

# ENUCLEAÇÃO DE OVÓCITOS MAMÍFEROS DESTINADOS À TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

MARCELO TIGRE MOURA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal.

<sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal.

---

## RESUMO

### ENUCLEAÇÃO DE OVÓCITOS MAMÍFEROS DESTINADOS À TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

A clonagem por Transferência Nuclear (TN) permite reprogramar células somáticas de mamíferos. Essa técnica é realizada pela remoção do DNA do ovócito e posterior introdução, neste mesmo ovócito, de um núcleo de uma célula doadora. Apesar das diversas aplicações em pesquisas científicas básicas e na pecuária, a TN permanece laboriosa e pouco eficiente. No processo de TN, a enucleação é uma etapa crítica e falhas na sua realização tornam inviável o posterior desenvolvimento embrionário. Em contrapartida, a remoção dos cromossomos do gameta diminui o volume da célula e reduz sua capacidade de desenvolvimento. Avanços nesta metodologia podem simplificar o processo de TN, aumentando a escala de produção de embriões. Recente pesquisa mostrou evidências de que a actinomicina D, um antibiótico conhecido como inibidor de transcrição e replicação de DNA, pode ser uma alternativa para enucleação convencional. No entanto, novos experimentos são necessários para comprovação desta hipótese.

**Termos para indexação:** Ovócito, Enucleação, Transferência Nuclear, Clonagem.

## ABSTRACT

### MAMMALIAN OOCYTE ENUCLEATION DESTINED FOR NUCLEAR TRANSFER

Cloning by Nuclear Transfer allows reprogramming of somatic cell in mammals. This technique is accomplished by oocyte's DNA removal and posterior introduction in this oocyte of a donor cell nucleus. Despite of its applications animal husbandry and general scientific research, NT remains laborious and with low efficiency. According to this technique, nucleation is a critical step, because failures may lead to impaired further embryonic

development. However, removal of the chromosomes reduces cell's volume and lowers the developmental capacity of the oocyte. Methodological advances in this technique may simplify the process and increase embryo production derived from NT. Recent research brought evidences that actinomycin D, an antibiotic known as a transcription and DNA replication inhibitor, may be an alternative to conventional enucleation. However, future experiments are necessary to test this hypothesis.

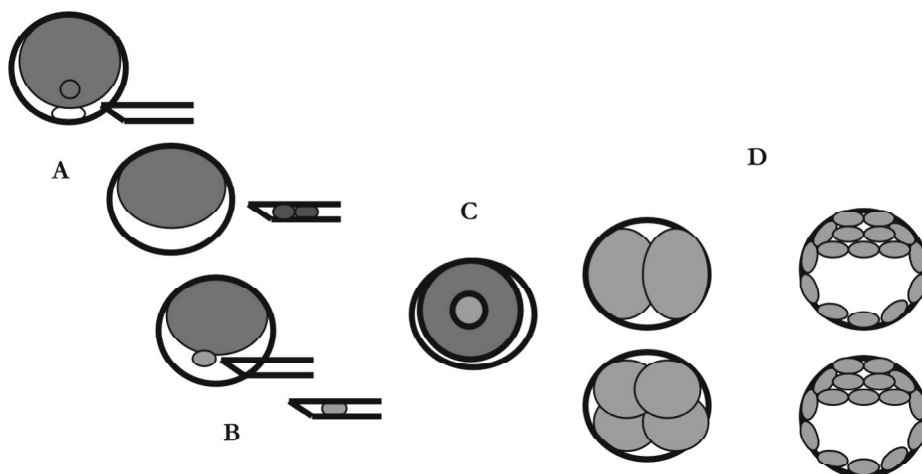
**Index terms:** oocyte, enucleation, nuclear transfer, cloning.

## 1. CLONAGEM POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR

A Transferência Nuclear (TN) permite introduzir o núcleo de uma célula no citoplasma de um ovócito enucleado (Figura 1). Esta introdução proporciona a reversão dos mecanismos que controlam o fenótipo celular, permitindo gerar células totipotentes, capazes de recapitular o desenvolvimento *in vivo* (Hochedlinger & Jaenisch, 2006; Wilmut *et al.*, 1997). Este processo tem sido denominado de reprogramação nuclear. O desenvolvimento desta técnica foi motivado para ser testada a hipótese de que todas as células do organismo apresentam a mesma quantidade de informação genética (Gurdon & Byrne, 2003). O nascimento de girinos obtidos a partir de células de blástulas comprovou esta teoria (Briggs & King, 1952).

A técnica de TN tem grande potencial por apresentar duas importantes propriedades: produzir animais a partir de uma única célula e promover a reversão global dos mecanismos epigenéticos. A partir destas particularidades, diversos autores utilizaram a TN, tomando neurônios sensitivos olfatórios para comprovar que a escolha dos seus receptores é regulada por mecanismos epigenéticos (Eggan *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004a). Concomitantemente, foi funcionalmente demonstrada a participação de tais alterações na determinação do melanoma (Hochedlinger *et al.*, 2004). A contribuição da aneuploidia na especialização dos neurônios pode também ser avaliada pela TN (Osada & Yagi, 2006). A clonagem tornou-se hoje uma importante ferramenta para distinguir mecanismos genéticos dos epigenéticos (Hochedlinger & Jaenisch, 2006) e a sua popularização está estreitamente relacionada ao aumento de sua eficiência.

Para conservação de recursos genéticos, a replicação de genótipos raros permitiria aumentar a chance de preservar raças (Wells *et al.*, 1998; Moura *et al.*, 2003) ou espécies (Loi *et al.*, 2001). Este fato reduziria a perda de alelos, embora haja muita controvérsia sobre a estratégia, inclusive dentro da comunidade científica (Holt *et*



**Figura 1.** — Transferência Nuclear em bovinos. A) Enucleação: remoção do DNA materno por micropipeta norteada pela presença do corpúsculo polar (CP). Identificação do DNA removido pela fluorescência azul causada pelo corante DNA específico Hoechst 33342 na presença da Ultravioleta (UV). B) Reconstrução: deposição de uma célula doadora no espaço perivitelino do ovócito. C) Eletrofusão e ativação: corrente elétrica para união da célula ao gameta enucleado e estímulo químico para induzir o desenvolvimento embrionário na ausência de espermatozóide, respectivamente. D) Cultivo in vitro por sete dias para obtenção de embriões na fase de blastocisto.

