



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**“Modificaciones epigenéticas en
clonación porcina”**

Autor: Buemo, Carla Paola

Licenciada en Genética

Universidad Nacional de Misiones

Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director: Dr. Salamone, Daniel Felipe

Director Adjunto: Dr. Fernandez y Martín, Rafael

Consejera de estudios: Dra. Carina Rivolta

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción

Facultad de Agronomía

Universidad de Buenos Aires, Argentina

2016

“A mi familia”

1. Agradecimientos

A mi director y amigo, el Dr. Daniel Salamone, por darme la posibilidad de aprender de él, por la confianza, el cariño, los consejos y toda la enseñanza que brindó durante éstos años. No me llevo solo el aprendizaje académico y profesional sino que me llevo un amigo que voy a mantener por el resto de mi vida. Me siento orgullosa de haber formado parte de su equipo de trabajo.

A mi mamá y mi papá, porque creyeron en mí cuando desde Misiones quise viajar a realizar mi sueño de realizar el doctorado. Por su apoyo incondicional en todas mis decisiones y por brindarme todo lo que necesité para llegar a ser Licenciada en genética y ahora Doctora de la Universidad de Buenos Aires. A mis hermanas, por compartir a la distancia y en visitas cada logro y cada día de estos años de doctorado.

Al Dr. Andrés Gambini, amigo y compañero fiel a lo largo de todo el doctorado. Su enseñanza, su tiempo, su paciencia infinita, sus chistes y alegrías, su cariño, sus ganas, me animaron a seguir y a ver que todo se puede lograr con esfuerzo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, gracias por el grupo humano tan lindo que transformó las horas de trabajo, en horas con amigos. Horas que no eran difíciles de pasar porque con amigos todo se hace mas llevadero. Por los consejos, la compañía, la amistad y el cariño que va a perdurar toda la vida: Nati, Romi, Inés, Lucía, Vir, Euge, Geraldina, Belén, Mariana, Olinda, Adrian e Isabel que ya no está en el grupo.

A Norma Bravo, por ser mi sostén, mi compañera, mi amiga y mamá postiza en todos estos años de estar lejos de la familia propia.

Al Dr. Rafael Fernández-Martín porque durante mis dos primeros años me enseñó todo sobre biología molecular y me levantó el ánimo muchas veces cuando me sentía desilucionada de la ciencia.

A Maxi que me acompañó durante los 5 años de doctorado, me apoyó e incentivó a que haga lo que me hacía feliz.

Al veterinario Dr. San Martín, del Frigorífico la Pompeya, que generosamente me cedió el material biológico con el cual trabajé durante todo el doctorado, con paciencia respondió cada semana al pedido de material para poder llevar a cabo los experimentos.

A Patricia Masanet, por sus charlas, sus mates y su compañía diaria a las mañanas.

A mis amigas de la vida, de la carrera de grado y del doctorado, Dani, Tini y Ale que supieron contenerme cuando sentía que la ciencia y la investigación no era para mí. Me acompañaron y me acompañan hasta el día de hoy.

Al CONICET que financió mi tesis doctoral y me dio la posibilidad de poder terminar mi doctorado.

Al Dr. Philippe Collas, de la Universidad de Oslo, Noruega, que me abrió las puertas de su laboratorio y me permitió terminar experimentos importantes de mi tesis doctoral.

Al grupo de amigos del GIGA, de Posadas, Misiones, por su apoyo y su compañía: Bety, Lili; Majo, Anibal y a los jefes Carina Argüelles, Marcos Miretti y Julian Ferrera, que me permitieron ocupar parte de mi tiempo de trabajo para terminar la escritura de la tesis.

A mis amigas de Posadas, Ceci y Flor que ayudaron en la escritura del primer paper de mi tesis.

A mi compañero y amor, Javier, que es el que me bancó durante la difícil tarea de la escritura de la tesis.

2. Tabla de Contenidos

1.	Agradecimientos	3
2.	Tabla de Contenidos	5
3.	Índice de Tablas	10
4.	Índice de Figuras	11
5.	Abreviaturas.....	13
6.	Resumen	16
7.	Abstract.....	18
8.	Introducción General	20
8.1.	Clonación en animales	20
8.2.	Anatomía, fisiología y ciclo estral porcino.	22
8.3.	Clonación porcina	24
8.4.	Limitantes en clonación porcina	27
8.5.	Agregación embrionaria	28
8.6.	Metilación y acetilación de la cromatina.	31
8.7.	Modificaciones epigenéticas en SCNT.	37
8.8	Descripción de la tesis	40
9.	Hipótesis:.....	41
9.1.	Objetivo general:.....	41
9.2.	Objetivos particulares:	41
10.	Introducción capítulo I.....	44
11.	Materiales y Métodos capítulo I.....	48
11.1.	Medios y drogas.....	48
11.2.	Colecta, denudación y maduración de oocitos.....	48
11.3.	Activación	49

11.4. Cultivo embrionario in vitro	49
11.5. Agregación embrionaria	50
11.6. Medición y conteo de células de los embriones día 7.....	50
11.7. Fijación y detección de apoptosis celular mediante test de TUNEL.	50
11.8. Análisis estadístico	51
12. Resultados.....	53
12.1. Efectos de fármacos que modifican la epigenética embrionaria en el desarrollo in vitro de embriones partenogénicos porcinos.	53
12.2. Efectos de fármacos que modifican la epigenética embrionaria en el número de células de embriones partenogénicos porcinos.	53
12.3. Efectos de la agregación embrionaria en el desarrollo embrionario in vitro de embriones partenogénicos porcinos.	54
12.4. Efectos de la agregación embrionaria sobre el diámetro en embriones partenogénicos porcinos.	54
12.5. Efectos de la agregación embrionaria en la fragmentacion del ADN medido por la técnica de TUNEL en embriones partenogénicos porcinos.	55
13. Discusión capítulo I.....	63
14. Conclusión capítulo I.....	65
15. Introducción capítulo II.....	67
16. Materiales y Métodos capítulo II.....	70
16.1. Colecta, denudación y MIV de los oocitos	70
16.2. Enucleación.....	70
16.3. Obtención de explantos de tejido y cultivo in vitro de células somáticas	70
16.4. Transferencia nuclear y reconstrucción embrionaria.....	71
16.5. Activación	71
16.6. Agregación embrionaria y cultivo in vitro hasta el día 7.....	72
16.7. Medición de los embriones	72

16.8. Fijación y detección de apoptosis celular mediante test de TUNEL en embriones clones.	72
16.9. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real .	72
16.10. Diseño de cebadores.	73
16.11. Producción , transporte y transferencia de los embriones clonados.	75
16.12. Análisis estadístico	75
17. Resultados capítulo II	76
17.1. Efectos de la agregación embrionaria en el desarrollo in vitro de embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.	76
17.2. Efectos de la agregación embrionaria sobre el diámetro en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.	76
17.3. Efectos de la agregación embrionaria sobre el número de células en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.	77
17.4. Efectos de la agregación embrionaria en la fragmentación del ADN medido por la técnica de TUNEL en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.....	77
17.5. Efectos de la agregación embrionaria sobre la expresión de genes de pluripotencia en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.....	77
17.6. Transferencia embrionaria de clones porcinos agregados 3x	78
18. Discusión II	89
19. Conclusiones.....	93
20. Introducción capítulo III.....	95
21. Materiales y métodos capítulo III.....	98
21.1. Colecta, denudación y MIV de los oocitos	98
21.2. Enucleación.....	98
21.3. Obtención de explantos de tejido y cultivo in vitro de células somáticas	98
21.4. Transferencia nuclear y reconstrucción embrionaria.....	98
21.5. Activación.....	98
21.6. Agregación embrionaria y cultivo in vitro hasta el día 7.....	98

21.7. Medición de los embriones	99
21.8. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real .	99
21.9. Diseño de cebadores.	99
21.10. Inmunofluorescencia de histonas H3Kme1 y H3K27ac.....	99
21.11. Análisis de metilación bisulfito del ADN de genes implicados en el desarrollo embrionario temprano.....	100
21.11.1. Purificación de ADN genómico.	100
21.11.2. Conversión de ADN a ADN bisulfito.	101
21.11.3. Amplificación de Productos de PCR de los genes <i>Oct4</i> y <i>Dnmt1</i> , purificación de bandas de geles de agarosa y clonado de los fragmentos obtenidos. .	103
21.11.4. Secuenciación de los productos de PCR y análisis de secuencias.	104
22. Resultados capítulo III.....	106
22.1. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre el desarrollo in vitro de embriones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.....	106
22.2. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre el diámetro y el número de células, en embriones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.	106
22.3. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre la expresión de genes de pluripotencia en embriones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.	107
22.4. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre la acetilación (H3K27ac) y la metilación de histonas (H3K4 me1) en tres tipos de embriones porcinos (día 7).	107
22.5. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre la metilación de genes importantes para el desarrollo embrionario clones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.	108
23. Discusión capítulo III	118
24. Conclusiones capítulo III.....	122
25. Conclusiones Generales.....	124

26. Perspectivas	126
27. Referencias Bibliográficas.....	127

3. Índice de Tablas

Tabla 1: Efecto de fármacos que modifican la epigenética embrionaria en el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones partenogénicos.....	56
Tabla 2: Efectos de la agregación embrionaria sobre el desarrollo embrionario <i>in vitro</i> en embriones partenogénicos porcinos.....	57
Tabla 3: Efectos de la agregación embrionaria sobre el diámetro de los blastocistos partenogénicos porcinos.	58
Tabla 4: Evaluación de los niveles de fragmentación del ADN mediante técnica de TUNEL en embriones partenogénicos agregados y no agregados (día 7).	58
Tabla 5: Secuencias de cebadores y condiciones de RT-qPCR.	74
Tabla 6: Efecto de la agregación embrionaria sobre el desarrollo <i>in vitro</i> en embriones porcinos clonados.	79
Tabla 7: Efecto de la agregación embrionaria sobre el diámetro de embriones clonados (día 7). Diámetro de blastocistos provenientes de clones agregados y no agregados al día 7.....	80
Tabla 8: Índice de apoptosis de embriones de cerdos agregados y no agregados en el estado de blastocistos (día 7).....	81
Tabla 9: Secuencias de cebadores y condiciones de RT-qPCR	105
Tabla 10: Efectos de 5 Aza + PD 0325901 en embriones porcinos clonados y agregados, cultivados <i>in vitro</i> hasta día 7.....	109
Tabla 11: Efectos de la agregación embrionaria y el uso de fármacos modificadores de la epigenética, en los diámetros de clones porcinos tratados y controles.....	110

4. Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo estral porcino.....	23
Figura 2. Muerte embrionaria y/o fetal y sus consecuencias.....	24
Figura 3. Esquema de la transferencia nuclear y la agregación embrionaria en porcinos.	31
Figura 4. Escenario hipotético relacionado con la actividad transcripcional embrionaria.	33
Figura 5. Hebras de ADN mostrando los dos principales componentes del código epigenético.....	36
Figura 6. Microfotografía de (A) ovarios de cerdas mostrando folículos de 3-6 mm con oocitos dentro, B) oocitos de cerdas rodeados por 3 o más capas de células del cúmulus.	59
Figura 7. Gráfico de barras representando número de células de embriones partenogénicos controles y tratados.....	59
Figura 8. Microfotografías de blastocistos de cerdos partenogénicos.....	60
Figura 9. Proceso de agregación en el sistema de micropozos en embriones partenogénicos porcinos.	61
Figura 10. Microfotografías de blastocistos de embriones partenogénicos porcinos expresando ADN fragmentado detectado con la técnica de TUNEL.....	61
Figura 11. Gráfico de barras mostrando niveles de apoptosis entre embriones partenogénicos agregados y no agregados.....	62
Figura 12. Número de células de blastocistos de cerdos clonados agregados y no agregados (día 7).	82
Figura 13: Índice de la apoptosis de blastocistos de cerdos clonados agregados y no agregado.....	82
Figura 14. Microfotografías de expresión de TUNEL de embriones porcinos producidos por SCNT (día 7).	83
Figura 15. Abundancia relativa de transcripción de los genes Oct4, Klf4, Nanog, Igf2, Cdx2, Dnmt1, Bcl-xl y gen Bax en blastocistos agregados porcinos (día 7) generados por SCNT.....	84
Figura 16. Transferencia embrionaria no quirúrgica de embriones clonados y agregados 3x.	86
Figura 17. Fotografías de transferencia embrionaria de clones porcinos.	87

Figura 18. Fotografía del aborto de embriones porcinos producidos por clonación (día 27).....	88
Figura 19: Vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).	97
Figura 20: Metilación del ADN. Muestra los cambios en la secuencia desde la conversión del ADN, pasando por la técnica de PCR y posterior secuenciación.	102
Figura 21. Gráfico de barras mostrando número de células en clones agregados controles y agregados tratados con drogas modificadoras de la epigenética.	111
Figura 22. Abundancia relativa de transcripción de los genes Oct4, Klf4, Nanog, Igf2, Cdx2, Mapk1, Bcl-xl y gen Bax en blastocistos agregados de cerdos (día 7) generados por SCNT y tratados con drogas modificadoras de la epigenética embrionaria.	112
Figura 23: Gráfico mostrando la distribución de la histona H3K27 ac.	114
Figura 24: Gráfico mostrando la distribución de la histona H3K4 me1.....	115
Figura 25: Muestra la diferencia en intensidad de marca de histonas H3K4me1 y H3K27ac.....	116
Figura 26: Gráficos de Metilación de <i>Oct 4</i> y <i>DNMT1</i>	117

5. Abreviaturas

%: Porcentaje

μl: Microlitro

μM: Micromolar

μs: Microsegundos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ATB: Antibiótico

5 Aza: 5 azacitidina, actúa inhibiendo la enzima ADN metiltransferasa y afecta la metilación del ADN.

Bax/ Bcl-XL: familias de proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis celular.

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CD: Corriente Directa

Cdx 2: gen que codifica para un factor de transcripción implicado en placentación.

cm: centímetros

CO₂: Dióxido de Carbono

COCs: Complejos cúmulus oocitos

CP: Corpúsculo Polar

DMAP: 6-Dimetilaminaminopurina

DMEM: Medio Eagle Dulbecco Modificado

DMSO: Dimetilsulfoxido

DNMT1: es una enzima llamada ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1, codificada por el gen DNMT1

DPBS: Solución Buffer Fosfato Dulbeccos

Enhancer: promotor génico

ERZF: Embriones Reconstituidos sin Zona Pelúcida

FAUBA: Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires

FIV: Fertilización *In vitro*

FSH: Hormona Folículo Estimulante

h/s: Hora/s

HDAC: Histonas deacetilasas

H3K4 me1:histona monometilada en la lisina 4, denota pérdida de metilación en enhancer

H3K27ac: histona monoacetilada en la lisina 27, denota pérdida de metilación en enhancer

Igf2: gen que codifica para factor de crecimiento insulínico tipo 2.

IP: Ioduro de Propidio

ITS: Insulina Trasferrina Selenio

Klf4: Factor de transcripción Klf4

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitogenos

MCI: Macizo Celular Interno

mg: Miligramos

MIV: Maduración *In vitro*

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

NaCl: Cloruro de Sodio

NC: No corresponde

Nanog: gen fundamental en la pluripotencia de las células madre de los embriones

° C: Grados Centígrados

Oct-4: Factor de transcripción Oct-4

Oocito-ZF: Oocito sin zona pelúcida

PD: droga modificadora epigenética (PD 0325901), es un inhibidor de la vía MAPK

PVA: Polivinil Alcohol

rpm: Revoluciones por minuto

SCNT: Transferencia Nuclear con Células Somáticas

SFB: Suero Fetal Bovino

SOF: Fluido Oviductal Sintético

TALP-H: Tirodes Albumina Lactato Piruvato con Hepes

TCM-199: Medio de Cultivo de Tejidos 199

TSA: Tricostatin A

TUNEL: Método basado en una transferasa terminal de dUTP marcado para detectar ADN fragmentado presente en apoptosis. - Terminal deoxinucleotidyl transferase mediate -.

UV: Luz ultravioleta

Ac valp: ácido valproico

v/v: Volumen en Volumen

WOW: Sistema de cultivo de micropozos. Del ingles: "Well of Well"

ZP: Zona Pelúcida

6. Resumen

“Modificaciones epigenéticas en clonación porcina”

Palabras Claves: clonación en porcinos, agregación embrionaria, reprogramación, modificaciones epigenéticas.

La técnica de transferencia de células somáticas (SCNT) o clonación animal, consiste en transferir el núcleo de una célula somática donante dentro del citoplasma de un ovocito al que se le ha eliminado previamente su núcleo, con el objetivo de obtener la maquinaria necesaria para generar un embrión. Sin embargo, es una técnica altamente ineficiente y requiere de mejoras.

La clonación tiene diversas aplicaciones en producción animal. No obstante, siguen sin estar del todo claro los mecanismos de remodelación y reprogramación nuclear que debe sufrir el embrión para que llegue a ser viable. Una variedad de factores probablemente contribuyen a esta ineficiencia, desde la calidad de los oocitos hasta el tipo de célula donante. El fracaso para reprogramar el núcleo trasplantado adecuadamente podría deberse a la deficiente impronta somática en los núcleos del embrión reconstituido. Para resolver las fallas en la reprogramación se recurrió a la técnica de agregación embrionaria y al uso de drogas modificadoras de la epigenética embrionaria.

Al principio del trabajo se utilizó embriones partenogénicos, en ellos se probaron fármacos que inducen modificaciones en la metilación y la acetilación de histonas, obteniéndose una combinación de drogas (5 Azacitidina 1 μ M + PD0325901 1 μ M) que demostró una tendencia a aumentar el desarrollo embrionario *in vitro*. Posteriormente se prosiguió a realizar la agregación embrionaria, generándose dos grupos: el control (1x) y los agregados (3x), en los que tres embriones reconstituídos formaban parte del mismo embrión. En los embriones agregados aumentaron las tasas de desarrollo *in vitro* no implicando un mayor uso de oocitos, se incrementó el tamaño medido en diámetro embrionario, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el número de células ni en la apoptosis celular o fragmentación del ADN entre ambos grupos.

Cuando se pasó a trabajar en los clones porcinos, la agregación embrionaria en la fase de una célula demostró que no fueron necesarios oocitos adicionales para

producir mayores tasas de blastocistos obteniéndose un aumento en el diámetro y en el número de células embrionarias, mientras que el nivel de apoptosis fue estadísticamente más bajo en los embriones agregados 3x. Ésto podría demostrar una compensación parcial causada posiblemente por la combinación de tres embriones epigenéticamente diferentes que presentaban una mayor expresión de genes de pluripotencia. Por otra parte, al mejorar desarrollo *in vitro*, número de células, el diámetro embrionario y disminuir los niveles de apoptosis se estaba mejorando la reprogramación embrionaria, obteniéndose embriones de mejor calidad.

En el último capítulo de la tesis se combinó el método de agregación embrionaria y los fármacos inductores de modificaciones epigenéticas en el embrión temprano. Se trató de abarcar varios aspectos que involucran la reprogramación nuclear mostrando expresión génica en relación a marcas de histonas y a metilación del ADN. Como resultado, el grupo 3x tratado con las drogas presentó un aumento en el tamaño embrionario, sin implicar cambios en el número celular. También presentó un incremento en la expresión génica en genes claves para el desarrollo de trofoblasto, implicados en la placentación embrionaria, al igual que en genes antiapoptóticos y genes implicados en la vía MAPK. Otro de los cambios visualizados fue la redistribución de la histona H3 acetilada en la lisina 27 (H3K27ac). Ésta se ubicó preferentemente en la periferia nuclear. La histona H3 con un grupo metilo en la lisina 4 (H3K4me1) no modificó su distribución dentro del núcleo, mostrando una distribución homogénea. Respecto a la metilación del ADN tanto el gen que codifica para *Oct4* como el que codifica para la enzima *Dnmt1* presentaron una desmetilación marcada, mostrando que la droga 5 Azacitidina, que actúa sobre la metilación, estaba generando cambios en los embriones estudiados.

Como conclusión, éste trabajo generó un aporte al estudio de la reprogramación embrionaria que deben sufrir los embriones provenientes de clonación, abarcando distintas variables que afectan el proceso de reprogramación.

7. Abstract

“Epigenetic modification in porcine cloning”

Key words: porcine cloning, embryo aggregation, reprogramming, epigenetic modification.

The somatic cells nuclear transfer technique (SCNT) or animal cloning, involves transferring the nucleus of a somatic donor cell into the cytoplasm of an oocyte that has been previously removed its nucleus, in order to obtain the necessary machinery to generate an embryo. However, it is a highly inefficient method and requires technical improvements.

Cloning has various applications in animal production. However, is still not entirely clear the mechanisms of nuclear remodeling and reprogramming that must suffer to become an embryo. A variety of factors probably contribute to this inefficiency, from the quality of oocytes to the type of donor cell. The failure to adequately reprogram the transplanted nucleus could be due to a deficient imprinting in somatic nuclei reconstituted embryo. To resolve the reprogramming failures we utilized in embryos the embryo aggregation technique and applied drugs that modify the epigenetic.

At the beginning of this study, partenogenetics embryos were used with these drugs that induce changes in methylation and histone acetylation, obtaining a combination of drugs (1 uM 5 Azacitidine + 1 uM PD0325901) which showed a tendency to increase in vitro embryo development. Subsequently, we continued to perform embryo aggregation, generating two groups: (1x) control and (3x) aggregates. The aggregated embryos increased in vitro development rates not involving a greater use of oocytes, also increased size measured by embryonic diameter, however, no statistically differences were found in the number of cells, apoptosis cell or DNA fragmentation between both groups.

When we worked in swine clones, embryo aggregation in the one cell stage showed that were not required additional oocytes to produce higher rates of blastocyst resulting in an increase in the diameter and number of embryonic cells, while the level apoptosis was statistically lower in 3x aggregates embryos . This could prove partial compensation possibly caused by the combination of three different epigenetically

embryos that had higher pluripotency gene expression . Moreover, by improving in vitro development, number of cells, embryonic diameter and decrease levels of apoptosis was improving embryonic reprogramming, obtaining better quality embryos.

In the last chapter of this thesis, we combined the embryo aggregation method and the use of drugs that induce epigenetic modifications in the early embryo development. This was encompass several aspects involving nuclear reprogramming, gene expression, showing marks relative to histones and DNA methylation. As a result, the treated 3x group showed an increase in embryonic size without involving changes in cell number. Also it showed an increase in gene expression related to trophoblast, involved in embryonic placentation, as in antiapoptotic genes and in the MAPK pathway genes involved.

Another change was displayed in the redistribution of acetylated histone H3 lysine 27 (H3K27ac). This is preferably located in the nuclear periferia. Histone H3 with a methyl group at lysine 4 (H3K4me1) did not modify their distribution within the core, showing a homogeneous distribution. Regarding DNA methylation, Oct4 and Dnmt1 presented a marked demethylation, showing that the drug 5 Azacitidine, acting on methylation, generated changes in the embryos.

In conclusion, this work generated a contribution to the study of embryonic reprogramming that must suffer embryos during cloning, covering different variables that affect the reprogramming process.

8. Introducción General

8.1. Clonación en animales

Desde el comienzo de la civilización y más específicamente a partir del período Neolítico el hombre comenzó a utilizar estrategias para incrementar las cualidades productivas de los animales, sin prever el posterior impacto sobre la selección genética, la producción y el ambiente. La reproducción sexual por cruza, entre individuos fenotípicamente superiores, fue la estrategia que dominó la producción animal durante un largo período de tiempo. Sin embargo, en los últimos años, nuevas tecnologías que incrementan la capacidad reproductiva de los ejemplares de valor, como la inseminación artificial, la fertilización *in vitro* y la transferencia de embriones, han permitido acelerar el mejoramiento genético animal. La clonación es la técnica más extrema de estas tecnologías y tiene su antecedente con el nacimiento de la oveja Dolly, en el año 1997, producida por el grupo de Wilmut y col., quienes obtuvieron el primer mamífero clonado a partir de una célula somática adulta.

La especie porcina juega un papel importante como modelo para estudiar las enfermedades en humanos. Éstos poseen la ventaja de reproducirse rápidamente y tener grandes camadas por lo que sería posible producir rápidamente un gran número de ejemplares para usarlos por ejemplo en xenotransplantes, también llamado trasplante heterólogo. Consiste en el trasplante de células, tejidos u órganos de una especie a otra. La producción *in vitro* de embriones porcinos, la cual incluye la maduración *in vitro*, fecundación *in vitro*, y el cultivo *in vitro*, genera crías viables, aunque con tasas de éxito mucho más bajas que en el ganado bovino. Los principales problemas son la maduración citoplasmática de los oocitos, una alta proporción de poliespermia en la fertilización y una baja proporción de blastocistos que, además, se caracterizan por un bajo número de células, que frenan su desarrollo *in vivo* después de las transferencias (Niemann y col., 2001).

La técnica de clonación o transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, del inglés: *somatic cell nuclear transfer*) consiste en transferir el núcleo de una célula dentro del citoplasma de un oocito al que se le ha eliminado previamente el núcleo. Una vez reconstituida la estructura, ésta requiere la activación embrionaria, proceso que incluye un tratamiento físico o químico que induce el comienzo de la síntesis de ADN y

el reinicio de las divisiones mitóticas. Es una forma de reproducción asexual en la que por definición no existe la fecundación. La célula dadora o carioplasto puede ser tomada de varios tejidos pero típicamente derivan de una muestra de tejido conectivo subcutáneo. De una pequeña muestra de tejido pueden obtenerse grandes cantidades de células que se multiplican *in vitro* y se pueden criopreservar en el laboratorio.

El hecho de que un procedimiento tan complejo funcione es absolutamente increíble y es el resultado de décadas de investigación pionera. Una de las formas naturales de producción de clones son los gemelos idénticos y uno de los ejemplos más notables e intrigante es el de los armadillos, dado que todos los descendientes de una hembra, en una misma camada, son clones derivados de un mismo cigoto (Prodöhl y col., 1996).

Los primeros intentos de clonación en mamíferos fueron realizados por Willadsen y col., 1986, utilizando blastómeras de embriones tempranos ovinos como células embrionarias donantes de núcleos. Sin embargo, fue con el nacimiento de la oveja Dolly que se demostró que células somáticas adultas podían también ser utilizadas para obtener animales viables. Desde ese momento, se comenzó a clonar diversos animales como ratones (Wakayama y col., 1998), bovinos (Kato y col., 1998), cabras (Baguisi y col., 1999), cerdos (Onishi y col., 2000; Polejaeva y col., 2000) y equinos (Woods y col., 2003; Galli y col., 2003).

La especie porcina resulta ser un modelo interesante para el estudio de enfermedades humanas y para xenotransplantes, tanto por su similitud fisiológica como anatómica con nuestra especie (Yao y col., 2016). Su uso en clonación terapéutica tendría como fin último alargar la vida de aquellos pacientes que están esperando un órgano (Butler y col., 2016). Además, la producción de embriones porcinos clonados puede ser usada para producir células madres, que posteriormente podrían servir para reparar diversas patologías humanas (Kim y col., 2016). Con respecto a la ganadería, la clonación constituye una herramienta importante porque posibilitaría incrementar el número de animales con una buena genética pre-existente, incluso teniendo la posibilidad obtener copias genéticas idénticas de animales muertos recientemente por causas naturales, por algún tipo de patología o incluso por accidentes, mediante células criopreservadas. A pesar de que actualmente es una técnica con muy baja eficiencia, constituye una solución alternativa a problemas reproductivos.

En otras situaciones en las que por diferentes circunstancias no genéticas, los animales se encuentran incapacitados para dejar descendencia (castrados, neoplasias, degeneraciones, atrofas, etc.), la clonación es usada como herramienta que permite producir animales genéticamente idénticos.

8.2. Anatomía, fisiología y ciclo estral porcino.

El cerdo (*Sus scrofa doméstica*) es una subespecie de mamífero artiodáctilo de la familia Suidae. La gestación dura 114 días o tres meses, tres semanas y tres días y pueden tener camadas numerosas. Las cerdas llegan a la pubertad entre los 5 y los 7 meses de edad y los machos entre los 6 y los 9 meses. Sin embargo, es recomendable esperar hasta el segundo celo en hembras y los diez meses en machos para utilizarlos con fines reproductivos. Las hembras son poliéstricas continuas o típicas, es decir, su ciclo estral se repite durante todo el año. El ciclo estral tiene una duración de 21 días y el celo dura de 8 a 48 horas. La ovulación tiene lugar en la segunda mitad del celo (Figura 1).

Una vez producida la fecundación, al día 10 u 11 se inician los signos de gestación, un fallo en este momento resultará en un retorno retrasado al celo. La implantación del embrión comienza durante los días 12-14 y se requiere un mínimo de 4-5 embriones para que continúe la gestación. Si ésta falla en este momento, el retorno al celo se retrasa 23-38 días. Si la gestación es mantenida hasta que se completa la implantación y fracasa posteriormente con reabsorción, la cerda se vuelve pseudogestante por un período variable y luego no gestante (Henricks y col., 1972; Parvizi y col., 1976; Howard y col., 1982) (Figura 2).

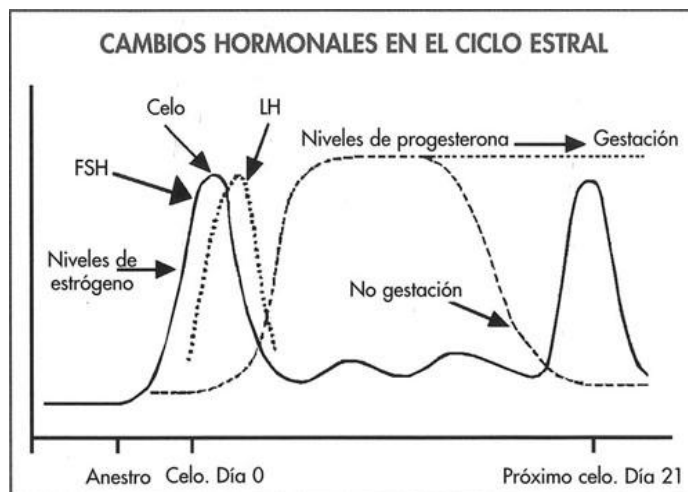


Figura 1. Ciclo estral porcino. Figura modificada de (<http://www.elsitioporcino.com>).

Desde la cubrición hasta el día 21 se debe mantener a la cerda en contacto cercano con el verraco, sus feromonas son importantes durante toda la gestación. Se debe observar a diario a las cerdas para detectar el momento exacto del celo, particularmente en los 18-22 días postcubrición. La ausencia de celo indicará que comenzó una gestación. A partir de allí se debe realizar una detección diaria controlando la vulva para valorar un posible engrosamiento desde los días 14-21 y desde esa edad en adelante para vigilar la presencia de descargas durante toda la gestación. Durante los días 28-35 postcubrición puede realizarse una prueba usando un equipo Doppler y repetirse dependiendo de los resultados una semana después.

Si la gestación prosigue va a ser mantenida como consecuencia de los cambios hormonales iniciados por la implantación de los embriones alrededor del día 14. Estos cambios permiten a los cuerpos lúteos, en los ovarios, desarrollarse y producir la hormona encargada de mantener la gestación (progesterona). La presencia de los cuerpos lúteos es necesaria para mantener la gestación a lo largo de todo el período. La pérdida o el fallo de los cuerpos lúteos, por cualquier causa, inicia el proceso de parto, provocando la reabsorción o si está cerca de la fecha se desencadenará un parto prematuro.

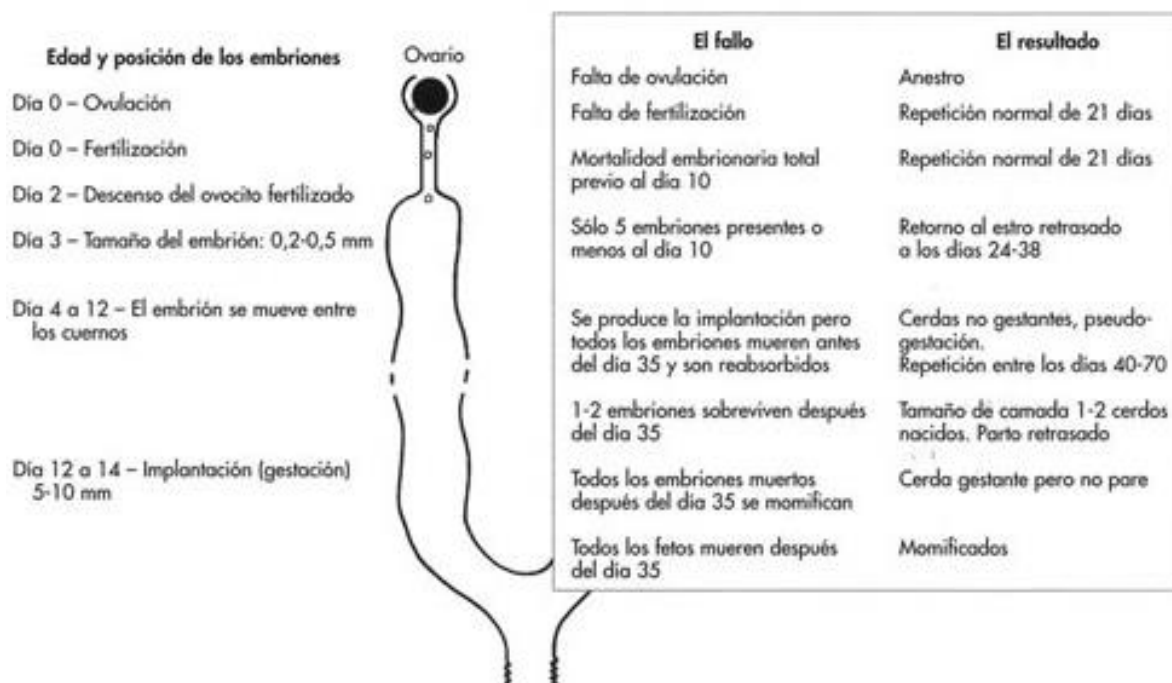


Figura 2. Muerte embrionaria y/o fetal y sus consecuencias.

8.3. Clonación porcina

El cerdo es un modelo animal que podría utilizarse para el estudio de enfermedades humanas y para el desarrollo de nuevas terapias, debido a sus similitudes genéticas, anatómicas y fisiológicas con nuestra especie (Prather y col., 2000, Luo y col., 2012 y Nagashima y col., 2012). Los cerdos domésticos son muy fértiles y relativamente baratos de mantener. Además comparten similitudes importantes con los seres humanos con respecto a los sistemas cardiovascular, respiratorio y gastrointestinal (Bode y col., 2010). En consecuencia, se están convirtiendo en uno de los más importantes modelos de animales grandes para ensayos preclínicos de fármacos preventivos o terapéuticos (Liu y col., 2008), de pruebas de toxicidad y regulación (Forster y col., 2010), de patogénesis de enfermedades humanas (Rogers y col., 2008) y de genómica funcional (Wimmers y col., 2010).

La producción *in vitro* (PIV) de embriones porcinos alcanzó a un nivel aceptable recién a principios de 1990, con la aparición de los sistemas de PIV de embriones porcinos y tasas confiables de formación de blastocistos. Eso posibilitó utilizar cada vez más a los cerdos como material de investigación para el desarrollo de tecnologías

reproductivas asociadas, como SCNT y criopreservación de embriones (Nottle y col., 1999; Pratt y col., 2006).

Si bien, el primer cerdo clonado (Prather y col., 1989) se realizó mediante el uso de blastómeras de embriones de cuatro células como células donantes, la carrera para producir cerdos clonados por SCNT culmina muchos años después con son varios los grupos que informaron este logro en el año 2000 (Onishi y col., 2000, Polejaeva y col., 2000 y Betthausen y col., 2000). Los 5 primeros cerdos clonados nacieron en Marzo del año 2000 y fueron producidos por la compañía PPL Therapeutics de Escocia. Fueron llamados de Millie, Cristha, Aléxis, Carrel y Dotcom, en honor a la llegada del nuevo milenio, a Christian Barnard (Médico que logró el primer trasplante del corazón hace mas de 40 años), a Aléxis Carrel (premio Nobel de medicina 1912) y a la nueva era de la internet, respectivamente. Pocos días después, en Marzo del 2000, investigadores del Instituto Nacional de la Industria Animal de Tsukuba-Japón, anuncian el nacimiento de una cerda clonada, a partir de las células fetales de cerdo. Recibió el nombre de Xena y fue la única sobreviviente de 110 embriones producidos por SCNT. Lo mismo ya había pasado previamente, en 1996, cuando la oveja Dolly había sido la única sobreviviente de 270 embriones producidos por clonación. Eso demuestra, que esta técnica, a pesar de las posibilidades que brinda, necesita todavía de nuevas mejoras, porque su índice de éxito continúa siendo muy bajo. La producción de descendencia clonada en los cerdos se encuentra entre el 1% al 5% de los embriones transferidos (Vajta y col., 2007; Nagashima y col., 2012).

