

IVENS ORTIGARI JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS PELA
CLONAGEM MANUAL (*Handmade Cloning*) COM DISTINTOS
VOLUMES CITOPLASMÁTICOS**

LAGES – SC

2008

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL E ALIMENTOS

IVENS ORTIGARI JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS PELA
CLONAGEM MANUAL (*Handmade Cloning*) COM DISTINTOS
VOLUMES CITOPLASMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Marcelo Bertolini

LAGES – SC

2008

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Ortigari Junior, Ivens

Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos pela
clonagem manual (*Handmade Cloning*) com distintos volumes
citoplasmáticos. / Ivens Ortigari Junior – Lages, 2008.

59 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1. Clonagem. 2. Partenogênese (Animais). 3. Bovino - Embrião.
I. Título.

CDD – 636.089264

IVENS ORTIGARI JUNIOR

**Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos pela Clonagem Manual
(*Handmade Cloning*) com distintos volumes citoplasmáticos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Banca Examinadora:

Professor Dr. Marcelo Bertolini, Orientador
CAV/UDESC

Professor Dr. Alceu Mezzalira
CAV/UDESC

Professor Dr. José Luiz Rodrigues
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Professor Dr. Rui Fernando Félix Lopes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lages, SC, 26 de maio de 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, por ter-me concedido a vida.

Aos professores e amigos Alceu Mezzalira e Arnaldo Diniz Vieira, e de forma especial, ao grande mestre Marcelo Bertolini, pelo apoio, compreensão e ensinamentos recebidos.

A todo o grupo de alunos integrantes do Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem, em especial ao Eduardo Ribeiro, Lain Ohlweiler e Joana Claudia Mezzalira, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao grande amigo Renato Gerger, pela ajuda em todos os momentos deste trabalho.

A meu pai que tornou possível a realização deste esforço acadêmico, incentivando-me e não medindo esforços para que ele se concretizasse.

E de forma muito especial, a minha esposa e filho, pelo apoio e compreensão devido durante os momentos em que estive ausente.

Dedico este trabalho a meus dois amores: minha querida esposa e meu amado filho. Também a meus pais, meus incentivadores. E para aqueles que acreditam na ciência, e que fazem uso dela no seu dia-a-dia, trabalhando por um amanhã melhor.

BIOGRAFIA DO AUTOR

IVENS ORTIGARI JR. é natural de Curitiba, SC, nascido em 10/12/1966, graduado em Medicina Veterinária em 04/1992 pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), com Especialização em Reprodução de Bovinos pela Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), em 2005. Atualmente, atua como Médico Veterinário autônomo na área de Reprodução em Bovinos, Ovinos e Equínos, também sendo proprietário e responsável técnico da empresa Santa Rita Central de Embriões Ltda., em Itajaí, SC. É aluno do Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias nesta Universidade no período de 2006 a 2008.

RESUMO

A clonagem animal tem sido associada a anormalidades de desenvolvimento, com o nível de heteroplasma causados pela técnica *per se* sendo um dos potenciais fatores determinantes do aparecimento dos problemas. A agregação embrionária pode ser uma alternativa para minimizar tais efeitos causados pela clonagem. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da heteroplasma pela fusão de hemi-citoplastos ou da agregação de hemi-embriões, variando-se o volume citoplasmático final, no desenvolvimento e na densidade celular de embriões produzidos por *handmade cloning* (HMC), partenogênese ou fecundação *in vitro* (FIV). Oócitos bovinos maturados *in vitro*, selecionados pela presença do corpúsculo polar, foram bisseccionados manualmente, seguidos da seleção de hemi-citoplastos por fluorescência. Um ou dois hemi-citoplastos enucleados foram pareados e fusionados a uma célula somática cutânea. Embriões e hemi-embriões de clonagem e de partenogênese (sem zona pelúcida) foram ativados e cultivados *in vitro* em micropoços (sistema WOW), sendo alocados para um de seis grupos experimentais, baseado no volume de citoplasma utilizado para a reconstrução embrionária pela fusão de hemi-citoplastos ou agregação de hemi-embriões e embriões, por micropoço (WOW), conforme a seguir: um único hemi-embrião de clonagem ou de partenogênese (G1: 1 x 50%); agregação de dois (G2: 2 x 50%), três (G3: 3 x 50%) ou quatro (G4: 4 x 50%) hemi-embriões de clonagem ou de partenogênese; um único embrião de clonagem ou de partenogênese (G5: 1 x 100%); ou agregação de dois embriões de clonagem ou de partenogênese (G6: 2 x 100%). Embriões intactos oriundos de FIV ou de partenogênese (G7: Zona intacta, 100%), utilizados como controle, foram cultivados *in vitro* em placas de 4 poços. Os resultados foram analisados pelos testes do χ^2 , ANOVA, correlação de Pearson ou regressão linear, para $P < 0.05$. Em termos gerais, os resultados indicaram que o aumento no número de estruturas agregadas em cada micropoço foi seguido por um aumento linear nas taxas de clivagem, de blastocisto e na densidade celular. Mesmo que tais observações tenham sido mais pronunciadas nos partenotos, a densidade celular e a qualidade embrionária foram superiores em embriões clonados. O aumento no volume citoplasmático por fusão ou agregação apresentou um efeito positivo no desenvolvimento embrionário, dando suporte ao estabelecimento de prenhez após a transferência para fêmeas receptoras. No entanto, a utilização de apenas metade do volume normal não afetou o potencial de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, mas reduziu o número de células. Em conclusão, apesar de haver um aumento no desenvolvimento e densidade celular em embriões por micropoço, a agregação embrionária não melhorou a taxa de blastocistos ou o número de células, com base no número de hemi-citoplastos utilizados por embrião.

Palavras-chave: *handmade cloning*, partenogênese, agregação embrionária, bovinos, heteroplasma

ABSTRACT

Animal cloning has been associated with developmental abnormalities, with the level of heteroplasmy caused by the procedure per se being one of the potential determining factors for the appearance of the problems. Embryo aggregation may be an alternative to minimize such effects during cloning. The aim of this study was to determine the effect of the heteroplasmy caused by fusion of hemi-cytoplasts or by aggregation of hemi-embryos, varying the final cytoplasmic volume, on development and cell density of embryos produced by handmade cloning (HMC), parthenogenesis or in vitro fertilization (IVF). In vitro-matured bovine oocytes, selected by the presence of a polar body, were manually bisected, followed by fluorescence screening of hemi-cytoplasts. One or two enucleated hemi-cytoplasts were paired and fused with one skin somatic cell. Activated clone and zona-free parthenote embryos and hemi-embryos were in vitro-cultured in microwells (WOW system), being allocated to one of six experimental groups, based on the volume of cytoplasm used for embryo reconstruction either by fusion of hemi-cytoplasts or by aggregation of hemi-embryos or embryo, on a per WOW basis, as follows: single clone or parthenote hemi-embryos (G1: 1 x 50%); aggregation of two (G2: 2 x 50%), three (G3: 3 x 50%) or four (G4: 4 x 50%) clone or parthenote hemi-embryos; single clone or parthenote embryos (G5: 1 x 100%); or aggregation of two clone or parthenote embryos (G6: 2 x 100%). Zona-intact parthenote or IVF embryos (G7: Zona-intact, 100%), used as controls, were in vitro-cultured in 4-well dishes. Data were analyzed by χ^2 , ANOVA, Pearson's correlation or linear regression, for $P < 0.05$. In general, results indicated that the increase in the number of aggregated structures within each WOW was followed by a linear increase in cleavage, blastocyst rate and cell density. Even though those observations were more pronounced in parthenotes, cell density and embryo quality were superior in clone embryos. The increase in cytoplasmic volume, either by fusion or by aggregation, had a positive effect on embryo development, supporting the establishment of pregnancies after transfer to female recipients. Nevertheless, the use of only half of the normal volume did not affect the developmental potential to the blastocyst stage, but reduced cell number. In conclusion, despite the increase in embryo development and cell density per WOW, embryo aggregation did not improve blastocyst yield or cell number, on a hemi-cytoplast basis.

Keywords: handmade cloning, parthenogenesis, embryo aggregation, cattle, heteroplasmy

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabela 1. Nascimento de animais clonados por transferência nuclear de células somáticas a partir da ovelha Dolly, em ordem cronológica..... | 6 |
| Table 1. <i>Cleavage and blastocyst rates for clone and parthenote embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes.....</i> | 35 |
| Table 2. <i>Total cell number (LSM ± SEM), by treatment group and by morphological quality, for clone and parthenote embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct ooplasmic volumes.....</i> | 38 |
| Table 3. <i>Pregnancy rate and losses after transfer of one or two Day-7 clone embryos and contemporaneous control embryos to synchronous female recipients.....</i> | 40 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figure 1. <i>Cleavage (a) and blastocyst (b) rates for embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes.....</i> | 36 |
| Figure 2. <i>Total cell number by morphological quality (a) and by treatment group (b) for clone and parthenote embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct ooplasmic volumes.....</i> | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| AC | Corrente Alternada (<i>Alternate Current</i>) |
| ANOVA | Análise de Variância |
| BL | Blastocisto |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| CIV (IVC) | Cultivo <i>in vitro</i> (<i>in vitro culture</i>) |
| CGP | Células germinativas primordiais |
| COC | Complexos <i>cumulus</i> -oócito (<i>cumulus-oocyte complexes</i>) |
| CSF | Fator citostático (<i>Cytostatic Factor</i>) |
| CTE | Células-tronco embrionárias |
| DC | Corrente Contínua (<i>Direct Current</i>) |
| FCS | Soro fetal bovino (<i>fetal calf serum</i>) |
| FIV (IVF) | Fecundação <i>in vitro</i> (<i>in vitro fertilization</i>) |
| GO | Oviduto de vidro (<i>Glass Oviduct</i>) |
| HMC | <i>Handmade Cloning</i> |
| HM | Hepes-buffered M-199 + 10% FCS |
| HP | Hepes-buffered M-199 + 0.01% PVA |
| ICM | Massa celular interna (<i>inner cell mass</i>) |
| LOS | <i>Large Offspring Syndrome</i> |
| MII | Metáfase II |
| MIV (IVM) | Maturação <i>in vitro</i> (<i>in vitro maturation</i>) |
| MPF | <i>Maturation/Mitosis Promoting Factor</i> |

| | |
|-------------|---|
| mRNA | RNA mensageiro |
| mSOFaa | <i>modified Synthetic Oviductal Fluid medium supplemented with amino acids</i> |
| mtDNA | DNA mitocondrial |
| p. ex. | por exemplo |
| PIV (IVP) | Produção <i>in vitro</i> (<i>in vitro production</i>) |
| 6-DMAP | 6-Dimetilaminopurina |
| TN (NT) | Transferência Nuclear (nuclear transfer) |
| TNCS (SCNT) | Transferência Nuclear de Células Somáticas (<i>somatic cell nuclear transfer</i>) |
| WOW | <i>Well-of-the-Well</i> |
| ZP | Zona Pelúcida |

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1 Aspectos históricos da clonagem animal..... | 4 |
| 2.2 Problemas pré- e pós-natais causados pela clonagem animal por TNCS..... | 8 |
| 2.3 Etapas fundamentais na clonagem por TNCS em mamíferos domésticos e relação com anormalidades de desenvolvimento..... | 11 |
| 2.3.1 Fonte de citoplasma..... | 13 |
| 2.3.2 Célula doadora de núcleo..... | 15 |
| 2.3.3 Reconstrução embrionária por transferência nuclear..... | 19 |
| 2.3.4 Fusão de membranas para a reconstrução embrionária..... | 20 |
| 2.3.5 Ativação..... | 21 |
| 2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões sem zona pelúcida..... | 23 |
| 2.5 Considerações finais sobre a clonagem bovina por TNCS..... | 26 |
| 3 CAPÍTULO ÚNICO: <i>Developmental potential of bovine handmade clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volume</i> | 28 |
| 3.1 <i>Introduction</i> | 28 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2 | <i>Materials and Methods</i> | 30 |
| 3.2.1 | <i>Generation of primary somatic cell cultures</i> | 30 |
| 3.2.2 | <i>Bovine embryo production</i> | 30 |
| 3.2.2.1 | <i>In vitro maturation (IVM)</i> | 31 |
| 3.2.2.2 | <i>In vitro fertilization (IVF)</i> | 31 |
| 3.2.2.3 | <i>Nuclear transfer (SCNT-derived) and parthenote embryos</i> | 31 |
| 3.2.2.4 | <i>In vitro culture (IVC) conditions</i> | 32 |
| 3.2.3 | <i>Experimental groups</i> | 32 |
| 3.2.4 | <i>Cell density</i> | 33 |
| 3.2.5 | <i>In vivo development</i> | 33 |
| 3.2.6 | <i>Data analyses</i> | 34 |
| 3.3 | <i>Results</i> | 34 |
| 3.4 | <i>Discussion</i> | 41 |
| 3.5 | <i>References</i> | 45 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 48 |
| 5 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 49 |

1 INTRODUÇÃO

O nascimento da ovelha Dolly (WILMUT *et al.*, 1997), o primeiro mamífero produzido a partir da Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS), representou a quebra do paradigma biológico de que uma célula diferenciada de origem somática não poderia ser reprogramada a um estado de totipotência que permitisse a geração de um novo indivíduo. A partir deste acontecimento científico e histórico, a clonagem por TNCS despertou grande interesse na comunidade científica devido a sua importância na possibilidade de multiplicação de animais de interesse zootécnico, na preservação de espécies em risco de extinção e na produção de animais transgênicos, através da clonagem reprodutiva. A clonagem por TNCS também tem sido de relevância no fornecimento de base técnica para estudos em células-tronco, terapia celular e medicina regenerativa, abrindo a possibilidade para a chamada ‘clonagem terapêutica’. Além disto, a possibilidade de sua utilização para estudos e aplicações em áreas da biologia, medicina e veterinária tem propiciado um avanço científico considerável em nosso conhecimento em aspectos da embriologia, biologia molecular, celular e do desenvolvimento, e mesmo em estudos fisiológicos, comportamentais e clínicos nas fases pré- e pós-natais, com impacto na saúde e bem estar animal.

Apesar do intenso interesse científico mundial e da existência de incontáveis trabalhos em clonagem animal por TNCS, a eficiência da tecnologia ainda permanece muito baixa, estando associada a elevadas taxas de perdas embrionárias e fetais, anormalidades de desenvolvimento e alta morbidade e mortalidade pós-natal, todas provavelmente causadas pela reprogramação inadequada do genoma doador.

O oócito receptor executa papel fundamental na reprogramação do núcleo doador após a TNCS, com a relação núcleo doador/citoplasma receptor e a heteroplasmia causada pela

fusão de oócitos durante a clonagem apresentando efeitos imprevisíveis no desenvolvimento embrionário subsequente. Neste contexto, vários processos inerentes à técnica de clonagem *per se* podem afetar esta relação. Invariavelmente, ocorre perda de parte do ooplasma durante a etapa de enucleação oocitária, que pode ser reconstituído ou não pela etapa de fusão, entre oócitos enucleados e a célula doadora de núcleo. Em seu final, pode haver aumento ou perda de volume citoplasmático, com efeitos ainda pouco caracterizados sobre a capacidade de desenvolvimento posterior. Uma alternativa sobre a fusão de estruturas é a agregação embrionária, a qual normalmente determina maiores taxas de desenvolvimento embrionário. Em estudos prévios, a agregação embrionária em bovinos e murinos melhorou a competência de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto, com um aumento no número total de células, com tais melhoras se repercutindo, em murinos, também em um aumento no desenvolvimento fetal e sobrevivência pós-natal (PEURA *et al.*, 1998; BOIANI *et al.*, 2003; OBACK & WELLS, 2003; TECIRLIOGLU *et al.*, 2005). Porém, estudos sistemáticos comparando o efeito da fusão ou agregação de estruturas com distintos volumes citoplasmáticos no potencial de desenvolvimento embrionário posterior ainda não foram relatados.