*al.*, 2004). A técnica também possibilita a replicação de genótipos de animais de alto mérito genético (Westhusin *et al.*, 2001), com maior resistência a doenças (Westhusin *et al.*, 2001), aumento da disseminação de alelos em diferentes condições de produção, e da confiabilidade dos testes de progênie (Bousquet & Blondin, 2004). Associada à transgênese (Kuroiwa *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2005), aumenta a eficiência de produção deste tipo de animal (Schnieke *et al.*, 1997; Brophy *et al.*, 2003; Kues & Niemann, 2004), permitindo produzir órgãos para xenotransplante (Phelps *et al.*, 2003), animais mais produtivos (Brophy *et al.*, 2003) e proteínas exógenas de interesse (Schnieke *et al.*, 1997; Kuroiwa *et al.*, 2002).

## 2. LIMITAÇÕES DA TN

A clonagem por TN permanece como uma técnica pouco eficiente, que se deve, principalmente, à incompleta reprogramação nuclear. Este aspecto seria a principal causa do baixo desenvolvimento in vivo (Jaenisch *et al.*, 2002). Existem vários indícios desta hipótese, como, por exemplo, a expressão gênica aberrante (Humpherys *et al.*,

2002; Moura *et al.*, 2006a, 2006b), alterações epigenéticas (Santos *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2002; Wee *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007) e problemas de placentação (Yang *et al.*, 2007).

Independentemente desses fatos, parte da baixa eficiência é devida a aspectos técnicos. A técnica de TN é laboriosa e a micro-manipulação é o principal fator responsável pela taxa de desenvolvimento *in vitro*, aferida pela produção de embriões (Jaenisch *et al.*, 2002). O grande entrave da micro-manipulação é limitar o número de ovócitos reconstruídos, dificultando a obtenção de material para estudos sobre a reprogramação nuclear e os embriões transferíveis para produção de clones. O seu aperfeiçoamento será obtido por meio da redução do tempo requerido e das agressões as quais as células são submetidas.

A enucleação, ou seja, a remoção do DNA do ovócito é fundamental para garantir o potencial de desenvolvimento do embrião produzido, pois células tetraplóides são normalmente eliminadas progressivamente na formação de quimeras (Eakin *et al.*, 2005). Estas células se concentram em anexos placentários (Nagy *et al.*, 1993), não havendo relatos replicáveis de nascimento de mamíferos exclusivamente tetraplóides (Eakin & Behringer, 2003). A enucleação é a etapa da TN mais invasiva e agressiva aos ovócitos, causando danos aos mesmos, diminuindo seu volume e reduzindo a qualidade dos embriões (Zakhartchenko *et al.*, 1997; Westhusin *et al.*, 1996). Foi descrito na literatura que a enucleação remove proteínas importantes do fuso e causa aneuploidia nos embriões (Simerly *et al.*, 2003). Por isso, muito esforço tem sido direcionado para seu aperfeiçoamento.

### 3. HISTÓRICO DA ENUCLEAÇÃO DE OVÓCITOS

O primeiro relato de enucleação de ovócitos foi em anfíbios, na metade do século XX (Briggs & King, 1952). O método de enucleação foi fundamentado num relato em bactérias, sendo, até hoje, a base da metodologia utilizada. Por meio do uso de micro-manipuladores acoplados a um sistema de seringas, foi realizada pelos referidos autores, a remoção do DNA materno, norteadas pela posição do pólo animal do ovócito. Posteriormente, uma célula de uma blástula era cuidadosamente removida do embrião doador de núcleos. Este tipo de célula apresentava maior diâmetro do que a pipeta e, após diversas passagens dentro da mesma, sua membrana era rompida e seu núcleo isolado. Em seguida, o núcleo era injetado no gameta enucleado. Não foi empregado nenhum método para confirmação da enucleação. Para estimar o

sucesso do método, os autores produziram paralelamente embriões androgenéticos, removendo o pró-núcleo feminino, e obtiveram uma estimativa de 94–99% de eficiência. Devido à ausência de confirmação da remoção de DNA, esta estratégia tem sido chamada de enucleação “cega” (Li *et al.*, 2004b).

Em meados da década de 70, foram produzidos os primeiros embriões por TN em mamíferos (Bromhall, 1975). Aparte dos avanços que permitiram manipular ovócitos muito menores que os anfíbios, o autor não descreveu um método apropriado de enucleação. Apesar disso, o autor confirmou a produção de alguns embriões diplóides, sugerindo uma “enucleação espontânea”. Os embriões se desenvolveram apenas até a fase de mórula, possivelmente devido à poliploidia. Em 1978, Modlinski descreveu o desenvolvimento de embriões novamente tetraplóides, após a injeção de células embrionárias em embriões de camundongos (Modlinski, 1978). Um fato comum dos relatos foi à baixa eficiência. Com efeito, Bromhall obteve apenas 25% de sucesso na reconstrução e 3% de clivagem, enquanto que apenas 9% dos zigotos utilizados por Modlinski sobreviveram à manipulação.

Durante o mesmo período, Hoppe & Illmensee (1977) relataram o nascimento de camundongos ginogenéticos e androgenéticos. Curiosamente, ao utilizar citocalasina B para bloquear a divisão mitótica nos embriões onde um pró-núcleo foi removido, os autores observaram aumento na sobrevivência dos ovócitos. A citocalasina é um potente inibidor da polimerização dos filamentos de actina e, com isso, desestabiliza o citoesqueleto da célula. A partir desse relato, o reagente tornou-se indispensável no processo de enucleação. Em 1981, os referidos autores, relataram agora o que seria o primeiro experimento em mamíferos, onde os ovócitos foram devidamente enucleados (Illmensee & Hoppe, 1981). No entanto, os resultados mostraram-se inconsistentes.

Apesar do esforço despendido para replicar os dados de Illmensee & Hoppe (1981), a estratégia de enucleação desenvolvida posteriormente seria utilizada como referência por muito tempo (McGrath & Solter, 1983; 1984). Neste caso, a enucleação era realizada pela remoção de um filamento de citoplasma, contendo os dois pró-núcleos. Em seguida, um blastômero era depositado no espaço perivitelino. Por meio de um vírus inativado, ocorria à fusão entre a célula embrionária e o ovócito enucleado. A grande virtude desta metodologia foi evitar ao máximo a remoção de citoplasma e o rompimento da membrana plasmática do gameta (Solter, 2000).