Actualmente, se han producido modelos de cerdos transgénicos para una larga lista de enfermedades humanas. Dentro de las que incluimos enfermedades neurodegenerativas (Uchida y col., 2001) como el Alzheimer (Kragh y col., 2009) y la enfermedad de Huntington (Yang y col., 2010); enfermedades cardiovasculares (Bode y col., 2010), aterosclerosis (Amuzie y col., 2016), osteoporosis (Phillips-Eakley y col., 2015), cáncer de mama (Donninger y col., 2015), diabetes (Larsen y col., 2002; Umeyama y col., 2009, von Wilmowsky y col., 2010) y fibrosis quística (Yan y col., 2015) entre otras. Una de las aplicaciones de la clonación porcina que interesó a numerosos grupos de investigación fue utilizarla como una herramienta para producir órganos para xenotrasplantes. A pesar de estar en sus inicios, los resultados se muestran alentadores. Los mejores ejemplos de este progreso en medicina humana son:

-Respecto a reparación de tejidos dañados:

1- Reemplazo de piel: se la utiliza en trasplantes temporarios, en casos de quemaduras de tercer-grado, que causan grandes discontinuidades de dermis y epidermis (Ge y col., 2010).

2- Reemplazo de válvulas cardíacas: los cerdos que proporcionan esas válvulas, pesan de 16 a 25 kg (Cooper y col., 2000).

3- Recuperación de impulsos nerviosos: Científicos de la Universidad de Yale (EE.UU.) consiguieron restaurar la transmisión de impulsos nerviosos en la médula de la espina dorsal dañada de ratones, a través del trasplante de células de cerdo, responsable por los impulsos olfatorios al cerebro. Este trabajo es la más reciente evidencia que el cerdo puede servir como fuente de células para la recuperación de lesiones en la médula espinal, a la vez de estimular la formación de nuevas conexiones nerviosas y la producción de mielina nueva.

4- Reconstrucción de tejidos dañados: Investigadores de la Universidad de Purdue, EE.UU, aislaron un material retirado de una parte del intestino del cerdo, constituido de colágeno, proteínas y factores de crecimiento. Aprobado por el FDA (órgano del gobierno americano que regula el uso de medicamentos) para uso en humanos, este material favorece la reconstrucción de tejidos dañados.

-Respecto a enfermedades:

5- Diabetes: el páncreas del cerdo es abastecedor de islotes pancreáticos (islotes de Langherans) para los injertos en personas diabéticas que no los poseen (Wang y col., 2007). Uno de los trabajos pioneros en Argentina fue realizado desde el 2010 por el Dr. Adrián Abalovich. El estudio fue aprobado por el Ministerio de Salud Bonaerense. El xenotrasplante, es una estrategia factible para vencer el problema de la escasez de páncreas humanos. En el hospital Eva Perón del partido de San Martín, provincia de Buenos Aires, 22 pacientes fueron trasplantados con islotes pancreáticos porcinos microencapsulados. Los islotes son encapsulados bajo una capa de alginato y poli-lisina. Ese recubrimiento se convierte en una especie de barrera que permite el ingreso de los nutrientes y la salida de insulina, pero impide la entrada de macrófagos del sistema inmune. Algunos pacientes no variaron sus requerimientos de insulina, pero en otros se redujo entre un 30 y un 40%.

6- Mal de Parkinson: esta enfermedad neurológica crónica afecta la movilidad de las personas y es causada por la pérdida de células que producen Dopamina en el cerebro. Galpern y col., 1996 transplantó neuronas dopaminérgicas derivadas de fetos

porcinos (día 27) en el cuerpo estriado denervado de ratas. La recuperación funcional se evaluó por la supervivencia del injerto y la morfología neuronal, que se analizó mediante inmunotinción glial, así como hibridación *in situ* con una sonda de ADN de porcino. Los neuroblastos fetales porcinos fueron capaces de sobrevivir en el cerebro adulto de ratas inmunodeprimidas, mediar en la recuperación funcional y ampliamente reinervar el cuerpo estriado de acogida. Estos hallazgos sugieren que las neuronas porcinas podrían ser una alternativa adecuada para el uso en xenotransplante.

7- Insuficiencia hepática: La evidencia sugiere que, en pacientes con enfermedad hepática, el hígado de cerdo puede ser menos susceptible a la lesión mediada por anticuerpos que otros órganos, tales como el corazón o el riñón. Las células de Kupffer del cerdo y otros macrófagos reconocen y fagocitan las células rojas de la sangre de primates, pero este problema debería ser vencido por la inmunosupresión de macrófagos previo al trasplante de cerdo al órgano de origen (Hara y col., 2008; Cooper y col., 2016).

8.4. Limitantes en clonación porcina

Hasta la fecha, la eficiencia de la SCNT, ha sido muy baja. Desafortunadamente no están del todo claro los mecanismos de remodelación nuclear (cambios en la estructura del núcleo) y reprogramación (cambios en el perfil de transcripción) durante la SCNT. La remodelación incompleta del genoma es la causa de la baja eficiencia y las anomalías en embriones clonados (Zhao y col., 2010).

Una variedad de factores probablemente contribuyen a esta ineficiencia. Estos incluyen la variación de laboratorio a laboratorio, la fuente y la calidad de los oocitos (Polejaeva y col., 2000), el método de cultivo de embriones (Vajta y col., 2008) y el tipo de célula donante. Los oocitos y embriones porcinos son aún más sensibles a las fluctuaciones de temperatura que los de otras especies domésticas (Polge y col., 1977). Debido al elevado contenido de lípidos los embriones tienen menor densidad y siguen flotando en las placas de cultivo durante más tiempo que otras especies, por lo que el manejo de los mismos se hace más tedioso (Zhang y col., 2012). El fracaso para reprogramar el núcleo trasplantado adecuadamente podría deberse a la pérdida de la impronta somática en los núcleos del embrión reconstruido (Liu y col., 2015), o a el

fracaso de los métodos artificiales de activación para emular los eventos que se producen durante el proceso de la fertilización (de Sousa y col., 2002).

Finalmente, en el cerdo existe la dificultad adicional de requerirse de al menos 4-5 embriones viables para inducir y mantener una preñez (Cibelli y col., 1998; Polejaeva y col., 2000) sino ésta se pierde antes del primer tercio de gestación.

Todas esas desventajas hacen a la baja eficiencia del proceso de clonación y deben ser mejoradas para tener un incremento en las tasas de desarrollo, preñez y sobrevida en cerdos.

8.5. Agregación embrionaria

En 1970 surge la idea de la agregación embrionaria con la finalidad de producir quimeras entre células derivadas de embriones partenogénicos y blastómeras de embriones *in vivo* (Stevens y col., 1977; Surani y col., 1977) y como resultado obtuvieron células germinales viables de origen partenogénico (Stevens y col., 1978; Anderegg y col., 1986). Años más tarde, cuando fueron agregados embriones partenogénicos bovinos se aumentaron las tasas de sobrevida *in vitro* e *in vivo* (Boediono y col., 1995) e incluso se logró el nacimiento de bovinos quiméricos al agregar embriones partenogénicos con blastómeras provenientes de fertilización *in vitro* (Boediono y col., 1999). En los trabajos citados, las blastómeras eran retiradas de un embrión y colocadas dentro de la zona pelúcida del embrión con el cual se pretendía agregar.

Con el objeto de superar las limitaciones de la SCNT, Boiani y col., 2003, emplearon por primera vez la técnica de agregación embrionaria para producir clones de ratón. Este método consiste en cultivar en estrecho contacto, desde el estadio inicial, más de un embrión. Para lograr esto se cultivan los embriones sin zona pelúcida dentro de un micropozo, brindando la posibilidad de que las blastómeras se integren y formen finalmente una sola estructura. Esta técnica puede realizarse mediante clonación libre de zona pelúcida (ZP) y requiere de un sistema de cultivo especial dado que la ZP mantiene en íntimo contacto y le da contención física a las blastómeras durante el desarrollo embrionario temprano.

Este sistema de cultivo fue inicialmente descrito por Vajta y col., 2000, y se denominó sistema "Pozo en pozo" (del inglés "Well of Well"). El sistema permite un

intercambio de factores y sustancias entre los embriones, ya que éstos comparten el mismo medio de cultivo, al estar en el mismo pozo. Los embriones generados por SCNT pertenecen a un mismo individuo, y darán lugar a un único embrión a partir de varios embriones con genética nuclear idéntica, cada uno producido a partir de una célula donante (proveniente del mismo animal) y un oocito enucleado, todos ellos puestos en íntimo contacto. Eventualmente podrían mostrar distintos patrones epigenéticos dependiendo de la célula o de los ooplastos con diferente capacidad de reprogramación, debido a que cada núcleo sufrirá eventos de reprogramación independientes (Boiani y col., 2002; Park y col., 2002). Reportes previos sugieren que la agregación embrionaria puede ser un medio para aumentar la eficiencia de la clonación (Ribeiro y col., 2009), no sólo por promover un aumento de la densidad de células de los embriones desarrollados, sino también porque podría favorecer el desarrollo del trofoblasto, y por lo tanto de la futura placenta (Vajta y col., 2005). Es probable que esta técnica permita la eliminación y/o sustitución de blastómeras con menor capacidad de desarrollo del macizo celular interno (Viuff y col., 2002) y la compensación, corrección o regulación de defectos epigenéticos presente en algunas blastómeras (Boiani y col., 2003). En ratones, se demostró que la agregación aumenta la media del número de células por blastocisto, mejora el desarrollo *in vivo* y normaliza la expresión de genes asociados a la pluripotencia (Balbach y col., 2010). En equinos, la agregación embrionaria de tres clones (3x) mejora el desarrollo *in vitro*, y aumenta las tasas de preñez y de animales nacidos (Gambini y col., 2012) y actualmente se ha establecido que el número máximo de embriones a agregar en equinos es de 4x (Gambini y col., 2014). Hasta el momento, nuestro grupo de trabajo, ha producido el nacimiento de cuatro clones equinos producidos a partir de embriones agregados, incluyendo al primer clon equino viable de América Latina. En gatos, la agregación de dos embriones de SCNT mejoró la producción de blastocistos y su calidad, normalizando la expresión de genes clave para el desarrollo de los clones (Moro y col., 2015).

Actualmente, la agregación embrionaria está siendo utilizada como estrategia para la clonación comercial de equinos en la Argentina. Hasta la fecha, nuestro laboratorio ha estudiado la agregación embrionaria en varias especies, reportando beneficios y la producción de animales sanos (Gambini y col., 2012 y Gambini y col., 2014). Los beneficios informados de embriones clonados obtenidos por el proceso de

agregación embrionaria hace que sea una estrategia interesante para ser aplicada en programas comerciales.

Una manera alternativa para realizar el método de agregación embrionaria es mediante la técnica de clonación hecha a mano o *Hand made cloning* (HMC), que también requiere trabajar sin zona pelúcida. Ésta, se presenta como un proceso simplificado de transferencia nuclear, sin la necesidad de usar un micromanipulador. La técnica consiste en la bisección manual de los oocitos maduros, libres de zona pelúcida y previamente teñidos con Hoechst 33342. Una vez realizada la enucleación a mano se procede a la fusión de una célula somática a dos ooplastos (Tecirlioglu y col., 2003). La diferencia con la enucleación por micromanipulador es que ésta última permite remover menos cantidad de citoplasma comparado con la clonación manual (Oback y col., 2003).

En general, se piensa que la agregación conlleva a la "heteroplasma". Éste término se refiere a la combinación de diferentes genomas de ADN mitocondrial (ADNmt) uno por cada estructura agregada. Cuando se trabaja con HMC los niveles de heteroplasma son mayores, por el simple hecho de combinar dos ooplastos con diferentes mitocondrias para producir cada estructura reconstituída. Sin embargo, mediante la enucleación por micromanipulador, la heteroplasma es mínima, y es la producida por la fusión de una célula somática en un oocito enucleado durante la SCNT. La agregación embrionaria no implica mayores niveles de heteroplasma, por el contrario, es una alternativa para minimizar los posibles efectos desfavorables causados por la fusión de los oocitos hemi- enucleados durante la clonación por HMC (Vajta y col., 2005; Misica-Turner y col., 2007; Ribeiro y col., 2009).

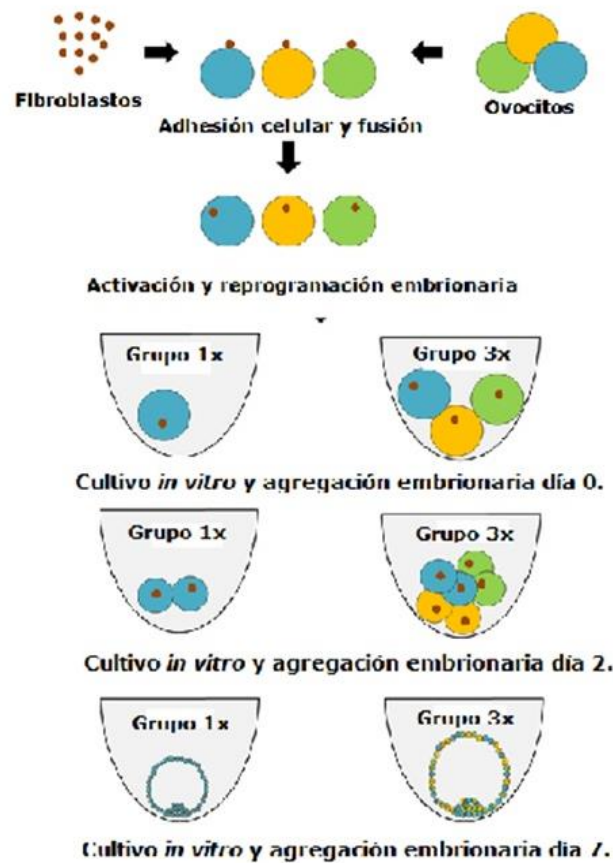


Figura 3. Esquema de la transferencia nuclear y la agregación embrionaria en porcinos. Luego de la activación, los embriones reconstituidos sin ZP (ERZFs) son cultivados en un sistema de micropozos en cantidades diferentes por cada micropozo para generar: embriones no agregados (Grupo 1x, uno por micropozo, grupo control), o agregados (3x, tres por micropozo). Se esquematizan diferentes días de cultivo *in vitro*. Diagrama modificado de Gambini y col., 2012.

8.6. Metilación y acetilación de la cromatina.

El conocimiento del ácido desoxirribonucleico (ADN), su estructura y función, fue determinante para el desarrollo de nuevas biotecnologías embrionarias. El ADN está organizado en cromosomas. En las células eucariotas los cromosomas son lineales, mientras que los organismos procariotas, como las bacterias, presentan cromosomas circulares. La molécula de ADN se asocia a proteínas, llamadas histonas. Esta asociación de ADN y proteínas se conoce como cromatina. La cromatina puede estar más o menos condensada dependiendo de la etapa en que se encuentra la célula. La expresión de genes tempranos en el desarrollo embrionario va a depender no solo de las

histonas sino también del grado de metilación del ADN que va a dar como consecuencia una configuración más "abierta" o más "cerrada" del material genético.

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. El ADN presenta regiones de 1000- 1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas ADN-metiltransferasas. Una de éstas metiltransferasas, durante la replicación del ADN, metila el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, en los dinucleótidos CpG hemimetilados, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN (Laird y col., 2003; Salozhin y col., 2005) (Figura 4). Las islas CpG son regiones de ADN donde existe una gran concentración de dinucleótidos CpG, enlazados por fosfatos, que comprenden aproximadamente el 1% - 2% del genoma (Ehrlich y col., 1982). En los mamíferos, la metilación del ADN es esencial y se produce casi exclusivamente en las citosinas, en el contexto de los dinucleótidos CpG (Li y col., 1992). Análisis recientes del genoma completo han corroborado que la mayoría de las islas CpG no están metiladas y se mantienen así durante el desarrollo embrionario, mientras que la mayoría de las CpG fuera de las islas CpG están metiladas por *default* (Weber y col., 2007 y Lister y col., 2009, Lienert y col., 2011). Se han propuesto varios mecanismos de como éste patrón global de metilación del ADN se establece. Sin embargo, los patrones de metilación de ADN no son estáticos, son más bien un proceso dinámico (Figura 5).

En general, se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación *de novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la pérdida de metilación genómica (hipometilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad (Laird y col., 2003).

La metilación del ADN es un marcador epigenético del silenciamiento de genes o eficaz represor de la actividad transcripcional provocando el descenso o incluso silenciamiento de un gen determinado (Mesa-Cornejo y col., 2006; Richards y col., 2006) y representa una verdadera modificación epigenética, como así también, su mecanismo de herencia durante el ciclo celular (Bird y col., 2002). A su vez, la modificación de histonas puede afectar la transcripción y aumentar aún más la

complejidad del proceso (Richards y col., 2006). La focalización de los sitios susceptibles de modificación epigenética podría estar controlado por pequeños RNA de interferencia, que por lo tanto son también importantes factores epigenéticos (Jensen y col., 2015).

En ratones y en humanos, casi la mitad de las islas están asociadas con los sitios de inicio de transcripción y muchas están vinculadas a genes de mantenimiento, de desarrollo y genes reguladores. Mientras que las enzimas responsables de establecer y mantener la metilación del ADN han sido bien establecidas, no está claro cómo hay sitios particulares en el genoma que son protegidos de metilación y otros sitios que mantienen o sufren metilación *de novo* (Smith y col., 2013).

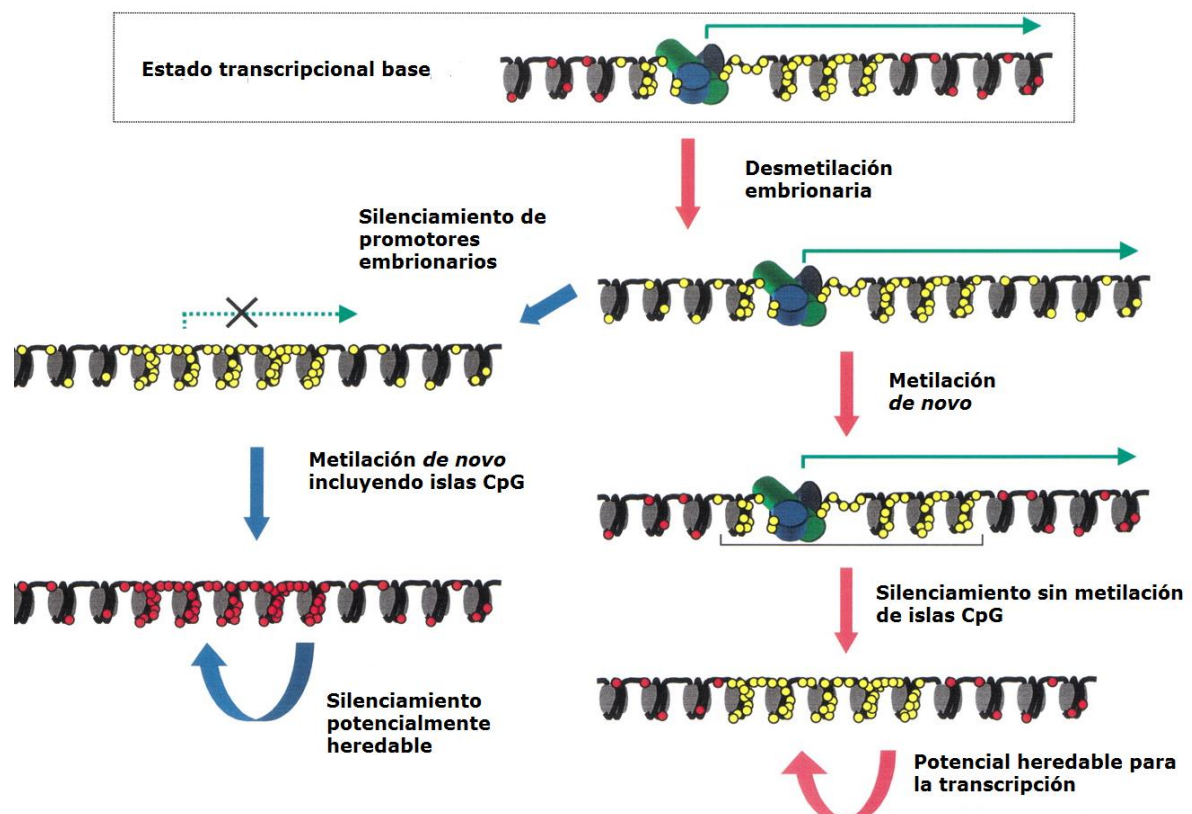


Figura 4. Escenario hipotético relacionado con la actividad transcripcional embrionaria. Estado de metilación del ADN en mamíferos. A partir de una noción del estado basal de transcripción, la desmetilación embrionaria conduce a la sustitución de los sitios metilados (círculos rojos) por sitios no metilados (círculos amarillos). Dos destinos alternativos son previstos: 1) la transcripción persiste o 2) la transcripción se bloquea por otros mecanismos y esto invita a la metilación de novo de la isla CpG y sus flancos. Adaptación de Bird y col., 2002.

Una familia de ADN (citosina-5) - metiltransferasas (DNMT) es responsable de la transferencia de un grupo metilo a la quinta posición del anillo de citosina. Actualmente han caracterizado cinco DNMTs en mamíferos: DNMT1, 2, 3A, 3B, y 3L (Goll y col., 2005). DNMT1 es la responsable del mantenimiento de la metilación a través de la remetilación de nuevas hebras durante la replicación, si la hebra madre estaba metilada previamente (Bestor y col., 2000). Las enzimas DNMT 3 (DNMT3a, 3b, y 3L) están implicadas en la adquisición de metilación *de novo* en el ADN previamente desprovisto de metilación (Okano y col., 1999). La pérdida de los patrones de metilación a través de la ablación genética de estas enzimas es letal en las etapas embrionarias o postnatal temprana en ratones (Li y col., 1992, Okano y col., 1999).

Ninguna de las tres ADN metiltransferasas (Dnmt1, 3a y 3b), catalíticamente activas, muestran una preferencia particular que podría explicar la metilación del tipo específica en cada tipo celular, lo que sugiere que es un mecanismo complejo en donde las tres enzimas trabajan en conjunto (Smith y col., 2013).

La metilación no es la única marca epigenética que influencia la expresión génica. Otra manera es mediante cambios en la acetilación de histonas. Las histonas están cargadas positivamente debido a los grupos amino presentes en los residuos de lisina y arginina. Estas cargas positivas ayudan y afianzan la interacción con las cargas negativas de los grupos fosfato del esqueleto carbonado del ADN. La acetilación, una reacción que se produce corrientemente en la célula, neutraliza las cargas positivas de las histonas, convirtiendo las aminas en amidas y reduciendo así la capacidad de las histonas para unirse al ADN. Esta reducción de la afinidad de unión permite la expansión de la cromatina y así la transcripción genética de esa región cromosómica. Las histonas deacetilasas eliminan los grupos acetilo, incrementando la carga positiva de las histonas y por tanto la afinidad de éstas por el ADN. Este incremento de la unión condensa la estructura del ADN, impidiendo la transcripción. La acetilación de histonas juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica. La cromatina hiper-acetilada estará transcripcionalmente activa, y la hipo-acetilada estará silenciada (Sorensen y col., 2010).

Entre las modificaciones de histonas hay algunas que están ampliamente caracterizadas, la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3) es una marca de genes activos, mientras que la histona H3 trimetilada en la lisina 27 (H3K27me3) o la histona H3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9me3) promueven la represión

transcripcional. Modificaciones de las histonas están por lo tanto asociados con eventos regulación de genes y pueden servir también para una función predictiva la expresión génica (Collas y col., 2007).

La histona H3 metilada en la lisina 4 (H3K4me1) fue una de las primeras modificaciones de histonas vinculada a enhancer o regiones reguladoras a distancia, en contraste con la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3), que está presente en promotores activos (Heintzman y col., 2007). Sin embargo, es importante tener en cuenta, que la presencia de H3K4me1 no está únicamente en potenciadores, sino que también coincide con grandes porciones de genes activamente transcritos. Además, incluso en el contexto de las secuencias no codificantes, H3K4me1 está ampliamente distribuída y generalmente cubre regiones más amplias que el potenciador o enhancer. Curiosamente, la presencia de H3K4me1 a menudo precede a la histona H3 acetilada en la lisina 27 (H3K27ac) y hasta a otros potenciadores (Creyghton y col., 2010; Rada-Iglesias y col., 2011; Bonn y col., 2012). A diferencia de H3K27ac, H3K4me1 parece persistir en potenciadores después de su separación y pérdida de potencial de activación, ya sea temporal (Bogdanovic y col., 2012) o por un tiempo prolongado (Bonn y col., 2012). H3K4me1 se correlaciona con una "ventana de oportunidad" dentro de la cual se se facilita la movilidad nucleosomal y/o la unión de los primeros factores de transcripción (Zaret y col., 2011). H3K27ac, una marca asociada a potenciadores activos, sin embargo, está presente casi exclusivamente en el contexto de la pre-existencia de H3K4me1 (Bonn y col., 2012).

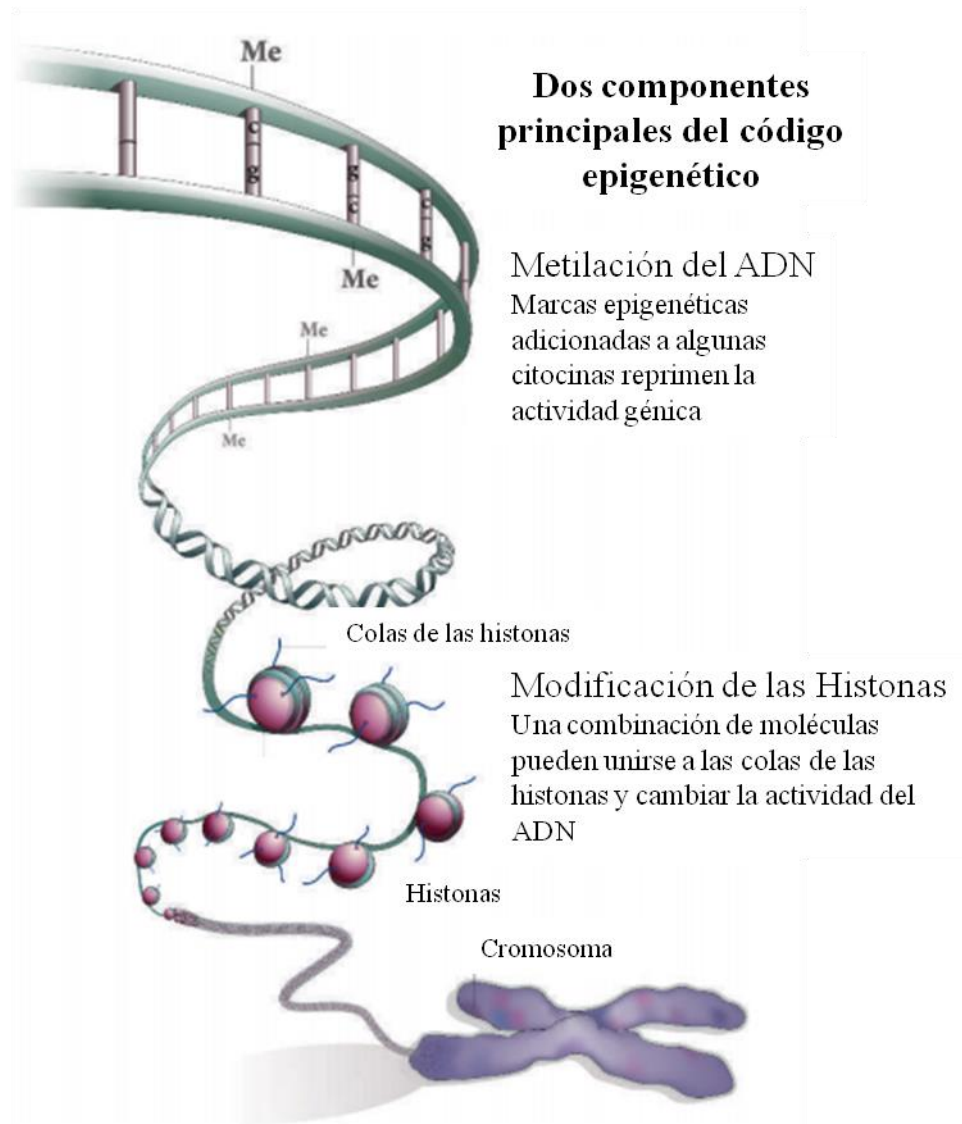


Figura 5. Hebras de ADN mostrando los dos principales componentes del código epigenético. Figura modificada de la revista Nature, Qiu y col., 2006.

Las estrategias metodológicas para el análisis del estado metilado de las islas CpG han estado en constante evolución y actualmente se cuenta con diversas técnicas que comparten estándares universales, óptima sensibilidad y reproducibilidad (Mesa Cornejo y col., 2006). El éxito de la mayoría de los métodos depende de la transformación química de las citosinas no metiladas a uracilos, por el tratamiento con bisulfito de sodio, que no afecta las 5-metilcitosinas, y marca de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG. La modificación del ADN, su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o secuenciación automatizada son las técnicas más usadas con este propósito. En los últimos años la tecnología basada en el análisis del ADN metilado es considerada una

poderosa herramienta para el diagnóstico, terapia y pronóstico de enfermedad, así como en el campo de la medicina forense, farmacogenética y en estudios epidemiológicos (Laird y col., 2003; Mesa-Cornejo 2006).

Con respecto a las histonas, se utilizan anticuerpos específicos para técnica de Inmunofluorescencia, Western blot, Inmunoprecipitación o matriz de hibridización (Lindeman y col., 2011).

8.7. Modificaciones epigenéticas en SCNT.

Las modificaciones epigenéticas, tales como la metilación del ADN y la acetilación de histonas, han sido consideradas como candidatos que regulan la reprogramación nuclear.

En el ADN de mamíferos la metilación juega un papel importante en la regulación y expresión de genes en el desarrollo embrionario. Durante la gametogénesis ocurren los cambios dramáticos en el nivel de metilación y el desarrollo embrionario temprano (Monk y col., 1987; Sanford y col., 1987). La metilación disminuye significativamente y alcanza el punto más bajo en la etapa de blastocisto (Monk y col., 1987; Razin y col., 1993). En embriones tempranos, durante el proceso de reprogramación epigenética, se borra el patrón de metilación específica que traían las gametas, esto es necesario para resetear la impronta genómica (Solter y col., 1988; Howlett y col., 1991; Oswald y col., 2000; Hill y col., 2002). El proceso de remodelación epigenética o reprogramación nuclear de células somáticas durante el desarrollo embrionario temprano incluye la remodelación de la estructura de la cromatina, cambiando no solo la metilación del DNA sino también la expresión de genes improntados, la restauración de la longitud de los telómeros y la inactivación del cromosoma X, entre otros eventos (Collas y col., 2007). Por lo tanto, durante la SCNT, pasar del estado diferenciado de una célula somática a un estado totipotente, cambiando la dinámica de la epigenética del ADN genómico, es un proceso único y esencial. Implica que los núcleos de las células donantes deben suprimir su propia expresión génica y comenzar a expresar genes implicados en un desarrollo embrionario normal (Gurdon y col., 1999; Jensen y col., 2015).

Durante el desarrollo post-implantación, tiene lugar una ola de metilación de *novo* y la mayoría del ADN genómico se metila en un tiempo definido (William y col., 2001; Whitworth y col., 2010; Ogura y col., 2013). La adquisición de las marcas

epigenéticas embrionarias propias, en los embriones clonados, debe realizarse de manera similar a como ocurre en la fertilización, después del borrado y la adquisición de marcas epigenéticas en los pronúcleos femenino y masculino. La primera diferenciación celular del embrión en desarrollo se produce en la etapa de blastocisto, dando lugar al macizo celular interno (MCI) y al trofoectodermo (Santos y col., 2003). En la fase de blastocisto, el ADN y la metilación de histonas se eleva en el MCI, mientras que en el trofoectodermo el ADN y las histonas están hipometiladas. Por lo tanto, la formación de blastocisto establece el comienzo de diferencias epigenéticas entre ambos linajes celulares (Reik y col., 2003).

A diferencia de los embriones de fertilización, los embriones producidos por SCNT tienen demetilación incompleta después de la etapa de una célula, independientemente de las especies (Dean y col., 2003). Además, estos embriones sufren metilación *de novo* prematuramente (etapa 4-células frente a 8-16 células en embriones *in vivo*), por lo que en fase de mórula, la metilación en blastómeras se parecería a la de las células del donante (Dean y col., 2003).

Actualmente se están usando diferentes drogas que cambian patrones de metilación y acetilación de histonas para mejorar la competencia del desarrollo de embriones clonados (Han y col., 2003). Se han publicado resultados interesantes sobre reprogramación epigenética del genoma de las células donantes en embriones clonados (Kang y col., 2001; Bouc'his y col., 2001; Kang y col., 2002). Sin embargo, el efecto de los agentes de modificación epigenética en los genes de pluripotencia y por ende en la reprogramación embrionaria sigue siendo poco clara.

Para mejorar la eficiencia de la SCNT, los investigadores han recurrido a estimular la célula donante o el embrión reconstituido que va a sufrir reprogramación celular mediante tratamientos químicos. Se empezaron a usar agentes como las histonas deacetilasas (HDAC) que son enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas, causan que la cromatina más flexible y permiten que se unan al ADN una combinación factores de transcripción (Kishigami y col., 2006; Lager y col., 2008; Dai y col., 2010). En los cerdos, se han probado varios agentes, entre ellos: Tricostatin A (TSA), Scriptaid, ácido Valproico (Ac. valp) y han demostrado aumentar el desarrollo *in vitro* de embriones provenientes de SCNT (Li y col., 2008; Miyoshi y col., 2010; Zhao y col., 2010; Kim y col., 2011). También se ha probado el tratar las células donantes con TSA y se vió que producían una ligera mejora

en el desarrollo de embriones clonados en bovinos (Enright y col., 2003; Wee y col., 2007; Ding y col., 2008; Iager y col., 2008), en ratones (Maalouf y col., 2008; Kishigami y col., 2006; Li y col., 2008), en cerdos (Zhang y col., 2007; Martínez Díaz y col., 2010) y en conejos (Meng y col., 2009). El grupo de Li y col., 2008b y Martínez Díaz y col., 2010 presentaron resultados alentadores con cerdos nacidos vivos después del tratamiento con TSA. En la especie bovina, el uso de las drogas fue beneficioso para el desarrollo de clones tanto en tratamientos de células del donantes (Wee y col., 2007; Ding y col., 2008) como en embriones reconstruidos (Ding y col., 2008; Iager y col., 2008).

Cuando se pretrataron las células donante mediante un inhibidor de metilación del ADN, 5-aza-2-deoxicitidina (5-aza), antes de la transferencia nuclear, no se obtuvieron resultados beneficiosos para el desarrollo de embriones clonados (Enright y col., 2005; Shi y col., 2003).

Respecto a PD 0325901 que es un inhibidor de la vía MAPK, en el año 2014 demuestran que la droga podría incrementar el desarrollo embrionario y generar mayor proporción de células en el macizo celular interno (MCI) en bovinos. En fibroblastos de la misma especie, a una concentración baja (menor a 10 μ M) inhibió totalmente la vía de señalización de MAPK (Guillomot y col., 2004). Sin embargo, en otras especies como en ratón, la fosforilación se vió solo parcialmente inhibida (Huang y col., 2011).

Estos resultados pueden indicar que la readquisición de metilación durante el período previo a la implantación de los embriones es un procedimiento muy complejo y puede requerir el uso de una combinación de agentes para tratar de imitar este proceso *in vitro* (Monteiro y col., 2010). Hay numerosos ejemplos de diferentes drogas utilizadas con el propósito de mejorar la eficiencia del proceso de clonación, pero cada una de ellas tiene efectos diferentes dependiendo de las concentraciones y las especies utilizadas.

8.8 Descripción de la tesis

En la primera etapa de la presente tesis (capítulo I) se evaluó en embriones partenogenéticos el uso de diferentes fármacos que modifican la epigenética embrionaria, mediante una curva de dosis en donde se estudió cual era la combinación de fármacos más conveniente para reprogramar mejor los embriones y obtener mayores tasa de desarrollo *in vitro*. Posteriormente, se realizaron los experimentos de agregación embrionaria 1x (grupo control sin agregar) y 3x (tres embriones juntos en un mismo pozo) en los que se evaluaron: desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, tamaño y número de celular y fragmentación del ADN mediante la técnica de TUNEL.

En la segunda etapa (capítulo II), de acuerdo con los resultados obtenidos en en el capítulo I se profundizó en los experimentos de agregación embrionaria pero esta vez en embriones porcinos clonados mediante SCNT, comparando el desarrollo embrionario *in vitro*, tamaño y número de células embrionarias además de expresión génica de genes implicados en el desarrollo embrionario temprano (*Oct4*, *Klf4*, *Nanog*, *Igf2*, *Dnmt1*, *Cdx2*, *Bax* y *Bcl-xl*) y de apoptosis celular mediante ensayo de TUNEL. Para finalizar el capítulo se realizaron transferencias embrionarias de clones agregados 3x.