A clonagem por TNCS pela técnica manual, sem uso de micromanipuladores, denominada *handmade cloning* (HMC), associada ao sistema de cultivo de embriões sem zona pelúcida (ZP), denominado *Well-of-the-Well*, ou WOW (VAJTA *et al.*, 2000, 2001, 2003), são as ferramentas ideais para a avaliação do efeito da fusão de oócitos ou da agregação de embriões sobre o desenvolvimento embrionário e a reprogramação do genoma (PEDERSEN *et al.*, 2005). A técnica de enucleação e reconstrução embrionária permitida pela clonagem por HMC e pelo sistema de cultivo WOW parece ser o caminho para a universalização do acesso à técnica de clonagem a todos os pesquisadores, laboratórios e institutos de pesquisa, incluindo aqueles com menor disponibilidade de recursos para

aquisição de equipamentos. Como tais técnicas não apresentam a necessidade de mão-de-obra altamente capacitada pelo treinamento em micromanipulação, a variação com relação aos aspectos técnicos e treinamento é minimizada, permitindo uma melhor repetibilidade e comparação de resultados entre laboratórios. Porém, a influência do maior grau de heteroplasma pela técnica de HMC ou da agregação embrionária no desenvolvimento subsequente, causado pela fusão de diferentes citoplastos (estruturas enucleadas receptoras de núcleo), ainda permanece indefinida. Por conseguinte, comparou-se neste estudo o efeito da reconstituição embrionária com distintos volumes ooplasmáticos finais pela fusão de hemioócitos ou pela agregação de hemi-embriões ou embriões no desenvolvimento embrionário *in vitro* subsequente, como também taxa de fusão, clivagem e número total de células em blastocisto e o potencial de desenvolvimento *in vivo* pela transferência para receptoras síncronas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos da clonagem animal

O cientista Hans Spemann, para muitos, é considerado o pai da clonagem animal e um expoente maior na embriologia experimental, pela execução de estudos que visavam a compreensão dos eventos de diferenciação e totipotencialidade celular (TAGARELI *et al.*, 2004). Foram os seus experimentos em clonagem em anfíbios, por bipartição embrionária em 1902, e por transferência nuclear (TN) em 1924, que o fizeram merecedor do Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina de 1935. Os avanços em seus estudos, que envolviam instrumentação simples e metodologia objetiva, fizeram-no propor, mais tarde, já em 1938, o que ele denominaria de ‘Experimento Fantástico’. Naquele ensaio, Hans Spemann lança as bases da clonagem animal por TN, descrevendo conceitos e idéias básicas que, sob o ponto de vista técnico e teórico, fundamentaram os sucessos subseqüentes nesta atividade, ainda em utilização nos dias de hoje.

Os primeiros experimentos de relativo sucesso em TN em anfíbios foram realizados por Briggs & King (1952) com o objetivo de avaliar a capacidade de desenvolvimento do núcleo de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, ou seja, uma seqüência das idéias de Spemann. Os autores utilizaram células embrionárias no estágio de blástula, obtendo clones com desenvolvimento até a forma larval. Posteriormente, várias outras tentativas de clonagem animal por TN foram realizadas por diferentes grupos, incluindo os contestados estudos de John Gurdon em 1962, pela clonagem de anuro até a forma adulta utilizando-se de células somáticas intestinais oriundas de formas larvais, os trabalhos de Tong Dizhou em 1963, na China, pela clonagem da carpa doméstica a partir de células somáticas de adulto, e de Illmensee e Hoppe, em 1981, pela clonagem de murinos a partir de células da massa

celular interna (ICM) de embriões no estágio de blastocisto (FOOTE, 2002; WAKAMATSU & OZATO, 2002). Porém, o sucesso incontestável da clonagem animal por TN, que somente é alcançada pelo nascimento de indivíduos vivos, foi alcançado em mamíferos (ovinos) por Willadsen (1986) com células embrionárias em estágio de pré-implantação (blastômeros). Tal sucesso com blastômeros, células com características de toti- ou multipotencialidade, também foi subsequente alcançado em outras espécies mamíferas, em especial a bovina.

Com o nascimento da ovelha Dolly, produzida a partir de células da glândula mamária de uma ovelha adulta, pela TNCS, Ian Wilmut, Keith Campbell e colaboradores (WILMUT *et al.*, 1997) derrubaram um dos dogmas mais rígidos da biologia moderna, ou seja, que células somáticas diferenciadas não poderiam ser reprogramadas a ponto de gerar um indivíduo viável. Este marco histórico abriu inúmeras possibilidades biológicas, pois provou-se, então, que células somáticas, quando em condições específicas, podem apresentar mudanças induzidas na estrutura de sua cromatina, permitindo a dediferenciação celular, no processo denominado de reprogramação epigenética ou genômica. Este acontecimento, para muitos cientistas e historiadores, talvez seja tão ou mais importante do que a chegada do homem à lua, considerando-se os avanços e as potencialidades que se abriram quanto à execução de estudos científicos fundamentais envolvendo diferenciação e totipotencialidade celular, estrutura e função da cromatina, reprogramação epigenética, controle do desenvolvimento, transgênese, entre tantos assuntos diretamente ligados à vida.

O sucesso da clonagem animal por TNCS em ovinos propiciou um renascimento do interesse científico pela TN, com a realização de trabalhos que resultaram na clonagem de outras espécies a partir de células somáticas de distintos tipos e origens (Tabela 1).

Tabela 1. Nascimento de animais clonados por transferência nuclear de células somáticas a partir da ovelha Dolly, em ordem cronológica

| Espécie | Tipo e origem celular | Referência |
|---------------------------|---|--------------------------------|
| Ovinos | Células da glândula mamária de adulto, fibroblastos fetais, ICM | Wilmut <i>et al.</i> , 1997 |
| Bovinos | Células de oviduto e do cumulus de adulto | Kato <i>et al.</i> , 1998 |
| Camundongo | Células do cumulus de adulto | Wakayama <i>et al.</i> , 1998 |
| Caprinos | Fibroblastos fetais | Baguisi <i>et al.</i> , 1999 |
| Suínos | Células da granulosa de adulto | Polejaeva <i>et al.</i> , 2000 |
| Gaur | Fibroblastos cutâneos de adulto | Lanza <i>et al.</i> , 2000 |
| Mouflon | Células da granulosa de adulto | Loi <i>et al.</i> , 2001 |
| Gato doméstico | Células do cumulus de adulto | Shin <i>et al.</i> , 2002 |
| Coelho | Células do cumulus de adulto | Chesné <i>et al.</i> , 2002 |
| Banteng | Fibroblastos cutâneos de adulto | Anúncio na mídia, 2003a |
| Cervo da cauda branca | Fibroblastos cutâneos de adulto | Anúncio na mídia, 2003b |
| Mula | Fibroblastos fetais | Woods <i>et al.</i> , 2003 |
| Equínos | Fibroblastos cutâneos de adulto | Galli <i>et al.</i> , 2003a |
| Rato | Fibroblastos fetais | Zhou <i>et al.</i> , 2003 |
| Zebrafish | Fibroblastos embrionários | Ju <i>et al.</i> , 2004 |
| Gato selvagem | Fibroblastos cutâneos de adulto | Gómez <i>et al.</i> , 2004 |
| Cão doméstico | Fibroblastos cutâneos de adulto | Lee <i>et al.</i> , 2005 |
| Carpa comum/peixe dourado | Células blastodermis da carpa comum adulta | Sun <i>et al.</i> , 2005 |
| Furão | Fibroblastos fetais, células do cumulus de adulto | Li <i>et al.</i> , 2006 |
| Lobo | Fibroblastos cutâneos de adulto | Kim <i>et al.</i> , 2007 |

Fonte: adaptado de BERTOLINI *et al.*, 2007.

A possibilidade de resgate de animais em risco de extinção, pela clonagem inter-espécies, é outro exemplo da aplicação formidável oferecida pela TNCS. Tal possibilidade foi confirmada por Lanza *et al.* (2000) em bovídeos, através da utilização de oócitos de bovinos (*Bos taurus*) como fontes de citoplasma fusionados a fibroblastos cutâneos coletados *post mortem* de um macho adulto Gaur (*Bos gaurus*), e por Loi *et al.* (2001) em ovídeos, com oócitos da ovelha doméstica (*Ovis aries*) e células da granulosa de ovários coletados entre 18 e 24 h *post mortem* de duas fêmeas Mouflon adultas (*Ovis orientalis musimon*). Ambos experimentos resultaram no nascimento dos primeiros clones mamíferos inter-espécies. Estudos nesta área têm trazido importantes contribuições para o conhecimento dos eventos de reprogramação e heteroplasmia após a clonagem animal por TNCS. Por exemplo, apesar de os animais gerados acima terem sido da espécie doadora de núcleo, comprovado pela análise citogenética, o DNA mitocondrial (mtDNA) foi detectado como sendo das espécies doadoras de citoplasma, o que demonstra o grau de conservação do mtDNA, em termos evolutivos e funcionais, visto que fenotipicamente os descendentes tinham características estritamente de Mouflon e Gaur. Porém, esta heteroplasmia ainda deve ser avaliada quanto ao desenvolvimento futuro de animais produzidos nestas condições.

Como a eficiência do processo de clonagem animal ainda é baixa, com o nascimento de descendentes saudáveis sendo imprevisível (LOI *et al.*, 2006), a pesquisa com enfoque na melhoria dos resultados obtidos com a clonagem tem sido contínua e intensa. Muitos mecanismos envolvidos no processo precisam ainda ser melhor compreendidos, pois alterações pré- e pós-natais têm se mostrado de grande importância no que diz respeito ao bem estar animal e a questões econômicas (BERTOLINI *et al.*, 2007), limitando o interesse da indústria com relação à aplicação mais intensa desta tecnologia.

O Brasil também faz parte integrante no reduzido rol de países no mundo que dominam a tecnologia da clonagem por TNCS, com o nascimento de bovinos viáveis

produzidos por diversas Instituições, incluindo os grupos de Garcia (UNESP, Jaboticabal, SP) em 2002, Visintin (FMVZ/USP, São Paulo, SP) em 2003, Rumpf (Embrapa-Cenargen, Brasília, DF) em 2003, Meirelles (FZEA/USP, Pirassununga, SP) em 2004, Cyagra Brasil (Mogi Mirim, SP) em 2006, Ohashi (UFPA, Belém, PA) em 2006, e, Rodrigues (FAVET/UFRGS, Porto Alegre, RS) em 2007 (Meirelles, 2007; Rodrigues, 2007; comunicações pessoais).

2.2 Problemas pré- e pós-natais causados pela clonagem animal por TNCS

A produção *in vitro* de embriões (PIV) tanto por clonagem por TNCS quanto por fecundação *in vitro* (FIV), está associada a altas perdas de gestação e à ocorrência de anormalidades placentárias que levam a alterações do crescimento embrionário e fetal, hidropsia dos envoltórios fetais, aborto, gestação prolongada com ausência de sinais de parto, distocia e nascimento de bezerros gigantes, com dificuldade de sobrevivência extra-uterina (BEHBOODI *et al.*, 1995; WALKER *et al.*, 1996; WILSON *et al.*, 1995; RENARD *et al.*, 1999; HILL *et al.*, 1999, 2000; KATO *et al.*, 2000; WELLS *et al.*, 2004; PEDERSEN *et al.*, 2005). A coletânea destes distúrbios é comumente denominada de ‘Síndrome do Bezerro Absolutamente Grande’, ou *Large Offspring Syndrome* (LOS). Devido à variação nas causas, com o peso ao nascer nem sempre estando exacerbado, e à quase unanimidade de aceitação do envolvimento da placenta no aparecimento dos distúrbios, alguns autores têm sugerido a mudança da designação de ‘LOS’ para ‘Síndrome da Clonagem’ (WELLS *et al.*, 2004), ‘Síndrome do Bezerro Anormal’, em bovinos (FARIN *et al.*, 2006), ou mesmo ‘Síndrome da Placenta Grande/Anormal’ (CONSTANT *et al.*, 2006).

Em bovinos, as taxas de prenhez aos 30 dias de gestação de embriões oriundos de FIV e de TNCS são normalmente menores do que de embriões produzidos *in vivo* por superovulação ou inseminação artificial, mas comparáveis entre si, situando-se entre 30-50%.

Entretanto, as perdas gestacionais observadas entre os dias 30 e 60 de gestação são significativamente maiores na FIV e TNCS, variando de 15 a 60% para a FIV, e entre 40 e 100% para a TNCS (WELLS *et al.*, 1999; HILL *et al.*, 2000; BERTOLINI & ANDERSON, 2002; HEYMAN *et al.*, 2002; BATCHELDER *et al.*, 2005, 2007ab). Não obstante, os mecanismos fisiológicos ou moleculares deste fenômeno, definido em estádios embrionários iniciais e manifestados durante e imediatamente após a gestação, ainda permanecem desconhecidos (BERTOLINI *et al.*, 2007).

A grande maioria de conceptos de origem de PIV, em especial os oriundos de clonagem, apresenta crescimento retardado durante a fase embrionária e fetal inicial. Este processo parece estar associado a perdas gestacionais por insuficiência placentária. Porém, os que sobrevivem igualam-se aos fetos normais, em tamanho, já no final do primeiro trimestre de gestação (BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2004). A placenta de prenhez de clones normalmente apresenta baixa vascularização, cotilédones com menor diâmetro e espessura, interconexões frágeis com as carúnculas, além do desenvolvimento rudimentar corio-alantóico, sendo estas algumas prováveis causas do atraso no crescimento inicial e/ou altas perdas gestacionais nesta fase (HILL *et al.*, 1999, 2000; BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2004; FARIN *et al.*, 2006; LOI *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2007).

No segundo e terceiro trimestres de prenhez, as perdas gestacionais estão muitas vezes associadas à hidropsia dos envoltórios fetais, com alta ocorrência de hidroalantóide (HEYMAN *et al.*, 2002; CONSTANT *et al.*, 2006; HALL *et al.*, 2006). Em rebanhos bovinos, a ocorrência de hidropsia é menor do que 1% em gestações normais e menor que 2% em prenhez de FIV, mas pode passar de 60% em clones de TNCS (LI *et al.*, 2005; FARIN *et al.*, 2006), evidenciando falhas epigenéticas e funcionais em conceptos clonados. Outros sintomas menos caracterizados das anormalidades atingem a fase final da prenhez e compreendem: prolongamento da gestação; menor preparação fisiológica da fêmea para o

parto; comprometimento da mamogênese pré-parto que parece afetar a lactogênese no pós-parto (BERTOLINI *et al.*, 2007). Porém, os mecanismos causais destas alterações permanecem ainda desconhecidos.

Um número pequeno de embriões clonados chegam a termo após a transferência para fêmeas receptoras, com a taxa de nascimento para clones de TNCS situando-se em torno de 6% (OBACK & WELLS, 2003). A sobrevivência neonatal encontra-se entre 40% e 80%, com animais nascidos freqüentemente necessitando atendimento clínico intensivo após o parto (HILL & CHAVATTE-PALMER, 2002). Animais clonados podem apresentar, ao final da gestação, dilatação do cordão umbilical, aumento de peso e tamanho corporal, bem como de diversos órgãos viscerais. Estas alterações, por sua vez, podem estar associadas a mudanças no metabolismo pelo maior fluxo sanguíneo causado pelo tamanho aumentado dos placentônios e do cordão umbilical (WELLS *et al.*, 1999; PEDERSEN *et al.*, 2005; CONSTANT *et al.*, 2006; BATCHELDER *et al.*, 2005, 2007ab).