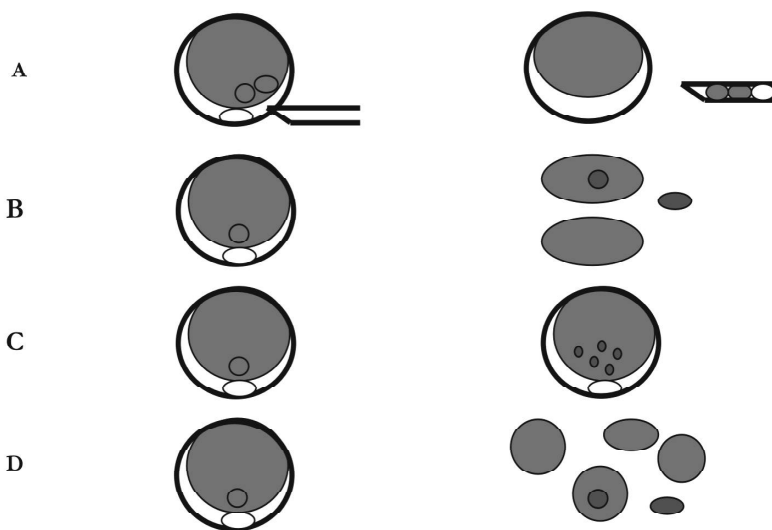
A ausência de um método para confirmação da enucleação permanecia, principalmente para animais de produção. Os ovócitos desses animais são escuros,

pela grande quantidade de lipídeos, aonde a enucleação é realizada, pela remoção do corpúsculo polar (CP) e parte do citoplasma adjacente. A quantidade de citoplasma removido é sempre variável, mas com um valor médio de 10–30%. Este parâmetro é importante, pois o volume final do ovócito é fundamental para sua capacidade de desenvolvimento. O método de desnudamento deve ser cuidadoso, para ser evitado o deslocamento do CP em relação à placa metafásica. Este deslocamento pode aumentar significativamente o volume do ovócito a ser removido (Li *et al.*, 2004b). O percentual de ovócitos com grande deslocamento do CP em relação à placa pode chegar a 60% (Mitalipov *et al.*, 1999). Outro fator importante é o período em que o ovócito é submetido ao procedimento. Apesar do envelhecimento do gameta permitir aumentar o percentual de ativação partenogenética, nesse momento, observa-se o deslocamento da placa metafásica (Nour & Takahashi, 1999), resultando em baixas taxas de enucleação (Prather *et al.*, 1987).

Smith & Wilmut (1989) pioneiramente utilizaram em ovinos a coloração com o corante DNA específico Hoechst 33342 e exposição à luz ultravioleta (UV) para confirmação da enucleação. Esta associação tornou os cromossomos fluorescentes, permitindo sua visualização. A biópsia obtida do ovócito deveria apresentar dois pontos visíveis contendo DNA: a placa metafásica e o CP. Apesar da importância do método, a utilização dessa metodologia é cercada de controvérsia. Alguns autores comprovaram seu efeito nocivo no desenvolvimento embrionário (Smith, 1993; Dominko *et al.*, 2000). Apesar disso, os nascimentos de animais clonados oriundos de ovócito expostos à UV demonstram que a prática não inviabiliza o citoplasma da célula. Mark Westhusin e colaboradores relataram que esse método não reduz as taxas de nascimento de clones com células embrionárias (Westhusin *et al.*, 1992)..

#### 4. ESTRATÉGIAS ALTERNATIVAS DE ENUCLEAÇÃO

Variações e novas metodologias têm sido desenvolvidas para simplificar a enucleação de ovócitos e evitar o uso do Hoechst 33342 e UV (Figura 2). Diferentes fluorocromos foram testados como alternativa, embora apenas a rhodamine tenha apresentado resultados satisfatórios (Dominko *et al.*, 2000). No entanto, por não ser capaz de penetrar à membrana do ovócito, esse corante deve ser injetado, aumentando o tempo requerido para cada ovócito, e necessitando-se perfurar a membrana plasmática. Outra alternativa é a utilização da microscopia Pol-Scope®, que permite visualizar a placa metafásica sem coloração, inclusive em ovócitos bovinos (Liu *et al.*, 2000). No entanto, o alto custo limita à aplicação (Fulka *et al.*, 2004).



**Figura 2.** — Métodos alternativos para enucleação de ovócitos. A) Telófase II: Ovócito pré-ativado apresenta os cromossomos próximos da membrana, facilitando a sua enucleação e reduzindo o volume de citoplasma removido. B) Bipartição: O gameta é dividido ao meio e exposto a UV para detecção da porção de citoplasma enucleado C) A exposição dos cromossomos do ovócito a UV ou Raio X causa fragmentação e inativação. D) Centrifugação: Ovócitos sem zona pelúcida são submetidos a ultracentrifugação e os fragmentos de citoplasma enucleados com diâmetro maior que 50µm são selecionados.

Bordignon & Smith (1998) demonstraram que os ovócitos pré-ativados em telófase II (TII) podem ser enucleados com uma redução mínima do citoplasma, devido à proximidade dos cromossomos à membrana plasmática. A produção de embriões foi semelhante ao controle, inclusive utilizando-se células somáticas como doadoras de núcleo (Bordignon *et al.*, 2003). A transição anáfase I – Telófase I (AI–TI) também pode ser utilizada com sucesso (Lee & Campbell, 2006). Apesar de não necessitar expor o ovócito a corantes e UV, o método não reduz o trabalho e tempo despendido ao processo.

A bipartição também permite enuclear ovócitos. Nesta estratégia, os ovócitos são seccionados ao meio e após a exposição à UV, as porções sem DNA são selecionadas. Este procedimento foi bastante aplicado durante o período de experimentos utilizando-se células embrionárias como doadoras (Willadsen, 1986; Westhusin *et al.*, 1992). Provavelmente esta redução drástica do volume citoplasmático era compensada pelo volume do blastômero, que recuperava o volume inicial da célula. Tal alternativa de enucleação permitiu o desenvolvimento da técnica de

handmade cloning, onde a TN foi realizada sem os equipamentos comumente usados, no caso, o microscópio invertido com micro-manipuladores acoplados (Vajta *et al.*, 2001). Na TN com células somáticas, duas porções são fusionadas a uma célula somática para obtenção de estruturas reconstruídas com volume compatível (Vajta *et al.*, 2001). Apesar das altas taxas de embriões obtidas, a quantidade inicial de ovócitos é reduzida pela metade. Além disso, sua aplicação tem sido pouco difundida, sendo cercada de ceticismo (Fulka *et al.*, 2004).