La tercer etapa (capítulo III) consistió en caracterizar y comparar patrones epigenéticos de embriones de cerdos clonados y agregados, después del tratamiento con el fármaco elegido en el capítulo I, esas drogas (5-aza-2/-deoxycytidina -inhibidor de la metilación del ADN y PD0325901 -inhibidor de la quinasa activada por mitógeno MEK) inducen a modificaciones en la epigenética embrionaria. Cambian el patrón de metilación del ADN e inhiben a MEK en las vías de MAPK respectivamente, e inducen a un estado más indiferenciado a los embriones reconstituidos. Se evaluó calidad embrionaria mediante procesos como agregación embrionaria, expresión génica, metilación de ADN en genes importantes para el desarrollo embrionario y cambios en las histonas que forman parte del ADN.

9. Hipótesis:

Es posible aumentar la eficiencia de la clonación porcina mediante modificaciones epigenéticas producidas por agregación embrionaria y reprogramación celular inducida por fármacos.

9.1. Objetivo general:

Estudiar el efecto de la agregación sobre la expresión de embriones porcinos producidos por transferencia nuclear de células somáticas, para luego modular la epigenética de los mismos, con el fin de mejorar la eficiencia de la clonación en esta especie.

9.2. Objetivos particulares:

- Evaluar los efectos de la agregación embrionaria en el desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto mediante clonación libre de zona pelúcida.
- Utilizar drogas que modifican la epigenética (5-Aza-2'-Deoxicitidina + PD 0325901) en embriones porcinos producidos por partenogénesis y por transferencia nuclear como salida para maximizar la reprogramación nuclear.
- Estudiar la expresión génica en embriones clonados controles y tratados con las drogas anteriormente mencionadas, mediante la técnica de PCR en tiempo real o qPCR.
- Examinar nivel de muerte celular programada mediante técnica de TUNEL en embriones clonados en el grupo control (1x) y en los agregados (3x).
- Examinar patrones de modificación de histonas en el núcleo embrionario, distribución de histona H3K27ac y H3K4me1, dos marcas de potenciadores o enhancers mediante microscopía confocal cuantitativa y análisis avanzado de imágenes.

- Analizar patrones de metilación del ADN en genes esenciales para el desarrollo embrionario en embriones tratados (5Aza y PD) mediante la técnica de secuenciación bisulfito.

CAPÍTULO I

**Estudio de la agregación embrionaria y de fármacos
modificadores de la epigenética embrionaria en
embriones partenogénicos porcinos**

Capítulo I.

Parte de los resultados obtenidos en este capítulo fueron publicados en la revista *Theriogenology* en el año 2016 bajo el nombre: "**Embryo aggregation does not improve the development of interspecies somatic cell nuclear transfer embryos in the horse.**" Andrés Gambini, Adrián De Stéfano, Javier Jarazo, **Carla Buemo**, Florencia Karlanian y Daniel Felipe Salamone.

10. Introducción capítulo I

A pesar de que han pasado casi 20 años desde el nacimiento del primer mamífero clonado a partir de una célula somática adulta (Wilmut y col., 1997), la eficiencia de clonación a partir de células somáticas en todas las especies de mamíferos, todavía es baja (alrededor del 1%-5%) (Yang y col., 2007). Por lo tanto, la baja eficiencia y las anomalías causadas en el desarrollo de los clones se consideran dos importantes desventajas a la aplicación de la SCNT. Para que la clonación tenga éxito, el patrón de modificaciones epigenéticas en las células donantes debe ser remodelado hasta llegar a ser similar al patrón presente en los embriones fertilizados.

Aunque han sido sugeridos los mecanismos para la remodelación de la epigenética durante el desarrollo del embrión normal y los provenientes de SCNT, la transformación de un genoma somático diferenciado a un estado totipotente por SCNT es ineficiente y el mecanismo por el cual se produce esta remodelación no se mantiene del todo claro (Zhao y col., 2010).

En la actualidad se están probando drogas que llevan a un estado más indiferenciado a las células, éstas son usadas para generar células madres y células madres pluripotentes inducidas (iPS- del inglés *induced pluripotent stem cell*) (Li y col., 2009).

Las drogas utilizadas en este primer capítulo fueron 5-aza-2/-deoxicitidina (5-aza), ácido valproico (Ac valp) y PD 0325901 (PD) que cambian el patrón de metilación del ADN, la acetilación de histonas, e inhiben a MEK en las vías de MAPK, respectivamente. Estas drogas inducen a un estado más indiferenciado a las células, que

podría ser importante para mejorar la reprogramación de los embriones reconstruidos por SCNT.

Se ha demostrado que las modificaciones epigenéticas, tales como la metilación del ADN y la acetilación de histonas, regulan la expresión de genes en organismos superiores (Rideout y col., 2001). Los niveles de metilación de ADN en el transcurso de la reproducción natural, son relativamente bajos en las gametas masculinas y femeninas, las cuales a su vez sufren desmetilación durante el desarrollo embrionario temprano (Kang y col., 2001). Durante el desarrollo del embrión proveniente de SCNT, se produce la remodelación epigenética de la cromatina embrionaria, incluyendo cambios dramáticos en la estructura nuclear, tanto en la metilación del ADN, así como, en la modificación de las colas de las histonas. El fracaso en el desarrollo de los embriones clonados, la baja tasa de nacimientos y la producción de crías anormales podría atribuirse a la incompleta reprogramación epigenética del núcleo donante de ADN genómico; generando patrones epigenéticos anormales durante la transferencia nuclear (Rideout y col., 2001; Wilmut y col., 2002; Han y col., 2003; Han y col., 2011). La tasa de éxito de la clonación de animales puede mejorarse previniendo o revirtiendo los errores epigenéticos, tales como la hipermetilación del ADN (Haaf y col., 2006; Yamazaki y col., 2006) o la hipoacetilación de las histonas (Yamanaka y col., 2011; Liu y col., 2012).

Estudios en varias especies, incluyendo ratones (Kishigami y col., 2006; Rybouchkin y col., 2006); conejos (Shi y col., 2008); bovinos (Enright y col., 2003; Iager y col., 2008; Ding y col., 2008) y cerdos (Li y col., 2008; Zhao y col., 2009; Miyoshi y col., 2010) han demostrado que el desarrollo de embriones clonados podría mejorarse por el borrado parcial de marcas epigenéticas preexistentes en las células del donante o en embriones reconstruidos. Eso podría lograrse por el uso de algunos de inhibidores de la acetilación de histonas por ejemplo, tricostatina A (TSA) y ácido valproico (Ac valp) o inhibidores de ADN metiltransferasa (por ejemplo, 5-aza-2'-deoxicitidina) entre otros.

Durante esta primer etapa, este estudio se basó en embriones partenogénicos. Creímos pertinente el uso de este tipo de embriones para probar distintos fármacos y en distintas concentraciones, debido a que son más fáciles de producir que los embriones provenientes de clonación, se obtienen más embriones en un corto tiempo y son más económicos de producir. Por este motivo, se propuso identificar un fármaco y una

concentración adecuada para hacer más eficaz el proceso de SCNT a través de la modificación de los eventos epigenéticos de regulación y remodelación que deben ocurrir durante el desarrollo preimplantacional de embriones. La finalidad fue aumentar la eficiencia de la reprogramación nuclear y como consecuencia, obtener mejor desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Se midió la calidad embrionaria teniendo en cuenta el número de células, el diámetro embrionario y la apoptosis o fragmentación del ADN.

La fragmentación del ADN o apoptosis celular es un proceso fisiológico en el cual las células mueren después de haber sido expuestas a un estímulo normal o patológico (Hao y col., 2004). La apoptosis se hace evidente demostrando cambios bioquímicos y morfológicos en la cascada de caspasas, cambios en la función de las mitocondrias, liberación de la Citocromo C, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y por último arresto en el desarrollo (Hardy 1997; Hardy y col., 2001; Green y col., 1998; Ranger y col., 2001).

Hao y col., 2004 mostraba que los embriones partenogénicos tenían un alto nivel de apoptosis que aumentaba desde los embriones de día 5 a los que se encontraban más avanzados (día 8). Además, los embriones partenogénicos mostraban bajas tasas de clivaje y de desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto y bajo número de células en comparación con embriones provenientes de fertilización *in vitro*. Sin embargo, este tipo de embrión nos sirvió para estudiar si las drogas inducen a un aumento de las tasas de desarrollo embrionario en el grupo tratado *vs.* el no tratado.

El segundo objetivo de este capítulo fue el de dilucidar si la agregación embrionaria podría ayudar a aumentar el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénicos para después implementarlo en embriones provenientes de SCNT.

La agregación embrionaria, como se dijo anteriormente, podría ayudar a compensar fallas epigenéticas, formando un solo embrión que sea epigenéticamente quimérico. Esta estrategia fue evaluada en el ratón (Boiani y col., 2003) en donde se obtuvieron blastocistos con mayor cantidad de células y mejores tasas de desarrollo *in vivo*. En equinos (Gambini y col., 2012; Gambini y col., 2014) se aumentó la eficiencia de la técnica obteniéndose crías a partir de embriones generados por agregación de 2, 3 y 4 estructuras reconstituidas. En bovinos se logró mayores tasas de formación de blastocistos, mayor cantidad de células y mayores tasas de preñez (Pedersen y col. 2005,

Zhou y col. 2008, Ribeiro y col. 2009; Bang y col., 2015) y algo similar ocurrió en cerdos (Siriboon y col., 2014) y en felinos (Moro y col., 2015).

En la presente tesis doctoral nuestro objetivo fue estudiar el efecto de estos fármacos y de la agregación embrionaria en desarrollo *in vitro* de embriones partenogénéticos y embriones provenientes de clonación, estableciendo las mejores condiciones para la SCNT en porcinos.

11. Materiales y Métodos capítulo I

11.1. Medios y drogas

Todas las drogas y medios utilizados fueron obtenidos de la compañía química Sigma St. Louis, MO, USA. Nota: se especifica el origen en caso de que algún material provenga de otra compañía.

11.2. Colecta, desnudación y maduración de oocitos

Los ovarios fueron obtenidos de cerdas jóvenes provenientes de un matadero local llamado "La pompeya", ubicado en Marcos Paz, provincia de Buenos Aires y transportados al laboratorio dentro de las 3 primeras horas de recolección, a una temperatura alrededor de los 25 a 30 °C. Los complejos cúmulo-oocito (COCs) de folículos de 3 a 6 mm de diámetro se aspiraron usando una aguja calibre 18 unida a una jeringa descartable de 10 mL. Los COCs compactos con cúmulus uniforme fueron seleccionados y madurados en gotas de 100 µl medio de cultivo TCM-199 (31100-035, Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.) bajo aceite mineral (M8410). El medio de maduración fue suplementado con piruvato de sodio 0,3 mM (P2256), 100 µM cisteamina (M9768), 5 mg/ml de mioinositol, 1 µg/ml de insulina transferrina selenio (ITS 51300-044, Gibco), 1% de antibiótico-antimicótico (15240-096, Gibco), 10% (v/v) fluido folicular porcino, 5 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y 10 g/ml de hormona estimulante del folículo (FSH) (NIH-FSH-P1Folltropin, Bioniche, Caulfield Norte, Victoria, Australia). La maduración se realizó a 38.5 °C en una atmósfera humidificada con 6,5% de CO₂ en 90% de aire durante 42-44 hs. Posteriormente fueron removidas las células del cúmulus mediante agitación mecánica (vortexeo) durante 3 minutos en Hialuronidasa 1 mg/mL (H-4272) diluida en tirodes albúmina lactato piruvato con hepes (TALP-H) (Bavister y col., 1977). Posteriormente, fueron lavados en TALP-H y colocados en gotas calibradas de 100 µl de Synthetic Oviductal Fluid (SOF, Tervit y col., 1972; Holm y col., 1999), en incubadora hasta que fueron activados (Figura 6).

Los oocitos maduros fueron separados en dos grupos:

1) para el experimento de agregación embrionaria, se eliminó la zona pelúcida (ZP) mediante incubación en 1,5 mg/ml de pronasa (P- 8811) diluída en TALP-H durante 1-2 min. Los oocitos libre de zona pelúcida se mantuvieron en microgotas individuales de 5ul de SOF en estufa hasta la activación. 2) la otra parte de los oocitos se usaron con zona pelúcida para el experimento de curva de dosis de las diferentes drogas.

11.3. Activación

Los embriones partenogénéticos con y sin ZP fueron activados eléctricamente usando una cámara de fusión adicionada a un Electro-Manipulador-Cell 830 (BTX, Inc., San Diego, CA) mediante un pulso de corriente directa (CD) de 1,2 kV / cm de 80 microsegundos de duración, seguido de una incubación durante 3 hs con 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP-D2629) en una microgota 100 µl de SOF. El medio de activación contenía 0,3 M manitol (M9546), 0,1 mM MgSO₄ (M7506), 0,05 mM CaCl₂ (C7902), y 1 mg/ml de alcohol polivinílico (PVA-P8136). Una vez activados fueron a incubadora para cultivo en medio SOF.

11.4. Cultivo embrionario in vitro

Los embriones con ZP fueron tratados y cultivados en microgotas de 100 µl de medio SOF suplementado con diferentes fármacos. Se ensayaron dos concentraciones para cada droga (1 uM y 2 uM de 5-aza, 2 mM y 4 mM de Ac Valp y 0,5 uM y 1uM de PD). También, se combinaron las distintas drogas con el objetivo de identificar mayores tasas de blastocistos. Asi se obtuvieron 10 grupos en estudio:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| 1) Embriones partenogénicos control | 6) Part. + PD 0,5µM |
| 2) Part. + Ac Valp 2mM | 7) Part. + PD 1µM |
| 3) Part. + Ac Valp 4mM | 8) Part. 5 Aza 1 µM + PD 1µM |
| 4) Part. + 5 Aza 1µM | 9) Part. PD 1uM + Ac Valp 2mM |
| 5) Part. + 5 Aza 2µM | 10) Part. 5 Aza 1 µM + Ac Valp 2mM |

Después de tres días de cultivo, se cambiaron los embriones a nuevas microgotas de 100 µl de SOF, lavándolos previamente en gotas de SOF de lavado, en el mismo momento fue monitoreado el clivaje, al día 5 se incorporó 10% de suero fetal bovino

(SFB) y al día 7 se registró el desarrollo a blastocisto. Las condiciones de cultivo fueron 5% CO₂ y 5% O₂ en aire humidificado a 38.5 °C.

11.5. Agregación embrionaria

La agregación embrionaria se realizó colocando al azar más de un embrión reconstituído sin zona elúcida (ERFZ) por pocillo. Se realizaron dos grupos experimentales diferentes: grupo 1x, un embrión ERFZ por cada pocillo (embriones no agregados; grupo control); y el grupo de 3x, tres ERFZs por pocillo. El número total de ERFZs por microgota fue similar entre ambos grupos. Los embriones se cultivaron en una mezcla gaseosa humidificada (5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂) a 38.5°C durante 7 días. La mitad del medio se renovó al día 2 de cultivo con SOF fresco, y al día 5 se renovó mitad del medio nuevamente con SOF que contenía 10% de FBS. El clivaje se evaluó a las 48 hs después de la activación, y la formación de blastocisto y el diámetro de los embriones se registró al día 7. El modo de cultivo fue mediante el sistema WOW (*well of the well system*). Los pocillos se produjeron utilizando un capilar de vidrio sometido a calor. Los orificios se hicieron en la parte inferior de una placa de Petri de 35 mm x 10 mm. Los micropocillos se cubrieron con una microgota de 100 µl de medio de SOF (Figura 9).

11.6. Medición y conteo de células de los embriones día 7.

Los blastocistos que se obtuvieron al día 7 fueron observados bajo lupa estereoscópica y mediante la utilización de un ocular milimetrado, se procedió a realizar la medición del diámetro del blastocisto. Cada raya del ocular equivalen a 13,6 micras de diametro. Esos mismos embriones se incubaron durante 15 minutos en una gota SOF que contenía 1 µg/ml de Hoechst 33342 Bisbenzimidide (B2261) y fueron evaluados mediante observación bajo luz ultravioleta para el conteo de sus células.

11.7. Fijación y detección de apoptosis celular mediante test de TUNEL.

A partir del día 7 se fijaron los blastocistos de ambos grupos experimentales 1x y 3x mediante paraformaldehído al 4% (F1635) durante 20 minutos y después se lavó en solución Dulbecco tamponada con fosfato salino (DPBS) (14287-072 Gibco, Gran

Island, NY, USA) y se almacenó en DPBS con solución de albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg / ml. Se detectaron niveles de fragmentación del ADN *in situ* utilizando el método de TUNEL (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System - Promega G3250, Madison, WI, USA). Luego, los embriones fueron permeabilizados con 0.2% de Tritón X-100 en DPBS por 15 minutos a temperatura ambiente y colocados nuevamente en la solución con 0.4% DPBS-BSA. A continuación, las muestras se colocaron en tampón de incubación que consiste en tampón de equilibrio, una mezcla de nucleótidos que contiene fluoresceína-dUTP y el terminal deoxynucleotidyltransferase durante 2 horas a 39 ° C en la oscuridad. Como control negativo se utilizaron embriones en donde se omitió la transferasa terminal de la reacción. Para visualizar los núcleos de los embriones se utilizó una contraincubación con yoduro de propidio (IP) al 0.5% por 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los embriones se lavaron en la solución de PBS/BSA y se montaron sobre un portaobjeto de vidrio con una gota de glicerol al 70% v/v. Los embriones fueron analizados dentro de las 48 horas con microscopio Confocal Nikon C.1. Para la detección de fluoresceína-12-dUTP se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y para excitar el IP una longitud de onda de 544 nm. Se tomaron fotografías cada 1,5-2 μm a lo largo del eje Z de cada embrión. Las imágenes tridimensionales fueron construidas utilizando el software EZ-C1 3.9. Se contó el número de células totales y los núcleos con ADN fragmentado mediante el software IMAGE J versión 1.46r.

Los resultados se expresaron como la cantidad de la relación entre el número de células con fragmentación de ADN y el número de células totales. Se determinó el índice apoptótico (IAP), utilizando la siguiente fórmula: $\text{IAP} = \frac{\text{células TUNEL (+)}}{\text{Número de células totales}} \times 100$. El índice apoptótico en cada blastocisto se calculó como la relación de núcleos TUNEL-positivos sobre los núcleos totales en cada blastocisto y luego se utilizó una prueba *t-Student* no pareada para calcular las diferencias estadísticas entre el índice de los diferentes grupos ($p < 0,05$).

11.8. Análisis estadístico

Para estos análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Las diferencias estadísticas en el desarrollo embrionario *in vitro* de los diferentes grupos experimentales fueron determinadas utilizando el programa mediante el test exacto de

Fisher con un $p < 0,05$. Al igual que fue utilizado en la medición del número de células y en el tamaño en diámetro de los embriones.

En el ensayo de TUNEL y el índice de células muertas se compararon mediante el test *t-Student*. Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0,05$.

12. Resultados

12.1. *Efectos de fármacos que modifican la epigenética embrionaria en el desarrollo in vitro de embriones partenogénicos porcinos.*

La Tabla 1 muestra el desarrollo de embriones partenogénicos expuestos a diferentes drogas durante los primeros tres días de cultivo (72hs). Se probaron dos concentraciones de tres fármacos diferentes y combinación entre ellos: 5-aza, Ac Valp y PD. El clivaje se vio afectado mostrando un descenso estadísticamente significativo respecto al grupo control (84,71%) en los tratamientos con Ac Valp 4mM (77,31%) y 5-Aza 2 μ M (77,20%) respecto a embriones clivados. Sin embargo, en las tasas de desarrollo a blastocistos los grupos tratados con 5-Aza no difirieron en ninguna de sus concentraciones respecto al control.

Los grupos tratados con Ac Valp en sus dos concentraciones generaron un efecto tóxico en embriones, disminuyendo significativamente la tasa de blastocistos en ambos casos. Esta disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) también se evidenció en el grupo tratado con PD 0,5 μ M y la combinación de drogas Ac Valp + 5-aza.

Ninguna de las drogas evidenció un mejor comportamiento que el control, sin embargo, encontramos una tendencia en la combinación de 5-aza 1 μ M + PD 1 μ M que mostró mayores tasas de blastocistos, sin embargo, no reflejó diferencias estadísticamente significativas respecto al control (test de Fisher $p < 0,05$). Las drogas usadas en la combinación mostraron una buena performance individualmente y en conjunto mostraron una tasa de 31,05% de desarrollo a blastocistos respecto a los embriones clivados, tasa superior al control, sin embargo, no alcanzó para generar diferencias estadísticamente significativas. Se eligió esta combinación para proseguir el estudio en embriones provenientes de clonación.

12.2. *Efectos de fármacos que modifican la epigenética embrionaria en el número de células de embriones partenogénicos porcinos.*

Este experimento se hizo con la finalidad de ver si el grupo que había mostrado una tendencia a incrementar el desarrollo *in vitro* mostraba ese mismo incremento en el

número de células, respecto al grupo control partenogénico. Sin embargo, el grupo 5 Aza + PD, no presentó diferencias estadísticas. Se midieron al azar otros dos grupos: 5 Aza 1 μ M y PD + Ac Valp, pertenecientes a los 10 generados en la curva de dosis, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en el grupo PD + Ac Valp, no así en el grupo de 5 Aza 1 μ M. Se contó número de células de blastocistos día 7 y se utilizó como análisis estadístico el *test de Fisher* con un $p < 0.05$ (Figura 7).

12.3. Efectos de la agregación embrionaria en el desarrollo embrionario *in vitro* de embriones partenogénicos porcinos.

En la Tabla 2 se muestra el desarrollo de embriones partenogénicos expuestos a agregación embrionaria. Se observó que las tasas de clivaje de los embriones agregados correspondientes al grupo 3x (85,91%) fueron significativamente superiores que las tasas del grupo control con ZP y las del grupo 1x sin agregar, 76,00 % y 65,73 % respectivamente, $p < 0,05$. Respecto al porcentaje de blastocistos por embriones clivados tanto el grupo 1x (19,66%) como el 3x (12,40%) presentaron diferencias significativas en comparación al control con ZP (35,52%). Sin embargo, los grupos 1x y 3x, no presentaron diferencias estadísticas entre ellos. Por otro lado, la tasa de blastocisto por embrión/pozo en el grupo 3x (considerando cada pozo como un sólo embrión) fueron casi tres veces superior a la del grupo 1x (31,96% vs. 12,92%, respectivamente) presentando diferencias estadísticas (*Test de Fisher* $p < 0,05$). Las Figuras 8 y 9 muestran el proceso de agregación y la diferencia de tamaño entre los grupos.

La agregación embrionaria en embriones partenogénicos mejoró las tasas de desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, y no implicó el uso de oocitos adicionales para obtener más embriones.

12.4. Efectos de la agregación embrionaria sobre el diámetro en embriones partenogénicos porcinos.

Se midió el tamaño de los blastocistos 1x y 3x, fueron divididos en tres grupos diferentes de acuerdo a su diámetro al día 7: 80 μ m-199 μ m (pequeño), 200 μ m-299 μ m (mediano) y >300 μ m (grande). El número de embriones analizados en cada categoría fueron: 1x $n = 18$ (13 embriones pequeños, 5 medianos y 0 grandes) y en el

grupo 3x n = 14 (3 embriones pequeños, 7 medianos y 4 grandes). Los embriones 3x eran más grandes que los 1x y éstas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Grupo experimental 1x tenía una mayor proporción (72,22 %) de embriones de tamaño pequeños, 27,78% de embriones medianos y ningún blastocisto (0 %) de más de 300 μ m. Por el contrario, el 78,57 % de los blastocistos agregados (grupo experimental 3x) eran de diámetro mediano y grande. Ésta diferencia fue estadísticamente significativa (Test exacto de Fisher $p < 0,05$). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

12.5. Efectos de la agregación embrionaria en la fragmentación del ADN medido por la técnica de TUNEL en embriones partenogénicos porcinos.

La expresión de los niveles de ADN fragmentado en embriones porcinos partenogénicos agregados y no agregados se muestran en la Figura 10. El porcentaje de células positivas de la técnica de TUNEL no resultó significativamente diferente entre los grupos experimentales 1x y 3x, presentando entre un 4,35 y un 29,55% de células con algún grado de fragmentación del ADN en el grupo de embriones partenos 1x y entre un 2,60 a un 10% en el grupo 3x (Tabla 4). A pesar de que en el grupo sin agregar aparecieron niveles bastante superiores a los agregados, las diferencias dentro de los grupos diluyeron las diferencias estadísticas. Los resultados son expuestos en la Figura 10 y 11. Se detectó fragmentación del ADN, tanto en MCI como en el trofoblasto de embriones en ambos grupos, no visualizándose una localización específica.

Tabla 1: Efecto de fármacos que modifican la epigenética embrionaria en el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénicos.

Tratamiento	N	No Clivaje (%)	No. Blastocistos (%)
Partenogénicos control	242	205 (84,71 ^a)	57 (27,80 ^a)
Ac Valp 2mM	140	120 (85,71 ^a)	10(8,33 ^b)
Ac Valp 4mM	260	201 (77,31 ^b)	10 (4,97 ^{cb})
5 aza 1μM	147	119 (80,95 ^a)	29 (24,37 ^{afg})
5 aza 2μM	364	281 (77,20 ^b)	60 (21,35 ^{afh})
5 Aza1μM + Ac Valp 2mM	94	81 (86,17 ^a)	12 (14,81 ^{dbgh})
PD 0,5μM	224	191 (85,27 ^a)	35 (18,32 ^{fd})
PD 1μM	312	256 (82,05 ^a)	55 (21,48 ^{ad})
5 Aza 1μM +PD 1μM	255	219 (85,88 ^a)	68 (31,05 ^a)
PD 1μM + Ac Valp 2mM	159	138 (86,79 ^a)	26 (18,84 ^{ad})

Diferentes superíndices dentro de la misma columna son significativamente diferentes (Prueba exacta de Fisher, $p < 0,05$).

Tabla 2: Efectos de la agregación embrionaria sobre el desarrollo embrionario *in vitro* en embriones partenogénéticos porcinos.

Tratamiento	No. embriones	No. pozo	No. clivaje embrión (%)	por	No. clivaje por pozo (%)	No. blastocisto	No. blastocisto (% por embrión clivado)	No. blastocisto (% por pozo)
Con zona	100	NC	76 (76,00%) ^a		NC	27	27 (35,52%) ^a	NC
1x	178	178	117 (65,73%) ^a		117(65,73%) ^a	23	23 (19,66%) ^b	23(12,92%) ^a
3x	291	97	250 (85,91%) ^b		93 (95,88%) ^b	31	31 (12,40%) ^b	31(31,96%) ^b

(a, b) Valores diferentes de superíndices dentro de una misma columna son significativamente diferentes (Prueba exacta de Fisher, $p < 0,05$). * NC= No corresponde.

Tabla 3: Efectos de la agregación embrionaria sobre el diámetro de los blastocistos partenogénicos porcinos.

Diámetro de blastocistos				
Grupo experimental	No. Blastocisto	80 µm-199 µm (%)	200µm-299µm (%)	>/= 300µm (%)
1x	18	13(72,22) ^a	5 (27,78)	0 (0) ^a
3x	14	3 (21,43) ^b	7 (50,0)	4 (28,57) ^b
Total	32	16 (50)	12 (37,5)	4 (12,5)

Valores diferentes de superíndices (a, b) dentro de una misma columna son significativamente diferentes (Prueba exacta de Fisher, p <0,05).

Tabla 4: Evaluación de los niveles de fragmentación del ADN mediante técnica de TUNEL en embriones partenogénicos agregados y no agregados (día 7).

Blastocistos	Grupo experimental	N° de embriones analizados	Blastocistos con células TUNEL +	Total de células por embrión	Células TUNEL+	% índice de TUNEL
				23	1	4,35
				44	13	29,55
Día 7	1x	3	3	21	1	4,76
Total				88	15	17,04
				77	2	2,60
				30	3	10,00
Día 7	3x	3	3	81	3	3,70
Total				188	8	4,25

Valores diferentes de superíndices (a, b) en una misma columna son significativamente diferentes (Test t de Student, p<0.05).

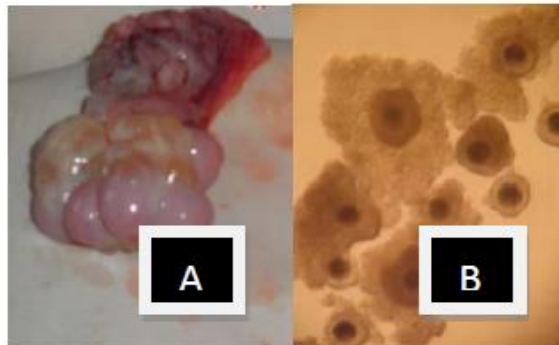


Figura 6. Microfotografía de (A) ovarios de cerdas mostrando folículos de 3-6 mm con oocitos dentro, B) oocitos de cerdas rodeados por 3 o más capas de células del cúmulus. Una vez punzados los oocitos se ponen a maduran in vitro en estufa gaseada por 40-44hs.

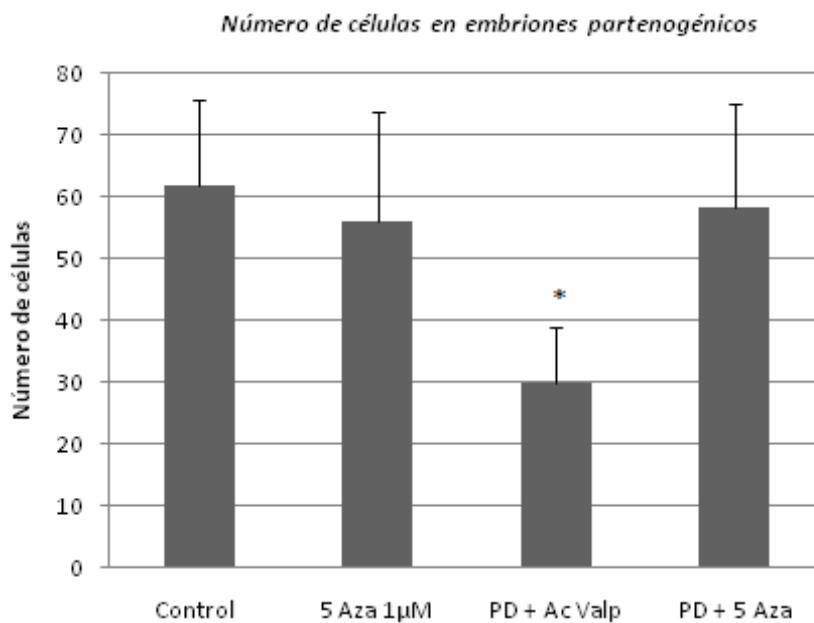


Figura 7. Gráfico de barras representando número de células de embriones partenogénicos controles y tratados. Blastocistos día 7 teñidos con Hóechst 33342 Bisbenzímide observados en microscopio bajo luz UV.

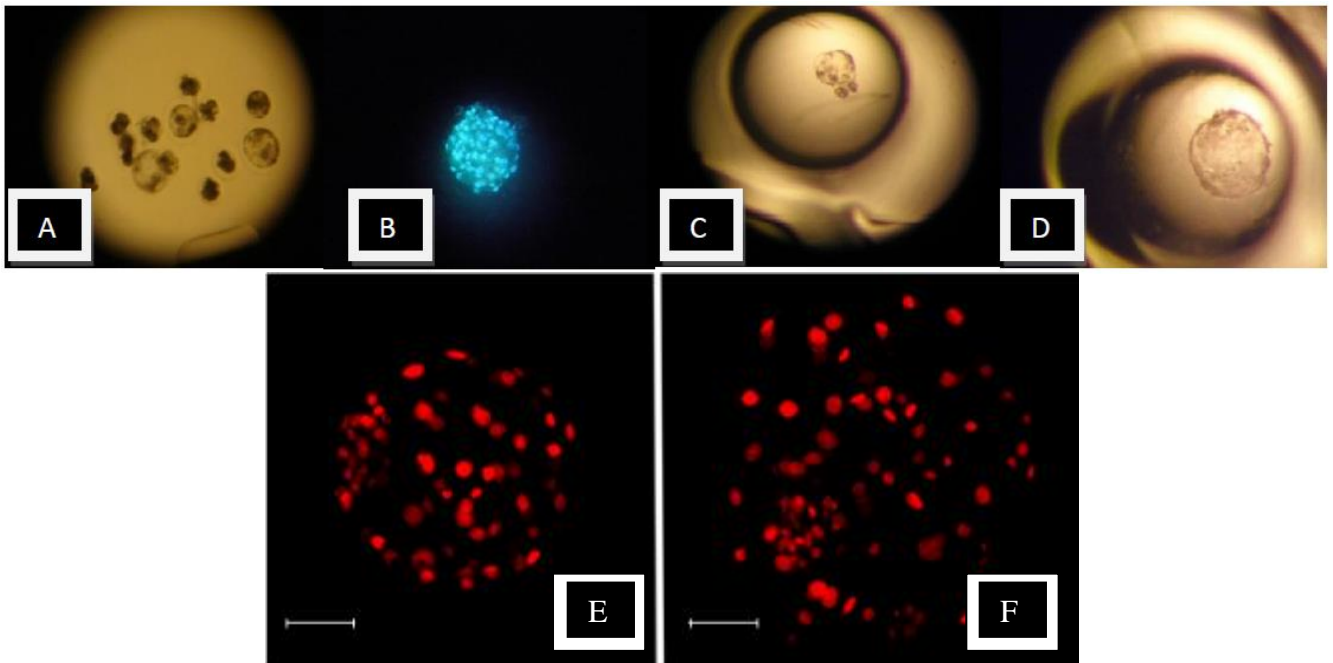


Figura 8. Microfotografías de blastocistos de cerdos partenogénicos. (A) Gota de 100ul de SOF con embriones pertenecientes al grupo control con zona pelúcida (día 7), (B) Blastocisto día 7, teñido con Hoechst 33342 bisbenzimidide observado en microscopio bajo luz UV, (C, E) blastocistos 1x (día 7) en el caso de la figura E se tiñó durante 15 min con IP, (D, F) blastocistos 3x (día 7), en el caso de la figura F se tiñó durante 15 min con IP en oscuridad. (E y F) muestran diferencia en tamaño del blastocisto en grupo 3x respecto al 1x, bajo el mismo aumento del microscopio (40X). La barra blanca marca 50 μm , muestra la relación entre el tamaño de los embriones 1x y 3x.

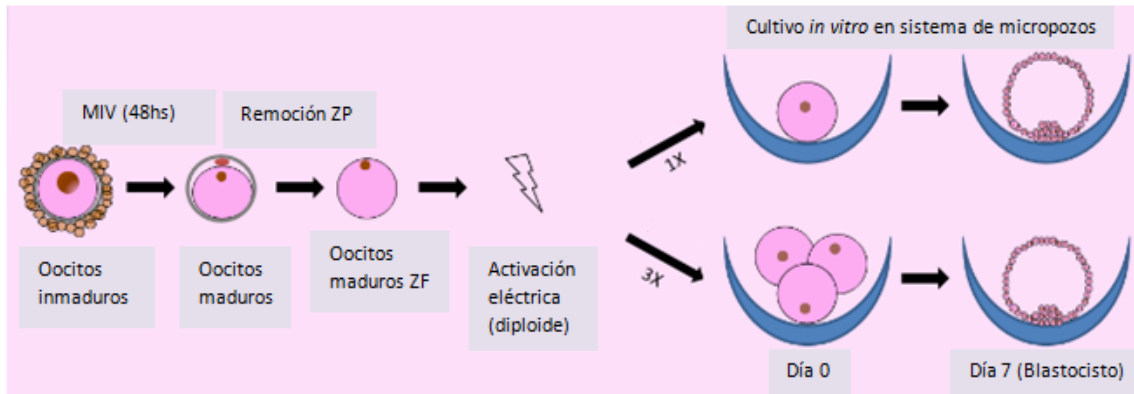


Figura 9. Proceso de agregación en el sistema de micropozos en embriones partenogénicos porcinos. Diagrama modificado de Gambini y col, 2016.