O acompanhamento de bezerros clonados até a fase adulta evidenciou taxas de mortalidade de 33% do parto ao desmame, e mais de 8% do desmame aos 4 anos de idade, com uma taxa de desmame aos 3 meses de 60% (WELLS *et al.*, 2004). Apesar dos problemas pós-parto iniciais, bezerros clonados tendem a normalizar, mas ainda há uma maior morbidade e mortalidade durante o período juvenil (RUDENKO *et al.*, 2004), normalmente associadas a anormalidades do sistema músculo-esquelético. Geralmente, os clones apresentam problemas de adaptação à vida extra-uterina, com a manifestação de vários problemas clínicos e patologias, tais como dificuldade respiratória, esteatose hepática, desenvolvimento renal anormal, hipotermia, morte súbita, entre outros (WELLS *et al.*, 1999; PEDERSEN *et al.*, 2005; BERTOLINI *et al.*, 2007). Há evidências também de imunodeficiência, demonstrada pela maior susceptibilidade a infecções, principalmente de ordem entérica, umbilical e respiratória, a exemplo de camundongos que apresentam aplasia

do timo com baixos níveis de imunidade ativa (WELLS *et al.*, 2004). Como a longevidade em bovinos pode passar de 20 anos de idade, e como os primeiros bovinos clonados por TNCS foram produzidos há apenas uma década, não pode-se afirmar ainda o quão alterada será a sobrevivência de clones bovinos até a idade adulta. Porém, animais sobreviventes parecem normais, sendo férteis e gerando descendentes normais.

2.3 Etapas fundamentais na clonagem por TNCS em mamíferos domésticos e relação com anormalidades de desenvolvimento

As anormalidades após a clonagem parecem estar associadas a alterações não genéticas, visto que nem todos os descendentes apresentam sintomas, com o crescimento acelerado não permanecendo após o nascimento (YOUNG *et al.*, 1998). Sabe-se que certas condições de cultivo *in vitro* de embriões e a falha de reprogramação epigenética inerente à técnica de TN estão diretamente relacionados ao aparecimento de anormalidades (DEAN *et al.*, 1998; WRENZYCKI *et al.*, 1998, 1999; BOURC'HIS *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2001; BERTOLINI *et al.*, 2002b; XUE *et al.*, 2002). A expressão de genes com caráter de *imprinting*, ou seja, aqueles que são expressos somente em um dos alelos parentais, e não de maneira aleatória, parecem ser mais susceptíveis a alterações epigenéticas pela PIV de embriões (MOORE, 2001). Levando-se em consideração a teoria evolutiva correlacionando o *imprinting* genômico à placentação (HAIG & GRAHAM, 1991), alterações na expressão de genes com caráter de *imprinting* refletir-se-ão em desvios de desenvolvimento ou função placentárias (BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2004, 2006). Palmieri *et al.* (2007) sugerem ainda que os genes que regulam o desenvolvimento e função da placenta são provavelmente menos 'reprogramáveis' que em outros tecidos, sendo mais susceptíveis a falhas temporais e espaciais de expressão gênica ao longo do desenvolvimento. Como a placenta representa a interface entre o sistema materno e fetal, distúrbios em sua formação poderão causar

alterações morfológicas e/ou funcionais que culminariam com o aparecimento de anormalidades pré- e pós-natais (BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2004, 2007).

Devido à natureza não-somática (extra-corporal) da placenta, com presença de células altamente especializadas, os genes placenta-específicos podem estar fortemente reprimidos em células somáticas, dificultando a reprogramação adequada (LOI *et al.*, 2006). Humpherys *et al.* (2002) analisaram, pela técnica de *microarray*, o padrão de expressão gênica global de amostras de fígado e placentas de neonatos murinos normais e de derivados de TNCS. Aproximadamente 4% dos genes analisados, de um total de 10 mil sequências, apresentaram um padrão de expressão diferenciado no tecido placentário dos clones, com diferenças menos pronunciadas no tecido hepático, com a maioria dos genes expressos apresentando perfis distintos entre estes tecidos. Os autores concluíram que o padrão anormal de expressão gênica estava relacionado a alterações fenotípicas, aos procedimentos de clonagem por TNCS *per se* e a aspectos inerentes à célula doadora. Portanto, as falhas de desenvolvimento de embriões, conceptos e prenhez oriundos da clonagem estão possivelmente associadas à reprogramação incompleta do genoma doador durante e após a TNCS. O sucesso na produção de embriões clonados por TNCS, portanto, depende da eficiência das diversas etapas intrínsecas ao processo de reconstrução dos embriões propriamente dito. Os componentes ooplasmáticos são, então, peças chave na reprogramação genômica após a TNCS para a obtenção de um desenvolvimento embrionário normal.

A clonagem animal por TNCS, apesar de conceitualmente simples, envolve múltiplas etapas que tornam o processo bastante complexo. Algumas destas etapas, como a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos ou o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões, são comuns a outros procedimentos de PIV de embriões. Porém, outras etapas são exclusivas à clonagem, como àquelas que substituem a fecundação *per se* pela TNCS. Estas incluem características e processos associados à fonte e preparo do citoplasma receptor enucleado (citoplasto) e da

célula doadora de núcleo (carioplasto), à TN propriamente dita pela fusão de membranas plasmáticas, e à ativação embrionária (CAMPBELL *et al.*, 2005).

2.3.1 Fonte de citoplasma

Oócitos e zigotos, produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, já foram demonstrados como fontes competentes de citoplasto (citoplasma receptor enucleado) para a realização da clonagem por TN (CAMPBELL *et al.*, 2005). Porém, o instrumento mais utilizado para a viabilização da TN é o oócito secundário, sendo este também um fator limitante para algumas espécies, em termos de disponibilidade, e uma das principais fontes de variação em programas de produção *in vitro* de embriões (GALLI *et al.*, 2003b). Em bovinos, oócitos em metáfase II (MII) são normalmente utilizados após a MIV de oócitos primários, obtidos em estado de estagnação meiótica, na prófase I da meiose, provenientes de folículos terciários com presumível capacidade de desenvolvimento, e com diâmetros entre 1 e 12 mm (CAMPBELL *et al.*, 2001; OBACK & WELLS, 2003). Acredita-se que a capacidade de reprogramação nuclear esteja em seu pico máximo quando do uso de oócitos em MII, com o 1º corpúsculo polar extruso, em função do citoplasma do oócito conter proteínas, RNA mensageiro (mRNA) e precursores moleculares acumulados durante a foliculogênese, todos necessários para o desenvolvimento embrionário até a ativação do genoma embrionário (PEURA *et al.*, 1998; ALBERIO *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2007). Dentre os componentes acima, os fatores que atuam na reprogramação do núcleo doador ainda não estão completamente identificados, sendo a qualidade do oócito considerada de suma importância para o sucesso da clonagem animal (PEURA *et al.*, 1998; SCHURMANN *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2007).

Estudos anteriores demonstraram que o aumento ou diminuição do volume citoplasmático pode afetar significativamente o futuro desenvolvimento embrionário. Vários experimentos foram conduzidos alterando este volume para avaliar a relação citoplasma/célula doadora, na capacidade de desenvolvimento do embrião reconstruído e seu

posterior desenvolvimento, podendo ser realizado por fusão de citoplastos com diferentes volumes ou agregação de embriões clonados (PEURA *et al.*, 1998; BOIANI *et al.*, 2003; PEDERSEN *et al.*, 2005; TECIRLIOGLU *et al.*, 2005). Tem-se demonstrado que a taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (BL) aumentou à medida que a remoção de volume do citoplasma receptor durante a enucleação foi minimizada (WESTHUSIN *et al.*, 1996). O aumento de volume citoplasmático embrionário para 150% do original propiciou um maior número de células totais (massa celular interna e trofotoderma) em BL clonados, os quais apresentariam, supostamente, maior capacidade de desenvolvimento pós-transferência para fêmeas receptoras (PEURA *et al.*, 1998; OBACK *et al.*, 2003; VAJTA *et al.*, 2003; PEDERSEN *et al.*, 2005; TECIRLIOGLU *et al.*, 2005; MISICA-TURNER *et al.*, 2007). Por outro lado, a retirada de 50% ou 25% do volume citoplasmático reduziu o desenvolvimento e a qualidade embrionária (WESTHUSIN *et al.*, 1996; PEURA *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 2002). Estudos nesta linha de procedimentos são facilitados e favorecidos quando do uso de oócitos/embriões sem ZP. Não obstante, o grau de heteroplasma causado pela fusão dos citoplastos tem ação indefinida no desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* subsequentes, apesar de sua ocorrência natural no cruzamento em bovinos, pelo menos parcial, sem nenhuma evidência de efeito prejudicial. Métodos alternativos de reconstrução embrionária, como a agregação, minimizam potenciais efeitos deletérios da heteroplasma. A agregação embrionária têm sido associada a maiores taxas de desenvolvimento *in vivo* e maior densidade celular em murinos, onde as células de um embrião podem compensar os erros de reprogramação do outro e vice-versa, por via parácrina, habilitando o embrião, agora favorecido pelo seu maior número de células, a eliminar blastômeros com desenvolvimento comprometido (BOIANI *et al.*, 2003).

2.3.2 Célula doadora de núcleo

O primeiro procedimento com grande impacto na clonagem é a escolha do núcleo doador, que é responsável por variações importantes nas taxas de sucesso, sendo um componente chave para o sucesso no processo (CAMPBELL *et al.*, 2005). A eficiência de reprogramação após a TNCS parece depender do tipo celular e do grau de diferenciação da célula doadora (WELLS *et al.*, 2003). Com isto em vista, muitos estudos têm sido realizados para a identificação de tipos celulares mais adequados, levando-se em consideração a fase de desenvolvimento animal (por exemplo, embrião, feto, animal adulto), a origem tecidual, o ciclo celular, o grau de diferenciação, e características quando em cultivo, entre outros (HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2002, 2006; OBACK & WELLS, 2007). Torna-se claro, que resultados objetivos, além de generalidades que somente auxiliam na categorização ou agrupamento dos fatores acima, ainda são esperados.

Segundo alguns autores, células de origem embrionária parecem apresentar um potencial de desenvolvimento maior e nível de anormalidades menor do que células de origem fetal, as quais, por sua vez, parecem apresentarem-se mais eficientes do que células de origem adulta (HEYMAN *et al.*, 2002; OBACK & WELLS, 2003, 2007; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2002, 2006). A eficiência da reprogramação genômica após a TN parece ser dependente do estado de diferenciação da célula doadora (WELLS *et al.*, 2003). Desta forma, células embrionárias apresentam-se mais totipotentes ou multipotentes que as células diferenciadas de origem adulta, motivo pelo qual blastômeros apresentam melhor resultado na clonagem, pois até o estágio de 16-células, tais células são totipotentes (WILLADSEN, 1986; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2002, 2006; OBACK & WELLS, 2007). O grau de diferenciação indicaria, então, uma maior ou menor eficiência na reprogramação genômica, aumentando o potencial de desenvolvimento e diminuindo o nível de anormalidades subsequentes. O desenvolvimento *in vivo* e o nascimento de clones murinos e bovinos

derivados de embriões clonados por TNCS utilizando células-tronco embrionárias (CTE) de camundongo ou células germinativas primordiais (CGP) putativas de bovinos (derivadas da crista genital embrionária), respectivamente, foi significativamente maior do que aquele observado com células somáticas convencionais (HUMPHERYS *et al.*, 2001; FORSBERG *et al.*, 2002). Um aspecto coincidente entre estes estudos refere-se ao fato de que CTE e CGP, em conjunto com as células das linhagens de blastocistos, são caracterizadas como os tipos celulares com menor metilação de DNA dentro do desenvolvimento em mamíferos (REIK *et al.*, 2001). Esta condição tem sido considerada fundamental para a eficiência na reprogramação após a clonagem por TN.

Sabe-se, então, que o tipo e a linhagem celular, incluindo até sub-clones de certas linhagens, podem apresentar potenciais de desenvolvimento dramaticamente distintos após a clonagem em bovinos e murinos (EGGAN *et al.*, 2000; HUMPHERYS *et al.*, 2001; ARAT *et al.*, 2002; FORSBERG *et al.*, 2002; XUE *et al.*, 2002). Da mesma forma, células de um mesmo indivíduo, mas em distintos níveis de diferenciação, também apresentam resultados em favor do menor grau de diferenciação (BATCHELDER *et al.*, 2005). Contrariando estes achados, Kato, Tani & Tsunoda (2000) não encontraram diferença na eficiência da clonagem, utilizando fibroblastos da pele de feto ou de animal adulto. Possivelmente, o fator genótipo também exerça um papel de importância na reprogramação epigenética e eficiência na clonagem por TN (BATCHELDER *et al.*, 2005).

O tipo de célula somática mais universalmente utilizado tem sido o fibroblasto, normalmente de origem cutânea, mas muitos outros tipos celulares, em distintos níveis de diferenciação, já foram testados (WILMUT *et al.*, 1997; KATO *et al.*, 1998, 2000; WAKAYAMA *et al.*, 1998; WELLS *et al.*, 1999; HILL *et al.*, 2000; WRENZYCKI *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2003; BATCHELDER *et al.*, 2005; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2002, 2006). Os resultados destes experimentos mostram-se semelhantes, embora com

diferentes eficiências. Normalmente, os fibroblastos utilizados na clonagem são considerados equivalentes em seus níveis de diferenciação, mas linhagens distintas de fibroblastos podem ser capazes de transformação em diversos tipos de células do tecido conjuntivo; a ausência de marcadores específicos para esta transdiferenciação torna a identificação destas variantes celulares difícil de ser realizada (SCHOR & SCHOR, 1987; FRESHNEY, 2000). Epigeneticamente, fibroblastos derivados de distintos tecidos, ou da mesma região de um organismo, podem ser fundamentalmente diferentes por representarem populações de células heterogêneas, programadas para distintas funções, mesmo que morfológicamente semelhantes (SCHOR & SCHOR, 1987; FRESHNEY, 2000). A natureza menos diferenciada de células embrionárias, como os blastômeros, certamente desempenham um papel favorável à reprogramação genômica após a TN, mas o nível de diferenciação das células somáticas, como os fibroblastos, ainda não pode ser utilizado como parâmetro para a clonagem com estas células até que as caracterizações epigenéticas sejam melhor determinadas (OBACK & WELLS, 2007). Porém, pelo número reduzido de nascimentos relatados nas distintas publicações, pela inexistência de estudos controlados, e pela baixa eficiência da técnica, torna-se difícil a comparação adequada entre tipos celulares (TECIRLIOGLU *et al.*, 2005).

Bourc'his *et al.* (2001), Kang *et al.* (2001) e Beaujean *et al.* (2004) avaliaram os padrões de metilação do DNA das células somáticas e dos embriões clonados, por este fator estar relacionado à reprogramação do genoma e ao nível de expressão gênica. Os achados daqueles autores demonstraram claramente que o nível de metilação do DNA em embriões clones foi semelhante à célula doadora, sendo significativamente maiores do que embriões controle produzidos *in vivo*, por FIV ou por partenogênese. Durante o desenvolvimento embrionário, ocorre uma progressiva demetilação do embrião, com o zigoto de murinos reduzindo dramaticamente a metilação do DNA desde a fecundação até o estágio de BL, para valores ao redor de 30% daqueles encontrados em células somáticas (REIK *et al.*, 2001;

BIRD, 2002; DEAN *et al.*, 2003). Desta forma, no contexto da reprogramação genômica induzida pela clonagem, a eficiência da demetilação do DNA parece ser uma das etapas mais limitantes para a melhoria da eficiência da TNCS (EILERTSEN *et al.*, 2007).