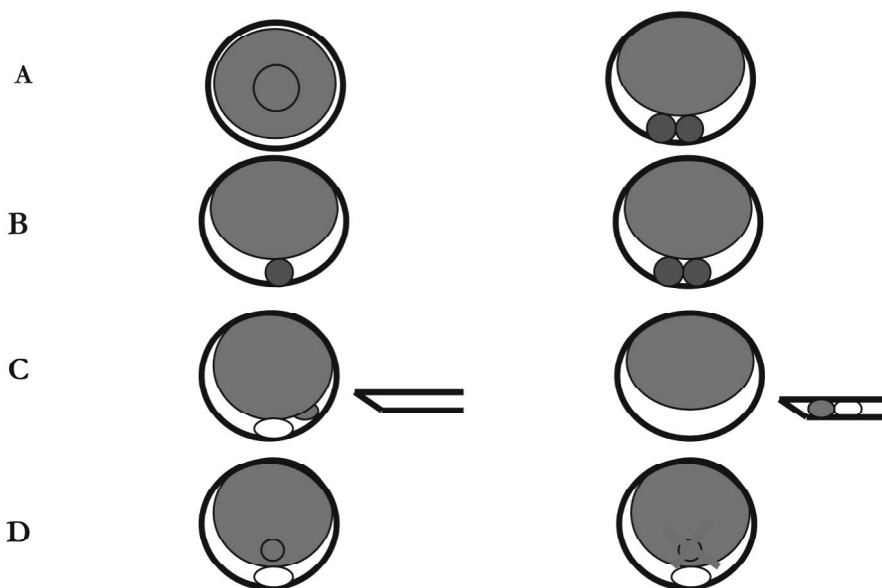
A exposição à UV por um período curto, mostrou-se capaz de proporcionar ovócitos bloqueados, incapazes de se desenvolverem (Wagoner *et al.*, 1996). O procedimento foi inicialmente descrito em anfíbios, fato que facilitou a manipulação, pois dissolvia uma membrana gelatinosa, comum em óvulos de *Xenopus* (Gurdon, 2006). No entanto, o método é bastante agressivo e pouco eficiente em mamíferos (Wagoner *et al.*, 1996; Bordignon & Smith, 1999). Uma alternativa demonstrada recentemente foi à aplicação da exposição dos ovócitos à radiação X, após a incubação, com ácido n-2-hidroxietilpiperazina-n-2-atanesulfanico, como método de inativação do DNA (Kim *et al.*, 2004). Com esta metodologia, foi obtida uma taxa semelhante de embriões em relação ao controle. Porém, não foi relatado nascimento de animais a partir da estratégia nem avaliações criteriosas do possível efeito da radiação no desenvolvimento embrionário.

Uma alternativa seria utilizar centrifugação diferencial. A técnica é muito utilizada para enuclear células somáticas, permitindo produzir populações bastante puras de citoplasma. Tatham e colaboradores fizeram o primeiro relato em ovócitos (Tatham *et al.*, 1995). Apesar de produzir gametas sem núcleo, o processo foi bastante agressivo, fragmentando os ovócitos e apresentando eficiência relativamente baixa. Além disso, é necessário remover a zona pelúcida, o que requer um cultivo diferencial, individual das estruturas (Vajta *et al.*, 2000). Recentemente, um grupo independente tentou repetir o resultado e, mais uma vez, foram obtidos índices baixos de enucleação (Savard *et al.*, 2004).

## 5. MÉTODOS DE ENUCLEAÇÃO QUÍMICA

Os métodos de enucleação química são considerados ideais, pois permitem a realização sem manipulação dos gametas (Fulka *et al.*, 2004). Com isso, seria possível a obtenção de uma população inicial grande de ovócitos para reconstrução. Alguns métodos que foram descritos são apresentados na Figura 3.





**Figura 3.** — Enucleação química de ovócitos. A) Etoposídeo: Ovócitos em vesícula germinativa são cultivados e ativados na sua presença deslocando os cromossomos para o segundo CP. B) Demecolcina: durante a ativação de ovócitos em metáfase II induz a retirada do DNA pelo segundo CP. C) Métodos assistidos de enucleação: A presença de demecolcina, sacarose ou nocodazole induz a formação de uma protusão na periferia do ovócito indicando a presença do DNA. D) Actinomicina D: Inibidor irreversível do DNA que quando usado na maturação dos ovócitos inibe a atividade posterior dos cromossomos presentes no gameta.

Fulka & Moor (1993) descreveram o primeiro método de enucleação química. Durante a maturação, os ovócitos foram expostos ao etoposídeo (potente inibidor das topoisomerases) e ativados na presença da combinação etoposídeo e ciclohexamida. Essa estratégia permitiu remover o DNA em 96% dos casos, pois todo o DNA concentrou-se no segundo CP. Apesar disso, o método se mostrou eficiente apenas para gametas em metáfase I (MI), apresentando resultados inconsistentes em ovócitos em metáfase II (MII) de camundongos e de bovinos (Fulka & Moor, 1993; Savard *et al.*, 2004). Existem outras desvantagens: a redução drástica da concentração intracelular do Fator promotor da metáfase (MPF), baixa capacidade de desenvolvimento e a possível reversibilidade do processo por meio da fusão espontânea do CP e do ovócito (Elsheikh *et al.*, 1997; Fulka *et al.*, 2004). Usando etoposídeo após a ativação com etanol, foi possível produzir um camundongo clonado a partir de células-tronco embrionárias (Gasparrini *et al.*, 2003).

Baguisi & Overström (2000) publicaram um novo método de enucleação química. Neste caso, foi utilizada a demecolcina que é um potente desestabilizador de microtúbulos, impedindo sua polimerização. Foi demonstrado que embriões reconstruídos com ovócitos enucleados pela demecolcina foram capazes de se desenvolverem a termo. Em contrapartida, poucos ovócitos foram devidamente enucleados e observou-se um efeito bastante significativo da linhagem de camundongo utilizada (Ibanez *et al.*, 2003). A exposição de ovócitos ovinos à demecolcina reduziu a taxa de extrusão do primeiro CP e apresentou eficiência modesta de enucleação (Hou *et al.*, 2006). Ao remover a demecolcina durante as últimas horas da maturação *in vitro*, foi possível melhorar a taxa de enucleação e recuperar o percentual de CP (Hou *et al.*, 2006).