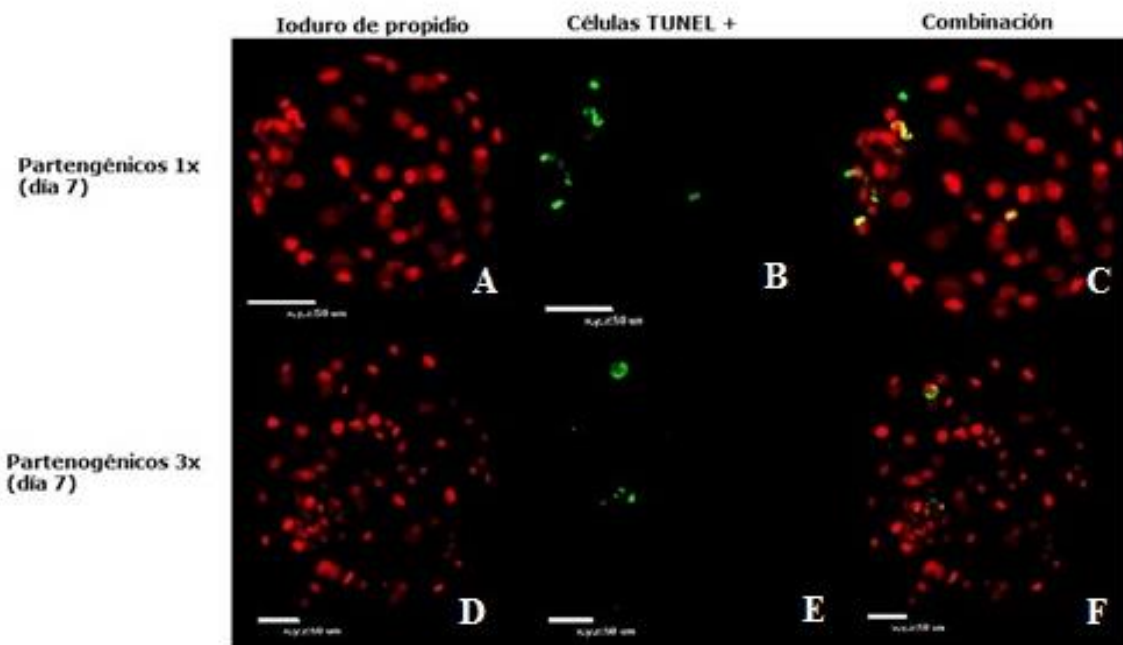


Figura 10. Microfotografías de blastocistos de embriones partenogénicos porcinos expresando ADN fragmentado detectado con la técnica de TUNEL. (A, B y C) Blastocisto partenogénico no agregado (1x) día 7, zoom 20x. (D, E y F) Blastocisto partenogénico agregado (3x) día 7, zoom 20x. La raya blanca marca 50µm de tamaño para muestra la relación de tamaño entre ambos grupos. Color rojo = Ioduro de propidio, color verde = células apoptóticas.

Apoptosis mediante TUNEL en embriones partenogenéticos

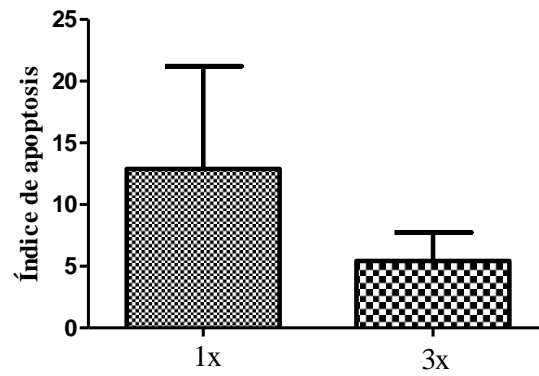


Figura 11. Gráfico de barras mostrando niveles de apoptosis entre embriones partenogenéticos agregados y no agregados (test *t-Student* $p < 0.05$).

13. Discusión capítulo I.

En este capítulo se presenta el estudio de algunas de las variables que fueron afectadas por el uso de drogas que modifican la epigenética embrionaria. Esto permitió encontrar una tendencia en la combinación de 5-Aza + PD que mostró un aumento en las tasas de desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Sin embargo, no presentó diferencias en el número de células respecto al control partenogénico sin tratar. McLean y col., 2014 usaban concentraciones bajas de PD y aumentaba el número de células de MCI sin afectar el número total celular, implicando menos células en el TE. Nuestros resultados combinaron dos drogas que inducen modificaciones epigenéticas, éstas fueron usadas previamente, pero nunca en forma conjunta, y los tiempos de exposición a éstas drogas fueron elegidos en base a los tiempos de activación del genoma embrionario porcino (que en cerdos es aproximadamente a las 8 células en adelante). Se eligió una concentración baja de las drogas, se expuso al embrión hasta la activación del genoma embrionario y hasta el período donde comienza la compactación debido a que esas condiciones debían ser replicadas posteriormente en clones porcinos reconstituídos sin ZP, en los cuales uno de los mayores inconvenientes es lograr la compactación embrionaria.

Con respecto al grupo tratado con PD + Ac. valp presentó un detrimento estadísticamente significativo en el número de células. El Ac. valp es un ácido graso de cadena corta que inhibe la histona desacetilasa, se ha usado por décadas para tratar la epilepsia, y también es eficaz para el tratamiento de dolores de cabeza (migraña) y esquizofrenia. Recientemente, se lo asocia a una mejora en la eficiencia de la reprogramación de fibroblastos en embriones de ratón, sin embargo, a concentraciones elevadas induce a problemas neurales (Seegmiller y col., 1991). En la presente Tesis, los grupos tratados con Ac valp presentaron un efecto tóxico *in vitro*, mostrando tasas de desarrollo inferiores al 9% de desarrollo *in vitro* en ambas concentraciones. A su vez, presentó un menor número celular, 30 células promedio mientras que el control presentó un promedio de 60 células, reflejado en la morfología y la forma del embrión que no mostró un MCI bien definido. Trabajos anteriores demostraron que el Ac. valp a concentraciones altas tenían efecto tóxico (Kang y col., 2013), no presentaban sobrevivida una vez implados en receptoras. Sin embargo, otros trabajos a igual concentración que

en nuestro trabajo (2 mM) tenían un aumento en el número celular y eso no se veía cuando se aumentaban a 4 u 8 mM (Huang y col., 2011 y 2013), en ese trabajo se usó 1mM de Ac valp para evitar tener toxicidad embrionaria.

Los demás grupos experimentales tratados mostraron un comportamiento similar al control partenogénico no mostrando un desempeño superior y por ende no presentaron diferencias estadísticas.

La agregación embrionaria demostró tener efectos beneficiosos para el desarrollo *in vitro*. Los trabajos previos reportados hasta el momento sobre agregación embrionaria en mamíferos enfocaron sus objetivos en determinar el efecto de embriones agregados, combinando hasta un máximo de tres estructuras (Stevens y col., 1977; Surani y col., 1977; Stevens y col., 1978; Anderegg y col., 1986; Boediono y col., 1995; Boediono y col., 1999; Boiani y col., 2003; Eckardt y col., 2004; Zhou y col., 2008; Misica-Turner y col., 2007; Lee y col., 2007; Oback y col., 2008; Ribeiro y col., 2009; Shan y col., 2012). Sin embargo, Gambini y col., 2014, reportaron un trabajo orientado a determinar cuál es el número adecuado de estructuras a agregar para lograr los máximos efectos de la agregación embrionaria. Y el número máximo fue de 4 estructuras por micropozo. A partir de 5 estructuras decaían los beneficios de la agregación.

Los beneficios de la agregación embrionaria se atribuyen a un aumento en el número de células, a una complementación epigenética o ambas situaciones (Boiani y col., 2003). También benefician la compactación embrionaria sobre todo en la especie porcina donde la cantidad de lípidos presente hace que los embriones tiendan a flotar en los micropozos, ya que ayudan a empezar el cultivo *in vitro* con mayor número de células iniciales. Esta idea permitiría suponer que mientras mayor sean las estructuras agregadas, mejores serán los beneficios. Sin embargo, cuando se agregaron cinco estructuras el desarrollo no fue el esperado, lo cual indicó que existen otros mecanismos asociados que afectan el desarrollo de embriones agregados cuando la cantidad de estructuras es elevada (Gambini y col., 2014).

Cuando se analizaron los niveles de fragmentación del ADN en blastocistos partenogénicos porcinos agregados y no agregados, se observó que el grupo 1x presentaba una tasa de apoptosis de entre 4,35% a 29% igual a la observada previamente por Hao y col., 2004. Sin embargo, esa tasa bajaba tres veces cuando se usaba a la agregación como herramienta para aumentar la calidad embrionaria.

En nuestro trabajo, la variabilidad intra grupo dentro de los no agregados diluyó las diferencias estadísticas. Sin embargo, el grupo 3x nunca superó el 10% de células apoptóticas demostrando que a pesar de tener un mayor tamaño no presentaba mayor proporción de células con el ADN fragmentado. Los embriones agregados a pesar de comenzar su desarrollo con mayor número de células, no se registró diferencia en las tasas de ADN fragmentado entre ambos grupos al día 7. Este fenómeno sumado a que no se observaron diferencias en el número celular sugieren que existen otros mecanismos mediante los cuales el embrión logra controlar el número de células y su crecimiento.

14. Conclusión capítulo I.

Los datos presentados en este capítulo permiten afirmar que se pudo encontrar una combinación de drogas (5 aza + PD) que mostró una tendencia a mejorar el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénicos y que podría utilizarse para clones porcinos.

La agregación embrionaria mejoró las tasas de desarrollo *in vitro* no implicando un mayor uso de oocitos, incrementó el tamaño en diámetro de los embriones 3x, sin embargo, no presentaron diferencias estadísticas en el número de células.

La apoptosis celular o fragmentación del ADN no presentó diferencias estadísticas entre el grupo agregado y el no agregado, demostrando que el control en el número celular de los embriones agregados podría estar controlado por otros parámetros que no son sólo la apoptosis celular.

CAPÍTULO II

Agregación embrionaria de clones porcinos: desarrollo embrionario *in vitro*, apoptosis, expresión génica y transferencias embrionarias.

Capítulo II.

Los resultados obtenidos en este capítulos se presentaron en formato paper en la Revista PlosOne con el nombre: *Embryo Aggregation in Pig Improves Cloning Efficiency and Embryo Quality*. PLoS One, 2016. Buemo CP, Gambini A, Moro LN, Hiriart MI, Fernández-Martín R, Collas P, Salamone DF.

15. Introducción capítulo II.

La clonación de mamíferos mediante SCNT tiene un enorme potencial en biotecnología y ha abierto nuevas posibilidades para obtener transgénicos útiles mediante modificaciones genéticas específicas en distintos animales de granja (Nagashima y col., 2003). Además de la posible aplicación en agricultura y biomedicina, la SCNT es una de las herramientas más poderosas utilizadas para estudiar los acontecimientos que se producen durante la reprogramación y la diferenciación celular (Tamada y col., 2004). El éxito de la clonación, utilizando células somáticas de mamíferos, indica que las modificaciones epigenéticas en un núcleo ya diferenciado a un tejido específico pueden ser remodeladas a un estado totipotente (Tamada y col., 2004). El primer cerdo clonado fue obtenido por transferencia nuclear de células adultas de la granulosa (Polejaeva y col., 2000) y posteriormente, se han obtenido otros clones porcinos (Hyun y col., 2003; Huan y col., 2013; Bordignon y col., 2013; Siriboon y col., 2014, entre otros).

Esta técnica ha sido utilizada previamente en nuestro laboratorio en varias especies de mamíferos. Sin embargo, cuando se adicionó la técnica de agregación embrionaria en clones libres de zona pelúcida, se obtuvieron ventajas significativas tanto en el equino (Gambini y col., 2012 y 2014) como el felino (Moro y col., 2015). La agregación embrionaria consiste en colocar más de un embrión libre de zona pelúcida en el mismo micropozo. Algunos de los beneficios informados en mamíferos son: un incremento en el desarrollo embrionario *in vitro* en el ratón (Boiani y col., 2003), en cerdos (Huan y col., 2013), equinos (Gambini y col., 2012 y 2014) y en felinos (Moro y col., 2015), un aumento de la densidad de células en el macizo celular interno en

bovinos (Misica-Turner y col., 2007), un aumento del diámetro del blastocisto en equinos y bovinos (Gambini y col., 2012 y Bang y col., 2015) y también una reducción en la apoptosis en embriones bovinos y porcinos (Zhou y col., 2008; Siriboon y col., 2014; Bang y col., 2015). Otra de las ventajas es la normalización de la expresión génica en bovino (Zhou y col., 2008). Para finalizar, en algunos casos, también se ha incrementado el desarrollo embrionario *in vivo* y las tasas de preñez en el ratón (Boiani y col., 2003), en los equinos (Gambini y col., 2012) y en ganado bovino (Ribeiro y col., 2009; Akagi y col., 2011; Bang y col., 2015).

Un clon puede tener defectos epigenéticos (Zhou y col., 2008), la agregación de embriones podría compensar las deficiencias de reprogramación a través de las interacciones entre las blastómeras (Boiani y col., 2003) o por la interacción de factores parácrinos (Boiani y col., 2003). De hecho, se ha propuesto que tal interacción podría también mejorar el desarrollo embrionario posterior a la implantación (Vajta y col., 2005).

Durante la embriogénesis ocurre un proceso llamado apoptosis que es la muerte celular programada, un proceso fisiológico que tiene un papel en la respuesta celular a condiciones de desarrollo subóptimos y al estrés (Betts y col., 2001). La apoptosis ayuda en la eliminación de las células con anomalías cromosómicas o con desarrollo inadecuado (Hardy 1997). Sin embargo, si la apoptosis sobrepasa un cierto umbral, el desarrollo del embrión podría verse comprometido (Betts y col., 2001; Ju y col., 2010). Por otra parte, su ocurrencia en embriones preimplantatorios ha sido considerada uno de los parámetros más importantes para la evaluación de la salud del embrión y la regulación del número de células (Brison y col., 1997; Hardy y col., 2002; Kamjoo y col., 2002); el ensayo de TUNEL (dUTP mediada por deoxynucleotidyltransferase etiquetado nick-extremo terminal) se ha utilizado previamente para la detección del proceso de apoptosis en embriones de mamíferos (Hardy y col., 1997).

Los mecanismos epigenéticos han demostrado influenciar críticamente el desarrollo embrionario a través del control de la expresión génica y el empaquetado de la cromatina (Jones y col., 1999). Varios genes están reportados estar asociados con la pluripotencia del embrión: *Oct4* (Nichols y col., 1998), *Sox2* (Avilion y col., 2003), *Nanog* (Chambers y col., 2003) y con la segregación de linaje como *Cdx2* (Strumpf y col., 2005). Sin embargo, en comparación con nuestra especie o con el ratón, los embriones porcinos presentan numerosas diferencias en su perfil de expresión de

marcadores de pluripotencia. Esto puede sugerir que existen diferentes mecanismos implicados en la regulación de la pluripotencia en esta especie (Gao y col., 2011).

Para mejorar la eficiencia de la clonación en porcinos, es necesario producir una alta calidad y cantidad de blastocistos clonados (Gambini y col., 2012; Tang y col., 2000; Lee y col., 2007). La hipótesis de este capítulo es que la agregación embrionaria podría mejorar la competencia de desarrollo *in vitro* y la calidad de los embriones. Con la finalidad de probar nuestra hipótesis, se estudiaron las tasas de desarrollo *in vitro* del embrión, el número total de células por blastocisto, el diámetro, los niveles de fragmentación del ADN mediante el ensayo de TUNEL y la expresión de genes asociados con la pluripotencia, apoptosis, marcadores de trofoblasto y enzimas intervinientes en la metilación, en embriones clonados agregados y no agregados. Para finalizar el capítulo, se hicieron tres transferencias embrionarias, mediante cirugía no quirúrgica de embriones clonados 3x.

16. Materiales y Métodos capítulo II

Sólo se detallarán los materiales y métodos que no hayan sido descriptos en capítulos anteriores.

16.1. Colecta, denudación y MIV de los oocitos

Los ovarios y oocitos se colectaron de la misma manera que se detalló en el capítulo anterior. La denudación de la ZP y la MIV ovocitaria se realizaron de igual manera a la descripta en capítulo I.

16.2. Enucleación

Previo a la enucleación, los oocitos-ZF fueron incubados en estufa por 15 minutos en gota de medio SOF que contenía 1 µg/ml Hoechst Bisbenzimidazole 33342 (B2261) y 0.5µg/ml de citocalasina B (C6762). La metafase II fue aspirada utilizando una pipeta con punta roma de 20 µm de diámetro, visualizando la misma por la emisión de luz UV. Otra pipeta con el extremo cerrado de 80 µm de diámetro fue utilizada para manipular el oocito y permitir su enucleación. Oocitos enucleados-ZF se mantuvieron en gotas individuales de 5 µl de medio SOF hasta la transferencia nuclear.

16.3. Obtención de explantos de tejido y cultivo *in vitro* de células somáticas

Los fibroblastos adultos fueron obtenidos a través del cultivo *in vitro* de biopsia de piel (dermis) tomadas con un punch de 4 mm de ancho en la pata trasera del animal. El cultivo primario fue realizado cortando en pequeños pedacitos del explante de tejido, seguido de sucesivos lavados con DPBS + 5% ATB. Esos pedacitos fueron desgarrados con una aguja y ubicados en una placa de petri de 35 mm de a 5 pedacitos. El medio de cultivo utilizado fue DMEM con 10% SFB y 1% ATB bajo 5% CO₂ en aire humidificado a 39 °C. Luego de una semana, los explantes comenzaron a generar células en división y una vez que se comenzó a células rodeando los explantes, éstos últimos fueron eliminados. Se dejó creciendo las células hasta tener 100 % de confluencia. Los fibroblastos obtenidos fueron finalmente criopreservados en DMEM

con 20% de SFB y 10% de dimetilsulfóxido y conservados en nitrógeno líquido. Tres a cinco días previos a la SCNT se descongelaron las células donantes y se sincronizaron mediante crecimiento hasta confluencia. Para levantar las células de la placa de cultivo se utilizó la enzima Tripsina (15 mg/ml) durante 2 minutos hasta que se visualizaron separadas, se neutralizó la acción de la enzima con DMEM conteniendo 10% de SFB. Se centrifugó durante 10 minutos y se hizo una dilución hasta obtener células separadas para el proceso de transferencia.

16.4. Transferencia nuclear y reconstrucción embrionaria

Oocitos libres de ZP y previamente enucleados fueron individualmente colocados en una gota de 50 μ l de 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA; L8754) disuelta in TCM-199, durante unos segundos. Luego, fueron rápidamente adheridos a una célula donante ubicada en el fondo de una placa de petri en una gota de 100 μ l con medio TALP-H. Luego, las estructuras adheridas fueron colocadas en medio de fusión (0.3 M manitol, 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 1mg/ml PVA) durante 1 minuto y luego colocadas en una cámara de fusión conteniendo 2 ml de medio de fusión. La fusión se realizó mediante un pulso doble unidireccional de CD de 1.2 kV/cm V. Cada pulso con una duración de 30 μ s, con un intervalo de descanso de 0.1 segundos. Luego del pulso, cada pareja fue colocada individualmente en microgotas de 5 μ l de SOF suplementadas con 2.5 % SFB e incubadas a 39 °C en atmósfera gaseada 5% CO₂. Veinte minutos después, se realizó el control individual de la fusión. Aquellas estructuras que no fusionaron, fueron sometidas a una segunda ronda de fusión bajo las mismas condiciones. Las parejas fusionadas se consideraron embriones reconstituidos sin zona pelúcida (ERZFs), los cuales fueron mantenidos en incubadora durante dos horas hasta la activación (tiempo de reprogramación).

16.5. Activación

Los ERZFs fueron activados de igual manera que los embriones partenogénicos, procedimiento explicado en el capítulo I.

16.6. Agregación embrionaria y cultivo in vitro hasta el día 7

Se utilizó el sistema de micropozos o "*Well of the Well*" previamente descrito por Vajta y col., 2000. Brevemente, los pocillos se produjeron usando un capilar de vidrio ligeramente caliente en su punta y se perforó haciendo micropozos en la parte inferior de una placa de petri de 35 mm x 10 mm. Los micropozos se cubrieron con 100 µl de medio de SOF y cada gota poseía entre 15 y 20 micropozos. La agregación de embriones se realizó colocando al azar más de un ERZF por pocillo. Se realizaron dos grupos experimentales diferentes: grupo 1x, un ERZF por pocillo (grupo de control o embriones no agregados); y el grupo de 3x, tres ERZFs por pocillo. El número total de ERZFs por gota de 100 µl fue similar entre ambos grupos. Los embriones se cultivaron en una mezcla de gas humidificado (5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂) a 38.5 °C. La mitad del medio se renovó al día 2 con SOF fresco, y al día 5 el medio se renovó de nuevo con medio SOF que contenía 10% de SFB. El clivaje embrionario se evaluó 48 hs después de la activación, y la formación de blastocisto y su diámetro se registraron al día 7, cuando los embriones fueron fijados ya sea para el ensayo de TUNEL o almacenados en ARN later (AM 7020, Ambion Co., Austin, TX, EE.UU) para el estudio de expresión génica.

16.7. Medición de los embriones

La medición de los embriones se realizó de igual manera que para los embriones partenogénicos descrito en materiales y métodos del capítulo I.

16.8. Fijación y detección de apoptosis celular mediante test de TUNEL en embriones clones.

Técnica descrita en materiales y métodos del capítulo I.

16.9. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real

Para el análisis de la expresión génica se utilizaron dos grupos (clones 1x y clones 3x). Se hizo un pool de n = 12 blastocistos de cada grupo y tres repeticiones biológicas,

es decir, cada grupo por triplicado. Los embriones fueron guardados a -20°C en RNA later® (AMBION, Austin, TX, EEUU AM7024) hasta el momento de su utilización. Posteriormente, éstos se lavaron dos veces en DPBS para eliminar el RNA later en el que se conservaron. El ARNm se aisló utilizando el kit micro RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania, Cat. No.74004) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la digestión del ADN genómico las muestras se trataron con DNasa I (0,04 U/litro). Inmediatamente, se realizó la RT-PCR en un volumen final de 20 μl . Para la PCR cuantitativa se utilizó el colorante SYBR de acuerdo con las instrucciones del fabricante con sistema de detección de un solo color en el ciclador MyiQ PCR en tiempo real de la marca BIO RAD. La cuantificación de los transcritos génicos se realizó utilizando ACTB como control estándar interno. La mezcla de reacción (en total 12,5 μl) contenía 6,5 μl de la mezcla ya preparada por fabricante, 0,25 μl de cada cebador (20 mmol / l), 5 μl de ADNc (250 ng concentración final), y 0,5 μl MilliQ agua.

16.10. Diseño de cebadores.

Los cebadores utilizados para el análisis de expresión génica fueron diseñados utilizando el programa Primer3 versión en línea basado en las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI). Los cebadores y los tamaños de los productos obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Secuencias de cebadores y condiciones de RT-qPCR.

Genes	Secuencias de cebadores (5´ -3´)	Tamaño de los productos de PCR (pb)	Tm (°C)	Números de acceso de referencia o secuencia
<i>Klf4</i>	CCATGGGCCAAACTACCCAC	81	60	NM_001031782.2
<i>Klf4</i>	GGCATGAGCTCTTGTAATGG	81	59	NM_001031782.2
<i>Nanog</i>	CCACTGGCCAAGGAATAGCA	88	60	NM_001129971.1
<i>Nanog</i>	CAGGCATCCTTGGTGGTAGG	88	60	NM_001129971.1
<i>Oct4</i>	GCTCACTTTGGGGTTCTCT	80	59	NM_001113060
<i>Oct4</i>	TGAAACTGAGCTGCAAAGCC	80	59	NM_001113060
<i>Bcl-xl</i>	GTTGACTTTCTCTCCTACAAGC	277	62	SUN HWANG, 2008
<i>Bcl-xl</i>	GGTACCTCAGTTCAAATCATC	277	62	SUN HWANG, 2008
<i>Bax- α</i>	ACTGGACAGTAACATGGAGC	294	63	SUN HWANG, 2008
<i>Bax- α</i>	GTCCCAAAGTAGGAGAGGAG	294	63	SUN HWANG, 2008
<i>Dnmt1</i>	TTCTCACTGCCTGACGATGT	79	59	NM_001032355.1
<i>Dnmt1</i>	CCTTCACGCATTCCTTTTCTGT	79	59	NM_001032355.1
<i>Igf2</i>	GGCATCGTGGAAGAGTGCT	128	60	X56094.1
<i>Igf2</i>	CTGGGGAAGTTGTCCGGAAG	128	60	X56094.1
<i>Cdx2</i>	CAGCCAAGTGAAAACCAGGAC	119	59	NM_001278769.1
<i>Cdx2</i>	CGGCCTTTCTCCGAATGGT	119	60	NM_001278769.1
<i>ACTB</i>	AGATCGTGCGGGACATCAAG	93	59	DQ452569.1
<i>ACTB</i>	GCGGCAGTGGCCATCTC	93	59	DQ452569.1

16.11. Producción , transporte y transferencia de los embriones clonados.

Se hicieron tres transferencias de blastocistos obtenidos por agregación embrionaria. Las transferencias fueron realizadas en el establecimiento Cabañas Argentinas, ubicada en General Las Heras, provincia de Buenos Aires, durante el año 2013. Los blastocistos fueron transportados en pajuelas de 0,5 centímetros cúbicos, en medio SOF previamente calibrado en estufa gaseada. Las pajuelas se colocaron en un contenedor de telgopor, entre dos botellas de agua a 37 °C, y fueron transportadas por vía terrestre hacia el campo en un lapso de 3 hs aproximadamente.

Cinco hembras de raza landrace de entre 2 y 3 años de edad fueron examinadas para determinar la fase de su ciclo estral. La transferencia de blastocistos (día 7) se realizó por el método no quirúrgico, vía transcervical, en receptoras ovuladas entre cinco y siete días antes del día de la transferencia, utilizando una vaina de transferencia específica para cerdos (Minitube, Buenos Aires, Argentina). Antes de la transferencia, las cerdas receptoras fueron introducidas al brete para sujetarlas y se realizó la higiene del área vulvar utilizando jabón blanco neutro y abundante agua.

La preñez fue diagnosticada primero por el método de retorno al celo, con la presencia de un macho. Si la hembra no retornaba al celo, se pasaba a la segunda etapa, que consistía en hacerle una ecografía 15 días después ovulación de la receptora.

16.12. Análisis estadístico

Tanto el desarrollo del embrión *in vitro*, las diferencias en el número de células y el diámetro de los blastocistos se compararon por el *test de Fisher*. El ensayo de TUNEL y el índice de células muertas por apoptosis se compararon mediante la prueba *t* de Student. Se consideraron significativa las diferencias con un $p < 0,05$ para ambos estudios. Se realizó la PCR en tiempo real con ACTB como gen de referencia. La expresión relativa de cada gen se calculó a partir de los valores medios de Ct de cada triplicado utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$. Las diferencias en el nivel de la expresión génica en ambos grupos se analizaron mediante una prueba paramétrica *t-Student*. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas con un nivel de significación de $p < 0,05$. Los datos obtenidos en este estudio se analizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

17. Resultados capítulo II

En el presente capítulo, se intentó dilucidar si la agregación embrionaria *in vitro* mejora la eficiencia de la técnica de clonación en la especie porcina, a través de un estudio exhaustivo de la calidad del embrión. Para evaluar esto, se analizaron las tasas de desarrollo *in vitro*, el diámetro y número de células del embrión, niveles de fragmentación de ADN y el patrón de expresión de diferentes genes relacionados a pluripotencia.

17.1. Efectos de la agregación embrionaria en el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.

Los registros de desarrollo *in vitro* de embriones clonados se muestran en la Tabla 6. Se observó que las tasas de clivaje por ERZF eran significativamente mayor en embriones agregados 3x respecto al grupo control 1x, 92,17% vs 73,05%, respectivamente, $p < 0,0001$. Sin embargo, la tasa de blastocistos por ERZF no difirió entre ambos grupos. Por otro lado, las tasas de blastocisto por embrión (considerando cada micropozo como un embrión) en el grupo de 3x (37.39%) fue más de tres veces mayor que la del grupo control (11,38%) ($p < 0,0001$). El embrión clonado agregado libre de zona mejoró las tasas de desarrollo de blastocisto, y no implicó el uso de oocitos adicionales para obtener más embriones.

17.2. Efectos de la agregación embrionaria sobre el diámetro en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.

El diámetro de blastocistos clonados se midió y se dividieron en tres grupos diferentes en función de su diámetro al día 7: 80 micras-199 micras (tamaño pequeño), 200µm-299 micras (tamaño medio) y >300 micras (tamaño grande). El número de embriones analizados en cada categoría de diámetro fueron: 1x (n = 16) y 3x (n = 28). Los diámetros de los embriones por grupo fueron: en el grupo 1x (pequeño) n = 12: 1 embrión midió 99,6 µm, 3 midieron 132,8 µm, 1 de ellos 149,4 µm, 166 µm (3) y 199,2 µm (4); en el grupo 1x (medio) n = 4: 1 de cada valor: 215,2 µm, 249 µm, 265,6 µm y 282,2 µm. En el grupo 3x (pequeño) n = 7: 132,8 µm (3), 166 µm (3) y 199,2 µm (1); en

el grupo 3x (medio) n = 12: 215,8 μm (2), 232,4 μm (2), 249 μm (4), 265,6 μm (2), 282,2 μm (1) y 298,8 μm (1). Por último, en el grupo 3x (grande) n = 9: 365,2 μm (2), 381,8 μm (3), 415 μm (1), 448,2 μm (2) y 514,6 μm (1). Embriones agregados 3x eran más grandes que no agregados 1x y éstas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,011$). El grupo experimental 1x tenía una proporción más alta (75%) de los embriones de diámetro pequeño, y ningún blastocisto midió más de 300 μm . Por el contrario, 75% de blastocistos agregados (grupo experimental 3x) eran de diámetros medio y grandes. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

17.3. Efectos de la agregación embrionaria sobre el número de células en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.

El número de células al día 7 en blastocistos porcinos clonados fueron diferentes entre los grupos. Los embriones agregados tenían más células que los embriones no agregados. El número medio de células en el grupo 1x fue entre 27-64 células y en el grupo 3x entre 26-108 células (Figura 12). Esto concuerda con el dato que la mayor parte de los blastocistos 3x eran de tamaño más grande ($> 300\mu\text{m}$) en comparación con los blastocistos 1x ($p < 0,0001$) (Tabla 7).

17.4. Efectos de la agregación embrionaria en la fragmentación del ADN medido por la técnica de TUNEL en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.

Los niveles de células apoptóticas se determinaron mediante la detección de fragmentación del ADN mediante el ensayo de TUNEL. Los embriones del grupo 3x mostraron un índice apoptótico más bajo que el grupo control 1x (4,18% frente a 13,18%)($p < 0,05$), mostrando diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se muestran en las Figuras 13 y 14 y en la Tabla 8.

17.5. Efectos de la agregación embrionaria sobre la expresión de genes de pluripotencia en embriones porcinos día 7, producidos por SCNT.

Con el fin de evaluar el efecto de la agregación embrionaria en clones de cerdos sobre la reprogramación celular, se midió el ARNm de genes relacionados a pluripotencia: *Oct4*, *Nanog* y *Klf4*; dos genes relacionados a diferenciación *Cdx2* y *Igf2*; dos a apoptosis *Bcl-XL* y *Bax* y finalmente *Dnmt1*, un modulador clave de la metilación del ADN. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión relativa de los genes *Oct4*, *Klf4*, *Igf2*, *Bax* y *Dnmt1*. Por otro lado, la expresión de *Nanog* no se vio afectada por la agregación embrionaria, mientras que la cantidad relativa de ARNm de genes *Cdx2* y *Bcl-XL* fue tan baja que no se detectó expresión en el grupo agregado 3x en 40 ciclos de la qPCR. Los resultados de expresión génica se muestran en la Figura 15.

17.6. Transferencia embrionaria de clones porcinos agregados 3x.

De las tres transferencias se produjeron tres preñeces, obteniéndose un 100% de efectividad, sin embargo, las mismas fueron abortadas antes del primer mes de gestación. El cerdo tiene una preñez de 3 meses, 3 semanas y 3 días. En el primer caso, se produjo el aborto el día 24; en la segunda transferencia el día 27, y en la tercera el día 29 (Fig. 16, 17 y 18). Ninguna paso el primer tercio de la preñez, en la foto puede visualizarse que los embriones estaban elongados, propio de los cerdos. Sin embargo, las preñeces podrían haberse perdido porque en el caso de cerdas se necesita que 4 embriones, como mínimo, estén implantados para proseguir con la preñez. En el primer caso, se implantaron 5 blastocitos de cerdos clonados y agregados, en la segunda transferencia 13 (de los cuales 5 eran mórulas y 8 estaban en estado de blastocito) y en la tercera de los 19 embriones implantados 9 eran blastocitos y 10 eran mórulas tempranas). Se implantaban en distintos estadios porque se hacían dos tandas de clonación para obtener mayor porcentaje de embriones a implantar (la tanda del segundo día de trabajo estaban más retrasados en su desarrollo).

Tabla 6: Efecto de la agregación embrionaria sobre el desarrollo in vitro en embriones porcinos clonados.

Grupo experimental	No. ERZFs*	No. embriones (pozo)	No. ERZFs clivados (%)	No. blastocistos	% de blastocistos por ERZFs	% de blastocistos por embrión (pozo)
1x	167	167	122 (73,05) ^a	19	11,38 ^a	11,38 ^a
3x	345	115	318 (92,17) ^b	43	12,46 ^a	37,39 ^b
Total	512	282	440 (85,94)	62	12,11	21,99

*ERZFs: embriones reconstituídos libres de zona pelúcida. Valores de superíndices diferentes (a,b) dentro de la misma columna implican diferencias estadísticas (test exacto de Fisher $p < 0.05$).

Tabla 7: Efecto de la agregación embrionaria sobre el diámetro de embriones clonados (día 7). Diámetro de blastocistos provenientes de clones agregados y no agregados al día 7.

Grupo experimental	No. Blastocistos	Diámetro de blastocistos		
		80 µm- 199 µm (%)	200 µm- 299 µm (%)	>/= 300 µm (%)
1x	16	12(75,0) ^a	4 (25,0)	0 (0) ^a
3x	28	7 (25,0) ^b	12 (42,86)	9 (32,14) ^b
Total	44	19 (43,18)	16 (36,36)	9 (20,45)

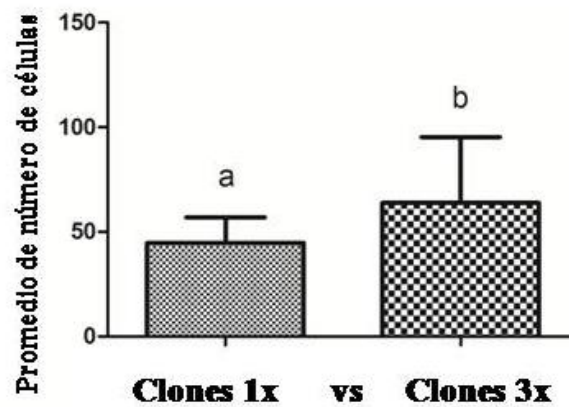
Valores con diferentes superíndices en una misma columna son significativamente diferentes (test exacto de Fisher p<0.05).

Tabla 8: Índice de apoptosis de embriones de cerdos agregados y no agregados en el estado de blastocistos (día 7).

Clones 1x			Clones 3x		
No. de células totales	No. células apoptóticas	IAP (Índice de apoptosis)	No. de células totales	No. células apoptóticas	IAP (Índice de apoptosis)
27	4	14,81	26	2	7,69
42	4	9,52	24	4	16,67
54	4	7,41	66	3	4,54
54	5	9,26	38	2	5,26
64	9	14,06	68	8	11,76
27	4	14,81	89	1	1,12
49	12	24,49	108	3	2,78
43	10	23,25	103	1	0,97
42	1	2,38	52	0	0
402	53	13,18^a	574	24	4,18^b

Valores con diferentes superíndices en una misma columna son significativamente diferentes (*test t-Student* $p < 0.05$).

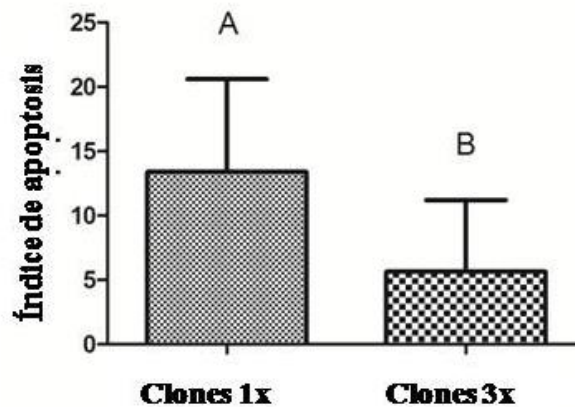
Figura 12: Número de células en blastocistos porcinos agregados y no agregados (día 7)



Valores con superíndices diferentes (a,b) son estadísticamente diferentes (test exacto de Fisher $p < 0,05$).

Figura 12. Número de células de blastocistos de cerdos clonados agregados y no agregados (día 7). Los núcleos se tiñeron con 30µg / ml de Ioduro de propidio (P4170) durante 10 minutos en la oscuridad.