Um dos paradigmas atuais preconiza que a maior eficiência da clonagem encontra-se associada à utilização de células somáticas no estágio G0 ou G1 do ciclo celular (WILMUT *et al.*, 1997; WAKAYAMA *et al.*, 1998; WELLS *et al.*, 2003). Tal condição pode ser obtida através da privação de soro (WILMUT *et al.*, 1997), através de inibidores do ciclo celular, como a roscovitina (ALBERIO *et al.*, 2001), ou através do cultivo celular até alta confluência, bloqueando desta forma o crescimento por contato, onde há, nesta fase, uma reduzida atividade transcripcional que facilita a reprogramação do núcleo (WELLS *et al.*, 1999). Porém, diferentes tipos celulares respondem de forma diferente ao soro, onde alguns necessitam de um longo tempo de privação para responderem, enquanto que outros não permitem esta retirada por um longo período (OBACK & WELLS, 2003). Contudo, a utilização de células na fase M mostra-se promissora, uma vez que os oócitos receptores também encontram-se nesta mesma fase, sincronizando-se os ciclos celulares. Porém, apesar da obtenção de indivíduos viáveis com células na fase G2/M, a eficiência ainda mostra-se baixa (GAO *et al.*, 2003), enquanto que a utilização de células na fase S ainda não mostrou-se viável, por causar a 'pulverização' da cromatina (CAMPBELL *et al.*, 2001).

O método de isolamento, o tipo de cultivo celular e o número de passagens celulares pode exercer um efeito importante nos resultados da clonagem (OBACK & WELLS, 2007). Estes aspectos devem ser cuidadosamente controlados, pois sabe-se que as condições de cultivo podem causar instabilidade genômica e, conseqüentemente, falhas na clonagem (HUMPHERYYS *et al.*, 2001). Células com poucas passagens em cultivo parecem apresentar uma maior eficiência de reprogramação epigenética após a clonagem, com o número de divisões celulares sendo um fator importante a ser considerado (POWELL *et al.*, 2004). Em

adição, células frescas apresentam maior taxa de fusão após a TN do que células criopreservadas, devendo estas serem cultivadas após descongelamento (LAI & PRATHER, 2003).

2.3.3 Reconstrução embrionária por transferência nuclear

A técnica de TN, originalmente introduzida por Willadsen (1986) para clonagem com células embrionárias, e posteriormente utilizada por Wilmut *et al.* (1997) com poucas modificações para uso com células somáticas, costumava ser privilégio apenas de laboratórios extremamente equipados, com alto grau de investimento, e que tinham em seu quadro, profissionais extremamente treinados. Através da micromanipulação, realiza-se a enucleação oocitária, pela aspiração do disco metafásico com micropipeta, onde o DNA apresenta-se corado por corante fluorescente, com posterior deposição sub-zonal do núcleo doador ou injeção intracitoplasmática (WAKAYAMA *et al.*, 1998).

No final do século XX houve o desenvolvimento de procedimentos de clonagem que excluam o uso de micromanipuladores na TN em mamíferos. Peura *et al.* (1998), utilizando blastômeros e oócitos sem ZP, reconstruíram embriões clonados por controle manual, resultando em taxas satisfatórias de desenvolvimento até o estágio de BL, com o nascimento de animais viáveis e saudáveis, provenientes da célula embrionária. Estudos subsequentes aprimoraram a metodologia descrita por Peura *et al.* (1998), com o uso de células somáticas para a produção de embriões sem ZP (VAJTA *et al.*, 2000, 2001, 2003), passando a técnica a ser denominada de *handmade cloning* (HMC). Os referidos trabalhos visavam o aumento na capacidade de produção de embriões reconstruídos e a diminuição do custo de produção, pela minimização da exigência de equipamentos sofisticados e de mão-de-obra altamente qualificada. O novo método ainda requer alguma sofisticação em termos de instrumentação, como a necessidade de equipamento para eletrofusão de membranas e microscópio invertido de epifluorescência para a seleção de oócitos enucleados. Porém, acredita-se que tais etapas

também serão simplificadas ao longo do tempo à medida que novas idéias e métodos sejam desenvolvidos. Não obstante, a alta produtividade alcançada pela técnica de HMC, associada ao baixo custo de produção, habilita muitos laboratórios à realização da clonagem, o que aumentará a curto e médio prazo a geração de novos conhecimentos na área pelo maior uso desta tecnologia.

As taxas de desenvolvimento alcançadas com a TNCS sem ZP é bastante similar à técnica tradicional (BOOTH *et al.*, 2001; OBACK *et al.*, 2003; VAJTA *et al.*, 2003), podendo atingir uma alta eficiência *in vitro* pela HMC (VAJTA *et al.*, 2005). Além disso, embriões produzidos por HMC mostraram-se qualitativamente comparáveis aos produzidos pela técnica convencional, com BL apresentando ligeiramente um maior número de células (VAJTA *et al.*, 2003), confirmando que a ZP pode ser dispensável para o desenvolvimento *in vitro*. Em experimentos de desenvolvimento *in vivo* em grande escala, realizados por Tecirlioglu *et al.* (2005), compararam-se os resultados de eficiência entre a FIV, a clonagem convencional (com micromanipuladores) e a técnica manual (HMC). As taxas de gestação aos 30 dias de clones produzidos por HMC foram superiores do que com embriões produzidos pela clonagem por TN convencional ou por FIV. Porém, como existiu uma elevada taxa de perda embrionária em ambos os grupos de embriões clonados, as técnicas tanto convencional quanto de HMC mostraram-se semelhantes em termos de eficiência *in vivo* final. Portanto, a técnica de HMC não parece aumentar a eficiência da clonagem, mas permite a produção ‘em massa’ de embriões, pela maior simplicidade e dinâmica do procedimento em comparação à clonagem convencional (VAJTA *et al.*, 2005).

2.3.4 Fusão de membranas para a reconstrução embrionária

O sucesso da fusão elétrica de membranas na clonagem está relacionado a vários fatores, tanto de caráter técnico quanto biológico. Em termos técnicos, o tipo de equipamento, o perfeito ajuste de amplitude, o tempo e intervalo entre pulsos elétricos, o posicionamento

das estruturas entre os eletrodos, a composição do meio de fusão, a qualidade morfológica e os tratamentos anteriores pelos quais passaram os oócitos e a célula doadora são alguns dos fatores de alta relevância para a fusão de membranas plasmáticas na clonagem.

A corrente alternada (AC) utilizada para a orientação das estruturas previamente ao pulso de corrente contínua (DC) apresenta uma eficiência variada entre os diferentes tipos celulares (OBACK & WELLS, 2003). Há uma relação direta entre o tamanho das estruturas a serem fusionadas; em geral, quanto menor esta relação, melhor é o alinhamento e fusão (TEISSIÉ *et al.*, 1999), como é o caso do uso de célula somática (pequeno tamanho), onde não é tão eficiente como para célula embrionária (grande tamanho). Desta forma, intensificase a magnitude dos pulsos para a fusão de células somáticas com citoplastos, em relação à fusão entre citoplastos, como demonstrado por Vajta *et al.* (2001).

As taxas de fusão para estruturas sem ZP são superiores quando comparadas a estruturas com ZP intacta (VAJTA *et al.*, 2005). Com a exposição dos oócitos a uma protease, para digestão da ZP, e das células à tripsina, para a desagregação celular, acredita-se que ocorra uma alteração nas proteínas da membrana plasmática responsáveis pela repulsão celular, o que facilita o processo de união entre estruturas, melhorando as taxas de fusão, principalmente no caso das células somáticas, onde a superfície de contato é pequena (BOOTH *et al.*, 2001; OBACK & WELLS, 2003). Outros fatores também podem contribuir para o maior sucesso na fusão de estruturas sem ZP com células somáticas. A utilização de substâncias biologicamente aderentes, como a lecitina fitohemoaglutinina, promove um forte contato entre a célula e o citoplasto, aumentando a eficiência da reconstrução embrionária (VAJTA *et al.*, 2005).

2.3.5 Ativação

Fisiologicamente, a ativação do oócito ocorre por ação de fatores liberados pelo espermatozóide, que provocam oscilações de cálcio intracelular no oócito por determinado

período de tempo (GALLI *et al.*, 2003b). Na TN, a ativação do embrião reconstruído deve ser funcionalmente equivalente à fecundação e pode ser induzida por pulso elétrico ou por ativação química, o que provoca uma permeabilização temporária do oolema, permitindo o influxo de cálcio extracelular e o uso de cálcio proveniente de reservas intracelulares (FISSORE *et al.*, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2005). A elevação nos níveis de cálcio intracelular, por sua vez, induz a progressão da meiose, com a extrusão do segundo corpúsculo polar, estimulando o desenvolvimento embrionário (FISSORE *et al.*, 2002).

Como a ativação química de oócitos bovinos com agentes ionóforos de cálcio é um evento artificial, a indução da elevação do cálcio intracelular ocorre em um único pico, suficiente para a inativação do Fator Promotor de Mitose ou de Maturação (MPF, *Maturation* ou *Mitosis Promoting Factor*), uma quinase reponsável pelo bloqueio meiótico em MII. Porém, esta ativação inicial não é seguida por um fenômeno importante que ocorre pela ativação espermática, que é a ocorrência de oscilações de cálcio por várias horas após a fecundação (FISSORE *et al.*, 2002). A ausência destas oscilações causa um re-acúmulo ooplasmático de ciclina B1, um ativador do MPF, e do fator citostático (CSF), o qual mantém o MPF elevado. Desta forma, a atividade do MPF é re-estabelecida precocemente, comprometendo o desenvolvimento subsequente (FISSORE *et al.*, 2002). Assim, após a ativação embrionária induzida na clonagem por TN, faz-se necessário o bloqueio da re-ativação do MPF por algumas horas (CAMPBELL *et al.*, 2005). Isto é necessário porque a ciclina B1 e o fator citostático (CSF) são continuamente produzidos em oócitos em MII (FISSORE *et al.*, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2005). Para tanto, normalmente utiliza-se a incubação em inibidores de proteínas quinases, como o 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), ou em inibidores da síntese protéica, com a cicloheximida ou a puromicina, que bloqueiam o MPF diretamente ou indiretamente, pela inibição da re-síntese da ciclina B1 (FISSORE *et al.*, 2002; CAMPBELL *et al.*, 2005).

O pulso elétrico muitas vezes é utilizado concomitante à fusão das membranas, especialmente em ovinos, com a eficiência variando de acordo com a magnitude e tempo do pulso (BOOTH *et al.*, 2001). Porém, esta ativação precoce normalmente não é desejada na clonagem bovina quando do uso de células somáticas. A exposição mais prolongada do núcleo doador aos fatores citoplasmáticos, desde a fusão até a ativação, é atualmente vista como benéfica ao processo de reprogramação do genoma doador, devendo o intervalo entre a fusão e ativação ser de 4 e 6 horas (CAMPBELL *et al.*, 1996; WELLS *et al.*, 1999; WRENZYCKI *et al.*, 2001; VAJTA *et al.*, 2003, 2005). Porém, Vajta *et al.* (2005) preconiza uma redução deste tempo para 3 a 4 h quando da ativação de embriões sem ZP. Não obstante, o período de tempo ideal necessário para permitir o início da reprogramação do genoma permanece indefinido e controverso (CAMPBELL, 2002).

2.4 Cultivo *in vitro* de embriões sem zona pelúcida

A composição do meio é de fato importante para a PIV de embriões, mas as maiores perdas que ocorrem com os clones, quando comparado aos fecundados *in vitro*, é mais indicativo de falhas na reprogramação do genoma do que propriamente do cultivo (HEYMAN *et al.*, 2002). Porém, a presença de soro no meio está associada ao aparecimento de anormalidades de placenta e bezerros pesados ao nascimento (BERTOLINI *et al.*, 2002a, 2004, 2007). Há opiniões divergentes quanto à utilização e concentração de soro ou fonte protéica no meio de cultivo. A presença de soro altera a expressão de genes indicativos do desenvolvimento embrionário (WRENZYCKI *et al.*, 2001), com BL apresentando-se mais escurecidos, com junções incompletas da ICM e do trofotoderma, podendo resultar em fragmentação do embrião (FARIN *et al.*, 2001). Porém, a utilização de uma fonte protéica parece ser necessária para o melhor desenvolvimento embrionário *in vitro* (VAJTA *et al.*, 2003). Mórulas produzidas em meio com soro parecem apresentar um desenvolvimento inicialmente comprometido, para recuperarem-se até o estágio de BL, ao passo que, quando

em meio sem soro, ocorre um atraso na progressão ao estágio de BL que parece comprometer o desenvolvimento futuro (FARIN *et al.*, 2001).

A composição do meio e as condições de CIV de embriões também afetam embriões clonados, que a partir da reconstrução e ativação, são cultivados em condições idênticas aos protocolos padrão de CIV para embriões com ZP. Porém, como os embriões reconstruídos por HMC são desprovidos de ZP, o cultivo em grupo sob a forma tradicional não é possível, pois pode resultar tanto na separação irreversível de blastômeros quanto na agregação indesejável entre estruturas. Acredita-se que o CIV em grupo seja benéfico ao desenvolvimento embrionário, mesmo que controverso, ocorrendo uma interação positiva entre os embriões, onde os mesmos estimulam-se mutuamente por via parácrina pela produção, por exemplo, de fatores de crescimento, como o fator de crescimento fibroblástico (bFGF), o fator de crescimento epidermal (EGF), os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF I e II), o fator de crescimento de transformação (TGF- α e β), entre outros. Por outro lado, quando cultivados em grupo, pode haver o efeito negativo dos oócitos não-fecundados e embriões degenerados que estejam presentes (VAJTA *et al.*, 2000). Tratando-se de embriões sem ZP, o cultivo em grupo torna-se impraticável devido à facilidade de agregação espontânea. Além disto, a ausência de ZP compromete a transferência de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, devido à fragilidade das junções celulares entre blastômeros, o que pode causar desagregação prévia à compactação (VAJTA *et al.*, 2005).

Diante do exposto, vários sistemas foram desenvolvidos para o cultivo individual de embriões sem ZP, sem comprometimento de desenvolvimento, como o cultivo em microgotas, descrito por Peura *et al.* (1998) e Oback & Wells (2003), o sistema *Well-of-the-Well* (WOW), proposto por Vajta *et al.* (2000), o sistema de oviduto de vidro (GO), desenvolvido por Thouas *et al.* (2001), e o sistema em poços em ágar, desenvolvido por Peura (2003). Existem vantagens e desvantagens com relação a cada sistema de cultivo embrionário

sem ZP, com a praticidade, taxas de BL, a qualidade embrionária e as taxas de desenvolvimento *in vivo* sendo os fatores a serem considerados quando na escolha do método a ser utilizado. O sistema de microgotas necessita troca de meio de cultivo com maior frequência e cobertura com óleo mineral, evitando-se a instabilidade nas condições de cultivo. Este excesso de manipulação pode prejudicar o desenvolvimento. Em estudos realizados por Vajta *et al.* (2000), não houve diferença significativa na taxa de BL entre cultivo em microgota e em poço (29% vs. 25%, respectivamente). Porém, as microgotas de cultivo individual normalmente apresentam menor taxa de sucesso, medido pela produção de BL (VAJTA *et al.*, 2000). Utilizando microcapilares de vidro, Thouas *et al.* (2001) desenvolveram o sistema GO, apresentando melhores resultados para cultivo individual quando comparado a microgotas. Neste sistema, a instabilidade pela manipulação é reduzida, com os embriões sendo envasados com uma quantidade reduzida de meio, e os microtubos dispostos verticalmente na incubadora de cultivo. Apesar da reduzida quantidade de meio, semelhante às microgotas, o sistema apresenta taxas razoáveis de BL (THOUAS *et al.*, 2001; VAJTA *et al.*, 2001, 2005). Dentre os sistemas utilizados para cultivo individual, mas em ambiente em grupo, o sistema WOW parece ser mais eficiente, permitindo inclusive a agregação de embriões quando desejado. Através da utilização de ponteiras de metal, confeccionam-se pequenos poços no fundo da placa plástica de cultivo, onde o embrião reconstruído é depositado. Atribuem-se ao sistema WOW melhores taxas de desenvolvimento até o estágio de BL, podendo ultrapassar os 50% (VAJTA *et al.*, 2000, 2003), sendo equivalente ao cultivo em grupo de embriões com ZP (BOOTH *et al.*, 2001). Os micropoços originais propostos por Vajta *et al.* (2000) apresentam dimensões de 280 μm de abertura e 250 μm na base. Porém, as dimensões dos micropoços foram posteriormente modificadas por Feltrin *et al.* (2006), sendo reduzidas para 150 μm e 130 μm , promovendo um maior desenvolvimento até o estágio de blastocisto que micropoços maiores. Estas dimensões

reduzidas assemelham-se mais ao diâmetro do embrião com ZP (BOOTH *et al.*, 2001), mimetizando o arcabouço delimitador natural da ZP, o que força a ocorrência das clivagens em espaço reduzido, mantendo os blastômeros em contato mais íntimo. O sucesso do sistema WOW também pode ser explicado pelo reduzido volume de meio no micropoço, o que pode evitar com que ocorra a dispersão de fatores de crescimento, principalmente os de maior densidade que o meio, promovendo um microambiente mais propício para o desenvolvimento embrionário, semelhante ao que ocorre no ambiente *in vivo*. Em adição, o sistema WOW minimiza os efeitos deletérios do co-cultivo com embriões degenerados. Pela abertura do micropoço, também permite o aporte de nutrientes e a diluição de metabólitos tóxicos como amônia e radicais livres (VAJTA *et al.*, 2000, 2005). Finalmente, tal sistema, além de permitir o cultivo de embriões sem ZP, também oportuniza a agregação embrionária quando desejado.