## 6. MÉTODOS ASSISTIDOS DE ENUCLEAÇÃO

Embora tenha sido avaliada como método para enuclear ovócitos, a demecolcina tem sido mais comumente usada para potencializar o método por micro-manipulação. O seu uso causa a formação de uma protusão que contém o DNA na periferia do ovócito. Esse fato dispensa o uso de corantes e UV. Esse tipo de alternativa tem sido denominado de método assistido de enucleação. O tratamento dos ovócitos de coelhos com demecolcina antes ou depois da reconstrução simplificou o procedimento e não afetou o desenvolvimento embrionário intra e interespecífico (Yin *et al.*, 2002a, 2002b; Jiang *et al.*, 2004). A enucleação assistida após a reconstrução pode ser uma alternativa para impedir a redução dos níveis citoplasmáticos do MPF (Yin *et al.*, 2002b). Em bovinos, observou-se que apenas trinta minutos de exposição à demecolcina foi o suficiente para formação de protusões em 93% dos ovócitos (Tani *et al.*, 2006). Como fator importante, o tratamento aumentou a concentração celular de MPF e foi obtido um bezerro após a transferência de apenas quatro embriões.

Outro método assistido é fundamentado no uso da sacarose. Como a demecolcina, causa projeção citoplasmática no ovócito. Entre 75–86% dos ovócitos bovinos apresentaram a protusão e todas continham a placa metafásica (Liu *et al.*, 2002). Seu uso não afeta a capacidade de desenvolvimento dos ovócitos após a fecundação ou TN (Wang *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002). Em suínos foi relatado que ovócitos podem apresentar mais de uma projeção, dificultando a localização do material genético (Li *et al.*, 2004b). No entanto, o uso da combinação sacarose e demecolcina aumentou

significativamente a taxa de enucleação na espécie, havendo relato de nascimentos (Kawakami *et al.*, 2003).

O nocodazole é uma molécula que permite sincronizar células em metáfase. Sua utilização em ovócitos de ratos provavelmente foi destinada à inibição da retomada precoce da meiose (Hayes *et al.*, 2001). Curiosamente, o tratamento dos ovócitos com nocodazole demonstrou a mesma propriedade da sacarose e demecolcina que auxilia a enucleação (Hayes *et al.*, 2001; Kawakami *et al.*, 2003).

Uma alternativa promissora e ainda não investigada seria utilizar inibidores irreversíveis de transcrição ou replicação. Em princípio, a alternativa permitiria bloquear o DNA do ovócito (enucleação química) sem a necessidade de ativá-lo, não afetando, conseqüentemente, os níveis citoplasmáticos de MPF. Neste caso o DNA não seria removido da célula, mas permanecendo inativo dentro do citoplasma.

## 7. ENUCLEAÇÃO POR ACTINOMICINA D

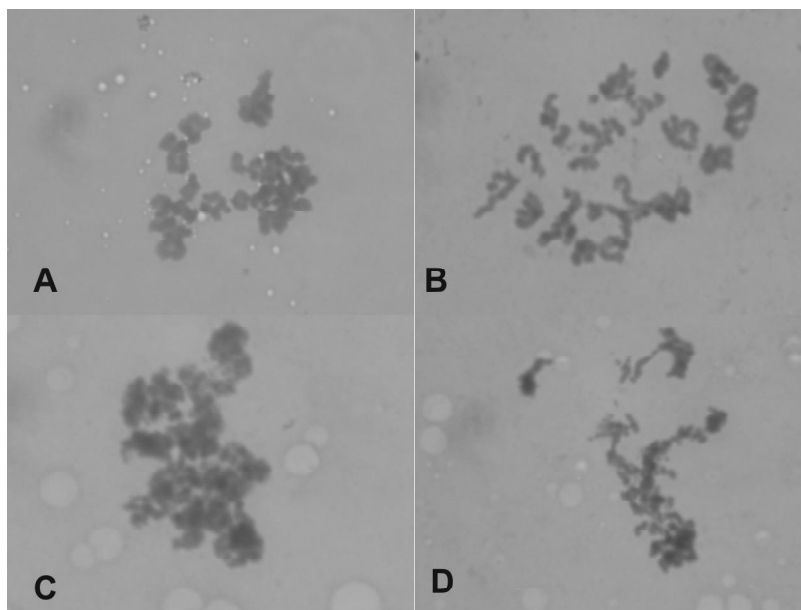
A actinomicina D também conhecida por actinomicina IV, dactinomicina e actinomicina C1 é um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces antibioticus* e reconhecido potente inibidor de transcrição e replicação (Bayona-Bafaluy *et al.*, 2003). Sua ação é primariamente mediada pela inibição da formação das forquilhas de transcrição e replicação dependentes das DNA e RNA polimerases, respectivamente (Sobell, 1985). A molécula liga-se a seqüências que apresentam guaninas, base pela qual o antibiótico tem alta afinidade. Doses equivalentes de Desamino-Actinomicina e N-p-Aminofenilaactinomicina, análogos que não se ligam ao DNA, não inibiram a transcrição (Goldberg *et al.*, 1962). Seqüências que não possuem guanina também não são afetadas pelo tratamento. A ligação da actinomicina D ao DNA é independente do estado transcricional da célula. Porém, genes que são altamente expressos (a exemplo dos responsáveis pela síntese de rRNA), mostraram-se particularmente susceptíveis à sua exposição (Sobell, 1985).

No primeiro relato de enucleação de células somáticas utilizou-se a actinomicina D associada à ementina, um inibidor ribossomal (Hikawa & Takenaka, 1996, 1997). Na ocasião, foi realizado um ensaio para determinação das menores concentrações de actinomicina D e ementina que, quando associadas, inibissem totalmente o potencial mitótico das células (Hikawa & Takenaka, 1996). Por meio desta metodologia foi possível estabelecer linhagens a partir de neurônios, utilizando-se uma pequena quantidade de células iniciais (Hikawa & Takenaka, 1996).

Posteriormente, a actinomicina D foi utilizada em estudo de interação núcleo-citoplasmática, para formar células híbridas, com mitocôndrias de duas origens e núcleo de apenas uma linhagem celular (Bayona-Bafaluy *et al.*, 2003). Esse estudo também avaliou diferentes concentrações por diferentes períodos de exposição. Posteriormente, foi utilizada uma concentração de  $0,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  por 15 horas. Através da análise de colônias de células sobreviventes, após o tratamento, foi estimada uma eficiência de 95%. Os autores concluíram que apenas esse tipo de associação (baixa concentração de actinomicina D por um longo período) permitiria alta eficiência de bloqueio associada a uma boa viabilidade citoplasmática (Bayona-Bafaluy *et al.*, 2003). Curiosamente, a replicação do DNA mitocondrial não foi afetada.