Figura 13: Índice de apoptosis de blastocistos porcinos agregados y no agregados (día 7)



Valores con diferentes superíndices (A,B) son estadísticamente diferentes (test t-Student $p < 0,05$)

Figura 13: Índice de la apoptosis de blastocistos de cerdos clonados agregados y no agregado. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, prueba *t-Student*).

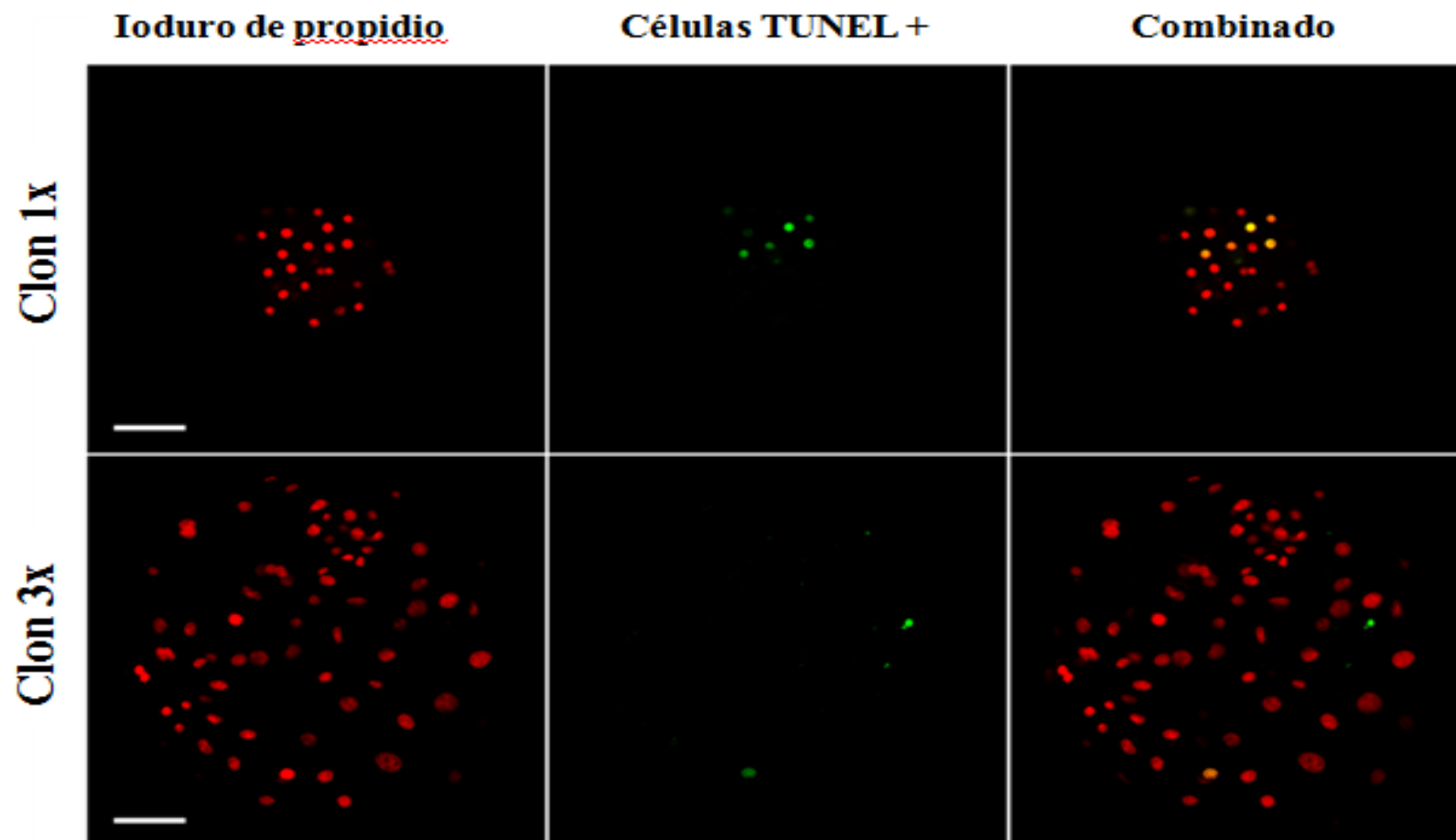


Figura 14. Microfotografías de expresión de TUNEL de embriones porcinos producidos por SCNT (día 7). Por encima embrión porcino clonado no agregado (1x), 40x zoom. A continuación embrión clonado agregado (3x), 40x zoom. La barra blanca equivale a 50µm de diámetro.

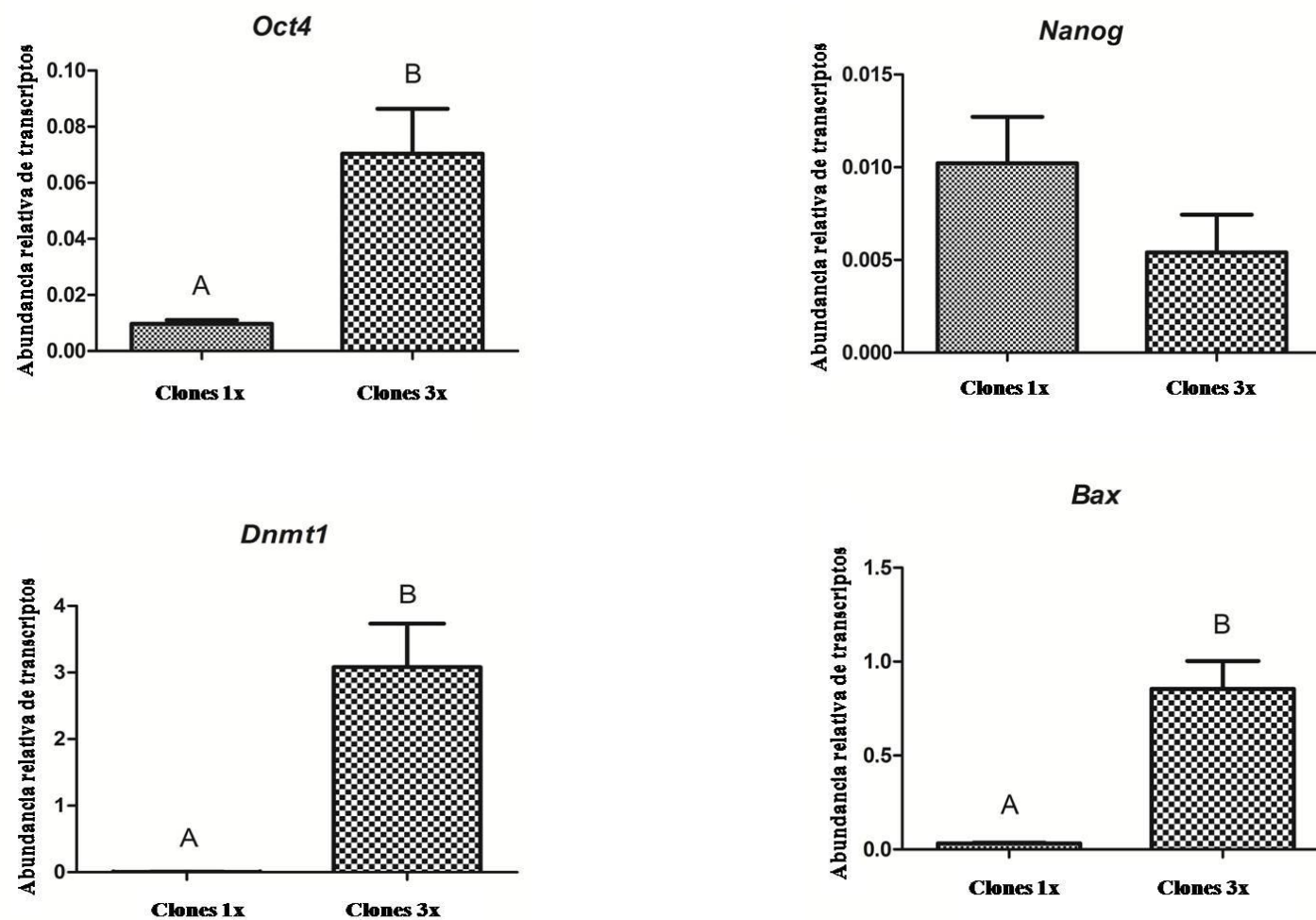
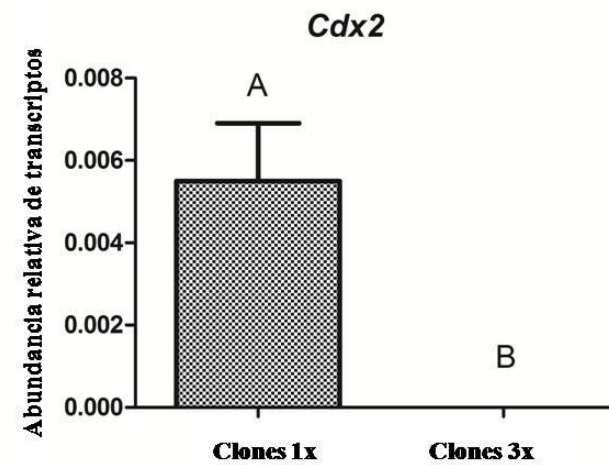
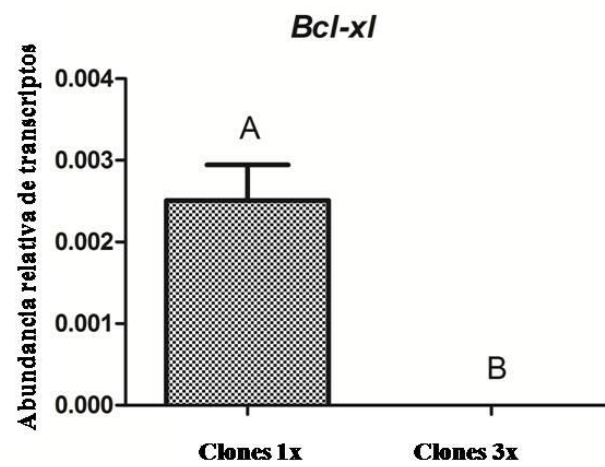
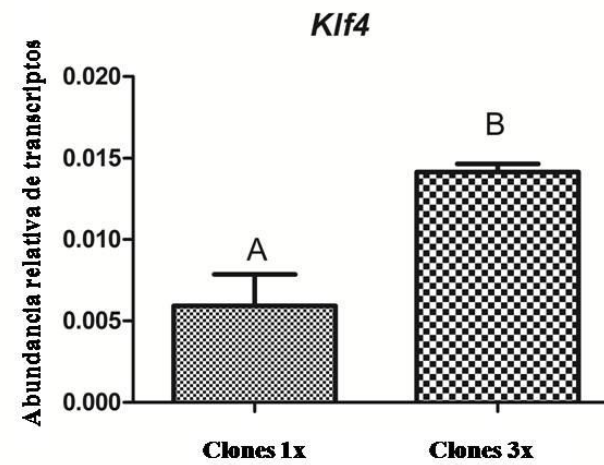
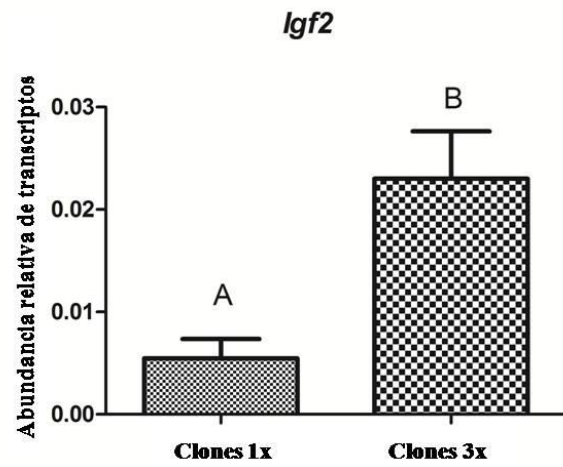


Figura 15. Abundancia relativa de transcripción de los genes Oct4, Klf4, Nanog, Igf2, Cdx2, Dnmt1, Bcl-xl y gen Bax en blastocistos agregados porcinos (día 7) generados por SCNT. Todos los genes se normalizaron con el gen ACTB; (A, B) diferentes letras son significativamente diferentes dentro de cada expresión génica ($p < 0,05$).



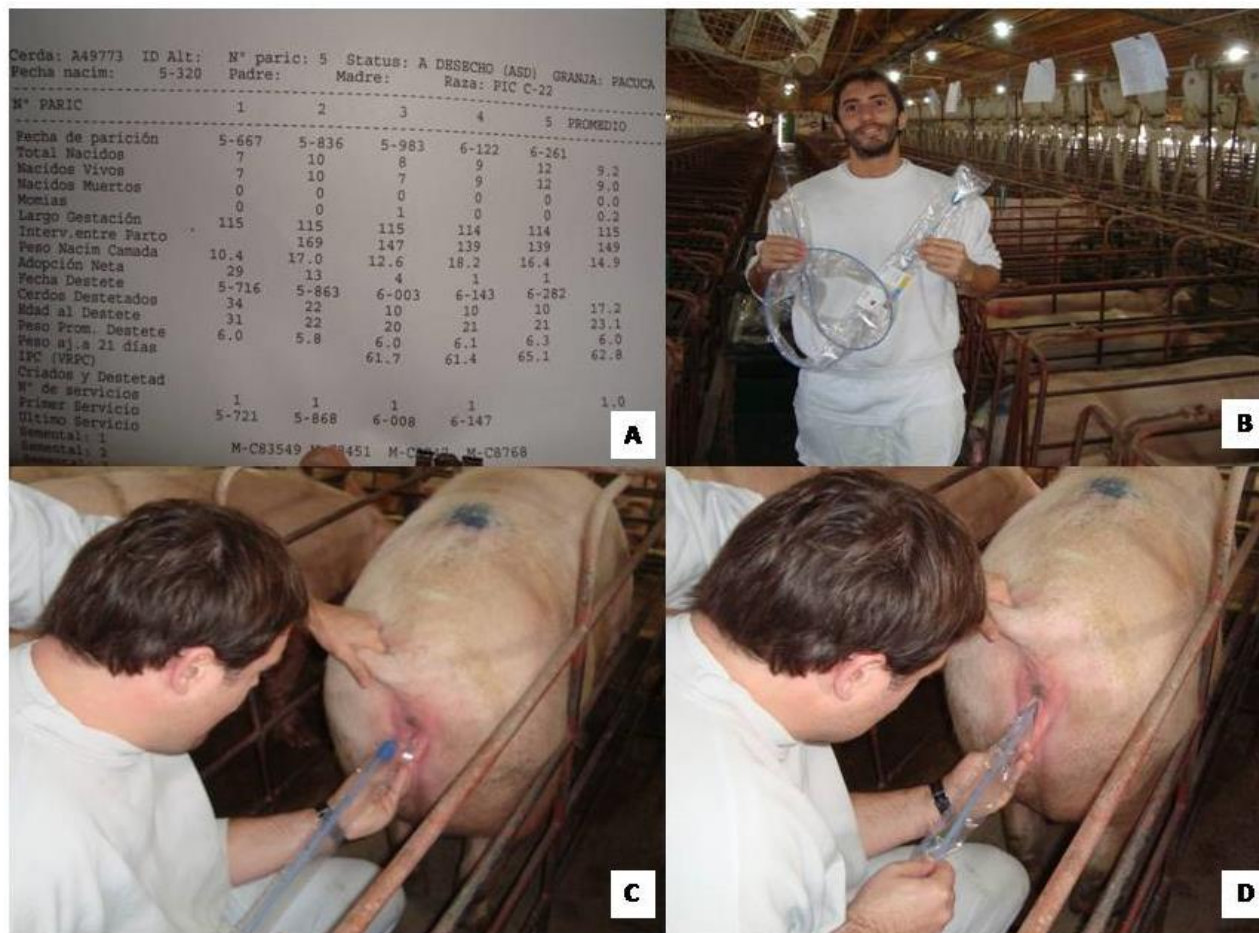


Figura 16. Transferencia embrionaria no quirúrgica de embriones clonados y agregados 3x. A) Datos tomados para la elección de la hembra receptora de los embriones, B) Vaina de transferencia embrionaria para cerdos de 1,20 mt (Minitube), C,D) Ingreso de la vaina por vagina hasta las trompas uterinas, una vez que hizo tope con la pared uterina se retiran unos 10 cm para descargar los embriones.

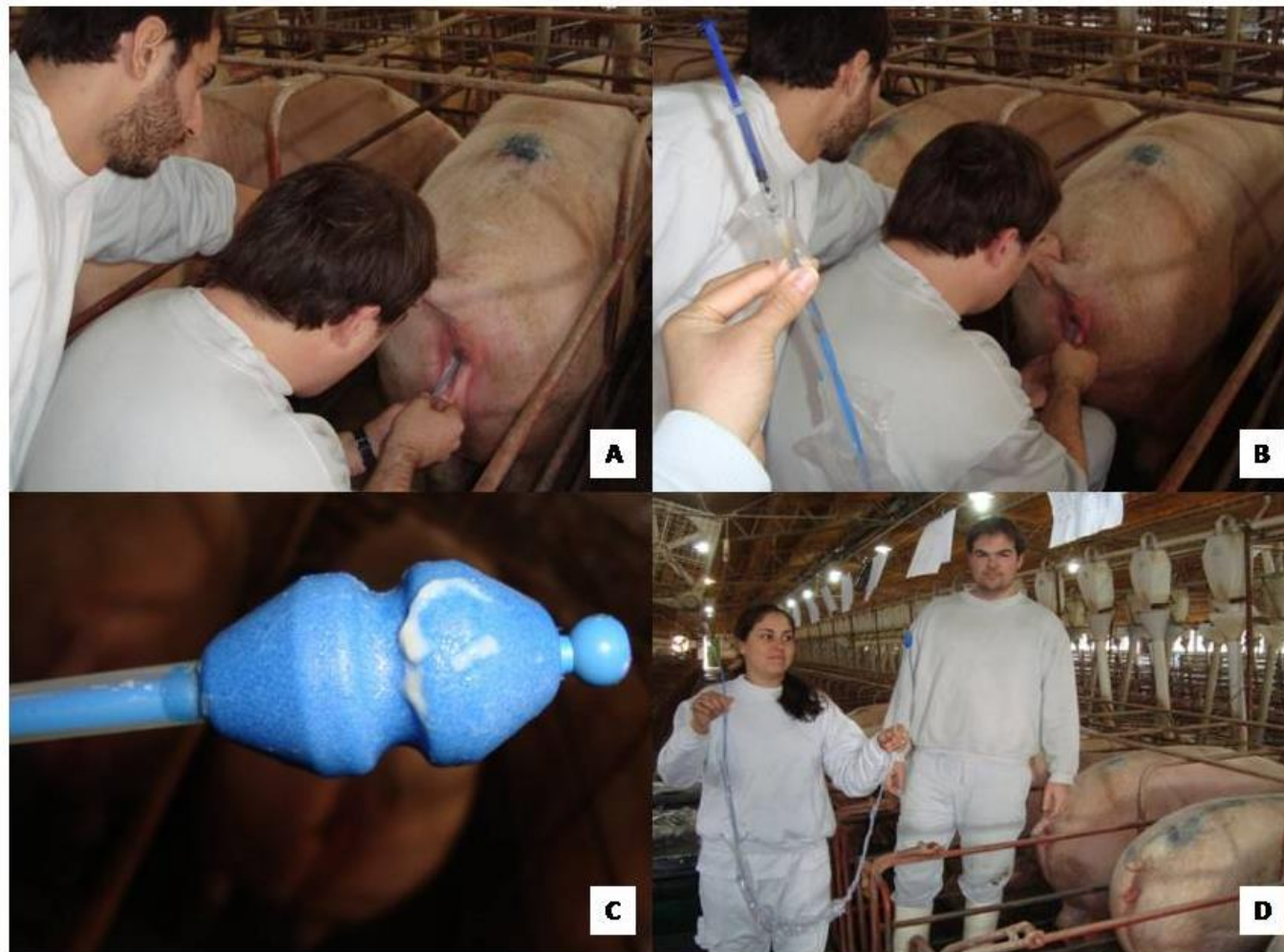


Figura 17. Fotografías de transferencia embrionaria de clones porcinos. A y B) Momento en que se esta metiendo la cánula por vía vaginal, C) Cánula con pus, indicando algun tipo de infección previa en la receptora, D) salida de la cánula y final de la transferencia.



Figura 18. Fotografía del aborto de embriones porcinos producidos por clonación (día 27). Correspondía a clones agregados 3x. Se visualiza descarga purulenta. Durante la transferencia la cerda había presentado signos de flujo y/o pus anormal.

18. Discusión II

En este capítulo se evaluó los efectos de la agregación embrionaria en clones porcinos, mediante la capacidad de desarrollo *in vitro* en términos del clivaje, tasa de blastocistos, número de células, diámetro embrionario y niveles de fragmentación del ADN mediante técnica de TUNEL. Además, se realizó un análisis cuantitativo de la abundancia relativa de ARNm de los diferentes genes implicados en la reprogramación celular (*Klf4*, *Nanog*, *Oct4*, *Bcl-xl*, *Bax*, *Igf2*, *Dnmt1* y *Cdx2*) comparados con un gen endógeno de referencia: *ACTB*. Para finalizar el capítulo se realizaron tres transferencias embrionarias mediante cirugía no quirúrgica.

La técnica de clonación en cerdos presenta algunas limitaciones tales como la necesidad de transferir varios embriones de buena calidad para producir y mantener una preñez, únicamente se mantiene si son implantados más de 4-5 embriones (Nagashima y col., 2003). Por otra parte, los oocitos y embriones porcinos son más sensibles a las fluctuaciones de temperatura que los de otras especies domésticas (Nagashima y col., 2003). Se cree que para que una clonación tenga éxito, el patrón de modificaciones epigenéticas en las células donantes, debe ser remodelado hasta llegar a ser similar al patrón presente en embriones provenientes de fertilización (Zhao y col., 2010).

Como resultado del capítulo, se utilizó la técnica de agregación embrionaria y se obtuvo un aumento significativo en la tasa de desarrollo embrionario *in vitro*, en el número de células totales, un aumento de casi un 20% en el clivaje y un incremento estadísticamente significativo de más de tres veces en la tasa de blastocistos. Observaciones similares respecto al uso de la técnica de agregación embrionaria fueron reportadas en animales domésticos como el cerdo después de la agregación de 2 células (Lee y col., 2007) o de 4 células (Boiani y col., 2003; Kurosaka y col., 2007; Balbach y col., 2010; Siriboon y col., 2014), en bovinos (Akagi y col., 2011), en equinos (Gambini y col., 2012 y 2014) y en felinos (Moro y col., 2015). El aumento en el clivaje, en las tasas de desarrollo *in vitro* y en el número de células demostraron que el medio utilizado fue el adecuado para obtener un desarrollo normal. Este es el primer estudio en el que se usó el medio de cultivo SOF en embriones de cerdos; demostrándose una tasa comparable de desarrollo embrionario *in vitro* a otros medios de uso común en la especie.

El hallazgo de efectos positivos usando agregación embrionaria podría deberse a **a)** una compensación epigenética, en donde algunos defectos epigenéticos durante la reprogramación celular podrían ser superados por la combinación de tres embriones derivados de la misma línea celular, pero con diferencias epigenéticas; **b)** un aumento en el número de células embrionarias al comienzo de su desarrollo (día 0) y un mayor volumen embrionario en el sistema de micropozos que puede ayudar a los embriones a compactarse más fácilmente, o **c)** un microambiente generado por la interacción de factores beneficiosos y paracrinos liberados por el embrión agregado, esto podría aumentar las tasas de desarrollo embrionario; o **d)** una combinación de todas esas situaciones. Además, la agregación embrionaria ha sido propuesta como una alternativa para evitar el aumento del nivel de heteroplasma causada por la fusión de los oocitos enucleados durante el procedimiento de clonación hecho a mano o "*hand made cloning*" (Misica Turner y col., 2007; Ribeiro y col., 2009; Akagi y col., 2011). En general, el término "heteroplasma" se refiere a diferentes genomas de ADN mitocondrial (ADNmt) dentro de una sola célula. Además de la heteroplasma mínima producida por la fusión de una célula somática en un oocito enucleado durante la SCNT, la agregación embrionaria no implica mayores niveles de heteroplasma (Hao y col., 2003). Sin embargo, es necesario indagar más acerca del efecto potencial de los diferentes ADNmt entre las células (pero no dentro de una misma célula), cuando se producen embriones agregados durante el proceso de clonación.

En base a los resultados de los ensayos de apoptosis mediante ensayo de TUNEL, los índices de células apoptóticas fueron estadísticamente inferiores en el grupo agregado 3x respecto al grupo no agregado 1x. Previamente se reportaron en embriones de cerdos niveles similarmente bajos de células apoptóticas (Burgstaller y col., 2007) y para bovinos (Yoon y col., 2009). Sin embargo, en otras especies como los equinos, los niveles de apoptosis no cambiaron con la agregación embrionaria (Gambini y col., 2014). Esta situación puede demostrar que los efectos de la agregación embrionaria dependen de las características fisiológicas de cada especie. Adicionalmente, recientes observaciones concuerdan con éstos resultados, lo que indica que la agregación embrionaria en porcinos tiene un efecto anti-apoptótico debido a un menor número de células apoptóticas como se ve por el ensayo de TUNEL en Siriboon y col., 2014; la agregación de embriones en el día 0 aumenta la calidad del embrión no sólo por el aumento de los diámetros de blastocistos y número inicial de células durante el

desarrollo embrionario temprano, sino también mediante la reducción de las cantidades de células con ADN fragmentado.

Inesperadamente, la expresión relativa de los genes relacionados con la apoptosis en el grupo experimental 3x no estuvo necesariamente correlacionada con las observaciones obtenidas con el ensayo de inmunohistoquímica por TUNEL. *Bcl-xl*, un gen con efecto anti-apoptótico, presentó una expresión extremadamente baja en el grupo de embriones agregados y no pudo ser detectada en 40 ciclos de RT-qPCR y el gen *Bax* (gen activador de apoptosis) incrementó su expresión de manera significativa.

La degradación del RNAm es controlada por las tasas de síntesis y degradación (Haimovich y col., 2013). Sin embargo, resultados recientes indican que numerosos ARNm sin traducir son ensamblados en "*P bodies*", constituidos por numerosas ribonucleoproteínas mensajeras que podrían acumularse en focos citoplasmáticos y también podrían ser degradadas o regresar a la traducción (Meyer y col., 2004; Pauley y col., 2006; Parker y col., 2004 y 2007). En eucariotas, se han descrito dos vías generales de degradación de RNAm y las dos vías comparten el proceso de de-adenilación (eliminación de la cola de poliA) (Eckardt y col., 2004; Pauley y col., 2006). En los embriones agregados se obtuvo un aumento en el número de células totales y una disminución de la traducción de proteínas que conllevan a una menor tasa de apoptosis en embriones de mayor tamaño y/o agregados. Mecanismos similares a los explicados podrían estar ocurriendo en los embriones 3x. Aún no está claro cómo éste proceso está regulado en los embriones, y cómo podría estar implicada la agregación embrionaria. Se requieren más estudios para comprender el proceso completo.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de genes relacionados a pluripotencia juegan un papel crítico durante la reprogramación celular y afecta el posterior desarrollo embrionario (Eckardt y col., 2004). Los embriones clonados generalmente presentan una menor expresión de éstos genes en comparación a embriones *in vivo* (Jeong y col., 2013). En éste capítulo se observó una mayor expresión de *Oct4*, *Klf4*, *Igf2* en blastocistos agregados, lo que sugiere que la agregación embrionaria en la etapa más temprana (día 0) podría mejorar el estado pluripotente en la etapa de blastocisto.

Se ha informado previamente que clones agregados de ratón tienen una expresión aumentada del gen *Oct-4* y un mayor potencial de desarrollo en comparación a clones sin agregar (Boiani y col., 2003). Del mismo modo, nuestros resultados están de

acuerdo con otros informes en blastocistos porcinos agregados obtenidos a partir de embriones producidos por SCNT (Lee y col., 2007; Terashita y col., 2011). Además, la agregación embrionaria no cambió la expresión de *Nanog*, al igual que en estudios anteriores donde los niveles de expresión de *Nanog* mostraban ser inferiores en blastocistos bovinos clonados en comparación con sus homólogos de fecundación *in vitro* (Beyhan y col., 2007; Aston y col., 2010). Sorprendentemente, no se pudo detectar la expresión de *Cdx2* en embriones agregados, posiblemente debido a niveles extremadamente bajos de expresión en este grupo experimental. Contradictoriamente, se ha informado de un aumento de la expresión de este gen en embriones agregados porcinos (Siriboon y col., 2014). Existen beneficios informados de la agregación embrionaria en el mantenimiento de preñeces y posteriormente en el desarrollo del embrión *in vivo* (Park y col., 2014), esto sugiere que si la expresión de *Cdx2* se ve afectada en blastocistos agregados, podría verse también afectado el proceso de placentación. Sin embargo, es necesario realizar experimentos centrados específicamente en la placentación y el desarrollo del embrión *in vivo* en embriones agregados para determinar los efectos que causa la técnica de agregación embrionaria sobre la expresión génica y su posterior desarrollo post-implantación.

Por último, *Dnmt1* (enzima ADN 5-metil-citosina transferasa) cataliza la producción y regulación de la dinámica de los patrones de metilación del ADN genómico en mamíferos (Leonhardt y col., 1992; Bestor y col., 2000; Golding y col., 2011). Nuestros resultados podrían implicar el redireccionamiento de la metilasa *Dnmt1* en la metilación *de novo*, que implica la reorganización de la metilación materna. La única forma de verificar si la reprogramación se ha realizado correctamente, es obtener el animal nacido vivo, sin embargo, el proceso de reprogramación del genoma para convertirse en embrión es complejo e implica varios pasos, y todavía no ha sido comprendido en su totalidad (Golding y col., 2011).

Con respecto a las transferencias embrionarias, no se pudo obtener clones nacidos vivos. De tres transferencias se obtuvieron tres preñeces, 100 % de efectividad en la técnica, sin embargo, todas se perdieron entre los días 24 y 29 desde la generación del embrión *in vitro*. Uno de los mayores inconvenientes fue el bajo número de implantación, otro inconveniente fue que las receptoras usadas provenían de hembras de descartes que ya habían tenido algún tipo de problema para sostener las preñeces. Eso hizo que en dos de las tres ocasiones las descargas con los embriones clones se den con

descarga purulenta. En el último intento, se dió antibióticos a la cerda, una semana previa a la transferencia (tetraciclinas), sin embargo igualmente se produjo un aborto con reabsorción natural. Siriboon y col.,2014 comparó embriones clonados agregados 3x y no agregados y demostró que únicamente obtuvo preñeces con los no agregados 3x, transfiriendo siempre entre 40 a 100 embriones por receptora. Demostrando que el número de embriones necesarios para producir una preñez es muy superior a otras especies y que la eficiencia de preñez es muy baja.

19. Conclusiones

En conclusión, nuestros datos sugieren que la agregación embrionaria en la fase de una célula podría compensar parcialmente una reprogramación incompleta en embriones porcinos clonados, posiblemente por la combinación de varios embriones epigenéticamente diferentes que presentan una mayor expresión de genes de pluripotencia. Por otra parte, no fueron necesarios oocitos adicionales para producir mayores tasas de blastocistos obteniéndose un aumento en el diámetro y en el número de células embrionarias, mientras que el nivel de apoptosis fue menor.

El número de embriones a transferir fue bajo, eso podría haber sido el factor por el cual se produjeron los abortos embrionarios. Otra de las condiciones claves que en este caso no se tuvo, fue el poseer receptoras con buenas condiciones sanitarias y fisiológicas para evitar cualquier tipo de infección y/o pérdidas.

Estos resultados permiten aseverar que la agregación embrionaria es una técnica simple que permite mejorar la eficiencia de la clonación en porcinos al incrementar el desarrollo y la calidad *in vitro* de los embriones producidos.

CAPÍTULO III

"Uso de drogas modificadoras de la epigenética embrionaria
en embriones clones agregados"

20. Introducción capítulo III

Durante el desarrollo del embrión generado por SCNT se producen diferentes eventos de reprogramación embrionaria, como remodelación de la cromatina, cambios en la metilación del ADN, en la estructura nuclear, modificación de las colas de las histonas implicando todos ellos cambios en la epigenética embrionaria (Kang y col., 2001; Diao y col., 2013). Generalmente cuando se produce un fracaso en el desarrollo puede atribuirse a una incompleta reprogramación epigenética del ADN genómico del donante (Wilmot y col., 2002; Han y col., 2003) y se pueden obtener como resultado embriones con patrones epigenéticos anormales (Rideout y col., 2001; Han y col., 2003).

En los cerdos, una mayoría de estudios demostraron efectos beneficiosos mediante el uso de tratamientos con fármacos modificadores de la epigenética, cuando se trataban a los embriones reconstituidos una vez finalizada la SCNT (Jager y col., 2008; Ding y col., 2008). Sin embargo, cuando se trataron a las células donantes, previo a la SCNT, los resultados fueron dispares (Li y col., 2008; Zhao y col., 2009; Martínez Díaz y col., 2010; Das y col., 2010; Kumar y col., 2013).

En éste último capítulo se pretende estudiar el uso de éstos tratamientos que modifican los patrones epigenéticos en embriones agregados clonados. La finalidad es mejorar la reprogramación nuclear y comprender la relación entre el estado epigenético y la eficiencia de la SCNT en porcinos. Para ello se articularon las dos mejores condiciones previamente estudiadas en ésta Tesis: el uso de drogas que modifican la epigenética embrionaria (usadas en el capítulo I), más la técnica de agregación embrionaria (usadas en capítulo I y II). Se analizaron los cambios en la expresión génica, cambios presentes en las histonas y en la metilación del ADN en embriones provenientes de clonación. Se empleó un inhibidor de la ADN (citosina 5) metiltransferasa (5-Aza) y PD0325901 (PD) un inhibidor de MEK en las vías de MAPK.

Hay numerosos estudios previos usando la droga 5-Aza. Todos ellos difieren en la concentraciones usadas, los tiempos de exposición a la misma, si se la usa en las células donantes (Diao y col., 2013), en los embriones reconstituidos (Huan y col., 2013) o en ambos (Wang y col., 2011). Los resultados son muy dispares cuando se las usa dentro de la misma especie o entre especies diferentes. Pero en general, todos los trabajos concuerdan que 5-aza puede inducir la hipometilación del ADN y hacer que la cromatina esté más abierta, en consecuencia, sería más fácil una mejor reprogramación nuclear (Enrigh y col., 2005).

La segunda droga elegida para usar en el proceso de SCNT fue PD, que actúa en la vía MAP quinasa (MAPK). Uno de los mayores problemas evolutivos que la célula eucariota tuvo que superar fue el poder transmitir señales extracelulares desde la superficie celular al interior del núcleo. Una de las principales vías que se desarrolló fue la MAPK. La Figura 19 muestra lo que ocurre cuando un ligando se une a un receptor tirosina quinasa apropiado, se induce a un cambio conformacional que conduce a la fosforilación y activación de la proteína Ras. Una vez activada, ésta induce a la dimerización de las quinasas Raf, así como a su fosforilación. Estos dímeros activados fosforilan a la proteína MEK, que a su vez fosforila a la proteína ERK. Ésta última una vez activada, entra al núcleo y actúa como un factor de transcripción, influenciando la transcripción de varios genes que conducen a la proliferación celular, modifican el metabolismo e influyen sobre la supervivencia. Existe un mecanismo de retroalimentación negativa que mantiene este sistema bajo control (Pratilas y col., 2008).

MAPK, corresponde a una familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos, es un grupo de serina /treonina quinasas que median en la señalización intracelular. Tras la activación, MAPK puede fosforilar una gran variedad de dianas intracelulares, incluyendo factores de transcripción, proteínas adaptadoras de la transcripción, la membrana y los sustratos citoplásmicos, y otras proteínas quinasas. PD0325901 se une selectivamente e inhibe a la proteína MEK, modificando la cascada río abajo (Bain y col., 2007).

Hay escasos estudios previos usando este inhibidor, sin embargo, los autores coinciden en que la droga podría inducir a la dediferenciación, generando un estado de pluripotencia. En el año 2008 se obtuvieron ESC-competentes, éstas células fueron derivadas de blastocistos de rata tratados con PD (Li y col., 2008). En el año 2011, se utilizó una combinación de dos y tres tipos de inhibidores de la vía MAPK para obtener células madre embrionarias en ungulados y se estudió la expresión génica de marcadores de pluripotencia tales como *Oct4*, *Nanog* y *Sox2* (Brevini y col., 2012; Zhao y col., 2011). Kujik y col., 2012, demostró que embriones bovinos cultivados en presencia de PD producen un porcentaje significativamente mayor de *Nanog*, respecto a su control. Otro estudio demostró que la inhibición de la quinasa promovió el desarrollo de blastocistos bovinos, incrementando el número de células de los mismos, con un 30% más de células de trofoectodermoy un 27% más de ICM. Los embriones tratados, tienen un ICM que expresa marcadores de pluripotencia *Sox2* y *Nanog*, mientras que reprimían el marcador GATA 4 (Harris y col., 2013).