2.5 Considerações finais sobre a clonagem bovina por TNCS

Em síntese, a clonagem por transferência nuclear com células somáticas (TNCS) está associada a anormalidades de desenvolvimento causadas por erros de reprogramação epigenética do genoma. Tendo em vista que a clonagem animal é uma ferramenta biológica que pode ser de grande valor para pesquisas biomédicas, este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que visa a melhor compreensão de alguns dos potenciais fatores causais destas falhas de reprogramação epigenética na clonagem animal, voltado, em seu final, ao aumento da eficiência da clonagem, com um enfoque especial à melhoria do bem estar animal.

Em termos gerais, este trabalho visou contribuir para o entendimento dos processo da reprogramação epigenética do núcleo somático após a introdução em um oócito receptor enucleado, o que mostra-se promissor quanto à promoção do aumento da eficiência geral da clonagem, com um enfoque na melhoria do bem estar animal. Neste contexto, o oócito receptor executa papel fundamental na reprogramação do núcleo doador após a TNCS.

Porém, a heteroplasma causada pela fusão de oócitos durante a clonagem apresenta um efeito imprevisível no desenvolvimento embrionário. Uma alternativa sobre a fusão é a agregação embrionária, onde controlamos ou minimizamos a heteroplasma. Entretanto, estudos comparando o efeito da fusão ou da agregação após a reconstrução embrionária por TNCS, mantendo-se o volume citoplasmático final ao redor de 100% do normal, ainda não foram conduzidos de forma sistemática em bovinos.

A técnica de clonagem manual por HMC, originalmente idealizada a partir de experimentos descritos por Peura *et al.* (1998) com blastômeros, e posteriormente aprimorada por Vajta *et al.* (2001, 2003) com células somáticas, constitui-se na ferramenta ideal para a avaliação do efeito da fusão de oócitos ou da agregação de embriões sobre o desenvolvimento embrionário e a reprogramação do genoma. Desta forma, neste trabalho buscou-se inicialmente adequar a rotina de produção de embriões bovinos pela clonagem por transferência nuclear com células somáticas (TNCS) pelo método manual (*handmade cloning*, HMC) junto ao laboratório de Reprodução do CAV-UDESC. Uma vez estabelecida, iniciaram-se rotinas de TNCS por HMC com os objetivos específicos de (a) determinar o efeito da heteroplasma após a reconstrução embrionária pela fusão de hemi-oócitos ou pela agregação de hemi-embriões clonados por HMC sobre a taxa de desenvolvimento *in vitro* e a densidade celular de blastocistos no Dia 7 de cultivo; (b) estabelecer o efeito da variação do volume citoplasmático final (50%, 100%, 150%, 200%) após a reconstrução embrionária pela fusão ou pela agregação de embriões clonados por HMC sobre a taxa de desenvolvimento *in vitro* e a densidade celular de blastocistos no Dia 7 de cultivo; e (c) verificar o potencial de desenvolvimento *in vivo* de blastocistos clonados pela técnica de HMC por fusão ou agregação após a transferência para fêmeas receptoras síncronas.

3 CAPÍTULO ÚNICO

Developmental potential of bovine handmade clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes[†]

3.1 Introduction

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology is an excellent model for studies in developmental biology and mammalian embryology (REIK *et al.*, 2003). However, somatic cell cloning usually leads to incomplete genomic remodeling, which are linked to increased rates of fetal and placental abnormalities and pregnancy losses (HILL *et al.*, 2000; BOURC'HIS *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2001; WRENZYCKI *et al.*, 2001; XUE *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 2003; REIK *et al.*, 2003; BERTOLINI *et al.*, 2007). Distinct epigenetic features, manifested by increased levels of DNA methylation (KANG *et al.*, 2001), along with suggested changes in DNA methyltransferase mRNA relative abundance in SCNT-derived bovine embryos (WRENZYCKI *et al.*, 2001), are thought to affect the pattern of expression of a variety of imprinted and nonimprinted genes after *in vitro* embryo manipulations (WRENZYCKI *et al.*, 1998, 1999, 2001; HUMPHERYS *et al.*, 2002; BERTOLINI *et al.*, 2002b, 2004; YANG *et al.*, 2007). Remarkably, a certain level of variation in gene expression after cloning is fully tolerable and compatible with development (HUMPHERYS *et al.*, 2002; WELLS *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007). Yet, the mechanisms involved in reprogramming after NT are still widely unknown. A better understanding of such mechanisms is essential for NT to become more reliable and efficient for practical uses.

[†]Artigo a ser submetido à revista *Reproduction in Domestic Animals*

In early embryos, genomic reprogramming occurs rapidly after fertilization, with the chromatin reconfiguration being established before and during pronuclear formation (REIK *et al.*, 2001). Comparatively, a somatic nucleus in NT procedures is introduced into an enucleated oocyte at a point in development compatible with the pronuclear stage (REIK *et al.*, 2001). Consequently, chromatin configuration does not seem to occur properly in time and space after cloning, creating a functional and molecular asynchrony between the donor nucleus and the ooplasm. In this process, the ooplasmic components seem to be insufficient to modify or erase marks of differentiation in the donor genome, leading to faulty or incomplete epigenetic reprogramming (BIRD, 2002).

One of the least investigated aspects associated with faulty reprogramming after cloning by SCNT is the heteroplasmic nature of the process *per se*. In conventional cloning, the fusion of a somatic cell to an enucleated oocyte causes a merge of two distinct cytoplasms, along with their components, which represents an unpredictable factor in development. With the establishment of handmade cloning (HMC) procedures (VAJTA *et al.*, 2000, 2001, 2003), the level of heteroplasmy was further increased, since two enucleated hemi-oocytes are usually needed for embryo reconstruction. Consequently, the process of heteroplasmy by fusion of distinct oocytes can, on one hand, promote or increase developmental capacity (LIU & KEEFE, 2000), also increasing cell density (TECIRLIOGLU *et al.*, 2005). Alternatively, the fusion of incompatible oocytes or between oocytes with distinctive maturation and developmental capacities can create a detrimental level of heteroplasmy to cloning efficiency (VAJTA *et al.*, 2005). An alternative to circumvent the degree of heteroplasmy caused by fusion during cloning by HMC, at least partially, is embryo aggregation (VAJTA *et al.*, 2005; MISICA-TURNER *et al.*, 2007), which could minimize any unfavorable effects caused by fusion. Due to the importance of such events on genome reprogramming and developmental normality after somatic cell cloning, systematic studies comparing the developmental

potential of bovine handmade clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes are still a need. Thus, the aim of this study was to determine the effect of the level of heteroplasmy after embryo reconstruction by fusing hemi-oocytes or by aggregating hemi-embryos, varying the final cytoplasmic volume (50%, 100%, 150%, 200%), on *in vitro* development and cell density of Day-7 blastocysts.

3.2 Materials and Methods

All chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

3.2.1 Generation of primary somatic cell cultures

For the establishment of adult skin cell primary cultures, ear biopsies aseptically collected from a donor Nelore adult female were diced into 3-mm pieces and placed in 60-mm tissue culture dishes (Corning Incorporated, NY, USA) containing Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.22 mM sodium pyruvate, 26.2 mM sodium bicarbonate, 10.000 UI/mL penicillin G, 10 mg/mL streptomycin sulfate, and 10% fetal calf serum (FCS; Gibco-BRL). Cell cultures were established, expanded and maintained at 38.5°C, 5% CO₂, and 95% humidity. When high in confluence (>90%), cells from passages 1 to 3 were harvested using trypsin-EDTA solution for 5 to 7 min, spun at 300 g for 5 min, re-suspended in culture medium, and (a) cultured in 4-well dishes (Nunc, Denmark) at 25 to 50 x 10³ cells/mL, (b) stored frozen at -196°C in cryovials containing 10% DMSO in culture medium, or (c) used fresh for cloning by SCNT.

3.2.2 Bovine embryo production

Bovine embryos were produced by *in vitro* fertilization, cloning or parthenogenetic procedures, as described below.

3.2.2.1 *In vitro maturation (IVM)*. Selected cumulus-oocyte complexes (COCs) from bovine ovaries obtained from a local slaughterhouse were *in vitro*-matured at a 38.5°C, 5% CO₂ and 95% humidity, according to procedures by Vieira *et al.* (2002) and Bertolini *et al.* (2004).

3.2.2.2 *In vitro fertilization (IVF)*. *In vitro* sperm capacitation and IVF followed procedures modified from Parrish *et al.* (1986), as established in our laboratory (VIEIRA *et al.*, 2002; BERTOLINI *et al.*, 2002ab, 2004, 2006). Briefly, frozen–thawed bovine sperm cells were segregated by swim up in Sperm-TALP medium. Sperm cells, after *in vitro* capacitation, and oocytes, after 20 to 24 h of IVM, were co-incubated for 18 to 20 h (IVF = Day 0) in IVF-TALP medium, when cumulus cells were removed by pipetting.

3.2.2.3 *Nuclear transfer (SCNT-derived) by handmade cloning (HMC) and parthenote embryos*. Skin cell cultures from early passages (P1 to P3) were used for the production of bovine SCNT embryos by modified handmade cloning (HMC) procedures, based on Vajta *et al.* (2003). In brief, after 17 h of IVM, COC were denuded by pipetting in HEPES-buffered M-199 + 10% FCS (HM), followed by polar body selection and zona pellucida removal in 0.5% protease in HEPES-buffered M-199 + 0.01% PVA (HP). Then, zona-free oocytes were rinsed several times in HM, incubated for 10 min in 5 µg/mL cytochalasin B in HM in groups of up to 5 oocytes and hand-bisected (Ultra-sharp Splitting Blade, Bioniche, USA) in 5 µL drops under oil. Hemi-oocytes were selected after screening for nuclear material under UV light in 10 µg/mL bisbenzimidazole in HM (Hoechst 33342) in hemi-cytoplasts and hemi-karyoplasts (enucleated hemi-oocytes and metaphase II hemi-oocytes, respectively). Then, clone embryos were reconstructed by fusing either one or two hemi-cytoplasts to one donor cell to attain approximately either 50 or 100% of the final cytoplasmic volume, respectively. For that, enucleated halves (hemi-cytoplasts) and donor cells were conjoined after a quick exposure to 500 µg/mL phytohaemagglutinin in HP, to be subsequently electrofused by two 1.0-kV/cm DC pulses for 20 µsec, after a brief exposure to a 15 V pre-fusion AC pulse, in a BTX 453

chamber coupled to an electrofusion apparatus (Votain™ EP-1 Cell Fusion System, Cryologic, Australia). Fusion rates for reconstructed hemi-embryos (one hemi-cytoplasm + one donor cell = 50% volume) and embryos (two hemi-cytoplasts + one donor cell = 100% volume) were assessed by microscopic examination after 60 min. Reconstructed clone embryos after 2 to 3 h from fusion, zona-free and zona-intact oocytes, and screened hemi-karyoplasts (metaphase II hemi-oocytes) were chemically activated in 5 µM ionomycin in HM for 5 min, followed by incubation in 2 mM 6-DMAP in mSOFaa + 0.4% BSA for 4 h.

3.2.2.4 In vitro culture (IVC) conditions. Activated clone and zona-free parthenote embryos were *in vitro*-cultured in the WOW system, according to Vajta *et al.* (2000), and modified by Feltrin *et al.* (2006), in microwells into 4-well dishes containing 400 µL mSOFaa + 0.4% BSA, under mineral oil, at 39°C and gas mixture (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) for 7 days, to the blastocyst stage. Zona-intact parthenote and IVF embryos were *in vitro*-cultured under the same conditions as above, but in 4-well dishes with no microwells.

3.2.3 Experimental groups

Based on the volume of ooplasm or cytoplasm used for embryo reconstruction either by fusion of hemi-cytoplasts (fusion of hemi-cytoplasm + hemi-cytoplasm + donor cell) or by aggregation of hemi-embryos (either after fusion of hemi-cytoplasm + donor cell or by activating MII hemi-karyoplasts, producing clone or parthenote hemi-embryos), clone and parthenote embryos or hemi-embryos were allocated to one of six experimental groups and cultured in the WOW system, as follows: G1 (1 x 50%) culture of single clone or parthenote hemi-embryos per WOW, composing approximately 50% of the final normal embryo volume; G2 (1 x 100%) culture of single clone or parthenote embryos per WOW, composing approximately 100% of the final normal embryo volume; G3 (2 x 50%) aggregation of two clone or parthenote hemi-embryos per WOW, composing approximately 100% of the final normal embryo volume; G4 (2 x 100%) aggregation of two clone or parthenote embryos per

WOW, composing approximately 200% of the final normal embryo volume; G5 (3 x 50%) aggregation of three clone or parthenote hemi-embryos per WOW, composing approximately 150% of the final normal embryo volume; and G6 (4 x 50%) aggregation of four clone or parthenote hemi-embryos per WOW, composing approximately 200% of the final normal embryo volume. A group containing zona-intact parthenote or IVF embryos (G7, Zona-intact, 100%) was used as controls.

3.2.4 Cell density

A sample of Grade 1, 2, and 3 Day-7 blastocysts from each group was used for the estimation of total cell number. Following fixation in ice-cold absolute ethanol for 12 h, blastocysts were exposed to 10 µg/mL *bisbenzimidazole* (Hoechst 33342) in HM, transferred to a drop of glycerol on a glass slide and covered with a cover slip before cell counting under UV light in an epifluorescent microscope. Cell counts were performed by two operators and, when differences exceeded 10%, a third operator re-analyzed the sample, with the disposal of the most divergent count.

3.2.5 In vivo development

Some morphologically viable fresh Day-7 clone blastocysts from groups G2 (1 x 100%) and G3 (2 x 50%) were nonsurgically transferred to synchronous female recipients at a commercial embryo transfer facility (1 or 2 per recipient). Pregnancy and fetal gender diagnoses were performed by transrectal ultrasonography on Days 30 and 60 of gestation, respectively, with weekly ultrasound examinations to Day 90 of pregnancy for the detection of potential losses and abnormalities. Pregnancy rates from clone embryos were compared with embryo transfer results on Day 30 from contemporaneous *in vivo*-produced embryos.

3.2.6 Data analyses

Data analyses were done using Minitab software (State College, PA, USA). Fusion, cleavage and blastocyst rates were compared by the χ^2 test, whereas data regarding total cell number, based on morphological quality, were analyzed by ANOVA, for a level of significance of 5%. Pairwise comparisons between groups were performed using the Tukey test. Simple Pearson's correlation and regression tests were used for the analysis of relationships and dependence between traits.