A actinomicina D é utilizada em ovócitos e embriões de diversas espécies como inibidor de transcrição (Sullivan *et al.*, 2004; Pivko *et al.*, 2002; Pang & Ge, 1999). Porém, existe grande diversidade de concentrações e períodos de tratamentos descritos na literatura. Muitos desses relatos não apresentaram dados de controle do tratamento (Pivko *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2004), dificultando a interpretação dos dados e a confiabilidade do bloqueio. Este fato é agravado pela ação seletiva do inibidor. Por isso, torna-se necessário estabelecer tratamentos confiáveis, avaliando-se funcionalmente sua ação, para aplicá-lo na enucleação de ovócitos.

Moura (2007), testou diferentes concentrações de actinomicina D, por dois períodos distintos, em ovócitos bovinos, durante a maturação *in vitro*. Curiosamente, o autor verificou que a actinomicina D afetou a porcentagem de estruturas em MII, apesar do tratamento ter ocorrido após o período em que as células do cumulus são fundamentais para maturação nuclear (Tatemoto & Terada, 1995; Kastrop *et al.*, 1991). O inibidor também alterou a morfologia dos cromossomos, como avaliado pela citogenética clássica (Figura 4). Células cultivadas com a actinomicina D freqüentemente apresentam alterações cromossômicas (Jagiello, 1969). Foi sugerido naquela ocasião que o efeito foi devido à ação da enzima topoisomerase I, que na presença de actinomicina D aumenta o número de ligações covalentes e clivagens do DNA, tornando-as irreversíveis (Trask & Muller, 1988). As topoisomerasas têm a função de clivar o DNA para permitir aliviar a tensão conformacional gerada pela descondensação do DNA. Mais importante, a adição da actinomicina D foi eficiente em bloquear o desenvolvimento embrionário, após a ativação partenogenética (Moura, 2007).



**Figura 4.** — A) Ovócito tratado com 1 $\mu$ g/ml de actinomicina D por 16 horas com cromossomos normais. B–C) Tratamento com 2,5  $\mu$ g/ml de actinomicina D por 14 horas causando moderada e intensa descondensação cromossômica, respectivamente. D) Ovócito tratado com 5,0  $\mu$ g/ml de actinomicina D por 14 horas apresentando severa descondensação e quebras cromossômicas.

Posteriormente ovócitos tratados com actinomicina D foram utilizados para TN com célula somática (Moura, 2007). Nessa pesquisa, a obtenção de blastocistos demonstrou que a introdução de um núcleo recuperava a capacidade de desenvolvimento do ovócito tratado. A incidência de apoptose nesses embriões foi avaliada por meio do teste de Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL). Apesar de induzir apoptose em células em proliferação (Fabian et al., 2003; Li et al., 2006), a actinomicina D não afetou o percentual de células apoptóticas em embriões reconstruídos com ovócitos tratados (Moura, 2007).

Tais resultados sugeriram que a actinomicina D possa se tornar uma alternativa à enucleação por micro-manipulação. No entanto, uma comparação direta entre as duas metodologias tornou-se necessária.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGUISI, A. & OVERSTROM, E.W. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 54: 209. 2000 (Resumo).

BAYONA-BAFALUY, M.P., MANFREDI, G. & MORAES, C.T. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. *Nucleic Acids Research* 31: e98. 2003.

BORDIGNON, V. & SMITH, L.C. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development* 49: 29–36. 1998.

BORDIGNON, V. & SMITH, L.C. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biology of Reproduction* 61: 1513–1520. 1999.

BORDIGNON, V., KEYSTON, R., LAZARIS, A., BILODEAU A.S., PONTES J.H., ARNOLD D., FECTEAU G., KEEFER C. & SMITH L.C. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells. *Biology of Reproduction* 68: 2013–2023. 2003.

BOUSQUET, D. & BLONDIN, P. Potential uses of cloning in breeding schemes: dairy cattle. *Cloning and Stem Cells* 6: 190–197. 2004.

BRIGGS, R. & KING, T.J. Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38: 455–463. 1952.

BROMHALL, J.D. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 258: 719–722. 1975.

BROPHY, B., SMOLENSKI, G., WHEELER, T., WELLS D., L'HUILLIER P. & LAIBLE G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nature Biotechnology* 2: 157–162. 2003.

DOMINKO, T., CHAN, A., SIMERLY, C., LUETJENS C.M., HEWITSON L., MARTINOVICH C. & SCHATTEN G. Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biology of Reproduction* 62: 150–154. 2000.

EAKIN, G.S. & BEHRINGER, R.R. Tetraploid development in the mouse. *Developmental Dynamics* 228: 751–766. 2003.

EAKIN, G.S., HADJANTONAKIS, A.K., PAPAIOANNOU, V.E. & BEHRINGER R.R. Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. *Developmental Biology* 288: 150–159. 2005.

EGGAN, K., BALDWIN, K., TACKETT, M., OSBORNE J., GOGOS J., CHESS A., AXEL R. & JAENISCH R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 428: 44–49. 2004.

ELSHEIKH, A.S., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M. & KANAGAWA H. Developmental ability of mouse late 2–cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes in vitro. *Journal of Veterinary Medical Science* 59: 107–113. 1997.

FABIAN, D., REHAK, P., CZIKKOVA, S., IL'KOVÁ G., BARAN V. & KOPPEL J. Induced cell death of preimplantation mouse embryos cultured in vitro evaluated by comet assay. *Theriogenology* 60: 691–706. 2003.

FULKA, J. JR. & MOOR, R.M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 34: 427–430. 1993.

FULKA, J. JR., LOI, P., FULKA, H., PTAK G. & NAGAI T. Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends in Biotechnology* 22: 279–283. 2004.

GASPARRINI, B., GAO, S., AINSLIE, A., FLETCHER J., MCGARRY M., RITCHIE W.A., SPRINGBETT A.J., OVERSTRÖM E.W., WILMUT I. & DE SOUSA P.A. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biology of Reproduction* 68: 1259–1266. 2003.

GOLDBERG, I.H., RABINOWITZ, M. & REICH, E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA–polymerase synthetic reactions by actinomycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48: 2094–2101. 1962.

GURDON, J.B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 1–22. 2006.

GURDON, J.B. & BYRNE, J.A. The first half–century of nuclear transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8048–8052. 2003.