En éste capítulo, se combinó la agregación embrionaria sumado al uso de modificadores epigenéticos para lograr hacer más eficaz el proceso de SCNT, estudiando diferentes parámetros que indican si mejoró la reprogramación embrionaria.

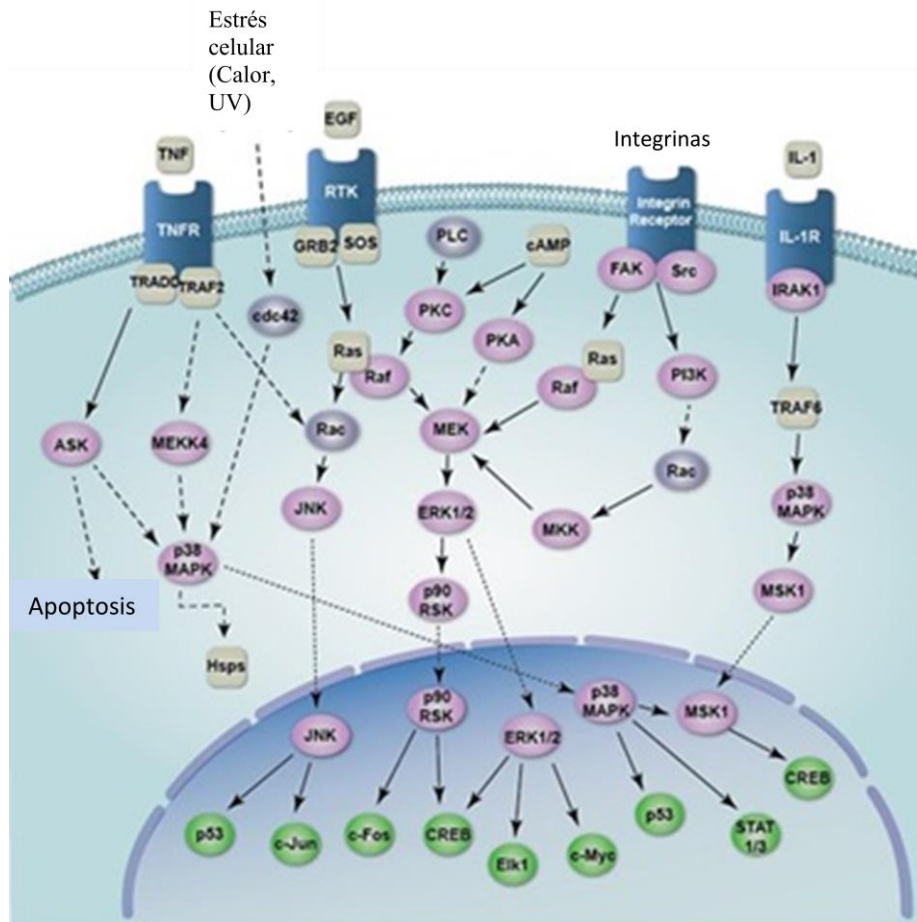


Figura 19: Vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Cuando se une por su ligando, varios receptores tirosina quinasas conducen a la activación de ERK, lo que desencadena la proliferación celular y las vías anti-apoptóticas. ERK también activa fosfatasa y retroalimenta negativamente a ERK y RAS. Figura adaptada de Pratilas y col., 2010; Clin Cancer Res ; 16:3329.

21. Materiales y métodos capítulo III

Sólo se detallarán los materiales y métodos que no hayan sido descriptos en capítulos anteriores.

21.1. *Colecta, denudación y MIV de los oocitos*

Los ovarios y oocitos se colectaron de la misma manera que se detalló en los dos capítulos anteriores. La denudación de la ZP y la MIV ovocitaria se realizaron de igual manera a la descripta en capítulo I.

21.2. *Enucleación*

Detallado en capítulo anterior.

21.3. *Obtención de explantos de tejido y cultivo in vitro de células somáticas*

Detallado en el capítulo anterior.

21.4. *Transferencia nuclear y reconstrucción embrionaria*

Detallado en el capítulo anterior.

21.5. *Activación*

Detallado en capítulos anteriores.

21.6. *Agregación embrionaria y cultivo in vitro hasta el día 7*

El modo de agregación embrionaria se realizó de igual manera que en capítulos anteriores, sin embargo, el cultivo *in vitro* fue diferente porque se usaron drogas que modifican la epigenética embrionaria. Los embriones fueron cultivados en el medio de cultivo SOF, con una concentración de 1 μ M de 5 Aza + 1 μ M de PD por las primeras 72 hs.

Una vez cumplido ese tiempo se lavaron tres veces los embriones con medio SOF libre de las drogas y se dejó en cultivo por otras 96 hs, hasta el día 7.

21.7. Medición de los embriones

Detallado en capítulos anteriores.

21.8. Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real

Para el análisis de la expresión génica se utilizaron dos grupos (clones agregados 3x y clones 3x con drogas). Se hizo un pool de $n = 12$ blastocistos de cada grupo y tres repeticiones biológicas, es decir, cada grupo por triplicado. Los embriones se lavaron dos veces en DPBS para eliminar el RNA later en el que se conservaron. El ARNm se aisló utilizando el kit micro RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania, Cat. No.74004) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la digestión de ADN genómico las muestras se trataron con 1 μ l de DNasa I (0,04 unidades/litro). Inmediatamente, se realizó la RT-PCR en un volumen final de 20 μ l. Para la PCR cuantitativa se utilizó el colorante SYBR de acuerdo con las instrucciones del fabricante con sistema de detección de un solo color, en el ciclador MyiQ PCR en tiempo real de la marca BIO RAD. La cuantificación de los transcritos génicos se realizó utilizando al gen ACTB como control estándar interno. La mezcla de reacción (en total 12,5 μ l) contenía: 6,5 μ l de master mix elaborada por fabricante, 0,25 μ l de cada cebador (20 mmol / l), 5 μ l de ADNc (250 ng concentración final), y 0,5 μ l de agua MilliQ.

21.9. Diseño de cebadores.

Detallado en capítulos anteriores. En la Tabla 9 se muestran los cebadores diseñados.

21.10. Inmunofluorescencia de histonas H3Kme1 y H3K27ac.

Con respecto al estudio de la reorganización del genoma se propuso el análisis de distintas histonas: H3K4me1, que es un activador transcripcional y H3K27ac que corresponde a una marca de potenciadores o enhancers. Esto se realizó por microscopía confocal cuantitativa y análisis avanzado de imágenes. Se midió la intensidad de la fluorescencia a lo largo de una línea definida mediante gráfico de perfil en el programa 1.42q

ImageJ, y los valores de intensidad de fluorescencia de cada píxel dentro de esa línea se representó en una región delimitada de la célula a través de un histograma en las opciones de análisis del ImageJ. Esa línea marcó los valores de intensidad de fluorescencia en la periferia del núcleo y el interior celular. Se midió las medias de los valores de entre 22 a 30 células de cada grupo (Clon 3x, Clon 3x con drogas y Partenogénicos 3x) correspondientes a 5 embriones por grupo. Éstas imágenes del plano medio del núcleo fueron capturadas con un objetivo 100X (apertura numérica 1.4) mediante un microscopio IX71 (Olympus, Tokio, Japón).

Los embriones se fijaron con paraformaldehído al 4% de durante 15 min; y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100, 0,01% de Tween 20, 2% de albúmina bovina durante 30 min y se ubicaron en portaobjetos. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron diluidos 1: 100 y 1: 200, respectivamente. El ADN se marcó con 0,25 mg / ml 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) de Sigma Aldrich.

Los anticuerpos usados fueron de tipo policlonal en conejo contra la región de la histona H3 que contiene la lisina 4 mono metilada H3K4me1 (de la marca Abcam cat# pAb-8895) y para la histona 3 que contiene la lisina 27 acetilada H3K27ac (Diagenode cat# pAb-174-050).

21.11. Análisis de metilación bisulfito del ADN de genes implicados en el desarrollo embrionario temprano.

Para finalizar, se procedió al estudio del estado de metilación del ADN en clones agregados tratados con las drogas anteriormente mencionadas, mediante la técnica de secuenciación bisulfito dirigida a genes claves del desarrollo temprano (*Oct4* y *Dnmt1*).

Para llevar a cabo el proceso, se extrajo el ADN mediante el método fenol-cloroformo-isoamílico.

21.11.1. Purificación de ADN genómico.

Los embriones obtenidos en el proceso de clonación fueron guardados en freezer -20°C. Se lavaron 5 de éstos embriones con DPBS y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. Para lisar los embriones se utilizó 100 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 10mM pH:8; EDTA 0,1mM pH:8 y SDS 0,5%).

Se agregó 1,2 µl de solución de proteinasa K por cada 100 µl de buffer de lisis (stock a 20 mg/ml) y se incubó toda la noche a 37°C.

Una vez incubado, se agregó el mismo volumen previo de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) equilibrado con TE y se mezcló por inversión 10-20 veces.

Se centrifugó 5 min a 15000 rpm y se transfirió la fase superior acuosa a un tubo limpio de 1,5 ml. Se repitió este paso con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se volvió a invertir por inversión 10-20 veces.

Se prosiguió con la centrifugación 5 min a 15000 rpm y únicamente se transvasó la fase acuosa a tubo limpio. Se agregó un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1), se invirtió y se centrifugó a la misma velocidad.

Para finalizar, se agregó 2,5 volúmenes de etanol 100% (-20°C) y 0,1 volumen de acetato de sodio Na Ac 3M pH:7, se incubó a -80°C por 1 h o a -20°C (toda la noche) y se centrifugó 15 min a 15000 rpm a 4°C.

Se descartó el sobrenadante por inversión y lavó con 1ml de etanol 70% frío; se centrifugó a 15000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por unos minutos. El volumen final fue de 100 µl de H₂O destilada o buffer TE (Tris-HCl 10mM pH:8; EDTA 1mM pH:8).

21.11.2. Conversión de ADN a ADN bisulfito.

Una vez extraído el ADN genómico se prosiguió a la conversión a ADN bisulfito. Ésto se realizó mediante el kit de modificación de ADN "MethylEasy-EpiTect Bisulfite" de QIAGEN, según describe el fabricante.

Para ello se utilizó la máquina de PCR según el siguiente ciclado:

- | | |
|---------------------|-----------------------|
| 1) 95°C por 5 min. | 5) 95°C por 5 min. |
| 2) 60°C por 25 min. | 6) 60°C por 90 min. |
| 3) 95°C por 5 min. | 7) 60°C por 85 min. |
| 4) 60°C por 85 min. | 8) 20°C por infinito. |

Cuando el ADN tratado con bisulfito se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa, la citocina que no está metilada pasa de uracilo a timina posterior a la amplificación, y en el último paso de secuenciación se observa como adenina. Las citosinas metiladas se mantienen como citosinas y en la secuenciación pasan a ser guaninas (Figura 20).

Análisis del ADN por metilación bisulfito y secuenciación

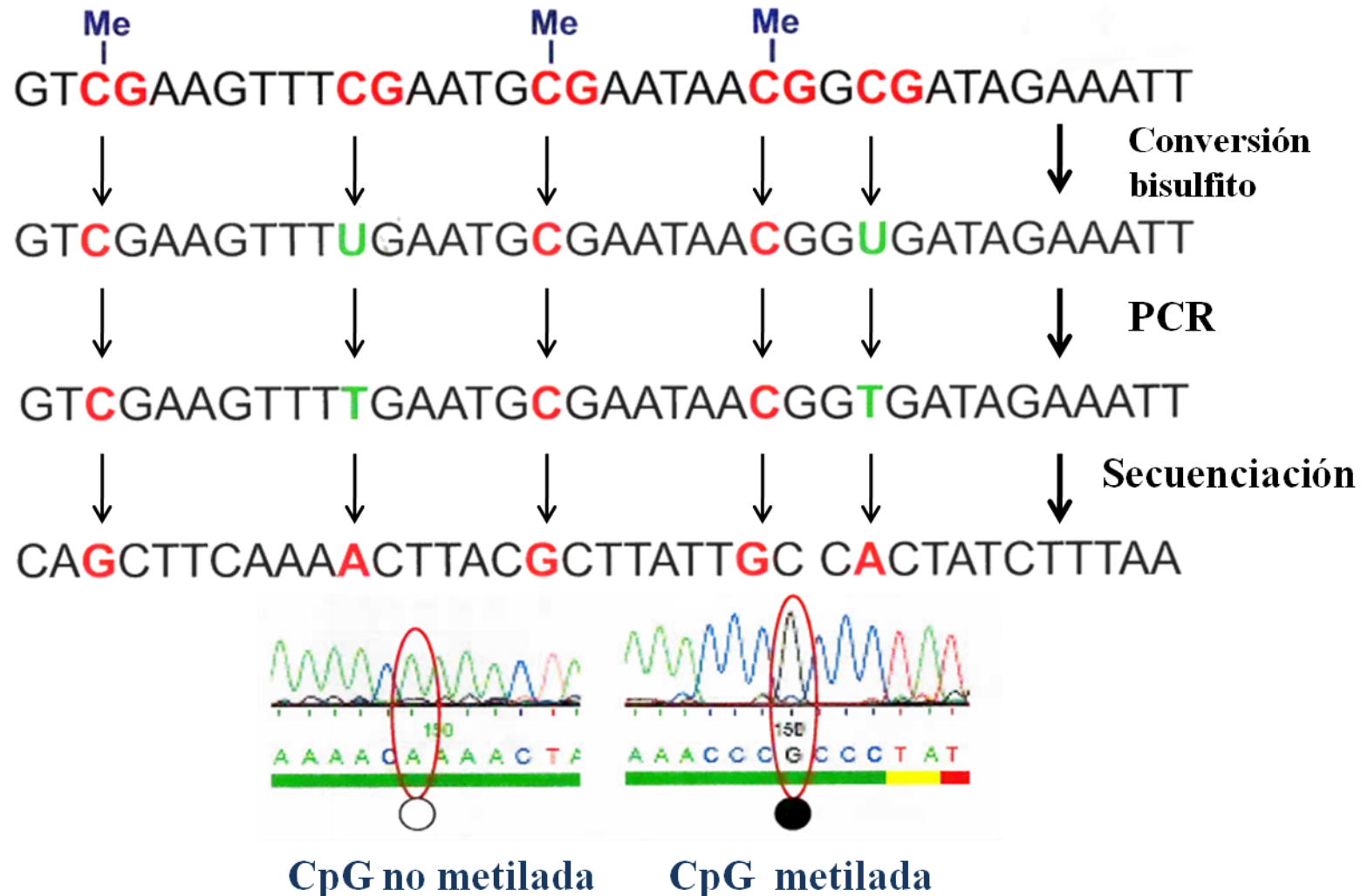


Figura 20: Metilación del ADN. Muestra los cambios en la secuencia desde la conversión del ADN, pasando por la técnica de PCR y posterior secuenciación.

21.11.3. Amplificación de Productos de PCR de los genes *Oct4* y *Dnmt1*, purificación de bandas de geles de agarosa y clonado de los fragmentos obtenidos.

Se amplificó el ADN modificado por bisulfito mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores diseñados con el programa "MethPrimer". Los cebadores utilizados en el estudio fueron:

- TTAGATTTGTGTGAGGATTTGAGAG OCT4 F bisul
- CACCCACTAACCTTAACCTCTAAC OCT4 R bisul
- AAGGAAATTAGGGTTGGATTTAAAT DNMT1 F bisul
- TACAACAAAACAACAACAACACAA DNMT1 R bisul

Las condiciones de PCR utilizadas fueron:

Ciclo 1 (1x) Paso 1: 95°C por 5 min.

Ciclo 2 (35X) Paso1: 95°C por 1 min

 Paso 2: 58°C por 2 min

 Paso 3: 72°C por 2 min.

Ciclo 3 (1X) Paso 1: 72°C por 10 min

Ciclo 4 (1X) Paso 1: 15°C por tiempo indefinido.

Los productos de la PCR se purificaron del gel de agarosa al 1% mediante el kit "Genomic DNA Miniprep GenElute" de mamíferos (Sigma Aldrich) y luego fueron clonados en bacterias mediante el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenidas las colonias bacterianas en las placas de cultivo de medio LB, se eligieron 15 colonias y se hicieron 15 minipreps para llegar a obtener al menos 5 colonias que posteriormente fueron re chequeadas por medio de un test de colonias con los mismos primers anteriormente usados. Con la finalidad de obtener el fragmento del tamaño deseado antes de corroborar por secuenciación.

La condiciones usadas para el test de colonia fueron:

Ciclo 1 (1x) Paso 1: 95°C por 10 min.

Ciclo 2 (35X) Paso1: 95°C por 30 seg.

Paso 2: 58°C por 30 seg.

Paso 3: 72°C por 30 seg.

Ciclo 3 (1X) Paso 1: 72°C por 7 min

Ciclo 4 (1X) Paso 1: 15°C por tiempo indefinido.

21.11.4. Secuenciación de los productos de PCR y análisis de secuencias.

Se mandó a secuenciar entre 5 a 10 clones bacterianos por región genómica, usando cebadores M13 (MWG Biotech, High Point, NC, EEUU). Una vez obtenidos los resultados de las secuenciaciones se procedió a analizar las secuencias de acuerdo a lo predicho por el programa de primers "MethPrimer" en el cual muestra los sitios CpG donde el ADN podría sufrir metilación de las citocinas.

Tabla 9: Secuencias de cebadores y condiciones de RT-qPCR

Genes	Secuencias de cebadores (5' -3')	Tamaño de los productos de PCR (pb)	Tm (°C)	Números de acceso de referencia o secuencia
<i>Klf4</i>	CCATGGGCCAAACTACCCAC	81	60	NM_001031782.2
<i>Klf4</i>	GGCATGAGCTCTTGGTAATGG	81	59	NM_001031782.2
<i>Nanog</i>	CCACTGGCCAAGGAATAGCA	88	60	NM_001129971.1
<i>Nanog</i>	CAGGCATCCTTGGTGGTAGG	88	60	NM_001129971.1
<i>Oct4</i>	GCTCACTTTGGGGTTCTCT	80	59	NM_001113060
<i>Oct4</i>	TGAAACTGAGCTGCAAAGCC	80	59	NM_001113060
<i>Bcl-xl</i>	GTTGACTTTCTCTCCTACAAGC	277	62	SUN HWANG, 2008
<i>Bcl-xl</i>	GGTACCTCAGTTCAAACATCATC	277	62	SUN HWANG, 2008
<i>Bax- α</i>	ACTGGACAGTAACATGGAGC	294	63	SUN HWANG, 2008
<i>Bax- α</i>	GTCCCAAAGTAGGAGAGGAG	294	63	SUN HWANG, 2008
<i>Mapk1</i>	AGGCTGTTCCCAAATGCTGA	111	59	NM_001198922.1
<i>Mapk1</i>	CAGGTATGGGTGGGCAAGAG	111	60	NM_001198922.1
<i>Igf2</i>	GGCATCGTGGAAGAGTGCT	128	60	X56094.1
<i>Igf2</i>	CTGGGGAAGTTGTCCGGAAG	128	60	X56094.1
<i>Cdx2</i>	CAGCCAAGTGAAAACCAGGAC	119	59	NM_001278769.1
<i>Cdx2</i>	CGGCCTTTCTCCGAATGGT	119	60	NM_001278769.1
<i>ACTB</i>	AGATCGTGCGGGACATCAAG	93	59	DQ452569.1
<i>ACTB</i>	GCGGCAGTGGCCATCTC	93	59	DQ452569.1

22. Resultados capítulo III

22.1. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre el desarrollo *in vitro* de embriones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.

En la Tabla 10 se muestra el desarrollo *in vitro* de embriones clonados y agregados, tratados con las drogas que modifican la epigenética embrionaria. Se observó que las tasas de clivaje por ERZFs no presentó diferencias entre grupos (84,0% en el grupo control vs 81,67% en el 3x con las drogas). Por otra parte, la tasa de blastocitos por ERZFs no fue estadísticamente diferente entre ambos grupos (11,67% en el grupo 3x control vs. 16,07% en el grupo tratado). Por el contrario, la tasa de blastocitos por embrión (tomando cada pozo como un sólo embrión) presentó un aumento estadísticamente significativo en el grupo 3x con la combinación de drogas (40,90%) (Test de Fisher $p < 0,05$) respecto al grupo control 3x (29,41%).

22.2. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre el diámetro y el número de células, en embriones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.

Se midió tamaño embrionario mediante el diámetro del blastocisto clonado tratado y sin tratar, y fueron divididos en tres grupos diferentes en función de su diámetro al día 7: 100 - 199 μm (pequeño), 200-299 μm (medio) y >300 μm (grande). El número de embriones analizados en cada categoría de tamaño fueron: 3x (n = 21) y 3x con drogas (n = 41). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al diámetro entre los grupos estudiados, los embriones tratados presentaron un 41,46% de embriones mayores a 300 μm (test de Fisher $p < 0,05$) (Tabla 11). Respecto al número de células, se midieron en el grupo 3x (n=11) y en el grupo 3x con drogas (n=14). Sus valores fueron en 3x control= 63 , 79, 113, 95, 92, 103, 105, 63, 87, 92, 50 células. Y en el grupo 3x con drogas= 92, 103, 75, 90, 115, 87, 100, 125, 115, 70, 79, 85, 85, 93 células. Mediante test *t de Student* con un $p < 0,05$; se constató que no habían diferencias estadísticamente significativa entre los grupos estudiados. Mostrando un comportamiento similar entre el grupo agregado control y el tratado con las dos drogas antes mencionadas (Figura 21).

22.3. *Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre la expresión de genes de pluripotencia en embriones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.*

Se midió la cantidad relativa de ARNm mediante RT-qPCR en genes marcadores de pluripotencia como *Oct4*, *Klf4* y *Nanog*; dos marcadores relacionados a diferenciación *Cdx2* y *Igf2*; dos marcadores de apoptosis *Bcl-xl* y *Bax* y finalmente *Mapk1*, un modulador clave de la metilación del ADN. Estos genes son claves en el desarrollo embrionario preimplantatorio. Mediante el test *t de Student* se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión relativa de *Igf2*, *Cdx2* y en los genes *Bcl-xl* y *Mapk1* en el grupo tratado con las dos drogas. Por otro lado, *Oct4* y *Nanog* no se vieron afectados por el tratamiento y genes como *Klf4* y *Bax* disminuyeron significativamente su expresión en el grupo tratado. Debido a que la cantidad relativa de ARNm de *Cdx2*, *Bcl-xl* y *Mapk1* era muy baja, no se detectó su presencia en el grupo agregado 3x (control) en 40 ciclos de la qPCR. Sin embargo, en el grupo tratado con las drogas la expresión génica de esos genes aumentaron significativamente, mostrando diferencias estadísticas. Resultados de la expresión génica se muestran en la Figura 22.

22.4. *Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre la acetilación (H3K27ac) y la metilación de histonas (H3K4 me1) en tres tipos de embriones porcinos (día 7).*

Se estudiaron tres tipos de embriones: clones 3x control, clones 3x tratados con las drogas, ambos producidos por SCNT y embriones partenogénicos tratados con las mismas drogas.

Con respecto a la localización de la histona H3K27ac, en los clones 3x tratados se evidenció mayor intensidad de marcas en la periferia, comparado al interior del núcleo, en el grupo tratado respecto al grupo clones 3x control (no tratado), éste último mostró una dispersión más uniforme. En el grupo de los embriones partenogénicos ocurrió algo similar a los clones 3x tratados, evidenciándose mayor cantidad de marcas en la periferia nuclear. En los histogramas producidos por el programa Image J se corrobora la distribución de las histonas en cada uno de los tipos de embriones (Figura 23).

En la Figura 24 se muestra la dispersión de la histona H3k4 me1. En clones tratados, clones control (sin tratar) y en embriones partenogénicos tratados se ve una distribución homogénea de la histona, con similar intensidad de marca en la periferia como en el centro

del núcleo. Eso se vio en los histogramas producidos, ubicados a la derecha de las fotografías de la figura 24. Respecto a la estadística, mediante test Anova One way, se corroboró si había diferencias entre los 3 grupos. En la histona H3K4me1 hay mayor intensidad en los embriones partenogénicos respecto a clones control y tratados, mostrando diferencias estadísticamente significativas. La histona H3k27ac muestran diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos, mostrando diferentes niveles de expresión en todos los grupos. Su localización dentro del núcleo fue diferente entre los grupos, donde el grupo control sin tratar presentó una localización más homogénea (Figura 25).

22.5. Efectos del uso de drogas modificadoras de la epigenética sobre la metilación de genes importantes para el desarrollo embrionario clones porcinos agregados (día 7), producidos por SCNT.

Para finalizar, se procedió al estudio de los estados de metilación del ADN en clones agregados tratados con las drogas anteriormente mencionadas, mediante la técnica de secuenciación bisulfito dirigida a genes claves del desarrollo temprano (*Oct4* y *Dnmt1*).

En ambos genes se vio una desmetilación marcada. En el estudio del gen que codifica para *OCT4* de 10 colonias estudiadas 4 de ellas tenían desmetiladas 17 /18 islas CpG, y otras 6 colonias con sus 18/18 islas CpG desmetiladas. Respecto al gen que codifica para *DNMT1* de las 5 colonias secuenciadas 3 presentaban desmetiladas 27/28 islas CpG y otras dos colonias 28/28 islas desmetiladas (Figura 26).

Tabla 10: Efectos de 5 Aza + PD 0325901 en embriones porcinos clonados y agregados, cultivados *in vitro* hasta día 7.

Grupo experimental	No. ERZFs*	No. embriones (por pozo)	No. ERZFs clivados (%)	No. blastocistos	% blastocistos por ERZFs	% blastocistos por embrión (pozo)
3x	306	102	257(84.0)	30	11.67	29.41 ^a
3x c/drogas	480	160	392(81.67)	63	16.07	40.90 ^b
Total	786	262	649 (82.57)	93	11.83	35.5

*ERZFs: Embrión reconstituido libre de zona pelúcida.

(a,b) Valores de superíndices diferentes dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$, test *exacto de Fisher*).

Tabla 11: Efectos de la agregación embrionaria y el uso de fármacos modificadores de la epigenética, en los diámetros de clones porcinos tratados y controles

Diámetro de blastocistos				
Grupo experimental	No. Blastocisto	80 µm-199 µm (%)	200µm-299µm (%)	>/= 300µm (%)
3x	21	8 (38,1)	7 (33,33)	6 (28,57) ^a
3x c/drogas	41	10 (24,39)	14 (34,15)	17 (41,46) ^b
Total	62	18 (29,03)	21 (33,87)	23 (37,1)

(a,b) Valores de superíndices diferentes dentro de una misma columna son estadísticamente significativos ($p < 0,05$, *test exacto de Fisher*).

Número de células en clones tratados y sin tratar (día 7)

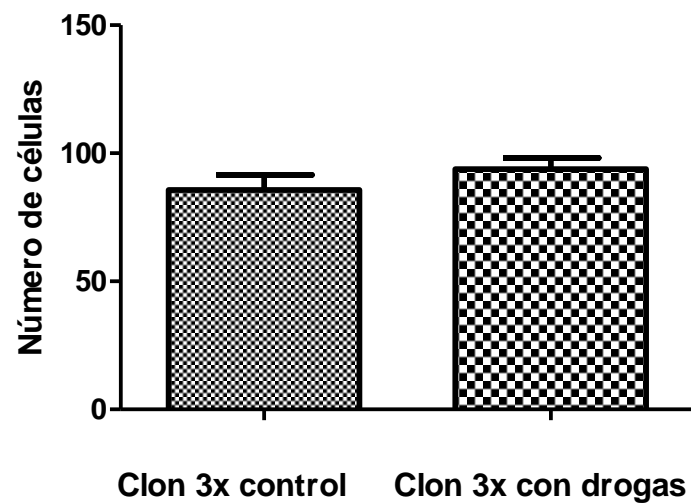


Figura 21. Gráfico de barras mostrando número de células en clones agregados controles y agregados tratados con drogas modificadoras de la epigenética. *Test t de Student* $p < 0.05$.

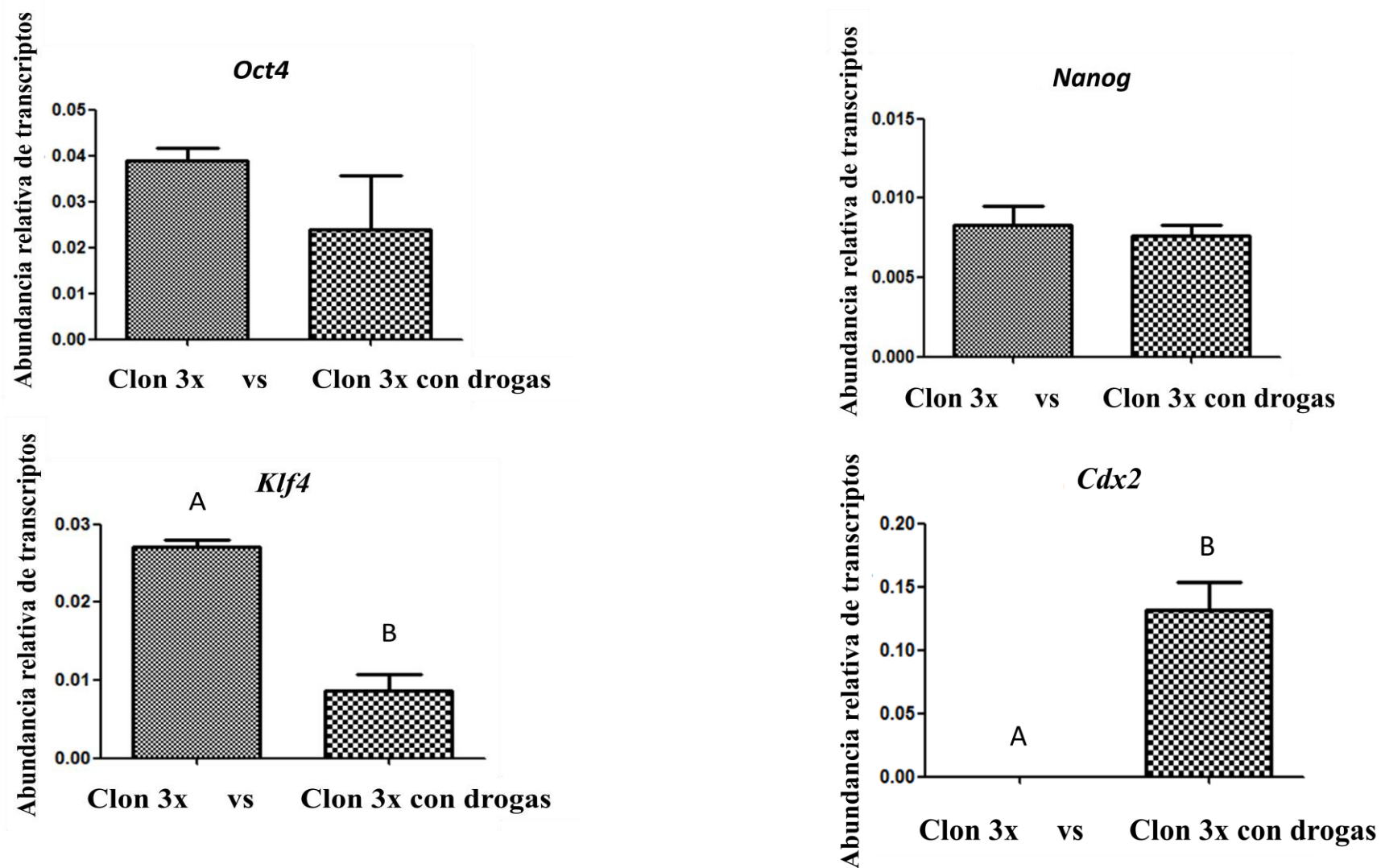
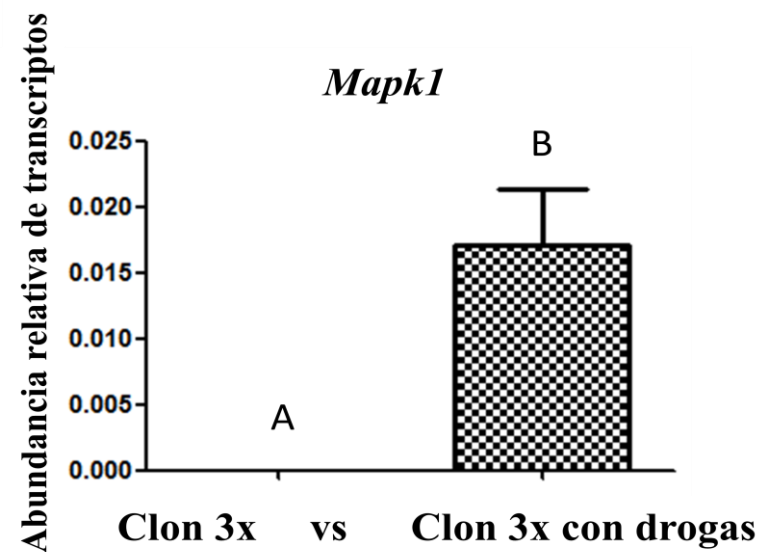
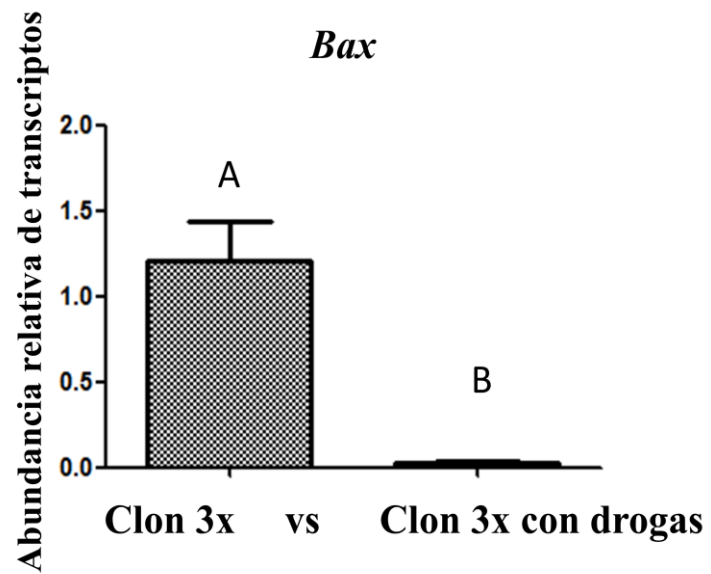
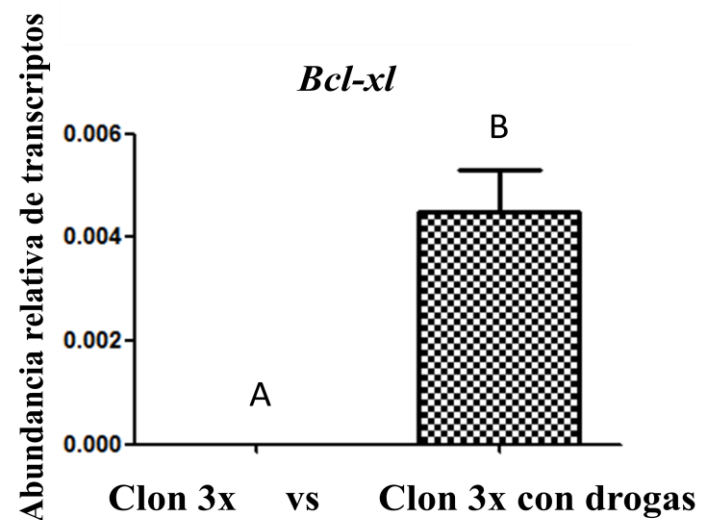
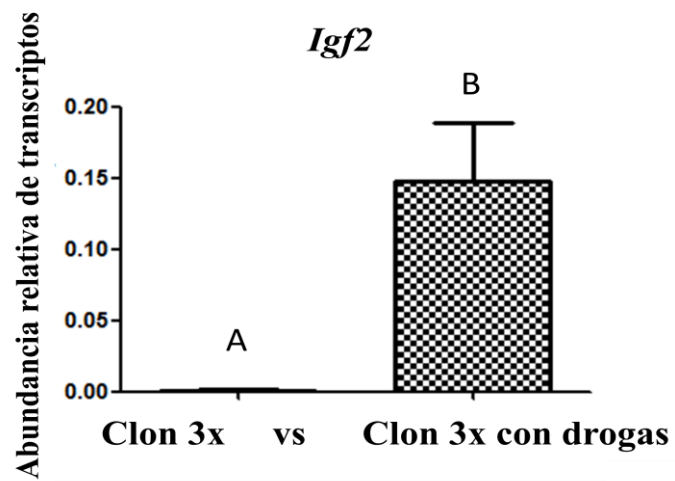


Figura 22. Abundancia relativa de transcripción de los genes Oct4, Klf4, Nanog, Igf2, Cdx2, Mapk1, Bcl-xl y gen Bax en blastocistos agregados de cerdos (día 7) generados por SCNT y tratados con drogas modificadoras de la epigenética embrionaria. Todos los genes se normalizaron con el gen ACTB; (A, B) letras diferentes indican diferencias estadísticas dentro de cada gráfico de expresión génica ($p < 0,05$).