3.3 RESULTS

After IVM, 65.4% of the matured oocytes (3,622/5,542) were selected for the presence of the first polar body, in 13 replications. Following zona removal, manual oocyte bisection, and fluorescence screening, more than half of the hemi-oocytes were enucleated (2,829/5,028; 56.3%), which were used for clone embryo reconstruction by fusion or aggregation, whereas a portion of the nucleated hemi-oocytes was used for parthenogenetic activation and embryo aggregation. After embryo reconstruction, fusion rates for clone hemi-embryos (one hemi-cytoplasm + one cell; 574/1,111, 51.7%) were lower ($P < 0.05$) than for clone embryos (two hemi-cytoplasts + one cell; 455/671, 67.8%). Reconstruction of clone embryos was performed by first sticking a somatic cell on a hemi-cytoplasm, followed by the adhesion of a second hemi-cytoplasm directly to the other one, creating a linear arrangement, with the donor cell staying on the edge. Under our experimental conditions, this strategy has proven more effective for subsequent membrane fusion than reconstruction methods described by Vajta *et al.* (2003), in which the donor cell is placed in between the adhered hemi-cytoplasts (data not shown).

In general, increasing the number of aggregated structures within each WOW determined a significant improvement in cleavage and blastocyst rates, especially for parthenote embryos (Table 1 and Figure 1). Also, a positive correlation was observed between the number of aggregated structures per WOW and blastocyst rate ($r=0.562$, $P=0.036$), and between cleavage and blastocyst rates ($r=0.676$, $P=0.008$), with the number of aggregated structures or cleavage rate being good predictors for blastocyst yield ($P<0.05$).

Table 1. Cleavage and blastocyst rates for clone and parthenote embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes

| Treatment | Ooplasmic Volume | Embryo type | n [*] | Cleavage [*] | | Blastocysts [*] | |
|--------------------------|------------------|-------------|----------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|---------------------|
| | | | | n | % | n | % |
| Fusion [†] | G1: 1 x 50% | Clone | 73 | 45 | 61.6 ^a | 8 | 11.0 ^a |
| | | Parthenote | 152 | 107 | 70.4 ^{ab} | 31 | 20.4 ^{ab} |
| | G2: 1 x 100% | Clone | 517 | 388 | 75.0 ^b | 112 | 21.7 ^b |
| | | Parthenote | 34 | 32 | 94.1 ^{def} | 19 | 55.9 ^{ef} |
| Aggregation [‡] | G3: 2 x 50% | Clone | 200 | 156 | 78.0 ^b | 41 | 20.5 ^{ab} |
| | | Parthenote | 155 | 136 | 87.7 ^d | 46 | 29.7 ^{bcd} |
| | G4: 2 x 100% | Clone | 44 | 36 | 81.8 ^{bc} | 17 | 38.6 ^{cde} |
| | | Parthenote | 37 | 37 | 100.0 ^f | 24 | 64.9 ^f |
| | G5: 3 x 50% | Clone | 72 | 65 | 90.3 ^d | 21 | 29.2 ^{bcd} |
| | | Parthenote | 156 | 135 | 86.5 ^d | 64 | 41.0 ^{de} |
| | G6: 4 x 50% | Clone | 72 | 65 | 90.3 ^{de} | 19 | 26.4 ^{bc} |
| | | Parthenote | 153 | 147 | 96.1 ^{ef} | 91 | 59.5 ^f |
| Zona-intact | 100% | IVF | 337 | 251 | 74.5 ^b | 85 | 25.2 ^b |
| | | Parthenote | 206 | 173 | 84.0 ^{cd} | 70 | 34.0 ^{cd} |

^{a,b,c}: Data in the same column without common superscripts differ significantly, $P<0.05$.

^{*} On a per WOW basis, except for zona-intact embryos

[†] Fusion of one hemi-cytoplasm + donor cell (1 x 50%) or two hemi-cytoplasm + donor cell (1 x 100%)

[‡] Aggregation of hemi-embryos (50%) or embryos (100%) produced either by the fusion of a hemi-cytoplasm + donor cell or by the activation of MII hemi-karyoplasts

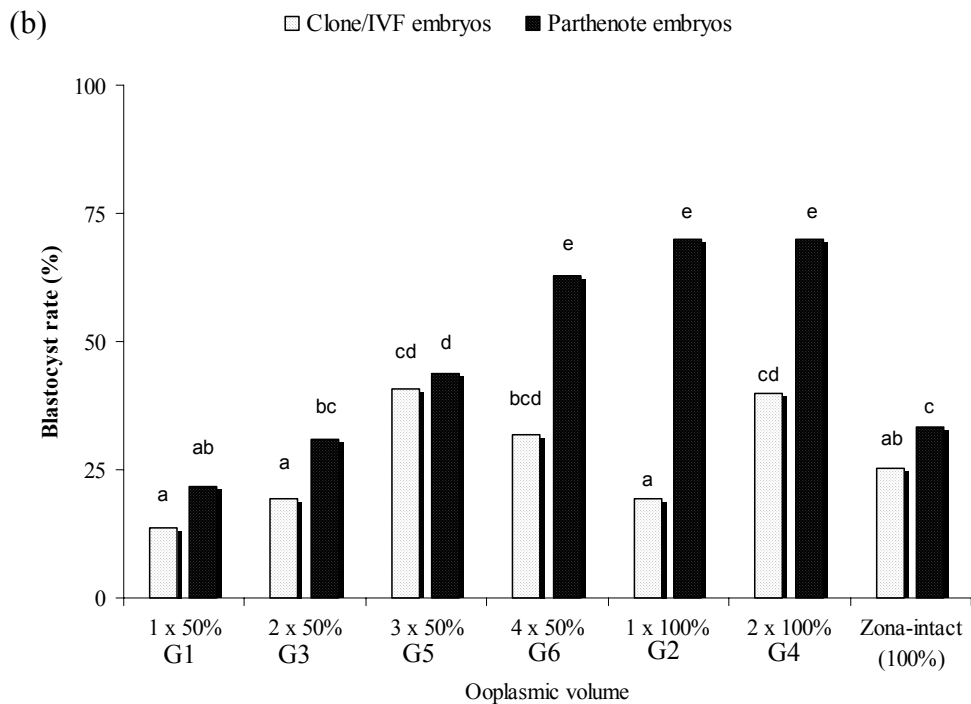
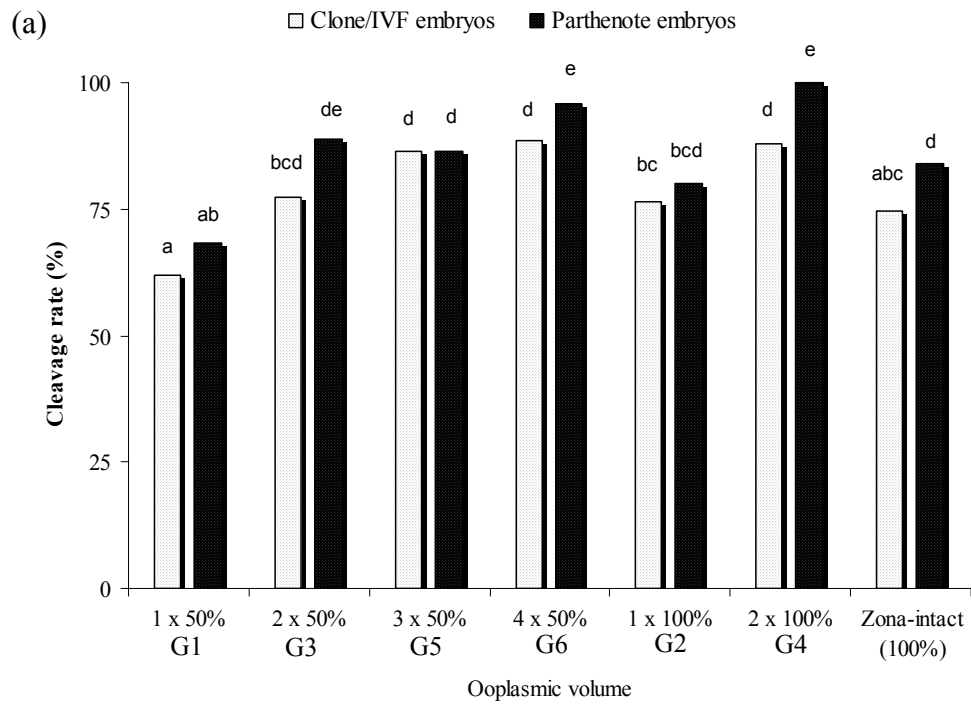


Figure 1. Cleavage (a) and blastocyst (b) rates for embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes

A linear increase in blastocyst rates was observed as the number of aggregates per WOW also increased (Figure 1b). Such positive effect on blastocyst development was more noticeable for parthenote embryos, from G1, G3, G5 and G6, but a similar trend was also observed with clone aggregated embryos (G3 to G6). However, results may be confounding due to the relative low total numbers in a few experimental groups. Irrespective of that, the increase in cytoplasmic volume, either by fusion or by aggregation, seemed to have a positive effect on cleavage and blastocyst rates. Conversely, the use of only half of the normal embryo cytoplasmic volume (G1: 1 x 50%) did not appear to affect significantly embryo development to the blastocyst stage.

Not surprisingly, embryo quality, assessed by morphology according to the guidelines from the International Embryo Transfer Society (IETS), was highly correlated with cell density ($P < 0.001$), with numbers of cells being significantly different between morphological grades 1, 2, and 3 (161.2 ± 6.2 , 110.1 ± 4.5 , and 62.1 ± 4.8 , respectively; $P < 0.0001$). Embryo type was also a good predictor of cell density, in which clone embryos had a significant higher number of cells than parthenote embryos (122.7 ± 4.6 vs. 99.6 ± 4.0 , respectively; $P < 0.0001$). However, embryo quality does not account alone for the difference between groups, since parthenote embryos tended to have fewer cells than clone or IVF embryos, within each treatment group, quality grade, or even across comparable treatments (Table 2). Still, differences between clones and parthenotes were more pronounced only between embryos of higher morphological quality (Figure 2a).

Cell density in blastocysts increased linearly as the number of aggregates per WOW also increased (Figure 2b). That observation was more obvious in parthenotes than in clones. However, such results may be due to the unbalanced occurrence of embryos of distinct morphological grades within each group, especially for groups G1 (1 x 50%) and G6 (4 x 50%), in which only blastocysts of lower grades were used for cell counting (Table 2).

Table 2. Total cell number (LSM \pm SEM), by treatment group and by morphological quality, for clone and parthenote embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct ooplasmic volumes

| Treatment | Ooplasmic Volume | Embryo type | Mean cell number | Cell number based on Embryo Quality | | |
|--------------------------|------------------|-------------|---------------------------------|--|---|--|
| | | | | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 |
| Fusion [†] | G1: 1 x 50% | Clone | 50.4 \pm 16.5 ^a | --- | 64.3 \pm 15.1 ^{aA} (n=3) | 38.9 \pm 13.1 ^{aA} (n=4) |
| | | Parthenote | 76.7 \pm 15.5 ^{abc} | --- | 84.7 \pm 15.1 ^{aA} (n=3) | 58.3 \pm 18.5 ^{aA} (n=2) |
| | G2: 1 x 100% | Clone | 144.4 \pm 8.5 ^d | 197.0 \pm 8.7 ^{aA} (n=9) | 155.0 \pm 9.3 ^{bA} (n=8) | 67.7 \pm 10.7 ^{aB} (n=6) |
| | | Parthenote | 92.5 \pm 12.5 ^{abc} | --- | 112.5 \pm 18.5 ^{abA} (n=2) | 37.8 \pm 18.5 ^{aA} (n=2) |
| | G3: 2 x 50% | Clone | 102.8 \pm 10.2 ^{ab} | 150.3 \pm 18.5 ^{abA} (n=2) | 121.3 \pm 10.7 ^{abAB} (n=6) | 66.4 \pm 9.9 ^{aB} (n=7) |
| | | Parthenote | 64.6 \pm 10.2 ^a | 87.0 \pm 18.9 ^{bA} (n=2) | 94.3 \pm 15.1 ^{abA} (n=3) | 48.8 \pm 10.7 ^{aA} (n=6) |
| Aggregation [‡] | G4: 2 x 100% | Clone | 108.4 \pm 12.4 ^{abc} | 162.8 \pm 18.5 ^{abA} (n=2) | 124.9 \pm 9.9 ^{abA} (n=7) | --- |
| | | Parthenote | 137.1 \pm 14.0 ^{cd} | --- | 117.0 \pm 18.5 ^{ab} (n=2) | --- |
| | G5: 3 x 50% | Clone | 66.9 \pm 13.4 ^{ab} | 157.3 \pm 18.5 ^{bA} (n=2) | 69.3 \pm 18.5 ^{abB} (n=2) | 43.0 \pm 18.5 ^{aB} (n=2) |
| | | Parthenote | 92.2 \pm 8.8 ^{abc} | 135.5 \pm 13.1 ^{abA} (n=4) | 94.5 \pm 10.7 ^{abAB} (n=6) | 61.3 \pm 9.3 ^{aAB} (n=8) |
| | G6: 4 x 50% | Clone | 84.2 \pm 14.7 ^{abc} | --- | --- | 56.8 \pm 15.1 ^a (n=3) |
| | | Parthenote | 116.4 \pm 7.4 ^{bcd} | 166.4 \pm 9.9 ^{aA} (n=7) | 132.7 \pm 9.3 ^{abAB} (n=8) | 85.4 \pm 9.3 ^{aB} (n=8) |
| Zona-intact | 100% | IVF | 102.9 \pm 8.8 ^{abc} | 133.2 \pm 8.3 ^{bA} (n=10) | 101.3 \pm 7.6 ^{abAB} (n=12) | 63.0 \pm 9.9 ^{aB} (n=7) |
| | | Parthenote | 94.7 \pm 8.7 ^{abc} | 111.4 \pm 11.7 ^{bA} (n=5) | 71.9 \pm 9.9 ^{aA} (n=7) | 59.7 \pm 15.1 ^{aA} (n=3) |

^{a,b,c}: Data in the same column without common superscripts differ significantly, P<0.05.

^{A,B}: Data in the same row without common superscripts differ significantly, P<0.05.