HAYES, E., GALEA, S., VERKUYLEN, A., PERA, M., MORRISON, J., LACHAM-KAPLAN, O. & TROUNSON, A. Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. *Physiological Genomics* 5: 193–204. 2001.

HIKAWA, N. & TAKENAKA, T. Improved method for producing neuronal hybrids using emetine and actinomycin D. *Brain Research* 734: 345–348. 1996.

HIKAWA, N. & TAKENAKA, T. Method for production of neuronal hybridoma using emetine and actinomycin D. *Brain Research Protocols* 1: 224–226. 1997.

HOCHEDLINGER, K., BLELLOCH, R., BRENNAN, C., YAMADA Y., KIM M., CHIN L. & JAENISCH R. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes & Development* 18: 1875–1885. 2004.

HOCHEDLINGER, K. & JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441:1061–1067. 2006.

HOLT, W.V., PICKARD, A.R. & PRATHER, R.S. Wildlife conservation and reproductive cloning. *Reproduction* 127: 317–324. 2004.

HOPPE, P.C. & ILLMENSEE, K. Microsurgically produced homozygous–diploid uniparental mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5657–5661. 1977.

HOU, J., LEI, T., LIU, L., CUI, X., AN, X. & CHEN, Y. Demecolcine–induced enucleation of sheep meiotically maturing oocytes. *Reproduction Nutrition Development* 46: 219–226. 2006.

HUMPHERYS, D., EGGAN, K., AKUTSU, H., FRIEDMAN, A., HOCHEDLINGER, K., YANAGIMACHI, R., LANDER, E.S., GOLUB, T.R. & JAENISCH, R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 12889–12894. 2002.

IBANEZ, E., ALBERTINI, D.F. & OVERSTROM, E.W. Demecolcine–induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell–cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biology of Reproduction* 68: 1249–1258, 2003.

ILLMENSEE, K. & HOPPE, P.C. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23: 9–18. 1981.

JAENISCH, R., EGGAN, K., HUMPHERYS, D., RIDEOUT, W., & HOCHEDLINGER, K. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning and Stem Cells* 4: 389–396. 2002.

JAGIELLO, G.M. Meiosis and inhibition of ovulation in mouse eggs treated with actinomycin D. *Journal of Cell Biology* 42: 571–574. 1969.

JIANG, M.X., YANG, C.X., ZHANG, L.S., ZHENG, Y.L., LIU, S.Z., SUN, Q.Y. & CHEN, D.Y. The effects of chemical enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection on panda–rabbit interspecies nuclear transfer. *Zygote* 12: 315–320. 2004.



KASTROP, P.M., HULSHOF, S.C., BEVERS, M.M., DESTRÉE O.H. & KRUIP T.A. The effects of alpha-amanitin and cycloheximide on nuclear progression, protein synthesis, and phosphorylation during bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 249–254. 1991.

KAWAKAMI, M., TANI, T., YABUUCHI, A., KOBAYASHI T., MURAKAMI H., FUJIMURA T., KATO Y. & TSUNODA Y. Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning and Stem Cells* 5: 379–387. 2003.

KIM, T.M., HWANG, W.S., SHIN, J.H., PARK H.J., HAN J.Y. & LIM J.M. Development of a nonmechanical enucleation method using x-ray irradiation in somatic cell nuclear transfer. *Fertility and Sterility* 82: 963–965. 2004.

KUES, W.A. & NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. *Trends in Biotechnology* 22: 286–294. 2004.

KUROIWA, Y., KASINATHAN, P., CHOI, Y.J., NAEEM R., TOMIZUKA K., SULLIVAN E.J., KNOTT J.G., DUTEAU A., GOLDSBY R.A., OSBORNE B.A., ISHIDA I. & ROBL J.M. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nature Biotechnology* 20: 889–894. 2002.

KUROIWA, Y., KASINATHAN, P., MATSUSHITA, H., SATHIYASELAN J., SULLIVAN E.J., KAKITANI M., TOMIZUKA K., ISHIDA I. & ROBL J.M. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- $\mu$  and prion protein in cattle. *Nature Genetics* 36: 775–780. 2004.

LEE, J.H. & CAMPBELL, K.H. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 74: 691–698. 2006.

LI, J., ISHII, T., FEINSTEIN, P. & MOMBAERTS P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. *Nature* 428: 393–399. 2004a.

LI, G.P., WHITE, K.L. & BUNCH, T.D. Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning and Stem Cells* 6: 5–13. 2004b.

LI, W., CAI, S., CAI, L. & LI, X. Anti-apoptotic effect of hepatocyte growth factor from actinomycin D in hepatocyte-derived HL7702 cells is associated with activation of PI3K/Akt signaling. *Toxicology Letters* 165: 142–148. 2006.

LIU, L., OLDENBOURG, R., TRIMARCHI, J.R. & KEEFE D.L. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nature Biotechnology* 18: 223–225. 2000.

LIU, J.L., SUNG, L.Y., BARBER, M. & YANG X. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. *Biology of Reproduction* 66: 1342–1349. 2002.

LOI, P., PTAK, G., BARBONI, B., FULKA J. JR, CAPPAI P. & CLINTON M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross–species nuclear transfer using post–mortem somatic cells. *Nature Biotechnology* 19: 962–964. 2001.

MCGRATH, J. & SOLTER, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220: 1300–1302. 1983.

MCGRATH, J. & SOLTER, D. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226: 1317–1319. 1984.

MELO, E.O., SOUSA, R.V., IGUMA, L.T., FRANCO M.M., RECH E.L. & RUMPF R. Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos. *Genetics and Molecular Research* 4: 812–821. 2005.

MITALIPOV, S.M., WHITE, K.L., FARRAR, V.R., MORREY J. & REED W.A. Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1,4,5–trisphosphate. *Biology of Reproduction* 60: 821–827. 1999.

MODLINSKI, J.A. Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. *Nature* 273: 466–467. 1978.

MOURA, M.T., MELO, A.H., TEIXEIRA, Á.A.C. & TEIXEIRA, V.W. Uso de Diferentes métodos de coloração para a identificação de células epiteliais no sêmen bovino. Resumos, III Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife, PE. 2003.

MOURA, M.T., MUNDIM, T.C.D., SOUSA, R.V., FRANCO, M.M. & RUMPF, R. Expressão diferencial dos genes imprinted IGF2R e GRB10 em embriões clones bovinos produzidos por transferência nuclear. Resumos, 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu, PR., 2006a. p. 269.

