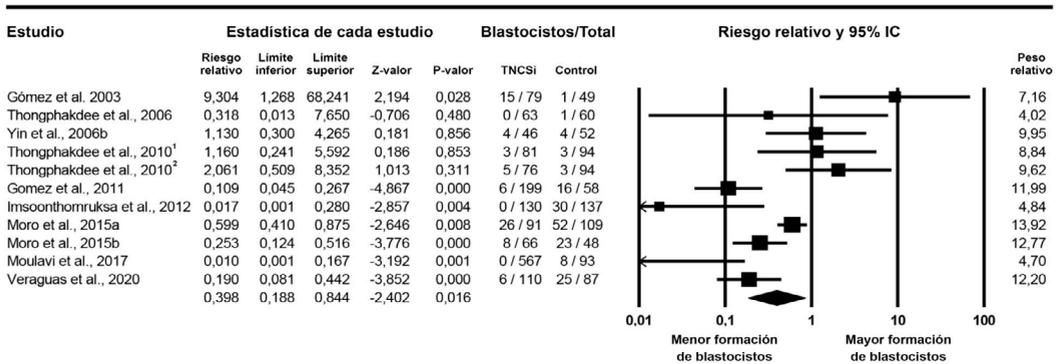


Figura 4. Resultados del metaanálisis que analiza el efecto de la técnica de transferencia nuclear interespecie (TNCSi) con células somáticas de félidos salvajes y ovocitos de gato sobre la formación de blastocisto en comparación con la formación de blastocisto de embriones generados mediante transferencia nuclear de células somáticas de gato a ovocitos de gato (TNCSg-g).

subfamilia de panterinos (*Pantherinae*); el tigre (Moro et al., 2015b) y el leopardo de Persia (Shahverdi et al., 2022).

En cuanto a los estudios de desarrollo *in vitro* (Tabla 1) de los embriones producidos por TNCSi, algunos incorporan tratamientos o variedades entre diferentes grupos de cultivo, como el tratamiento de fibroblastos con Tricostatina A (Lee et al., 2010), el tratamiento de fibroblastos con 5-Aza-2'-Deoxycytidine (inhibidor de la ADN metiltransferasa) y Scriptaid (inhibidor de la histona desacetilasa; Gómez et al., 2012), la exposición de fibroblastos a roscovitina (Gómez et al., 2003) o la eliminación de la zona pelúcida del ovocito para cultivar embriones agregados (Moro et al., 2015a; Moro et al., 2015b; Veraguas et al., 2020). De los 8 artículos que estudian el desarrollo *in vivo* del embrión producido por TNCSi (Tabla 2) solo 2 consiguen obtener descendencia viva (Gómez et al., 2004; Gómez et al., 2008). Algunos de los artículos comparan el desarrollo de embriones obtenidos mediante TNCSi con embriones obtenidos mediante TNCSg-g, siendo éstos los estudios incluidos en el metaanálisis de este trabajo (Gómez et al., 2003; Thongphakdee et al., 2006; Yin et al., 2006b; Thongphakdee et al., 2010; Gómez et al., 2011; Imsoonthornruksa et al., 2012; Moro et al., 2015a; Moro et al., 2015b; Moulavi et al., 2017; Veraguas et al., 2020).

2. Metaanálisis y análisis del riesgo de sesgo

El hecho de que no haya una diferencia estadísticamente significativa entre la tasa de división embrionaria de los embriones del grupo TNCSi y TNCSg-g, puede deberse a que las principales limitaciones de la TNCSi aparecen en el momento de la activación génica embrionaria (Beyhan et al., 2007). La activación génica es el momento en el que el embrión deja de utilizar los transcritos procedentes del ovocito y comienza a generar los propios (Memili y First, 2000). Este período de transición del control del

genoma materno al embrionario en los félidos no se produce hasta la etapa de 5 a 8 células (Hoffert et al., 1997). De modo que esto podría explicar que, hasta ese momento, ambos tipos de embriones funcionen de forma parecida, ya que el ovocito es de gato en ambos casos. Otro motivo por el que no se ha encontrado diferencia en cuanto a la división, podría ser que los efectos de la heteroplasmia en el desarrollo de la TNCSi no son evidentes durante las etapas más tempranas del desarrollo embrionario (Thongphakdee et al., 2006).