[†] Fusion of one hemi-cytoplasm + donor cell (1 x 50%) or two hemi-cytoplasm + donor cell (1 x 100%)

[‡] Aggregation of hemi-embryos (50%) or embryos (100%) produced either by the fusion of a hemi-cytoplasm + donor cell or by the activation of MII hemi-karyoplasts

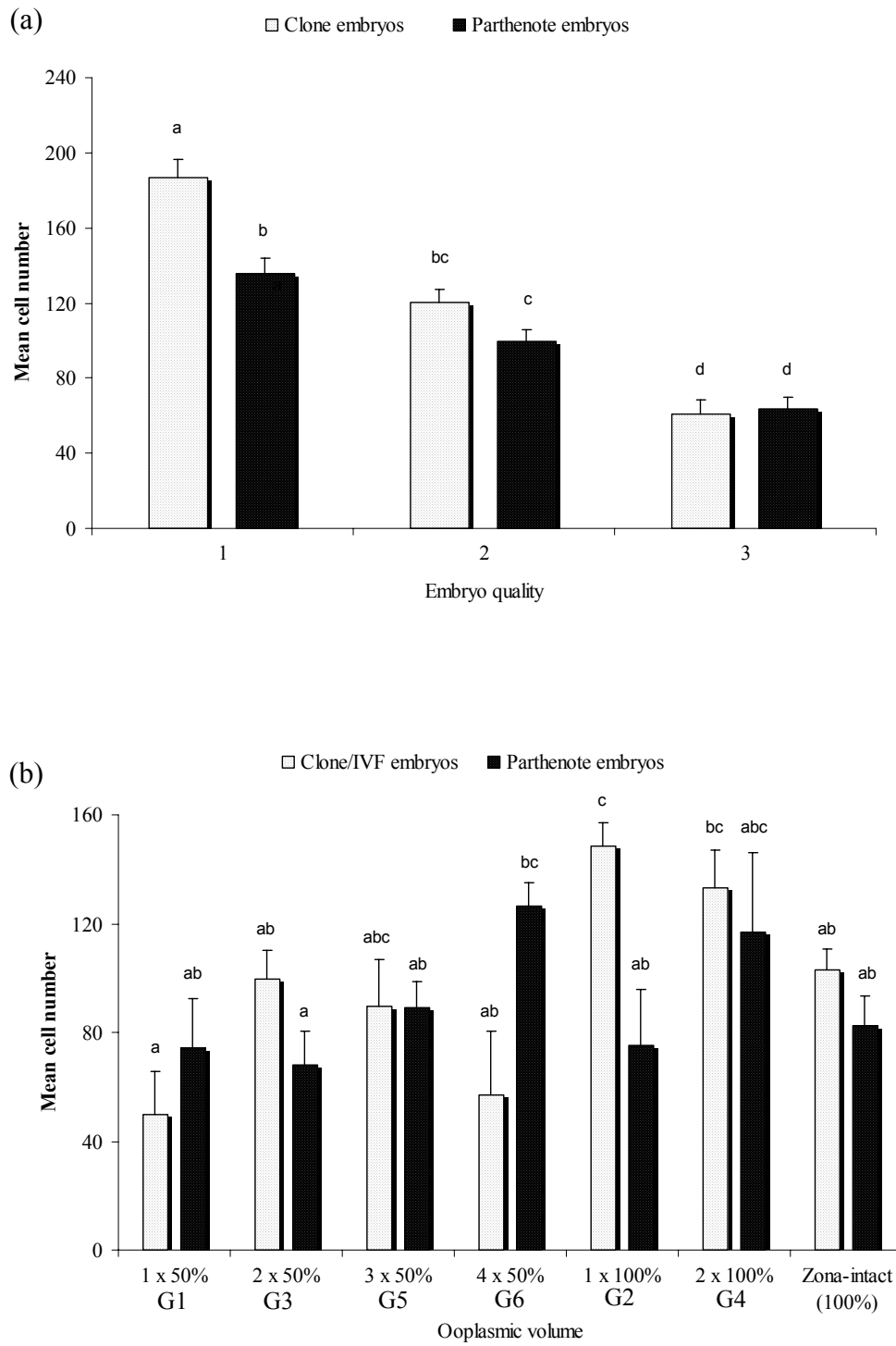


Figure 2. Total cell number by morphological quality (a) and by treatment group (b) for clone and parthenote embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct ooplasmic volumes

Finally, on a per WOW basis, blastocyst rates and cell density did show a linear increase as the number of aggregates increased, as reported above. However, on a per hemi-cytoplasm basis, when blastocyst rate and cell density data from each group were adjusted for the number of hemi-cytoplasm (50%) used for reconstruction, either by fusion or by aggregation, including an adjustment for parthenote and IVF embryos, the increase in blastocyst rate and total cell number was no longer obvious, except for clone embryos in group G2 (1 x 100%). Interestingly, even if blastocyst rate was generally lower, total cell numbers in clone blastocysts in group G2 (1 x 100%) was significantly higher than all the other groups, including the IVF controls, irrespective of the adjustment factor.

Table 3. Pregnancy rate and losses after transfer of one or two Day-7 clone embryos and contemporaneous control embryos to synchronous female recipients

| Group | Embryos/ recipient | Embryo Transfer | | Pregnancy | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------|---------|-----------|------|--------|------|--------|-------|
| | | | | Day 30 | | Day 60 | | Losses | |
| | | Recipients | Embryos | n | % | n | % | n | % |
| Clones - Pairs | One | 6 | 6 | 1 | 16.7 | 0 | 0.0 | 1 | 100.0 |
| G2: 1 x 100% | Two | 31 | 62 | 8 | 25.8 | 4 | 18.2 | 4 | 50.0 |
| Clones - Aggregates | One | 2 | 2 | 1 | 50.0 | 1 | 50.0 | 0 | 0.0 |
| G3: 2 x 50% | Two | 1 | 2 | 0 | 0.0 | --- | --- | --- | --- |
| Total clones | One or two | 40 | 72 | 10 | 25.0 | 5 | 16.7 | 5 | 50.0 |
| <i>In vivo</i> -produced embryos (controls)* | One | 94 | 94 | 50 | 53.2 | 50 | 53.2 | --- | --- |

*Contemporaneous fresh control bovine embryos, for which pregnancy losses were not determined.

Results from the transfer of clone embryos from groups G2 (1 x 100%) and G3 (2 x 50%) to female recipients are presented in Table 3. Pregnancies, as presented, will be all between 90 and 120 days by late May 2008, if no further losses occur. As expected, a trend was evident for embryo quality to be a predictor of pregnancy ($R=-0.310$, $P=0.095$), with

pregnancies developing from high quality embryos. The number of embryos per recipient did not seem to affect pregnancy rates or losses, but numbers are still too small for any trustworthy comparison.

3.4 DISCUSSION

Many aspects related to the physiological and developmental failures after SCNT in mammals have been associated with genomic reprogramming errors that in turn appear to be related to epigenetic failure at the DNA methylation, histone acetylation, and/or chromatin remodeling levels. An accurate nuclear reprogramming process after embryo reconstruction is needed for successful of somatic cell-nuclear transfer (NT). In this process, the donor nuclei must encompass changes to ascertain that the pattern of gene expression of cloned embryos and concepti becomes similar to that seen in fertilized embryos (BOURC'HIS *et al.*, 2001). Yet, the intricate mechanisms involved in cell reprogramming are still widely unknown. The use of preimplantation embryos and the establishment of cloning by HMC procedures, along with embryo aggregation methods, are valuable strategies and source of biological material for the study of embryonic development and epigenetic reprogramming that have an impact on developmental biology and mammalian embryology (VAJTA *et al.*, 2005; MISICATURNER *et al.*, 2007).

As the recipient oocyte exerts a key role in chromatin remodeling, the effect of the cytoplasmic volume after cloning cannot be neglected. Previous studies have demonstrated that the reduction or increase in cytoplasmic volume may have an important impact on embryo development. The removal of 50% or 25% of the ooplasm during enucleation compromised embryo development, embryo quality, and total cell number in clone blastocysts (WESTHUSIN *et al.*, 1996; PEURA *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 2002). Interestingly, the use of only 50% of the normal volume for embryo production in this study did not affect

the developmental potential of cloned embryos to the blastocyst stage. However, a reduction in total cell number per blastocyst corroborated with results from those early reports. Most likely, in conditions when the volume is reduced, such as for hemi-embryos, the amount of ooplasmic components may be sufficient to provide support to early cleavage, activation of the embryonic genome (8- to 16-cell stage) and cavitation, but as cytoplasmic volume does not increase during the first few rounds of embryonic cell division, total cell numbers tend to be limited by total embryo volume (WESTHUSIN *et al.*, 1996).

Increasing the embryonic cytoplasm either by fusing two or three enucleated oocytes to attain 150% of normal volume or by aggregating two or three clone embryos to approximately 200% or 300% of the embryo size improved blastocyst cell density in the inner cell mass and trophectoderm (PEURA *et al.*, 1998; OBACK *et al.* 2003; VAJTA *et al.*, 2003; PEDERSEN *et al.*, 2005; TECIRLIOGLU *et al.*, 2005; MISICA-TURNER *et al.*, 2007). The increase in embryo volume, either by fusion or by aggregation, as seen in this study, also increased the developmental potential and cell density in blastocysts, as reported above. When cytoplasmic volume is increased by fusing cytoplasts, the extra ooplasmic components may boost development beyond the 8- to 16-cell stage, improving embryo development. In addition, the larger cytoplasm will tend to allow or promote more cell divisions to occur, increasing total cell numbers.

The increase in cytoplasmic volume by aggregation may have a distinct explanation than fusion. In mice, embryo aggregation did not improve clone embryo development to the blastocyst stage, but increased cell density in blastocysts and promoted an 8-fold higher *in vivo* development than controls (BOIANI *et al.*, 2003). In that study, the improvement in *in vivo* development was not considered to be a consequence of an increase in cell numbers, but more a complementation of the genetically identical, but epigenetically different embryos, which exerted an additive effect on the developmental potential of embryos. In our study, an

increase in the number of aggregated structures within each WOW was followed by a linear increase in cleavage, blastocyst rate and cell density. In fact, embryo aggregation may be a means of increasing cloning efficiency, not only by promoting an increase in cell density in developed embryos, but also (a) by influencing cell allocation in the embryonic lineages, which may favor subsequent placental development (VAJTA *et al.*, 2005), (b) by eliminating blastomeres of lower developmental capacity (VIUFF *et al.*, 2002) or even (c) by compensating, correcting or regulating epigenetic defects present in some blastomeres through a paracrine fashion (BOIANI *et al.*, 2003). However, embryo aggregation in this study did not improve blastocyst yield or cell number, on a hemi-cytoplast basis. In addition, lower fusion rates for the reconstruction of clone hemi-embryos for aggregation caused a reduction in the overall cloning efficiency. Aside from differences regarding species, stages of development, or procedures, the observation above is what appears to differentiate our aggregation results from the other studies, since no apparent additive effect in embryo development or cell number was observed, on a per hemi-cytoplast basis, as opposed to results from Boiani *et al.* (2003), Pedersen *et al.* (2005), Tecirlioglu *et al.* (2005), and Misica-Turner *et al.* (2007), in which a nonlinear synergistic increase in blastocyst yield and/or cell density were detected. Most likely, the linear improvement in embryo development and cell density observed by aggregation in this study was more a reflection of probability for development than of a paracrine effect or epigenetic complementation.

Interestingly, embryos produced by aggregation of bovine embryos yielded higher early pregnancy rates than single embryos produced by fusion (PEDERSEN *et al.*, 2005). Such results opposed those by Tecirlioglu *et al.* (2005), in which no differences were observed in pregnancy rates between aggregated and non-aggregated clone embryos, despite the significant improvement in embryo development and total cell number in clone blastocysts. In this study, pregnancy rates were lower than contemporaneous controls. Even if

numbers were low, pregnancy outcome appeared to be more closely related to embryo quality, which in turn was correlated with cell density, rather than with embryo type. Nevertheless, further studies are still needed to elucidate this issue.

Differences seen for the fusion for structures with one hemi-cytoplast+one-cell and with two-cytoplasts+one-cell may be related to two basic factors: alignment of the structures into the electrofusion chamber during the AC pulse and relation between the nature of the DC pulse and cell size. It is known that the efficiency of the AC pulse used for alignment depends on the cell type (OBACK & WELLS, 2003) and, particularly, on the proper orientation. Vajta *et al.* (2002) showed that a proper structure orientation prior to AC pulse significantly improved fusion between one-hemi-cytoplast+one-cell structures, obtaining an improvement from 54% with random alignment to 94% fusion when alignment was well checked. As structure alignment in our study was properly and carefully controlled, lower fusion rates may be more related to the response of each type of structure to DC pulse. There is a direct relationship between the size of the structures being fused; in general, the lower this ratio, the higher the response to alignment and fusion (TEISSIÉ *et al.*, 1999). This is particularly true for cloning, in which fusion of a somatic cell to a cytoplast or hemi-cytoplast is not as efficient as fusion between cytoplasts or hemi-cytoplasts. In this way, the DC pulse amplitude is usually increased for the fusion of one-hemi-cytoplast+one-cell structures, as shown by Vajta *et al.* (2001). However, under our conditions, the increase in DC pulse amplitude usually resulted in higher rates of cytoplast lyses or subsequent degeneration. As electrofusion parameters were set in a pilot experiment, it appears that proper conditions fell within a narrow window for our apparatus settings.

In summary, this study aimed to determine the effect of the cytoplasmic volume on embryo development and cell density after aggregation or fusion of clone or parthenote embryos. Generally, the increase in cytoplasmic volume by fusion or by aggregation

improved embryo development and cell number in clone and parthenote embryos, with clone embryos having more cells and higher quality than parthenotes. Interestingly, developmental potential was not affected by a reduction in half of the normal embryo volume, but cell density in developing blastocysts was significantly reduced. Overall, embryo aggregation appeared to improve development and cell density, on a per WOW basis, but no additive effect was observed on blastocyst yield or cell number, on a hemi-cytoplasm basis. The benefit of embryo aggregation on development of clone embryos still needs to be further elucidated.

Our efforts to understand the effects of the heteroplasmy, and the role of the ooplasmic components and volume on subsequent development, ultimately intend to increase our knowledge on the process of nuclear reprogramming, which may benefit studies on aging, cancer, disease syndromes, normal processes in embryo development and abnormalities seen after embryo manipulations, such as cloning by somatic cell nuclear transfer.

3.5 REFERENCES

- Bertolini M, Bertolini LR, Petkov SG, Madden KR, Murray JD, Anderson GB, 2006: Embryo survival following lipid-based transfection of 1-cell stage bovine embryos with small interfering RNA (siRNA) fragments and/or DNA. *Reprod Fertil Dev* **18**, 168.
- Bertolini M, Mason JB, Beam SW, Carneiro GF, Sween ML, Moyer AL, Famula TR, Sainz RD, Anderson GB, 2002a: Morphology and morphometry of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* **58**, 973-994.
- Bird A, 2002: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21.
- Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Scholer HR, McLaughlin KJ, 2003: Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J* **22**, 5304-5312.

- Feltrin C, Forell F, Santos LC, Rodrigues JL, 2006: *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by HMC using a modified WOW culture system. *Reprod Fertil Dev* **18**, 126.
- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME, 2000: Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* **63**, 1787-1794.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM, 2002: Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* **67**, 487-492.
- Liu L, Keefe DL, 2000: Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* **62**, 1828-1834.
- Misica-Turner PM, Oback FC, Eichenlaub M, Wells DN, Oback B, 2007: Aggregating embryonic but not somatic nuclear transfer embryos increases cloning efficiency in cattle. *Biol Reprod* **76**, 268–278.
- Oback B, Wells DN, 2003: Cloning cattle. *Cloning & Stem Cells* **5**, 243-256.
- Pedersen HG, Schmidt M, Sangild PT, Strobecch L, Vajta G, Callesen H, Greve T, 2005: Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. *Mol Cell Endocrinol* **234**, 137–143.
- Peura TT, Lewis IM, Trounson AO, 1998: The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Mol Reprod Dev* **50**, 185-191.
- Reik W, Dean W, Walter J, 2001: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093.
- Reik W, Santos F, Dean W, 2003: Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* **59**, 21-32.
- Tecirlioglu RT, Cooney MA, Lewis IM, Korfiatis NA, Hodgson R, Ruddock NT, Vajta G, Downie S, Trounson AO, Holland MK, French AJ, 2005: Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod Fertil Dev* **17**, 573-585.

- Teissié J, Eynard N, Gabriel B, Rols MP, 1999: Electroporation of cell membranes. *Adv Drug Del Rev* **35**, 3–19.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H, 2000: New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* **55**, 256-264.
- Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO, 2001: Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning* **3**, 89-95.
- Vajta G, Lewis IM, Kortiatz NA, Travers RL, Trounson AO, 2002: Bovine somatic cell cloning without micromanipulators: optimization of certain parameters. *Reprod Fertil Dev* **57**, 453.
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H, 2003: Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. *Biol Reprod* **68**, 571-578.
- Vajta G, Krugh PM, Mtango NR, Callesen H, 2005: Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod Fertil Dev* **17**, 97-112.
- Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G, 2002: Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology* **45**, 91-94.
- Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P, Thomsen PD, 2002: Bovine embryos contain a higher proportion of polyploidy cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol Reprod Dev* **62**, 483-488.
- Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, L'Huillier PJ, Tervit HR, Oback B, 2003: Coordination between donor cell type and cell cycle improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* **59**, 45-59.
- Westhusin ME, Collas P, Marek D, Sullivan E, Stepp P, Pryor J, Barnes F, 1996: Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not the quantity of embryos produced by *in vitro* fertilization and nuclear transplantation. *Theriogenology* **46**, 243-252.
- Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T, 2007: Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genet* **39**, 295-302.