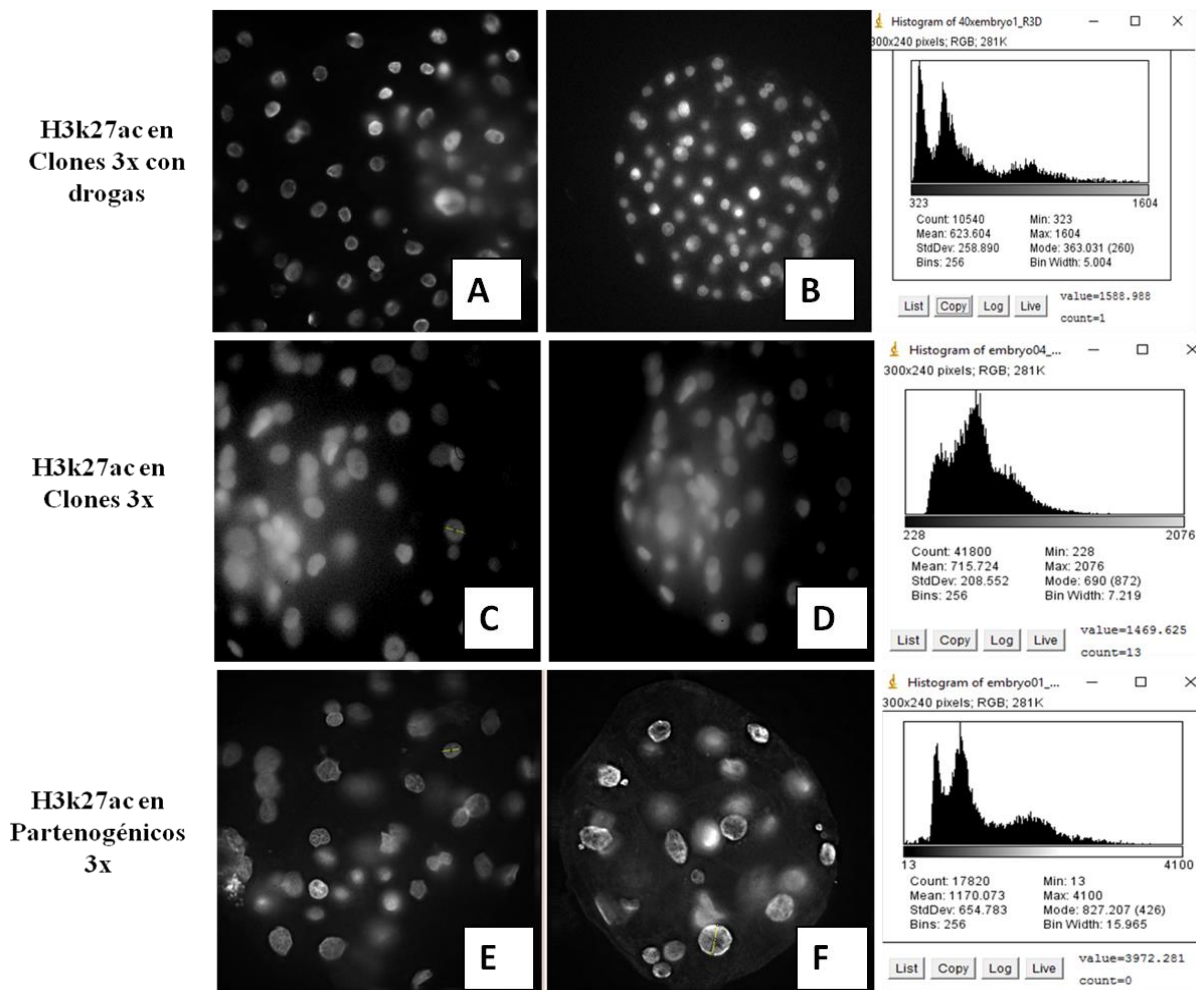


Figura 23: Gráfico mostrando la distribución de la histona H3K27 ac. A) Fotografía del núcleo celular mostrando marcas de histona H3K27ac en embriones clones 3x tratados con 5 Aza + PD (aumento 40X). B) Idem pero en aumento 20X. A la derecha de las figuras A y B se muestra el histograma de la distribución de H3K27 ac en células de clones 3x tratados con las drogas. C) H3K27 ac en aumento 40X. D) H3K27 ac en aumento 20X y a su derecha el histograma correspondiente. E) H3K27 ac en embriones partenogénicos aumento 40X. F) H3K27 ac en embriones partenogénicos aumento 20X, su histograma correspondiente a la derecha.

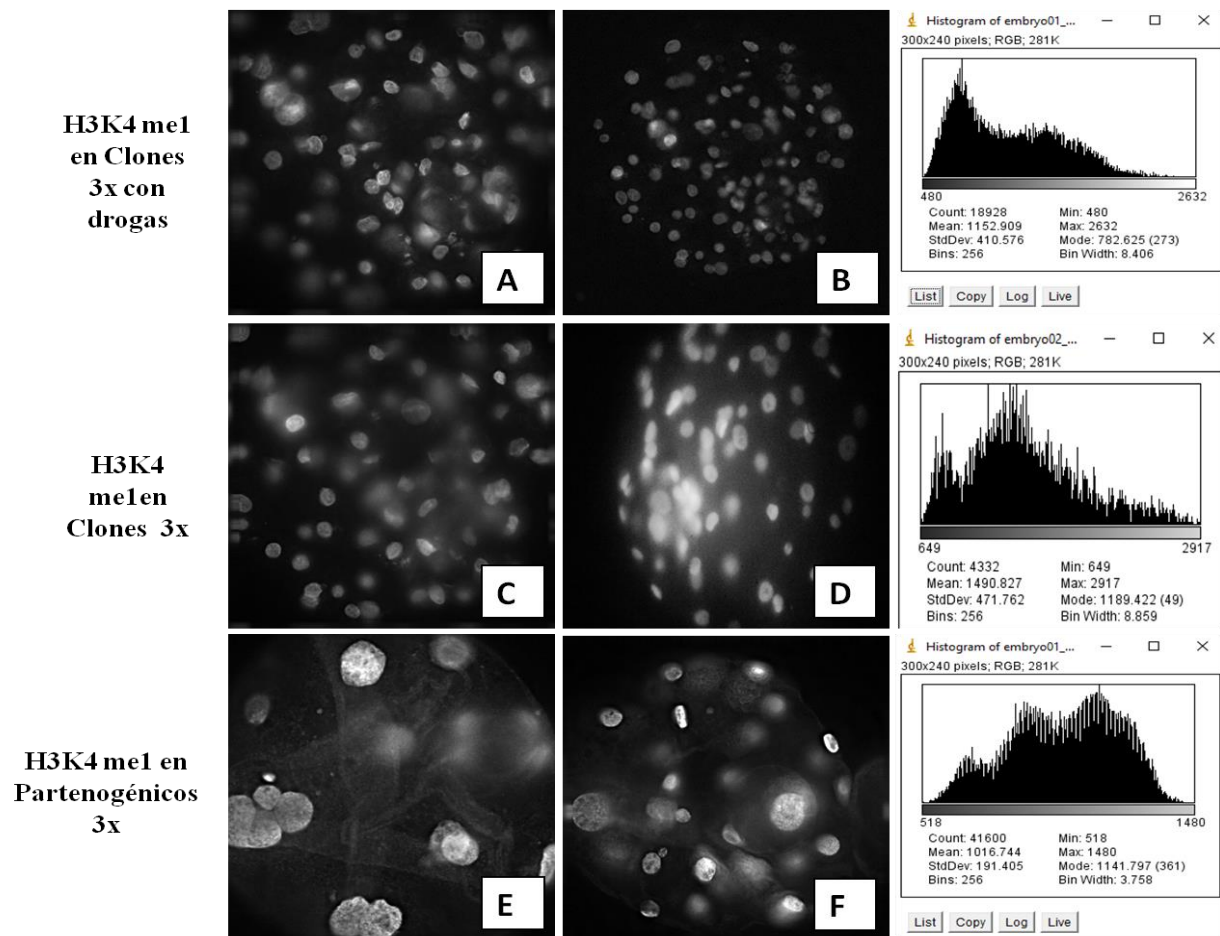


Figura 24: Gráfico mostrando la distribución de la histona H3K4 me1. A) Fotografía del núcleo celular mostrando marcas de histona H3K4me1 en embriones clones 3x tratados con 5 Aza + PD (aumento 40X). B) Idem pero en aumento 20X. A la derecha de las figuras A y B se muestra el histograma de la distribución de H3K4me1 en células de clones 3x tratados con las drogas. C) H3K4 me1 en aumento 40X. D) H3K4 me1 en aumento 20X y a su derecha el histograma correspondiente. E) H3K4 me1 en embriones partenogénicos aumento 40X. F) H3K4 me1 en embriones partenogénicos aumento 20X, su histograma correspondiente a la derecha.

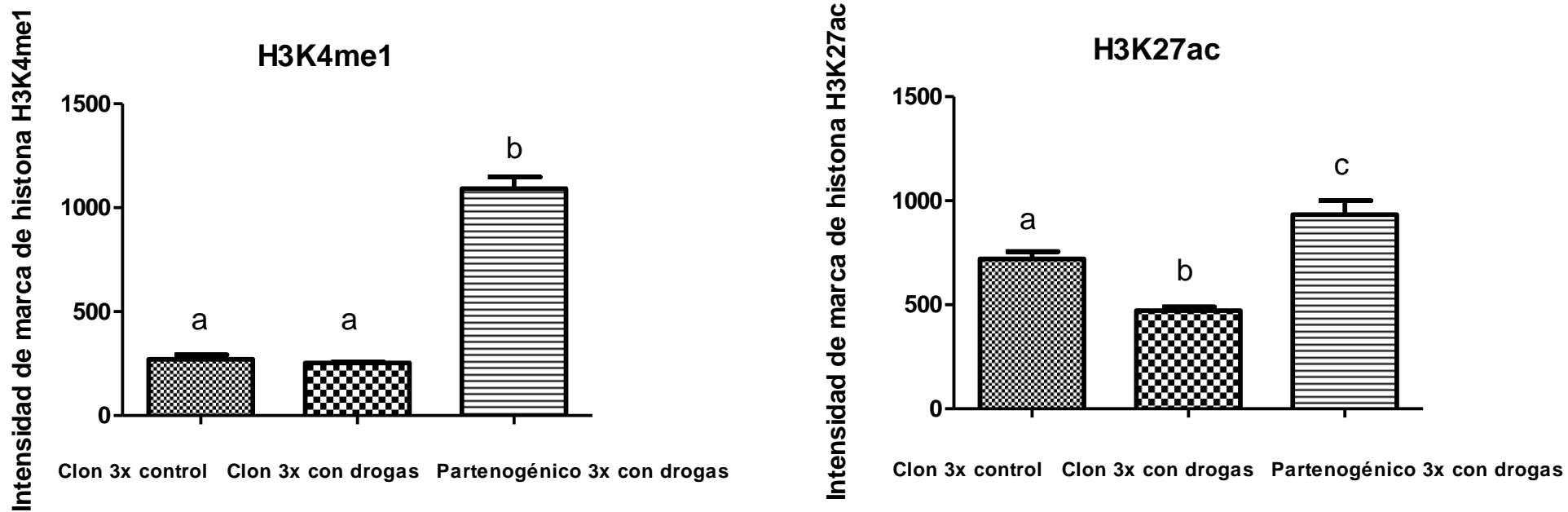


Figura 25: Muestra la diferencia en intensidad de marca de histonas H3K4me1 y H3K27ac. A) Gráfico de H3K4me1, a la izquierda. B) Gráfico de H3K27ac, a la derecha. Mediate test de Anova One way se constató diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0,05$, midiendo 22-30 células correspondientes a 5 embriones por grupo.

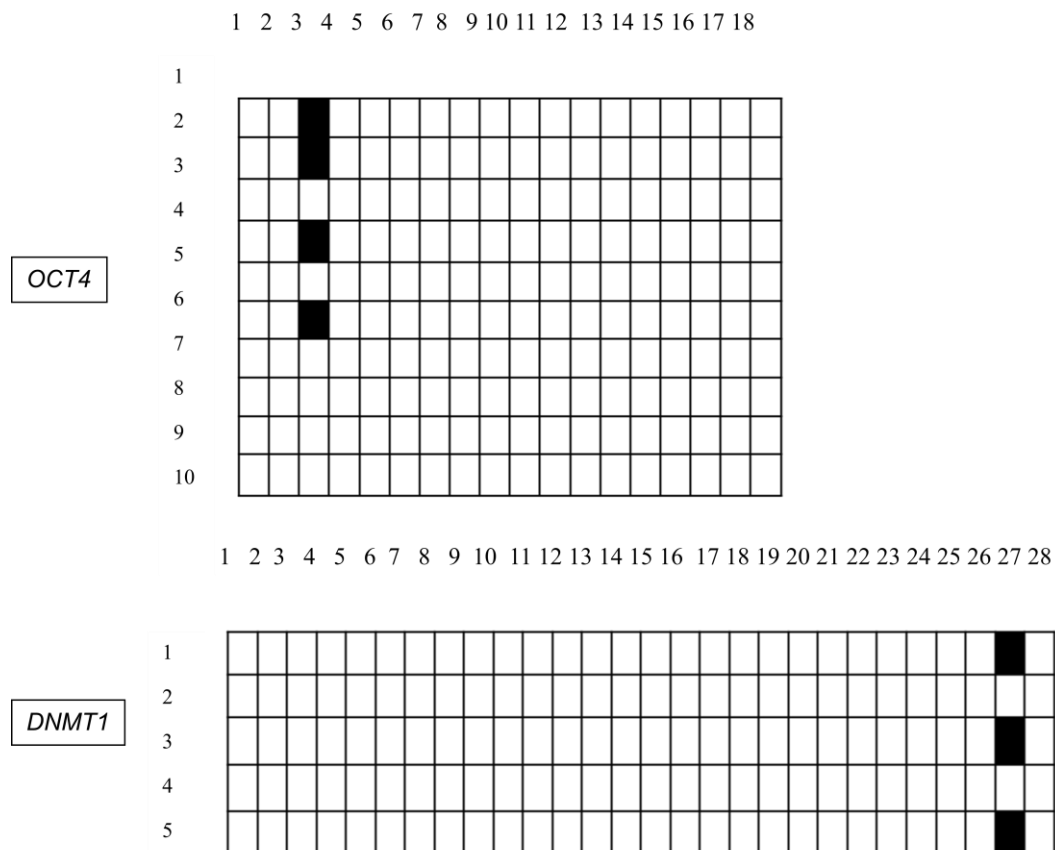


Figura 26: Gráficos de Metilación de *Oct 4* y *DNMT1*. Arriba se visualiza el gen que codifica para *Oct 4*, las columnas muestran las 18 islas estudiadas, y en las filas las 10 colonias. De las 18 islas estudiadas, 4/10 colonias presentan 17/18 islas desmetiladas, y las 6 restantes presentaron 18/18 islas desmetiladas. El color negro representa metilación y el blanco desmetilación. En la parte de abajo se encuentra el gen *DNMT1*, se estudiaron 28 islas CpG (mostradas en las columnas). Como resultado se obtuvieron, 3/5 con 27/28 islas desmetiladas y las 2 restantes con 28/28 islas desmetiladas.

23. Discusión capítulo III

En este tercer y último capítulo se combinaron los aportes de la técnica de agregación embrionaria y del uso de fármacos que modifican la epigenética embrionaria.

La mayoría de los trabajos de agregación embrionaria en clonación en diferentes especies siempre presentaron beneficios, tanto en porcinos (Siriboon y col., 2014), como en equinos (Gambini y col., 2012 y 2014) y en bovinos (Bang y col., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos con diferentes drogas inductoras de cambios en el ADN, fueron en algunos casos muy contradictorios. Por este motivo se pretende estudiar la combinación ambas para producir clones porcinos.

Los experimentos de ésta tesis tratan de elucidar las complejas etapas de reprogramación epigenética durante la embriogénesis y a comprender mejor los factores que intervienen en éste proceso nuclear, como la hipermetilación del ADN o el estado de hipoacetilación de histonas. También a la identificación de posibles fallas en la reprogramación, inducidas por la manipulación de embriones y/o por condiciones de cultivo. Por último, mediante el uso de inhibidores y otros agentes se pretende ayudar al establecimiento de patrones epigenéticos adecuados durante el desarrollo embrionario temprano. La tasa de éxito de la clonación animal puede por lo tanto ser mejorada mediante la prevención o reversión de errores epigenéticos (Diao y col., 2013). Todos estos esfuerzos son necesarios para mejorar la eficiencia y por ende el interés de la aplicación de la tecnología de clonación en la producción animal.

El uso en combinación de los dos recursos trajeron aparejado un aumento en el tamaño embrionario en el grupo tratado, medido como diámetro en μm . Los tamaños frecuentes de los embriones provenientes de clonación varían desde menos de 100 μm hasta más de 1000 μm (Bang y col., 2015). Presentando una amplia gama de tamaños, en este trabajo, los clones porcinos presentaban más del 41 % del total de blastocistos, un tamaño superior a 300 μm , llegando a medir hasta 500 μm . No obstante el número de células no varió. En trabajos previos (Gambini y col., 2014) se estableció que el número máximo de estructuras a agregar es de 4 en la especie equina, a partir de allí, decaen los parámetros indicadores de calidad del embrión. En cerdos no existen estudios previos que demuestren el número de estructuras máximas a agregar, sin embargo, estimamos podría ser de tres debido a que los embriones porcinos de por si tienen menor número de células comparado a otras especies y agregar tantas estructuras podría causar molestias estéricas en el pozo en donde se

compactan. Trabajos previos reportados hasta el momento sobre agregación embrionaria en mamíferos enfocaron sus objetivos en determinar el efecto de embriones agregados, combinando hasta un máximo de tres estructuras (Stevens y col., 1977, Surani y col., 1977; Stevens y col., 1978; Anderegg y col., 1986; Boediono y col., 1995; Boediono y col., 1999; Boiani y col., 2003; Eckardt y col., 2004; Zhou y col., 2008; Misica-Turner y col., 2007; Lee y col., 2007; Oback y col., 2008; Ribeiro y col., 2009; Shan y col., 2012); sin embargo, no se reportaron trabajos orientados a determinar cuál es el número adecuado de estructuras a agregar para lograr los máximos efectos de la agregación embrionaria en porcinos.

Los resultados obtenidos respecto a expresión génica indicaron que no hubo cambios en los genes relacionados a pluripotencia en el grupo 3x tratado respecto al 3x control. A pesar de ello, aumentaron su expresión los genes relacionados a trofoblasto, que participan en la generación de placenta. La placentación es uno de los principales inconvenientes en la generación de clones. En éste capítulo, se encontraron altos niveles de expresión de *Igf2* y *Cdx2*, esto podría acarrear un gran beneficio en la eficiencia de la técnica y favorecer la producción de clones nacidos vivos y normales. También aumentaron significativamente su expresión genes antiapoptóticos (*Bcl-XL*) y disminuyeron los proapoptóticos (*Bax*); sin implicar ello cambios en el número celular embrionario, sugiriendo ésto, que podrían existir otros mecanismos a parte de la apoptosis, mediante los cuales el embrión logra controlar el número de células y su crecimiento. Este podría relacionarse al uso de fármacos modificadores de la epigenética como PD (inhibidor de MEK en la vía MAPK) que finalizan su cascada generando control en el ciclo celular y la apoptosis embrionaria (Pratilas y col, 2010).

El gen que codifica para *Mapk1* aumento su expresión génica a pesar de haber usado PD durante las primeras 72 hs de desarrollo embrionario. Sin embargo, no es anormal que se de ese fenómeno debido a que el efecto de la droga permanece durante se esté ejerciendo su acción, cuando ésta se elimina, la vía puede reactivarse reversiblemente. Los resultados que se obtuvieron se pueden explicar debido a que las mediciones de expresión génica fueron hechas a los 7 días de cultivo, en el estadio de blastocisto, es decir varios días después de la remoción de la droga.

Además, como la figura 19 lo indica, la activación de *MAPK* puede darse a su vez por diferentes vías y hay varias familias de proteínas implicadas que equilibran o regulan a los inhibidores de la vía, que incluyen las proteínas sprouty (SPRY), las fosfatasas MAP quinasa (MKPs o DUSPs), proteínas como KSR-1, y RKIP (Therrien y col., 1995; Yeung y col.,

1999; Kim y col., 2004; Keyse y col., 2008), proteínas de andamiaje que regulan la localización celular (RAF) (Morrison y col., 1994).

Estudios previos demuestran, que la expresión de ERK fosforilada (diana de MEK) no se correlaciona únicamente con la dependencia de la vía MAP quinasa y la sensibilidad a inhibidores de MEK (Solit y col., 2006; Pratilas y col., 2008; Leboeuf y col., 2008; Pratilas y col., 2009). La explicación de esto es que después del tratamiento con un inhibidor tal como PD se puede atenuar la respuesta al fármaco debido a que existen vías paralelas que albergan el potencial para regular de forma redundante los mismos efectores comunes de ERK, tal como ciclinas D, RAF, RAS (Zimmermann y col., 1999) y vías previamente suprimidas por los altos niveles de proteínas SPRYs y DUSPs y pueden atenuar la respuesta al fármaco. Como consecuencia, se produce la hiperfosforilación de MEK y se puede promover un estado de hiperactivación durante los momentos en los que el medicamento no está presente en concentraciones suficientes para inhibir la enzima. Tal escenario se produciría si la exposición continua del medicamento no fuera posible, como por ejemplo por la limitante de toxicidad, que se da en los embriones y en las células *in vivo* en tratamientos usados para combatir el cáncer (Pratilas y col., 2010).

Existe una relación funcional entre metilación del ADN y modificaciones de las histonas, esa relación implica proteínas de unión al ADN metilado (Methyl-CpG-binding domain proteins, MBD) que atraen a complejos histona deacetilasa e histona metiltransferasas hacia la cromatina (Klose y col., 2006) Las modificaciones epigenéticas controlan la expresión génica mediante una variedad de procesos que incluyen la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas (Bernstein y col., 2005).

Existen varios estudios donde muestran que el pretratamiento de las células donantes, antes de la transferencia nuclear, con un inhibidor de la metilación del ADN como 5 Aza, no parece mejorar el desarrollo de los embriones clonados (Shi y col., 2003; Enright y col., 2005). No obstante, existen otros casos en que las células donantes porcinas fueron tratadas con una concentración baja de la misma droga y el desarrollo a blastocisto, en clones, mejoraba. (Diao y col., 2013). Como estos ejemplos contradictorios hay varios casos, sin embargo, cuando se tratan embriones reconstituídos, a concentraciones bajas, la droga facilita de forma segura la reprogramación y que conduce a la mejora de las tasas de desarrollo hasta blastocisto. En contraste, las concentraciones elevadas de 5 Aza (50 nM o superior) muestran efectos perjudiciales sobre embriones reconstruidos (Kumar y col., 2013). Como resultado de todo esto se eligió una concentración baja pero eficaz, establecida por Bain y col., 2007, esas concentraciones eran usadas para tratamientos de líneas celulares tumorales.

En relación a los resultados obtenidos en este capítulo, de los dos genes estudiados ambos presentaban una desmetilación marcada en sus islas CpG. Tanto *Oct4* como *Dnmt1* presentaron casi el 100 % de sus islas sin metilación, demostrando que 5 Aza podría estar cumpliendo su función de abrir la hebra de ADN para dejar paso al borrado y o reseteo de la impronta previa de la célula somática donante. Kang y col; 2001, reportó que las secuencias de ADN satélite centroméricas de las células del donante (fibroblastos fetales porcinos) se hipermetilaban. Este estado se mantenía hasta la etapa de 4-8 células, cuando el desarrollo normal del embrión requiere desmetilación. Esto mismo ocurre en embriones *in vivo*, indicando que las secuencias de ADN de embriones porcinos provenientes de SCNT se someten a desmetilación de una manera similar a la de embriones *in vivo*, durante la preimplantación embrionaria (Diao y col., 2013). El tratamiento con las drogas puede no sólo haber generado cambios en la metilación del ADN sino también colaborado en la generación de más de un 40% de blastocistos en el grupo tratado.

Respecto a las marcas de histonas se pudo corroborar que en los embriones 3x tratados, la histona H3K27ac aparecía con mayor frecuencia en la periferia nuclear. Estudios recientes del año 2015, demuestran que los genes que consistentemente muestran expresión significativamente más alta están asociados con potenciadores activos como H3K27ac o H3K4me1 en todos los tipos de células (Herlofsen y col., 2013; Nature Publishing Group, number 14310, 2015). En ese estudio publicado por la revista Nature se evidenció que el nivel de metilación del genoma completo (estudiado por ADN bisulfito) muestra que los potenciadores "activos" estaban asociados directamente con H3K27ac además de H3K4me1 y a su vez la marca de la histona H3K27ac indicaba niveles bajos de metilación, en consonancia con una mayor actividad reguladora. Sumado a esto, se sabe que los genes que se están expresando ocupan un lugar diferencial respecto al núcleo, aquellos activos que se están transcribiendo están en la periferia respecto a los inactivos que están distribuidos uniformemente en todo el núcleo (Kurz y col., 1996).

Esto nos demuestra que existe una relación estrecha entre marcas de histonas, metilación del ADN, accesibilidad del mismo y expresión génica. Suponemos que las drogas podrían estar ejerciendo una relocalización de los genes, en donde aquellos que más se expresan serían los que estaban ubicados en la periferia nuclear mostrando marcas de histona H3K27ac positivas. Con respecto a H3K4me1 presentó una distribución más uniforme alrededor de todo el núcleo en ambos grupos estudiados, no mostrando grandes diferencias en localización ni intensidad de marca. Queda pendiente como perspectiva del trabajo el poder incluir marcas de histonas y marcas de genes específicos dentro de un mismo

embrión, haciendo inmunohistoquímicas conjuntas para tener localización dentro del núcleo y tratar de dar luz sobre el encendido de genes.

24. Conclusiones capítulo III

Las drogas (5Aza 1 μ M + PD 1 μ M) modificadoras de la epigenética embrionaria no modificaron el clivaje, sin embargo, incrementaron significativamente la tasa de desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto por embrión, presentando un 40,90% de blastocistos en el grupo tratado respecto al grupo control con un 29,41%.

El tratamiento aplicado a los embriones produjo un aumento en el tamaño embrionario, medido como diámetro en micras, mostrando diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el número de células no se vió afectado mostrando valores similares en ambos grupos.

Respecto a la expresión génica, aumentaron su expresión relativa aquellos genes relacionados a diferenciación celular como *Igf2* y *Cdx2*; también genes antiapoptóticos como *Bcl-xl* y genes moduladores de la metilación del ADN como *Mapk1*. Genes de pluripotencia como *Oct4* y *Nanog* se mantuvieron sin diferencias estadísticas. El gen proapoptótico *Bax* disminuyó significativamente su expresión con el tratamiento de las drogas al igual que el gen *Klf4*. El tratamiento aumentó la expresión de genes que estaban expresados en muy baja proporción que casi no fueron detectados en 40 ciclos de PCR en el control, y con el tratamiento aumentaron su expresión en un nivel bajo pero detectable, implicando diferencias estadísticas.

La histona H3K27ac que está asociada a enhancers o promotores de genes, su marca se localizó principalmente en la periferia nuclear. Cuando se trataron los clones agregados, con 5Aza + PD se obtuvo mayor proporción de marcas en la periferia nuclear. Generalmente los genes que van a activarse se encuentran cercanos a la membrana nuclear, o sea, en la periferia del núcleo. La distribución en clones 3x sin tratar fue más uniforme en todo el núcleo. Por último, en los embriones partenogénicos tratados con las mismas drogas se evidenció una distribución similar a los clones 3x tratados, mostrando que posiblemente las

drogas estaban aumentando la expresión de ciertos genes al localizarlos en la periferia nuclear.

La histona H3K4me1 apareció localizada más uniformemente en todo el núcleo. Y en el grupo donde más marcas se visualizó fue en el grupo de partenogénicos 3x tratados con 5Aza+ PD, en los otros dos grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas en su expresión.

Con respecto a la metilación del ADN, se estudiaron dos genes: *Oct4* y *DNMT1*, ambos mostraron una desmetilación marcada cuando se trataron los clones agregados con drogas que inducían modificaciones epigenéticas. Una vez secuenciadas las 10 colonias correspondientes al gen *Oct4*, se evidenció 6 de ellas con sus 18 islas completamente desmetiladas y las 4 restantes presentaban 17/18 islas desmetiladas. Con respecto a *DNMT1*, de las 5 colonias estudiadas 2 de ellas poseían sus 28 islas desmetiladas y 3 de ellas 27/28 islas desmetiladas, mostrando que esos genes no poseían molestias estéricas y posiblemente podrían estar siendo expresados.

Estos resultados permiten aseverar que la agregación embrionaria combinada con el uso de modificadores epigenéticos como 5Aza + PD permitió mejorar la eficiencia de la clonación en porcinos incrementando el desarrollo *in vitro* a porcentajes muy elevados respecto a los que se conoce en el bibliografía para la especie porcina.

Se describió, por primera vez, el uso del medio de cultivo SOF para embriones porcinos, demostrando que el medio cubrió perfectamente las necesidades embrionarias demostrado por su elevado valor de desarrollo *in vitro*.

Por otro lado, las drogas mostraron una posible redistribución de marcas epigenéticas relacionadas a las histonas, en embriones porcinos agregados tanto partenogénicos como en clones.

25. Conclusiones Generales

La clonación es una biotecnología novedosa y muy útil en producción porcina, principalmente por permitir generar de nuevo animales de alta genética que de otro modo se perderían, pero también por su potencial uso como modelo en enfermedades humanas, en la generación de células madres o en trasplantes heterólogos o xenotrasplantes. No obstante, es necesario comprender aún más los mecanismos involucrados en la reprogramación celular, en donde una célula somática se vuelve totipotente y adquiere la capacidad de generar un organismo completo.

Los resultados presentados en esta tesis permiten afirmar que se pudo corroborar la hipótesis de trabajo planteada, mostrando que fue posible aumentar la eficiencia de la clonación porcina mediante modificaciones epigenéticas producidas por agregación embrionaria y reprogramación celular inducida por fármacos.

La agregación embrionaria mejoró las tasas de desarrollo *in vitro* tanto en embriones partenogénicos como en clones control y tratados con drogas que afectan la epigenética embrionaria (5 Aza 1 μ M + PD 1 μ M). El método de agregación, no implicó un mayor uso de oocitos para incrementar las tasas de blastocistos y produjo un aumento del tamaño en diámetro de los embriones agregados. La agregación embrionaria en la fase de una célula podría compensar parcialmente una reprogramación incompleta en embriones porcinos clonados, posiblemente por la combinación de varios embriones epigenéticamente diferentes que presentan una mayor expresión de genes de pluripotencia, incrementando el desarrollo y la calidad de los embriones producidos. En lo que respecta a apoptosis celular o fragmentación del ADN en clones porcinos agregados, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos, demostrando que la agregación embrionaria disminuía las tasas de células afectadas por apoptosis, aumentaba el número celular y el tamaño en diámetro de los embriones agregados. A pesar de que solamente pudieron ejecutarse tres transferencias embrionarias de clones agregados también pudo obtenerse tres abortos, demostrando que los embriones eran aptos para preñar. Sin embargo, se trabajó con hembras de descarte por alguna falla en concepción y o falla sanitaria, hecho que afectó de manera sustancial a las preñeces obtenidas.

Por otro lado, se encontró una combinación de drogas (PD + 5 aza) que mostró una tendencia a mejorar el desarrollo *in vitro* de embriones partenogénicos. Ésa combinación fue usada posteriormente en clones porcinos, con la finalidad de aumentar la eficiencia de la reprogramación que sufren los embriones en el proceso de transferencia nuclear de células somáticas.

Cuando se usó estos fármacos en clones agregados se visualizó un aumento estadísticamente significativo en el desarrollo *in vitro* del grupo tratado, sumado a un aumento en el tamaño embrionario, sin implicar cambios en el número celular. Se observó cambios en la expresión génica en genes claves para el desarrollo de trofoblasto, implicados en la placentación embrionaria, éstos aumentaron su expresión, al igual que genes antiapoptóticos y genes implicados en la vía MAPK.

La redistribución de la histona H3K27ac, fue otro de los cambios visualizados en el grupo tratado, tanto en embriones provenientes de clones agregados como en embriones partenogénicos tratados. Ésta se ubicó preferentemente en la periferia nuclear respecto al grupo no tratado que presentó una distribución homogénea. La histona H3K4me1 no modificó su distribución dentro del núcleo. Respecto a la metilación del ADN se decidió estudiar dos genes Oct4 y DNMT1 y los dos evidenciaron una desmetilación marcada, mostrando que la droga 5 Aza, estaba generando cambios en los embriones estudiados.

En ésta tesis se trató de abarcar varios aspectos del proceso de reprogramación que sufren los clones porcinos en el proceso de la transferencia nuclear de células somáticas. Quedan varios otros pendiente de estudio. Sin embargo, se obtuvo un aumento significativo en el desarrollo embrionario *in vitro*, mostrando que el medio de cultivo elegido y las condiciones provistas (tanto la agregación embrionaria como el tratamiento con fármacos modificadores epigenéticos) fueron condiciones ventajosas en el proceso de generación de embriones y pueden ser el camino a un aumento sustancial en la generación de clones porcinos.

26. Perspectivas

La técnica de agregación embrionaria ha venido demostrando en éstos últimos años que es un método fácil y útil de aplicar para mejorar el desarrollo *in vitro* en varias especies. Fármacos modificadores de la epigenética han tenido resultados disímiles entre varios autores, demostrando que probablemente existe la posibilidad de complementación de los beneficios de ambos aportes. No obstante, se propone el avance del estudio en clones porcinos con transferencias embrionarias que se trasladen los conocimientos desde el plano *in vitro* al *in vivo*. También encarar el estudio de agregación embrionaria hasta el máximo de estructuras que se pueden agregar para no perder la calidad embrionaria.

27. Referencias Bibliográficas

Akagi S, Yamaguchi D, Matsukawa K, Mizutani E, Hosoe M, Adachi N, et al. Developmental ability of somatic cell nuclear transferred embryos aggregated at the 8-cell stage or 16- to 32-cell stage in cattle. *J Reprod Dev* 2011 57(4):500-6.

Amuzie C, Swart JR, Rogers CS, Vihtelic T, Denham S, Mais DE. A Translational Model for Diet-related Atherosclerosis: Effect of Statins on Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in a Minipig. *Toxicol Pathol*. 2016 Feb 16. pii: 0192623315622304.

Anderegg C, Markert CL. Successful rescue of microsurgically produced homozygous uniparental mouse embryos via production of aggregation chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(17):6509-13. PubMed PMID: 3462710; PubMed Central PMCID: PMC386533.

Aston KI, Li GP, Hicks BA, Sessions BR, Davis AP, Rickords LF. Abnormal levels of transcript abundance of developmentally important genes in various stages of preimplantation bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Reprogram* 2010 12: 23–32.

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003 17:126-40.

Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe 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, Overström EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*. 1999; 17:456–461.

Bain JL, Plater M, Elliott N, Shpiro CJ, Hastie H, McLauchlan I, Klevernic JS, Arthur DR, Alessi and P Cohen. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 2007, 408:297–315.

Balbach ST, Esteves TC, Brink T, Gentile L, McLaughlin KJ, Adjaye JA, Boiani M. Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. *Dev Biol.* 2010 Jul 1;343(1-2):71-83. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.04.012. Epub 2010 Apr 22. PubMed PMID: 20417198.

Bang JI, Jin JI, Ghanem N, Choi BH, Fakruzzaman M, Ha AN, et al. Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile. *Theriogenology* 2015 84 (4): 509-23.

Bavister BD, Yanagimachi. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* 1977 Mar;16(2):228-37. PubMed PMID: 831847.

Bernstein E; Allis C D. RNA meets chromatin. *Genes and Development*, 2005.vol. 19, no. 14, pp. 1635–1655,.

Bestor T H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 2000, vol. 9, no. 16, pp. 2395–2402.

Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol* 2000;18:1055–9.

Betts DH, King WA. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology.* 2001; 55:171–191.

Beyhan Z, Iager AE, Cibelli JB. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell.* 2007; 1:502–512.

Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002, 16, 6–21.

Bode G, Clausing P, Gervais F et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010, 62:196–220

Boediono A, Saha S, Sumantri C, Suzuki T. Development *in vitro* and *in vivo* of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7:1073–1079.

Boediono A, Suzuki T, Li LY, Godke RA. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol Reprod Dev.* 1999; 53:159–170.