Por otro lado, la menor probabilidad de que se formen blastocistos en el grupo TNCSi, en comparación con el grupo TNCSg-g se debe a la distancia filogenética entre las células donantes y los ovocitos receptores (Thongphakdee et al., 2020). Diferentes autores han demostrado las consecuencias de emplear células somáticas de diferente especie a la del ovocito receptor, entre ellas destacan las incompatibilidades entre ADNmt y ADN genómico (Mrowiec et al., 2020), la inadecuada remodelación y reprogramación nuclear (Gómez et al., 2003), la ausencia de AGE o AGE parcial (Loi et al., 2001), etc. Estos problemas asociados a la TNCSi hacen que muchas veces sólo se consiga desarrollo embrionario hasta estadios tempranos (2-4 células o mórulas; Cordova et al., 2017).

La heterogeneidad de ambos metaanálisis puede deberse a las diferencias en el diseño experimental y, principalmente, al empleo de especies diferentes de félidos salvajes como donantes de células somáticas en las distintas investigaciones. En el caso de metaanálisis con alta heterogeneidad se recomienda el empleo de un modelo de efectos aleatorios y de RR como estimador del tamaño del efecto, tal y como se ha aplicado en este TFG.

CONCLUSIONES

Considerando la revisión sistemática y los resultados de los metaanálisis podemos concluir que: la bibliografía sobre TNCSi en félidos sal-

vajes es muy escasa y los artículos existentes estudian especies muy distintas, lo que hace difícil la realización de metaanálisis; la división embrionaria hasta el estadio de 2-4 células es similar cuando se realiza TNCSi con células somáticas de félido salvaje y ovocito de gato doméstico que cuando se realiza intraespecie (TNCSg-g); y la formación de blastocisto es significativamente menor cuando la célula somática transferida al ovocito de gato es de otra especie de félido distinta, lo que supone una menor eficiencia de la TNCSi con respecto a la TNCSg-g.

BIBLIOGRAFÍA

1. Beyhan, Z., Iager, A. E., & Cibelli, J. B. (2007). Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell*, 1(5), 502–512.
2. 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.
3. Cordova, A., King, W. A., & Mastromonaco, G. F. (2017). Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species. *Journal of Animal Science and Technology*, 59, 24.
4. 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.
5. Galli, C., & Lazzari, G. (2021). Current applications of SCNT in advanced breeding and genome editing in livestock. *Reproduction*, 162(1), 23–32.
6. Goeritz, F., Painer, J., Jewgenow, K., Hermes, R., Rasmussen, K., Dehnhard, M., & Hildebrandt, T. (2012). Embryo retrieval after hormonal treatment to control ovarian function and non-surgical artificial insemination in African lions (*Panthera leo*). *Reproduction in domestic animals*, 47(6), 156–160.
7. Gómez, M. C., Biancardi, M. N., Jenkins, J. A., Dumas, C., Galiguis, J., Wang, G., & Earle Pope, C. (2012). Scriptaid and 5-aza-2'-deoxycytidine enhanced expression of pluripotent genes and *in vitro* developmental competence in interspecies black-footed cat cloned embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 130–135.
8. Gómez, M. C., Jenkins, J. A., Giraldo, A., Harris, R. F., King, A., Dresser, B. L., & Pope, C. E. (2003). Nuclear transfer of synchronized African wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biology of Reproduction*, 69(3), 1032–1041.
9. Gómez, M. C., Pope, C. E., & Dresser, B. L. (2006). Nuclear transfer in cats and its application. *Theriogenology*, 66(1), 72–81.
10. Gómez, M. C., Pope, C. E., Biancardi, M. N., Dumas, C., Galiguis, J., Morris, A. C., Wang, G., & Dresser, B. L. (2011). Trichostatin A modified histone covalent pattern and enhanced expression of pluripotent genes in interspecies black-footed cat cloned embryos but did not improve *in vitro* and *in vivo* viability. *Cell Reprogramming*, 13(4), 315–329.
11. Gómez, M. C., Pope, C. E., Giraldo, A., Lyons, L. A., Harris, R. F., King, A. L., Cole, A., Godke, R. A., & Dresser, B. L. (2004). Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and Stem Cells*, 6(3), 247–258.
12. Gómez, M. C., Pope, C. E., Kutner, R. H., Ricks, D. M., Lyons, L. A., Ruhe, M., Dumas, C., Lyons, J., López, M., Dresser, B. L., & Reiser, J. (2008). Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning and Stem Cells*, 10(4), 469–483.