4 CONCLUSÕES

- 4.1 A eletrofusão de membranas é maior em estruturas com menor relação superfície:volume, o que pôde ser evidenciado pela maior taxa de fusão de embriões clonados a partir de dois hemi-citoplastos + uma célula somática do que hemi-embriões a partir de um hemi-citoplasto + uma célula somática.
- 4.2 O aumento no número de estruturas agregadas em cada micropoço aumentou linearmente os resultados, por micropoço, quanto às taxas de clivagem, de blastocisto e o número total de células de embriões produzidos por clonagem ou por partenogênese.
- 4.3 O aumento no volume citoplasmático tanto por fusão quanto por agregação apresentou um efeito positivo no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e na densidade celular destes embriões.
- 4.4 Embriões clonados produzidos por fusão (G2, 1 x 100%) ou por agregação (G3, 2 x 50%) apresentaram potencial de desenvolvimento *in vivo* semelhantes entre si, mas inferiores aos controles contemporâneos, apesar do pequeno número de amostras analisadas.
- 4.5 A agregação embrionária aumentou o desenvolvimento e densidade celular em embriões por micropoço, mas não melhorou a taxa de blastocistos ou o número de células, com base no número de hemi-citoplastos utilizados para cada agregação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anúncio na mídia, 2003a. Advanced Cell Technology, press release, <http://www.advancedcell.com/press-release/collaborative-effort-yields-endangered-species-clone>.
- Anúncio na mídia, 2003b. College of Veterinary Medicine & Biomedical Sciences, Texas A&M University, press release, http://www.cvm.tamu.edu/news/releases/2003/deer_clone.shtml.
- Alberio R, Brero A, Motlik J, Cremer T, Wolf E, Zakhartchenko V, 2001: Remodeling of donor nuclei, DNAsynthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. *Mol Reprod Dev* **59**, 371-379.
- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Respass DS, Tumlin M, Stice SL, 2002: In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod* **66**, 1768-1774.
- Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destremes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y, 1999: Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotech* **17**, 456-461.
- Batchelder CA, Hoffert KA, Bertolini M, Moyer AL, Mason JB, Petkov SG, Famula TR, Anderson GB, 2005: Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Cloning Stem Cells* **7**, 238-254.
- Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB, 2007a: Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells* **9**, 63-82.
- Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB, 2007b: Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Cloning Stem Cells* **9**, 83-96.
- 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.

- Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreuzer BR, Medrano JF, Murray JD, 1995: Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology* **44**, 227-232.
- Bertolini M, Anderson GB, 2002: The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology* **57**, 181-187.
- Bertolini M, Mason JB, Beam SW, Carneiro GF, Sween ML, Moyer AL, Famula TR, Sainz RD, Anderson GB, 2002a: Morphology and morphometry of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* **58**, 973-994.
- Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB, 2002b: Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*- produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev* **63**, 318-328.
- Bertolini M, Moyer AL, Mason JB, Batchelder CA, Hoffert KA, Bertolini LR, Carneiro GF, Cargill SL, Famula TR, CC Calvert, Sainz RD, Anderson GB, 2004: Evidence of increased substrate availability to *in vitro*-derived bovine fetuses and association with accelerated conceptus growth. *Reproduction* **128**, 341-354.
- Bertolini M, Bertolini LR, Petkov SG, Madden KR, Murray JD, Anderson GB, 2006: Embryo survival following lipid-based transfection of 1-cell stage bovine embryos with small interfering RNA (siRNA) fragments and/or DNA. *Reprod Fertil Dev* **18**, 168.
- Bertolini M, Bertolini LR, Gerger RPC, Batchelder CA, Anderson GB, 2007: Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. *Rev Bras Reprod Anim* **31**, 391-405.
- Bird A, 2002: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6-21.
- Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Scholer HR, McLaughlin KJ, 2003: Pluripotency deficit in clones overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J* **22**, 5304-5312.
- Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, Viegas-Pequignot E, 2001: Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol* **11**, 1542-1546.

- Booth PJ, Tan SJ, Reipurth R, Holm P, Callesen H, 2001: Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. *Cloning & Stem Cells* **3**, 139-150.
- Briggs R, King TJ, 1952: Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Zoology* **38**, 455-463.
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I, 1996: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* **380**, 64-66.
- Campbell KHS, Alberio R, Lee JH, Ritchie WA, 2001: Nuclear transfer in practice. *Cloning & Stem Cells* **3**, 201-208.
- Campbell KHS, 2002: Cell cycle regulation in cloning. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds), *Principles of Cloning*. Academic Press San Diego, pp. 391-399.
- Campbell KHS, Alberio R, Choi I, Fisher P, Kelly RDW, Lee JH, Maalouf W, 2005: Cloning: eight years after Dolly. *Reprod Dom Anim* **40**, 256-268.
- Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP, 2002: Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotech* **20**, 366-369.
- Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Palmer C, 2006: Large offspring or large placenta syndrome? morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* **75**, 122-130.
- Dean W, Bowden L, Aitchison A, Klose J, Moore T, Meneses JJ, Reik W, Feil R, 1998: Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development* **125**, 2273-2282.
- Dean W, Santos F, Reik W, 2003: Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Cell & Dev Biol* **14**, 93-100.
- Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R, 2000: X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* **290**, 1578-1581.
- Eilertsen KS, Power RA, Harkins LL, Misica P, 2007: Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* **98**, 129-146.

- Farin PW, Crosier AE, Farin CE, 2001: Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* **55**, 151-170.
- Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE, 2006: Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* **65**, 178-191.
- Feltrin C, Forell F, Santos LC, Rodrigues JL, 2006: *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by HMC using a modified WOW culture system. *Reprod Fertil Dev* **18**, 126.
- Fissore RA, Smyth J, Kurokawa M, Collas P, 2002: Activation of mammalian oocytes. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds), *Principles of Cloning*. Academic Press San Diego, pp. 21-45.
- Foot RH, 2002: Historical perspective. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds), *Principles of Cloning*. Academic Press San Diego, pp. 3-18.
- Forsberg EJ, Strelchenko NS, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsythe TM, Golueke PJ, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pace MM, Pfister-Genskow M, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD, 2002: Production of cloned cattle from *in vitro* systems. *Biol Reprod* **67**, 327-333.
- Freshney RI, 2000: Differentiation. In: Freshney RI (ed.), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. NY: Wiley-Liss, pp. 259-267.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G, 2003a: A cloned horse born to its dam twin. *Nature* **424**, 635.
- Galli C, Lagutina I, Lazzari G, 2003b: Introduction to cloning by nuclear transplantation. *Cloning & Stem Cells* **5**, 223-232.
- Gao, S.; McGarry, M.; Latham, K.E.; Wilmut, I. Cloning of mice by nuclear transfer, 2003: *Cloning & Stem Cells* **5**, 287-294.
- Gao T, Zheng J, Xing F, Fang H, Sun F, Yan A, Gong X, Ding H, Tang F, Sheng HZ, 2007: Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Cell Res* **17**, 135-150.
- Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL, 2004: Birth of african wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* **6**, 247-258.

- Haig D, Graham C, 1991: Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell* **64**, 1045-1046.
- Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Korfiatis NA, Tecirlioglu RT, Downie S, Williamson M, French AJ, 2006: Production of a clone calf using zona-free serial nuclear transfer. *Theriogenology* **65**, 424-440.
- Han YM, Kang YK, Koo DB, Lee KK, 2003: Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology* **59**, 33-44.
- Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP, 2002: Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* **66**, 6-13.
- Hill JR, Chavatte-Palmer P, 2002: Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds), *Principles of Cloning*, Amsterdam and others, Academic Press, pp 247-266.
- Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, Edwards JF, Hooper NL, Miller NW, Thompson JA, Looney CR, Westhusin ME, Robl JM, Stice SL, 1999: Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* **51**, 1451-1465.
- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME, 2000: Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* **63**, 1787-1794.
- Hochedlinger K, Jaenisch R, 2002: Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 741-748.
- Hochedlinger K, Jaenisch R, 2006: Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* **441**, 1061-1067.
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout III WM, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R, 2001: Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* **293**, 95-97.
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R, 2002: Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 12889-12894.

- Ju B, Huang H, Lee KY, Lin S, 2004: Cloning zebrafish by nuclear transfer. *Methods Cell Biol* **77**, 403-411.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM, 2001: Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature Genet* **28**, 173-177.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y, 1998: Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* **282**, 2095-2097.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y, 2000: Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* **120**, 231-237.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC, 2007: Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* **9**, 130-137.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM, 2002: Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* **67**, 487-492.
- Lai L, Prather RS, 2003: Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning & Stem Cells* **5**, 233-241.
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P, 2000: Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* **2**, 79-90.
- Lee BC, Kim MK, Jang G, Ju Oh H, Yuda F, Kim HJ, Shamim MH, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS, 2005: Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* **436**, 641.
- Li N, Wells DN, Peterson AJ, Lee RSF, 2005: Perturbations in the biochemical composition of fetal fluids are apparent in surviving bovine somatic cell nuclear transfer pregnancies in the first half of gestation. *Biol Reprod* **73**, 139-148.
- Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF, 2006: Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol* **293**, 439-448.
- Liu L, Keefe DL, 2000: Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* **62**, 1828-1834.

- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka Jr J, Cappai P, Clinton M, 2001: Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotech* **19**, 962-964.
- Loi P, Clinton M, Vackova I, Fulka Jr J, Feil R, Palmieri C, Salda LD, Ptak G, 2006: Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. *Theriogenology* **65**, 1110-1121.
- Misica-Turner PM, Oback FC, Eichenlaub M, Wells DN, Oback B, 2007: Aggregating embryonic but not somatic nuclear transfer embryos increases cloning efficiency in cattle. *Biol Reprod* **76**, 268–278.
- Moore T, 2001: Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. *Reproduction* **122**, 185-193.
- Oback B, Wells DN, 2003: Cloning cattle. *Cloning & Stem Cells* **5**, 243-256.
- Oback B, Wells DN, 2007: Donor cell differentiation, reprogramming, and cloning efficiency: elusive or illusive correlation? *Mol Reprod Dev* **74**, 646–654.
- Oback B, Wiersema AT, Gaynor P, Laible G, Tucker FC, Oliver JE, Miller AL, Troskie HE, Wilson KL, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, McMillan V, Tervit HR, Wells DN, 2003: Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning & Stem Cells* **5**, 3-12.
- Palmieri C, Loi P, Reynolds LP, Ptak G, Salda D, 2007: Placental abnormalities in ovine somatic cell clones at term: a light and electron microscopic investigation. *Placenta* **5-6**, 1-8.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH, First NL, 1986: Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* **25**, 591-600.
- Pedersen HG, Schmidt M, Sangild PT, Strobecch L, Vajta G, Callesen H, Greve T, 2005: Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. *Mol Cell Endocrinol* **234**, 137–143.
- Peura TT, Lewis IM, Trounson AO, 1998: The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. *Mol Reprod Dev* **50**, 185-191.
- Peura TT, 2003: Improved in vitro development rates of sheep somatic cell nuclear transfer embryos by using a reverse-order zona-free cloning methods. *Cloning Stem Cells* **5**, 13-24.

- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dal Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS, 2000: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**, 86-89.
- Powell AM, Talbot NC, Wells KD, Kerr DE, Pursel VG, Wall RJ, 2004: Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* **71**, 210-216.
- Reik W, Dean W, Walter J, 2001: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093.
- Reik W, Santos F, Dean W, 2003: Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* **59**, 21-32.
- Renard JP, Chastant S, Chesné P, Richard C, Marchal J, Cordonnier N, Chavatte P, Vignon X, 1999: Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. *The Lancet* **353**, 1489-1491.
- Rudenko L, Matheson JC, Adams AL, Dubbin ES, Greenlees KJ, 2004: Food consumption risks associated with animal clones: what should be investigated? *Cloning Stem Cells* **6**, 79-93.
- Schor SL, Schor AM, 1987: Clonal heterogeneity in fibroblast phenotype: Implications for the control of epithelial-mesenchymal interactions. *BioEssays* **7**, 200-204.
- Schurmann A, Wells DN, Oback B, 2006: Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear transfer and result in cloned offspring. *Reproduction* **132**, 839-848.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rigula J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M, 2002: A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* **415**, 859.
- Sun YH, Chen SP, Wang YP, Hu W, Zhu ZY, 2005: Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) enucleated eggs. *Biol Reprod* **72**, 510-515.
- Tagarelli A, Piro A, Lagonia P, Tagarelli G, 2004: Hans Spemann. One hundred years before the birth of experimental embryology. *Anat Histol Embryol* **33**, 28-32.
- Tecirlioglu RT, Cooney MA, Lewis IM, Korfiatis NA, Hodgson R, Ruddock NT, Vajta G, Downie S, Trounson AO, Holland MK, French AJ, 2005: Comparison of two approaches to nuclear transfer in the bovine: hand-made cloning with modifications and the conventional nuclear transfer technique. *Reprod Fertil Dev* **17**, 573-585.

- Teissié J, Eynard N, Gabriel B, Rols MP, 1999: Electroporation of cell membranes. *Adv Drug Del Rev* **35**, 3–19.
- Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO, 2001: Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed Online* **3**, 25-29.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H, 2000: New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* **55**, 256-264.
- Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO, 2001: Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning* **3**, 89-95.
- Vajta G, Lewis IM, Kortiatas NA, Travers RL, Trounson AO, 2002: Bovine somatic cell cloning without micromanipulators: optimization of certain parameters. *Reprod Fertil Dev* **57**, 453.
- Vajta G, Lewis IM, Trounson AO, Purup S, Maddox-Hyttel P, Schmidt M, Pedersen HG, Greve T, Callesen H, 2003: Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. *Biol Reprod* **68**, 571-578.
- Vajta G, Krugh PM, Mtango NR, Callesen H, 2005: Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod Fertil Dev* **17**, 97-112.
- Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G, 2002: Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology* **45**, 91-94.
- Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P, Thomsen PD, 2002: Bovine embryos contain a higher proportion of polyploidy cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol Reprod Dev* **62**, 483-488.
- Wakamatsu Y, Ozato K, 2002: Activation of mammalian oocytes. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (eds), *Principles of Cloning*. Academic Press San Diego, pp. 287-299.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R, 1998: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394**, 369-374.

- Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF, 1996: The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* **45**, 111-120.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR, 1999: Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* **60**, 996-1005.
- Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, L'Huillier PJ, Tervit HR, Oback B, 2003: Coordination between donor cell type and cell cycle improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* **59**, 45-59.
- Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B, 2004: The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells* **6**, 101-110.
- Westhusin ME, Collas P, Marek D, Sullivan E, Stepp P, Pryor J, Barnes F, 1996: Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not the quantity of embryos produced by *in vitro* fertilization and nuclear transplantation. *Theriogenology* **46**, 243-252.
- Willadsen SM. 1986: Nuclear transplantation in sheep embryos, *Nature* **320**, 63-65.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS, 1997: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813.
- Wilson JM, Williams JD, Bondioli KR, Looney CR, Westhusin ME, McCalla DF, 1995: Comparison of birth weight and growth characteristics of bovine calves produced by nuclear transfer (cloning), embryo transfer and natural mating. *Anim Reprod Sci* **38**, 73-83.
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ, 2003: A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* **301**, 1063.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carwath JW, Niemann H, 1998: Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J Reprod Fertil* **112**, 387-398.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carwath JW, Niemann H, 1999: Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev* **53**, 8-18.

- Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H, 2001: Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod* **65**, 309-317.
- Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X, 2002: Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature Genet* **31**, 216-220.
- Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T, 2007: Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genet* **39**, 295-302.
- Young LE, Sinclair KD, Wilmut I, 1998: Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* **3**, 155-163.
- Zhou Q, Renard JP, Friec G LE, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J, 2003: Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* **302**, 1179.