Bogdanovic, O., Fernandez-Min˜ a´ n, A., Tena, J.J., de la Calle-Mustienes, E., Hidalgo, C., van Kruysbergen, I., van Heeringen, S.J., Veenstra, G.J., and Go´ mez-Skarmeta, J.L. Dynamics of enhancer chromatin signatures mark the transition from pluripotency to cell specification during embryogenesis. *Genome Res.* 2012, 22, 2043–2053.

Boiani M, Eckardt S, Leu NA, Scholer HR, McLaughlin KJ. Pluripotency deficit in clones overcome by clone–clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J.* 2003; 22:5304–5312.

Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. Oct–4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 2002; 16:1209–1219.

Bonn, S., Zinzen, R.P., Girardot, C., Gustafson, E.H., Perez-Gonzalez, A., Delhomme, N., Ghavi-Helm, Y., Wilczynski, B., Riddell, A., and Furlong, E.E. Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. *Nat. Genet.* 2012, 44, 148–156.

Bordignon V, El-Beirouthi N, Gasperin BG, Albornoz MS, Martinez-Diaz MA, Schneider C, et al. Production of cloned pigs with targeted attenuation of gene expression. *PLoS One* 2013. 8 (5): e 64613.

Bourc’his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Somizzoli P, Renard JP, et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Surr Biol* 2001, 11: 1342–6.

Brevini T, Pennarossa G, Maffei S and Gandolfi F. Pluripotency network in porcine embryos and derived cell lines. *Reprod Domest Anim* 2012, 47 Suppl 4:86–91.

Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997 56 (5): 1088–96.

Burgstaller JP, Schinogl P, Dinnyes A, Müller M, Steinborn R. Mitochondrial DNA heteroplasmy in ovine fetuses and sheep cloned by somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev Biol.* 2007; 7:141.

Butler JR, Wang ZY, Martens GR, Ladowski JM, Li P, Tector M, Tector AJ. Modified glycan models of pig-to-human xenotransplantation do not enhance the human-anti-pig T cell response. *Transpl Immunol.* 2016 Feb 9. pii: S0966-3274(16)30009-0. doi: 10.1016/j.trim.2016.02.001.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003 113:643-55.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science.* 1998; 280:1256–1258.

Collas P, Noer A, Timoskainen S. Programming the genome in embryonic and somatic stem cells. *J Cell Mol Med.* 2007 Jul-Aug;11(4):602-20. Review. PubMed PMID: 17760828; PubMed Central PMCID: PMC3823245.

Cooper DKC, Keogh AM, Brink J, Corris PA, Klepetko W, Pierson RN, Schmoeckel M, Shirakura R, Warner Stevenson L. Xenotransplantation advisory committee of the international society for heart and lung transplantation, report of the xenotransplantation advisory committee of the international society for heart and lung transplantation: the present status of

xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases, *J. Heart Lung Transpl.* 2000, 1125e1165.

Cooper DK, Dou DF, Tao KS, Yang ZX, Tector AJ, Eksler B. Pig Liver Xenotransplantation: A Review of Progress Toward the Clinic. *Transplantation.* 2016 Jul 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27428714.

Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. USA 107, 21931–21936.

Dai XP, Hao J, Hou XJ, Hai T, Zhou Q et al. Somatic nucleus reprogramming is significantly improved by m-carboxycinnamic acid bishydroxamide, a histone deacetylase inhibitor. *J Biol Chem* 2010, 285:31002-31010.

Das ZC, Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their in vitro development in pigs. *Cell Reprog* 2010, 12:95–104

De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, Archibald AL, Ainslie A, Bosma W, Bowering J, Bracken J, Ferrier PM, Fletcher J, Gasparrini B, Harkness L, Johnston P, Ritchie M, Ritchie WA, Travers A, Albertini D, Dinnyes A, King TJ, Wilmut I. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod.* 2002 Mar;66(3):642-50. PubMed PMID: 11870070.

Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2003, vol. 14, no. 1, pp. 93–100.

Dean W, Santos F, Stojkovic M et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 2001, vol. 98, no. 24, pp. 13734–13738.

Diao Y F, Naruse K, Li X X, Han R X, Kim D K, Lin T, Jin D. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on the development of porcine parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Nature Science* Vol.5, No.7A, 31-37 (2013) <http://dx.doi.org/10.4236/ns.2013.57A005>.

Ding X, Wang Y, Zhang D, Wang Y, Guo Z, Zhang Y. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 2008, vol. 70, no. 4, pp. 622–630.

Donninger H, Hobbing K, Schmidt ML, Walters E, Rund L, Schook L, Clark GJ. A porcine model system of BRCA1 driven breast cancer. *Front Genet.* 2015 Aug 25;6:269. doi: 10.3389/fgene.2015.00269. eCollection 2015. PubMed PMID: 26379698; PubMed Central PMCID: PMC4548227.

Eckardt S, McLaughlin KJ. Interpretation of reprogramming to predict the success of somatic cell cloning. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82:97–108.

Ehrlich M. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res* 1982, 10:2709–2721.

Enright BP, Kubota C, Yang X, and Tian X C. “Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine”. *Biology of Reproduction* 2003, vol. 69, no. 3, pp. 896–901.

Enright BP, Sung LY, Chang CC, Yang X, Tian, XC. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biology of Reproduction* 2005, vol. 72, no. 4, pp. 944–948.

Forster R, Ancian P, Fredholm M, Simianer H, Whitelaw B. The minipig as a platform for new technologies in toxicology. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010, 62:227–235.

Galli C, Lagutina I, Crotti G, y col., A cloned horse born to its dam twin. *Nature*. 2003; 424:635.

Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, et al. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp Neurol*. 1996; 140: 1–13.

Gambini A, De Stefano A, Bevacqua RJ, Karlanian F, Salamone DF. The aggregation of four reconstructed zygotes is the limit to improve the developmental competence of cloned equine embryos. *PLoS One*. 2014 Nov 14;9(11):e110998. doi: 10.1371/journal.pone.0110998. eCollection 2014. PubMed PMID: 25396418; PubMed Central PMCID: PMC4232247.

Gambini A, Jarazo J, Olivera R, Salamone DF. Equine cloning: *in vitro* and *in vivo* development of aggregated embryos. *Biol Reprod*. 2012; 87:15:1-9.

Gao Y, Jammes H, Rasmussen MA, Oestrup O, Beaujean N, Hall V, et al. Epigenetic regulation of gene expression in porcine epiblast, hypoblast, trophoctoderm and epiblastderived neural progenitor cells. *Epigenetics* 2011, 6 (9): 1149-61.

Ge L, Xiong F, Zhang W, Kong Y, Wu J, Wei H. In vitro Ad5F35-mediated CTLA4-Ig gene transfer prolongs pig skin xenotransplant survival. *Transplant Proc*. 2010 Nov;42(9):3763-6. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.09.011. PubMed PMID: 21094853.

Golding MC, Williamson GL, Stroud TK., Westhusin ME, Long CR. Examination of DNA Methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Mol Reprod Dev* 2011 78 (5): 306–317.

Goll M G and Bestor T H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 2005, vol. 74, pp. 481– 514.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12. Review. PubMed PMID: 9721092.

Guillomot M, Turbe A, Hue I, Renard JP. Staging of ovine embryos and expression of the T-box genes Brachyury and Eomesodermin around gastrulation. *Reproduction*. 2004 Apr;127(4):491-501. PubMed PMID: 15047940.

Gurdon JB, Solman A. The future of cloning. *Nature* 1999;402:743–6.

Haaf T. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implication of genome reprogramming defects for development. *Curr Microbiol Immunol* 2006; 310: 13-22.

Haimovich G, Medina DA, Causse SZ, Garber M, Millán-Zambrano G, 465 Barkai O, et al. Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell* 2013, 153 (5): 1000-11.

Han H, Cortez CC, Yang X, Nichols PW, Jones PA, Liang G. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet*. 2011 Nov 15;20(22):4299-310. doi: 10.1093/hmg/ddr356. Epub 2011 Aug 11. PubMed PMID: 21835883; PubMed Central PMCID: PMC3196883.

Han YM, Kang YK, Koo DB, Lee KK. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2003, Jan 1;59(1):33-44. Review. PubMed PMID: 12499016.

Han, Y.M., Kang, Y.K., Koo, D.B. and Lee, K.K. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2003, 59, 33-44. doi:10.1016/S0093-691X(02)01271-2

Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A, Prather RS. Apoptosis and In Vitro Development of Preimplantation Porcine Embryos Derived In Vitro or by Nuclear Transfer. *Biology of reproduction* 2003, 69, 501–507.

Hara H, Gridelli B, Lin YJ, Marcos A, Cooper DK. Liver xenografts for the treatment of acute liver failure: clinical and experimental experience and remaining immunologic barriers. *Liver Transpl* 2008, Apr;14(4):425-34. doi: 10.1002/lt.21476. Review. PubMed PMID: 18383106

Hardy K, Spanos S, Becker D, Iannelli P, Winston RM, Stark J. From cell death to embryo arrest: mathematical models of human preimplantation embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):1655-60. PubMed PMID: 11172006; PubMed Central PMCID: PMC29312.

Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol* 2002, 172(2): 221–36.

Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol. Hum. Reprod*. 1997; 3:919–925.

Harris D, B Huang and B Oback. Inhibition of MAP2K and GSK3 signaling promotes bovine blastocyst development and epiblast-associated expression of pluripotency factors. *Biol Reprod* 2013, 88:74.

Heintzman, ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet* 2007, 39, 311–318.

Henricks D M, Guthrie H D, Handlin D L. Plasma estrogen, progesterone and luteinized hormone levels during the estrous cycle in pigs. *Biol Reprod* 1972, 6, 210–18.

Herlofsen SR, Bryne JC, Høiby T, Wang L, Issner R, Zhang X, Coyne MJ, Boyle P, Gu H, Meza-Zepeda LA, Collas P, Mikkelsen TS, Brinchmann JE. Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* 2013, Feb 15;14:105. doi: 10.1186/1471-2164-14-105. PubMed PMID: 23414147; PubMed Central PMCID: PMC3620534.

Hill JR, Schlafer DH, Fisher PJ, Davies SJ. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol Reprod* 2002;67:33–63.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999; 52: 683–700.

Howard P K, Chakraborty P K, Camp J C, Stuart L D, Wildt D E. Correlates of ovarian morphology, estrous behaviour, and cyclicity in an inbred strain of miniature swine. *Anat Rec* 1982, 203, 55–65

Howlett SK, Reik W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* 1991, Sep;113(1):119-27. PubMed PMID: 1764989.

Huan YJ, Zhu J, Xie BT, Wang JY, Liu SC, Zhou Y, Kong QR, He HB, Liu ZH. Treating cloned embryos, but not donor cells, with 5-aza-2'-deoxycytidine enhances the developmental competence of porcine cloned embryos. *J Reprod Dev.* 2013 Oct;59(5):442-9. Epub 2013 Jun 10. PubMed PMID: 23748715; PubMed Central PMCID: PMC3934119.

Huang B, Li T, Alonso-Gonzalez L, Gorre R, Keatley S, Green A, Turner P, Kallingappa PK, Verma V, Oback B. A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition. *PLoS One.* 2011, 6(9):e24501. doi: 10.1371/journal.pone.0024501. Epub 2011 Sep 2. PubMed PMID: 21912700; PubMed Central PMCID: PMC3166309.

Hyun S, Lee G, Kim D, Kim H, Lee S, Nam D, et al. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod* 2003, 69 (3): 1060-8.

Iager AE, Ragina NP, Ross PJ, et al. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning and Stem Cells* 2008, vol. 10, no.3, pp. 371–379.

Jensen P. *The Journal of Experimental Biology* 2015, 218, 32-40 doi:10.1242/jeb.106799

Jeong YI, Park CH, Kim HS, Jeong YW, Lee JY, Park SW, et al. Effects of Trichostatin A on In vitro Development of Porcine Embryos Derived from Somatic Cell Nuclear Transfer. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2013, 1680–1688.

Jones PL, Wolffe AP. Relationships between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Semin Cancer Biol* 1999, 9 (5): 339-47.

Ju S, Rui R, Lu Q, Lin P, Guo H. Analysis of apoptosis and methyltransferase mRNA expression in porcine cloned embryos cultured in vitro. *J Assist Reprod Genet* 2010, 27 (1): 49-59.

Kamjoo M, Brison DR, Kimber SJ. Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and *in vitro* culture. *Mol Reprod Dev* 2002, 61 (1):67–77.

Kang, YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK and Han YM. Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276, 39980-39984. doi:10.1074/jbc.M106516200.

Kang YK, Park JS, Koo DB, Shoi YH, Kim SU, Lee KK, et al. Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine preimplantation embryos. *EMBO J* 2002, 21:1092–100.

Kang JD, Li S, Lu Y, Wang W, Liang S, Liu X, Jin JX, Hong Y, Yan CG, Yin XJ. Valproic acid improved in vitro development of pig cloning embryos but did not improve survival of cloned pigs to adulthood. *Theriogenology* 2013, Jan 15;79(2):306-11.e1. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.08.021. Epub 2012 Nov 8. PubMed PMID: 23140802.

Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998, 282:2095–2098.

Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2008, 27:253–61. [PubMed: 18330678]

Kim E, Zheng Z, Jeon Y, Jin YX, Hwang SU, Cai L, Lee CK, Kim NH, Hyun SH. An Improved System for Generation of Diploid Cloned Porcine Embryos Using Induced Pluripotent Stem Cells Synchronized to Metaphase. *PLoS One*. 2016, Jul 29;11(7):e0160289. doi: 10.1371/journal.pone.0160289. eCollection 2016. PubMed PMID: 27472781.

Kim HJ, Bar-Sagi D. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:441–50. [PubMed: 15173823]

Kim YJ, Ahn KS, Kim M, Shim H et al. Comparison of potency between histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on enhancing in vitro development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011, 47:283–289.

Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, vol. 340, no. 1, pp. 183–189.

Klose R J., y Bird A P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006, 31, 89-97.

Kragh PM, Nielsen AL, Li J, Du Y, Lin L, Schmidt M, Bøgh IB, Holm IE, Jakobsen JE, Johansen MG, Purup S, Bolund L, Vajta G, Jørgensen AL. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. *Transgenic Res* 2009, Aug;18(4):545-58. doi: 10.1007/s11248-009-9245-4. Epub 2009 Jan 29. PubMed PMID: 19184503.

Kuijk EW, LT van Tol, H Van de Velde, R Wubbolts, M Welling, N Geijsen and BA Roelen. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the culture of bovine trophoblast stem-like cells using 2 inhibitors epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 2012, 139:871–882.

Kumar BM, Maeng GH, Lee YM, Lee JH, Jeon BG, Ock SA, Kang T, Rho GJ. Epigenetic modification of fetal fibroblasts improves developmental competency and gene expression in porcine cloned embryos. *Vet Res Commun.* 2013 Mar;37(1):19-28. doi: 10.1007/s11259-012-9542-x. Epub 2012 Oct 13. PubMed PMID: 23065456.

Kurosaka S, Eckardt S, Ealy AD, McLaughlin KJ. Regulation of blastocyst stage gene expression and outgrowth interferon tau activity of somatic cell clone aggregates. *Cloning and Stem Cells* 2007; 9:630–641.

Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol.* 1996, Dec;135(5):1195-205. PubMed PMID: 8947544; PubMed Central PMCID: PMC2121085.

Lager AE, Ragina NP, Cibelli JB et al Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells* 2008, 10:371–379

Laird CD, Pleasant ND, Clark AD, Sneed JL, Hassan KM, Manley NC, Vary JC Jr, Morgan T, Hansen RS, Stöger R. Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, Jan 6;101(1):204-9. Epub 2003 Dec 12. PubMed PMID: 14673087; PubMed Central PMCID: PMC314163.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev Genet.* 2003, 3:253-266.

Larsen J, Lane J, Mack-Shipman L. Pancreas and kidney transplantation. *Curr Diab Rep.* 2002, Aug;2(4):359-64. Review. PubMed PMID: 12643196.

Leboeuf R, Baumgartner JE, Benezra M, et al. BRAFV600E mutation is associated with preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase inhibition in thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93:2194–201. [PubMed: 18381570]

Lee SG, Park CH, Choi DH, Kim HS, Ka HH, Lee CK. *In vitro* development and cell allocation of porcine blastocysts derived by aggregation of *in vitro* fertilized embryos. *Mol Reprod Dev.* 2007, 74:1436–1445.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting 495 sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 1992, 27; 71 (5): 865-73.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992, 69, 915–926.

Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 2008, 135:1299–1310.

[b] Li J, Svarcova O, Villemoes K, Kragh PM, Schmidt M, Bogh IB, Zhang Y, Du Y, Lin L, Purup S, Xue Q, Bolund L, Yang H, Maddox-Hyttel P, Vajta G. High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology* 2008, 70: 800–8.

Lienert F, Wirbelauer C, Som I, Dean A, Mohn F, Schübeler D. Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nat Genet.* 2011, Oct 2;43(11):1091-7. doi: 10.1038/ng.946. PubMed PMID: 21964573.

Lindeman LC, Andersen IS, Reiner AH, Li N, Aanes H, Østrup O, Winata C, Mathavan S, Müller F, Aleström P, Collas P. Prepatterning of developmental gene expression by modified histones before zygotic genome activation. *Dev Cell.* 2011, Dec 13;21(6):993-1004. doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.008. Epub 2011 Dec 1. PubMed PMID: 22137762.

Lister R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009, 462, 315–322.

Liu T, Dou H, Xiang X, Li L, Li Y, Lin L, Pang X, Zhang Y, Chen Y, Luan J, Xu Y, Yang Z, Yang W, Liu H, Li F, Wang H, Yang H, Bolund L, Vajta G, Du Y. Factors Determining the Efficiency of Porcine Somatic Cell Nuclear Transfer: Data Analysis with Over 200,000 Reconstructed Embryos. *Cell Reprogram.* 2015, Dec;17(6):463-71. doi: 10.1089/cell.2015.0037. PubMed PMID: 26655078; PubMed Central PMCID: PMC4677548.

Liu LM, Liu Y, Gao F, Song GQ, Wen J, Guan JY, Yin YP, Ma X, Tang B, Li ZY. Embryonic Development and Gene Expression of Porcine SCNT Embryos Treated With Sodium Butyrate. *Journal of Experimental of Zoology Part B: Molecular and Development Evolution* 2012, 318, 224-234 doi:10.1002/jez.b.22440

Luo YL, Lin L, Bolund L, Jensen TG, Sorensen CB. Genetically modified pigs for biomedical research. *J Inherit Metab Dis* 2012, 35: 695–713.

Maalouf WE, Alberio R, Campbell K.HS. Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics* 2008, vol. 3, no. 4, pp. 199–209.

Martinez-Diaz MA, Che L, Albornoz M, et al. Pre-and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. *Cellular Reprogramming* 2010, vol. 12, no. 1, pp. 85–94.

McLean Z, Meng F, Henderson H, Turner P, Oback B. Increased MAP kinase inhibition enhances epiblast-specific gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod.* 2014, Aug;91(2):49. doi: 10.1095/biolreprod.114.120832. Epub 2014 Jul 9. PubMed PMID: 25009207.

Meng Q, Polgar Z, Liu J, Dinnyes A. Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin a treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos. *Cloning and Stem Cells* 2009, vol. 11, no. 1, pp. 203–208.

Mesa-Cornejo VM, Barros-Núñez P, Medina-Lozano C. Methylation of DNA: a marker for the diagnosis and prognosis in cancer. *Gac Med Mex* 2006, Jan-Feb;142(1):81-2. Spanish. PubMed PMID: 16548299.

Meyer S, Temme C, and Wahle E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2004, 39, 197–216.

Misica-Turner PM, Oback FC, Eichenlaub M, Wells DN, Oback B. Aggregating embryonic but not somatic nuclear transfer embryos increases cloning efficiency in cattle. *Biol Reprod.* 2007, 76:268–278.

Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Akasaka E, Ozawa A, Yoshida M, Sato M Valproic acid enhances in vitro development and Oct-3/4 expression of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *Cellular Reprogramming* 2010, 12:67–74.

Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987, 99: 371–82.

Monteiro FM, Oliveira CS, Oliveira LZ, Saraiva NZ, Mercadante ME, Lopes FL, Arnold DR, Garcia JM. Chromatin modifying agents in the in vitro production of bovine embryos. *Vet Med Int.* 2010, Sep 29;2011. pii: 694817. doi: 10.4061/2011/694817. PubMed PMID: 20936105; PubMed Central PMCID: PMC2948908.

Moro LN, Jarazo J, Buemo C, Hiriart MI, Sestelo A, Salamone DF. Tiger, Bengal and Domestic Cat Embryos Produced by Homospecific and Interspecific Zona-Free Nuclear Transfer. *Reprod Domest Anim.* 2015, Oct;50(5):849-57. doi: 10.1111/rda.12593. Epub 2015 Aug 30. PubMed PMID: 26332056.

Morrison D. 14-3-3: modulators of signaling proteins? *Science* 1994, 266:56–7. PubMed: 7939645.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*. 1995, Mar 30;374(6521):416. PubMed PMID: 7700349.

Nagashima H, Matsunari H, Nakano K, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M. Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative medicine. *Reprod Domest Anim* 2012, 47(Suppl. 4) 120–6.

Nature Publishing Group. Relationship between different epigenomic marks: DNA accessibility and methylation, histone marks, and RNA. *Nature* 2015. Article number:14310(2015) doi:10.1038/nature14310

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell* 1998, 95:379–391.

Niemann H, Rath D. Progress in reproductive biotechnology in swine. *Theriogenology*. 2001, Nov 1;56(8):1291-304. Review. PubMed PMID: 11758883.

Nottle MB, Nagashima H, Verma PJ, Du ZT, Grupen CG, McIlfatrick SM, et al. Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In: Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, McGloughlin MM, editors. *Transgenic animals in agriculture*. New York: CABI Publishing 1999, p. 145–56.

Oback B, Wiersema AT, Gaynor P, Laible G, Tucker FC, Oliver JE, y col., Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* 2003, 5:3–12.

Oback B. Climbing mount efficiency—small steps, not giant leaps towards higher cloning success in farm animals. *Reprod Domest Anim*. 2008, 43:407–416.

Ogura A, Inoue K, Wakayama T et al. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc* 2013, 368:20110329

Okano M, Bell DW, Haber D A, and Li E. “DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development”. *Cell* 1999, vol. 99, no. 3, pp. 247–257.

Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000, 289:1188–90.

Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000, 10:473–8.

Park KW, Lai L, Cheong HT, Cabot R, Sun QY, Wu G, Rucker EB, Durtschi D, Bonk A, Samuel M, Rieke A, D'Á BN, Murphy CN, Carter DB, Prather RS. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. *Biol Reprod.* 2002, 66:1001–1005.

Park SK, Roh S, Park JI. A simplified one-step nuclear transfer procedure alters the gene expression patterns and developmental potential of cloned porcine embryos. *J Vet Sci* 2014, 15 (1): 73-80.

Parker R, Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell* 2007, 25 (5): 635-46.

Parker, R and Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Struct Mol Biol* 2004, 11:121–127.

Parvizi N, Elsaesser F, Smidt D, Ellendorff F. Plasma luteinizing hormone and progesterone in the adult female pig during the oestrus cycle, late pregnancy and lactation, and after ovariectomy and pentobarbitone treatment. *J Endocr* 1976, 69, 193–03.

Pauley KM, Eystathioy T, Jakymiw A, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK. Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO Rep* 2006, 7, 904–910.

Pedersen HG, Schmidt M, Sangild PT, Strobecch L, Vajta G, Callesen H, Greve T. Clinical experience with embryos produced by handmade cloning: work in progress. *Mol Cell Endocrinol.* 2005, 234:137–143.

Phillips-Eakley AK, McKenney-Drake ML, Bahls M, Newcomer SC, Radcliffe JS, Wastney ME, Van Alstine WG, Jackson G, Alloosh M, Martin BR, Sturek M, Weaver CM. Effect of High-Calcium Diet on Coronary Artery Disease in Ossabaw Miniature Swine With Metabolic Syndrome. *J Am Heart Assoc* 2015, Aug 13;4(8):e001620. doi: 10.1161/JAHA.114.001620. PubMed PMID: 26272654; PubMed Central PMCID: PMC4599451.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000, 407:86–90.

Polge C. The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. *Ciba Found Symp* 1977, Jan 18-20;(52):3-18. PubMed PMID: 244400.

Prather RS, Kühholzer B, Lai L, Park KW. Changes in the structure of nuclei after transfer to oocytes. *Cloning* 2000, 2(3):117-22. Review. PubMed PMID: 16218847.

Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989, 41:414–8

Pratilas CA, Hanrahan AJ, Halilovic E, et al. Genetic predictors of MEK dependence in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008, 68:9375–83. PubMed: 19010912.

Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:4519–24. PubMed: 19251651.

Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res.* 2010, Jul 1;16(13):3329-34. doi: 10.1158/1078-

0432.CCR-09-3064. Epub 2010 May 14. Review. PubMed PMID: 20472680; PubMed Central PMCID: PMC2912210.

Pratt SL, Sherrer ES, Reeves DE, Stice SL. Factors influencing the commercialisation of cloning in the pork industry. *J Reprod Fertil Suppl* 2006, 62:303–15.

Prodöhl PA, Loughry WJ, McDonough CM, Nelson WS, Avise JC. Molecular documentation of polyembryony and the micro-spatial dispersion of clonal sibships in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Proc Biol Sci*. 1996, Dec 22;263(1377):1643-9. PubMed PMID: 9025312.

Qiu J. Epigenetics: unfinished symphony. *Nature*. 2006, May 11;441(7090):143-5. PubMed PMID: 16688142.

Rada-Iglesias A, Wysocka J. Epigenomics of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells: insights into pluripotency and implications for disease. *Genome Med*. 2011, Jun 7;3(6):36. doi: 10.1186/gm252. PubMed PMID: 21658297; PubMed Central PMCID: PMC3218810.

Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ. Mouse models of cell death. *Nat Genet*. 2001, Jun;28(2):113-8. Review. PubMed PMID: 11381252.

Razin A, Shemer R. DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet* 1993, 4:1731–3.

Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology* 2003, vol. 59, no. 1, pp. 21–32.

Ribeiro E de S, Gerger RP, Ohlweiler LU, Ortigari I Jr, Mezzalira JC, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambrósio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by agregación or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem Cells* 2009, 11:377–386.

Ribeiro ES, Gerger RP, Ohlweiler LU, Ortigari I Jr, Mezzalira JC, Forell F, et al. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning and Stem Cells* 2009, 11: 377–386.

Richards EJ. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet* 2006, May;7(5):395-401. Review. PubMed PMID: 16534512.

Rideout W.M. 3rd, Eggan, K. and Jaenisch, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001, 293, 1093-1098. doi:10.1126/science.1063206.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Rev Genet.* 2005, 6:597-610.

Rybouchkin A, Kato Y, Tsunoda Y. Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol Reprod* 2006, 74:1083–9.

Salozhin SV, Prokhorchuk EB, Georgiev GP. Methylation of DNA of the Major Epigenetic Markers. *Boichemistry* 2005, 70:525-532.

Sanford J, Slark HJ, Shapman V, Rossant J. Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev* 1987, 1:1039–46.

Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current Biology* 2003, vol. 13, no. 13, pp. 1116–1121.

Seegmiller R E, Harris C, Luchtel DL, Juchau MR. Morphological differences elicited by two weak acids, retinoic and valproic in rat embryos grown in vitro. *Teratology* 1991, 43:133-150.

Shan ZY, Wu YS, Shen XH, Li X, Xue Y, Zheng Z, Wang ZD, Liu CJ, Sun RZ, Li ZY, Shen JL, Liu ZH, Lei L. Aggregation of pre-implantation embryos improves establishment of

parthenogenetic stem cells and expression of imprinted genes. *Dev Growth Differ* 2012, May;54(4):481-8. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01335.x.

Shi LH, Miao YL, Ouyang YC, Huang JC, Lei ZL, Yang JW, Han ZM, Song XF, Sun QY, Chen DY. Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit-rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit-human interspecies cloned embryos. *Dev Dyn* 2008, 237:640–8.

Shi W, Hoeflich A, Flaswinkel H, Stojkovic M, Wolf E, Zakhartchenko V. Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. *Biology of Reproduction* 2003, vol. 69, no. 1, pp. 301–309.

Siriboon C, Tu CF, Kere M, Liu MS, Chang HJ, et al. Production of viable cloned miniature pigs by aggregation of handmade cloned embryos at the 4-cell stage. *Reprod Fertil Dev* 2014, 26: 395–406.

Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013, Mar;14(3):204-20. doi: 10.1038/nrg3354. Epub 2013 Feb 12. Review. PubMed PMID: 23400093.

Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006, 439:358–62. [PubMed: 16273091]

Solter D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Annu Rev Genet* 1988, 22:127–46.

Sørensen AL, Jacobsen BM, Reiner AH, Andersen IS, Collas P. Promoter DNA methylation patterns of differentiated cells are largely programmed at the progenitor stage. *Mol Biol Cell.* 2010, Jun 15;21(12):2066-77. doi: 10.1091/mbc.E10-01-0018. Epub 2010 Apr 21. PubMed PMID: 20410135; PubMed Central PMCID: PMC2883950.

Stevens LC, Varnum DS, Eicher EM. Viable chimaeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos. *Nature*. 1977, 269:515–517.

Stevens LC. Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimaeric mouse. *Nature*. 1978, 276:266–267.

Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005, 132:2093-102.

Surani MA, Barton SC, Kaufman MH. Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilised embryos. *Nature*. 1977, 270:601–603.

Tamada H, Kikyo N. Nuclear reprogramming in mammalian somatic cell nuclear cloning. *Cytogenet Genome Res* 2004, 105: 285–291.

Tang PC, West JD. The effects of embryo stage and cell number on the composition of mouse aggregation chimaeras. *Zygote* 2000, 8: 235–243.

Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Trounson AO. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev*. 2003, 15(7-8):361-6. PubMed PMID: 14984692.

Terashita Y, Sugimura S, Kudo Y, Amano R, Hiradate Y, Sato E. Improving the quality of miniature pig somatic cell nuclear transfer blastocysts: aggregation of SCNT embryos at the four-cell stage. *Reprod Domest Anim*. 2011, 46:189–196.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*. 1972, 30:493–497.

Therrien M, Chang HC, Solomon NM, Karim FD, Wassarman DA, Rubin GM. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell* 1995, 83:879–88. [PubMed: 8521512]

Uchida N. Similarity and differences between the haemopoietic and brain stem cell system. *Symp Soc Exp Biol* 2001, (53):21-8. Review. PubMed PMID: 12063845.

Umeyama K, Watanabe M, Saito H, Kurome M, Tohi S, Matsunari H, Miki K, Nagashima H. Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res* 2009, Oct;18(5):697-706. doi: 10.1007/s11248-009-9262-3. Epub 2009 Apr 9. PubMed PMID: 19357985.

Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* 2000, Mar;55(3):256-64. PubMed PMID: 10657044.

Vajta G, Kragh PM, Mtango NR, Callesen H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod Fertil Dev* 2005, 17(1-2):97-112. PubMed PMID: 15745635.

Vajta G, Maddox-Hyttel P, Skou CT, Tecirlioglu RT, Peura TT, Lai L, Murphy CN, Prather RS, Kragh PM, Callesen H. Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2005, 17(8):791-7. PubMed PMID: 16476206.

Vajta G, Zhang Y, Machaty Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. *Reprod Fertil Dev* 2007, 19:403–23.

Vajta G, Korösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy ZP. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reprod Biomed Online* 2008, Jul;17(1):73-81. PubMed PMID: 18616894.

Viuff D, Palsgaard A, Rickords L, Lawson LG, Greve T, Schmidt M, Avery B, Hyttel P, Thomsen PD. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. *Mol Reprod Dev* 2002, 62(4):483-8. PubMed PMID: 12112581.

von Wilmowsky C, Stockmann P, Metzler P, Harsch IA, Amann K, Schlegel KA. Establishment of a streptozotocin-induced diabetic domestic pig model and a systematic evaluation of pathological changes in the hard and soft tissue over a 12-month period. *Clin Oral Implants Res* 2010, Jul;21(7):709-17. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01914.x. PubMed PMID: 20636725.

Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998, 394:369–374.

Wang W. A pilot trial with pig-to-man islet transplantation at the 3rd XiangYa Hospital of the Central South University in Changsha. *Xenotransplantation* 2007.

Wang Y, Su J, Wang L, Xu W, Quan F, Liu J, Zhang Y. The effects of 5-aza-2'- deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell Reprogram*. 2011, Aug;13(4):297-306. doi: 10.1089/cell.2010.0098. Epub 2011 Apr 12. PubMed PMID: 21486115; PubMed Central PMCID: PMC3146745.

Weber M. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet* 2007, 39, 457–466.

Wee G, Shim JJ, Koo DB, Chae JI, Lee KK. and Han YM. Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction* 2007, vol. 134, no. 6, pp. 781–787.

Whitworth K, Prather RS et al. Somatic cell nuclear transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol Reprod Dev* 2010, 77:1001–1015

Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986, 320:63–65.

William M, Rideout III, Eggan K, Jaenisch R et al. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001, 293:1093–1098

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997, 385:810–813.

Wilmut I, Beaujean N, De Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002, 419, 583- 587. doi:10.1038/nature01079

Wimmers K, Murani E, Ponsuksili S. Functional genomics and genetical genomics approaches towards elucidating networks of genes affecting meat performance in pigs. *Brief Funct Genomics* 2010, 9:251–258.

Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*. 2003, 301:1063.

Yamanaka, K., Sakatani, M., Kubota, K., Balboula, A.Z., Sawai, K. and Takahashi, M. Effects of down-regulating DNA methyltransferase 1 transcript by RNA interference on DNA methylation status of the satellite I region and in vitro development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Journal of Reproduction and Development* 2011, 57, 393-402. doi:10.1262/jrd.10-181A

Yamazaki Y, Fujita TC, Low EW, Alarcon VB, Yanagimachi R, Marikawa Y. Gradual methylation of the OCT4 promoter in cloned mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 2006, 73: 180-186.

Yan Z, Stewart ZA, Sinn PL, Olsen JC, Hu J, McCray PB Jr, Engelhardt JF. Ferret and pig models of cystic fibrosis: prospects and promise for gene therapy. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2015, Mar;26(1):38-49. doi: 10.1089/humc.2014.154. Epub 2015 Feb 12. Review. PubMed PMID: 25675143

Yang D, Wang CE, Zhao B, Li W, Ouyang Z, Liu Z, Yang H, Fan P, O'Neill A, Gu W, Yi H, Li S, Lai L, Li XJ. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Mol Genet* 2010, Oct 15;19(20):3983-94. doi: 10.1093/hmg/ddq313. Epub 2010 Jul 21. PubMed PMID: 20660116; PubMed Central PMCID: PMC2947404.

Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard PJ, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning, *Nature Genetics* 2007, vol. 39, no. 3, pp. 295–302.

Yao J, Huang J, Zhao J. Genome editing revolutionize the creation of genetically modified pigs for modeling human diseases. *Hum Genet* 2016, Jul 18. Review. PubMed PMID: 27432159.

Yeung K, Seitz T, Li S, et al. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 1999, 401:173–7. PubMed: 10490027.

Yoon SW, Park CH, Lee SG, Kim HM, Park JK, Uh KJ, et al. Anti-apoptotic effect of aggregation on preimplantation development of bovine in vitro fertilized embryos. *Reprod Fertil Dev* 2009, 21, 210–211.

Zaret, K.S., and Carroll, J.S. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* 2011, 25, 2227–2241.

Zhang Y, Li J, Villemoes K, Pedersen A M, Purup S and Vajta G. “An epigenetic modifier results in improved in vitro blastocyst production after somatic cell nuclear transfer”. *Cloning and Stem Cells*, 2007, vol. 9, no. 3, pp. 357–363.

Zhang W, Yi K, Yan H, Zhou X. Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2012, Jun, 132(3-4):115-22. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.008. Epub 2012 May 24. Review. PubMed PMID: 22698497.

Zhao J, Hao Y, Ross J W, et al, Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cellular Reprogramming* 2010, vol. 12, no. 1, pp. 75–83.

Zhao J, Ross J W, Hao Y, et al, Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 2009, vol. 81, no. 3, pp. 525–530.

Zhao Y, J Lin, L Wang, B Chen, C Zhou, T Chen, M Guo, S He, N Zhang, et al. Derivation and characterization of ovine embryonic stem-like cell lines in semidefined medium without feeder cells. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2011, 315:639–648.

Zhou W, Xiang T, Walker S, Abruzzese RV, Hwang E, Farrar V, Findeisen B, Sadeghieh S, Arenivas F, Chen SH, Polejaeva I. Aggregation of bovine cloned embryos at the four-cell stage stimulated gene expression and *in vitro* embryo development. *Mol Reprod Dev* 2008, 75:1281–1289.

Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 1999, 286:1741–4. PubMed: 10576742.