13. Herrick, J. R., Campbell, M., Levens, G., Moore, T., Benson, K., D'Agostino, J., West, G., Okeson, D. M., Coke, R., Portacio, S. C., Leiske, K., Kreider, C., Polumbo, P. J., & Swanson, W. F. (2010). *In vitro* fertilization and sperm cryopreservation in the black-footed cat (*Felis nigripes*) and sand cat (*Felis margarita*). *Biology of reproduction*, 82(3), 552–562.
14. Higgins, J. P. T., Thomas, J., Chandler, J., Cumpston, M., Li, T., Page, M. J., & Welch, V. A. (2022). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 6.3 (Updated February 2022). Cochrane.
15. Hoffert, K. A., Anderson, G. B., Wildt, D. E., & Roth, T. L. (1997). Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos. *Molecular reproduction and development*, 48(2), 208–215.
16. Holt, W. V., Pickard, A. R., & Prather, R. S. (2004). Wildlife conservation and reproductive cloning. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(3), 317–324.
17. Howard, J. G., Lynch, C., Santymire, R. M., Marinari, P. E., & Wildt, D. E. (2016). Recovery of gene diversity using long-term cryopreserved spermatozoa and artificial insemination in the endangered black-footed ferret. *Animal Conservation*, 19(2), 102–111.
18. Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Sritattana, K., Parnpai, R., & Ketudat-Cairns, M. (2012). Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. *Cell Reprogramming*, 14(1), 79–87.
19. IUCN. (2022). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>.
20. Kitiyanant, Y., Saikhun, J., & Pavasuthipaisit, K. (2003). Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 59(8), 1775–1786.
21. Lee, H. S., Yu, X. F., Bang, J. I., Cho, S. J., Deb, G. K., Kim, B. W., & Kong, I. K. (2010). Enhanced histone acetylation in somatic cells induced by a histone deacetylase inhibitor improved inter-generic cloned leopard cat blastocysts. *Theriogenology*, 74(8), 1439–1449.
22. León-Quinto, T., Simón, M. A., Cadenas, R., Jones, J., Martínez-Hernández, F. J., Moreno, J. M., Vargas, A., Martínez, F., & Soria, B. (2009). Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation: The Iberian lynx bank as a model for other endangered species. *Animal Reproduction Science*, 112(3-4), 347–361.
23. Loi, P., Modlinski, J. A., & Ptak, G. (2011). Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. *Theriogenology*, 76(2), 217–228.
24. Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J. J. R., Cappai, P., & Clinton, M. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology*, 19, 962–964.
25. Mastromonaco, G. F., & King, W. A. (2007). Cloning in companion animal, non-domestic and endangered species: Can the technology become a practical reality? *Reproduction, Fertility and Development*, 19, 748–758
26. Memili, E., & First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote (Cambridge, England)*, 8(1), 87–96.
27. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., Altman, D., Antes, G., Atkins, D., Barbour, V., Barrowman, N., Berlin, J. A., Clark, J., Clarke, M., Cook, D., D'Amico, R., Deeks, J. J., Devereaux, P. J., Dickersin, K., Egger, M., Ernst, E., ... Tugwell, P. (2009). Preferred reporting items for sys-

- tematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*, 6(7).
28. Moro, L. N., Hiriart, M. I., Buemo, C., Jarazo, J., Sestelo, A., Veraguas, D., ... & Stover, J. (2015)a. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves *in vitro* development but not pluripotent gene expression. *Reproduction*, 150(1), 1-10.
 29. Moro, L. N., Jarazo, J., Buemo, C., Hiriart, M. I., Sestelo, A., & Salamone, D. F. (2015) b. Tiger, Bengal and Domestic Cat Embryos Produced by Homospecific and Interspecific Zona-Free Nuclear Transfer. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(5), 849–857.
 30. Moulavi, F., Hosseini, S. M., Tanhaie-Vash, N., Ostadhosseini, S., Hosseini, S. H., Hajinasrollah, M., Asghari MH, Gourabi H, Shahverdi A, Vosough AD., Nasr-Esfahani, M. H. (2017). Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from post-mortem frozen tissue in absence of cryo-protectant and *in vitro* matured domestic cat oocytes. *Theriogenology*, 90, 197-203.
 31. Mrowiec, A., Waleń, M., Łukaszuk, K., & Smorağ, Z. (2020). Mitochondrial DNA Replication Disorders and Cancer: Epigenetic Regulation of MUT-Related Genes in Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2524.
 32. Seaby, R. P., Alexander, B., King, W. A., & Mastro Monaco, G. F. (2013). *In vitro* development of bison embryos using interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reprod Domest Anim*, 48(6), 881–887.
 33. Shahverdi, M., Akbarinejad, V., Dalman, A., Hajinasrollah, M., Vodjgani, M., Tanhaei Vash, N., Nasr-Esfahani, M. H., & Eftekhari-Yazdi, P. (2022). Effect of Mechanical Micro-Vibrations on The Efficiency of Leopard Inter-Species Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell Journal*, 24(10), 612-619.
 34. Spindler, R. E., Crichton, E. G., Agca, Y., Loskutoff, N., Critser, J., Gardner, D. K., & Wildt, D. E. (2006). Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. *Theriogenology*, 66(1), 82–92.
 35. Takeda, K., Akagi, S., Kaneyama, K., Kojima, T., Takahashi, S., Imai, H., Yamanaka, M., Onishi, A., & Hanada, H. (2003). Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development*, 64(4), 429–437.
 36. Thongphakdee, A., Numchaisrika, P., Omsongkram, S., Chatdarong, K., Kamolnorranath, S., Dumnui, S., & Techakumphu, M. (2006). *In vitro* development of marbled cat embryos derived from interspecies somatic cell nuclear transfer. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(3), 219-226.
 37. Thongphakdee, A., Siriaronrat, B., Maneein, S., Klincumhom, N., Kamolnorranath, S., Chatdarong, K., & Techakumphu, M. (2010). Intergeneric somatic cell nucleus transfer in marbled cat and flat-headed cat. *Theriogenology*, 73(1), 120-128.
 38. Thongphakdee, A., Sukparangsi, W., Comizoli, P., & Chatdarong, K. (2020). Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. *Theriogenology*, 150, 360-373.
 39. Trounson A. (2001). Nuclear transfer in human medicine and animal breeding. *Reproduction, fertility, and development*, 13(1), 31–39.
 40. Veraguas, D., Aguilera, C., Echeverry, D., Saez-Ruiz, D., Castro, F. O., & Rodriguez-Alvarez, L. (2020). Embryo aggregation allows the production of kodkod (*Leopardus guigna*) blastocysts after interspecific SCNT. *Theriogenology*, 158, 148-157.
 41. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810-813.
 42. Yamochi, T., Kida, Y., Oh, N., Ohta, S., Amano, T., Anzai, M., ... & Niwa, K. (2013).

- Development of interspecies cloned embryos reconstructed with rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) oocytes and cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fibroblast cell nuclei. *Zygote*, 21(4), 358–366.
43. Yin, X. J., Lee, Y., Lee, H., Kim, N., Kim, L., Shin, H., & Kong, I. (2006)a. *In vitro* production and initiation of pregnancies in inter-genus nuclear transfer embryos derived from leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) nuclei fused with domestic cat (*Felis silvestris catus*) enucleated oocytes. *Theriogenology*, 66(2), 275-282.
44. Yin, X. J., Lee, Y. H., Jin, J. Y., Kim, N. H., & Kong, I. K. (2006)b. Nuclear and microtubule remodeling and *in vitro* development of nuclear transferred cat oocytes with skin fibroblasts of the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and leopard cat (*Prionailurus bengalensis*). *Animal Reproduction Science*, 95(3-4), 307-315.
45. Zuo, Y., Su, G., Cheng, L., Liu, K., Feng, Y., Wei, Z., Bai, C., Cao, G., & Li, G. (2017). Coexpression analysis identifies nuclear reprogramming barriers of somatic cell nuclear transfer embryos. *Oncotarget*, 8(39), 65847–65859.