MOURA, M.T., MUNDIM, T.C.D., DODE, M.A., FRANCO, M.M. & RUMPF, R. Análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em embriões clones e partenogênicos bovinos. Resumos, 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu, PR., 2006b. p. 270.

MOURA, M.T. Utilização da actinomicina D como método de enucleação química de ovócitos bovinos destinados à transferência nuclear. (Dissertação de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 2007.

NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW–NEWERLY W. & RODER J.C. Derivation of completely cell culture–derived mice from early–passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8424–8428. 1993.

NOUR, M.S. & TAKAHASHI, Y. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 51: 661–666. 1999.

OSADA, T. & YAGI, T. Neuronal genomics using mouse cloning with the single neuronal nucleus. *Current Genomics* 7: 217–225. 2006.

PANG, Y. & GE, W. Activin stimulation of zebrafish oocyte maturation in vitro and its potential role in mediating gonadotropin-induced oocyte maturation. *Biology of Reproduction* 61: 987–992. 1999.

PHELPS, C.J., KOIKE, C., VAUGHT, T.D., BOONE, J., WELLS, K.D., CHEN, S.H., BALL, S., SPECHT, S.M., POLEJAEVA, I.A., MONAHAN, J.A., JOBST, P.M., SHARMA, S.B., LAMBORN, A.E., GARST, A.S., MOORE, M., DEMETRIS, A.J., RUDERT, W.A., BOTTINO, R., BERTERA, S., TRUCCO, M., STARZL, T.E., DAI, Y. & AYARES, D.L. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299: 411–414. 2003.

PIVKO, J., GRAFANAU, P. & KUBOVICOVA, E. Bovine abnormal preimplantation embryos: analysis of segregated cells occurring in the subzonal space and/or blastocoele cavity for their nuclear morphology and persistence of RNA synthesis. *Zygote* 10: 141–147. 2002.

PRATHER, R.S., BARNES, F.L., SIMS, M.M., ROBL, J.M., EYESTONE, W.H. & FIRST, N.L. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biology of Reproduction* 37: 859–866. 1987.

SANTOS, F., ZAKHARTCHENKO, V., STOJKOVIC, M., PETERS, A., JENUWEIN, T., WOLF, E., REIK, W. & DEAN, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Current Biology* 13: 1116–1121. 2003.

SAVARD, C., NOVAK, S., SAINT-CYR, A., MOREAU, M., POTHIER, F. & SIRARD, M.A. Comparison of bulk enucleation methods for porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 67: 70–76. 2004.

SCHNIEKE, A.E., KIND, A.J., RITCHIE, W.A., MYCOCK, K., SCOTT, A.R., RITCHIE, M., WILMUT, I., COLMAN, A. & CAMPBELL, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278: 2130–2133. 1997.

SIMERLY, C., DOMINKO, T., NAVARA, C., PAYNE, C., CAPUANO, S., GOSMAN, G., CHONG, K.Y., TAKAHASHI, D., CHACE, C., COMPTON, D., HEWITSON, L. & SCHATTEN, G. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 300: 297. 2003.

SMITH, L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 99: 39–44. 1993.

SMITH, L.C. & WILMUT, I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biology of Reproduction* 40: 1027–1035. 1989.

SOBELL, H.M. Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 5328–5331. 1985.

SOLTER, D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nature Reviews Genetics* 1: 199–207. 2000.

SULLIVAN, E.J., KASINATHAN, S., KASINATHAN, P., ROBL, J.M. & COLLAS, P. Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. *Biology of Reproduction* 70: 146–153. 2004.

TANI, T., SHIMADA, H., KATO, Y. & TSUNODA, Y. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning and Stem Cells* 8: 61–66. 2006.

TATEMOTO, H. & TERADA, T. Time-dependent effects of cycloheximide and alpha-amanitin on meiotic resumption and progression in bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 43: 1107–1113. 1995.

TATHAM, B.G., DOWSING, A.T. & TROUNSON, A.O. Enucleation by centrifugation of in vitro-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 53: 1088–1094. 1995.

TRASK, D.K. & MULLER, M.T. Stabilization of type I topoisomerase–DNA covalent complexes by actinomycin D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 1417–1421. 1988.

VAJTA, G., PEURA, T.T., HOLM, P., PÁLDI, A., GREVE, T., TROUNSON, A.O., CALLESEN, H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Molecular Reproduction and Development* 55: 256–264, 2000.

VAJTA, G., LEWIS, I.M., HYTTTEL, P., THOUAS, G.A. & TROUNSON, A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning* 3: 89–95. 2001.

WAGONER, E.J., ROSENKRANS, C.F., JR., GLIEDT, D.W., PIERSON, J.N. & MUNYON, A.L. Functional enucleation of bovine oocytes: Effects of centrifugation and ultraviolet light. *Theriogenology* 46: 279–284. 1996.

WANG, M.K., LIU, J.L., LI, G.P., LIAN, L. & CHEN, D.Y. Sucrose pretreatment for enucleation: an efficient and non-damage method for removing the spindle of the mouse MII oocyte. *Molecular Reproduction and Development* 58: 432–436. 2001.

WEE, G., KOO, D.B., SONG, B.S., KIM, J.S., KANG, M.J., MOON, S.J., KANG, Y.K., LEE, K.K. & HAN, Y.M. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatin in cloned embryos. *Journal of Biological Chemistry* 281: 6048–6057. 2006.

WELLS, D.N., MISICA, P.M., TERVIT, H.R. & VIVANCO, W.H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reproduction, Fertility and Development* 10: 369–378. 1998.

WESTHUSIN, M.E., LEVANDUSKI, M.J., SCARBOROUGH, R., LOONEY, C.R. & BONDIOLI, K.R. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 475–480. 1992.

WESTHUSIN, M.E., COLLAS, P., MAREK, D., SULLIVAN, E., STEPP, P., PRYOR, J. & BARNES, F. Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by in vitro fertilization and nuclear transplantation. *Theriogenology* 46: 243–252. 1996.

WESTHUSIN, M.E., LONG, C.R., SHIN, T., HILL, J.R., LOONEY, C.R., PRYOR, J.H. & PIEDRAHITA, J.A. Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology* 55: 35–49. 2001.

WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 63–65. 1986.

WILMUT, I., SCHNIEKE, A.E., MCWHIR, J., KIND, A.J. & CAMPBELL, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810–813. 1997.

XUE, F., TIAN, X.C., DU, F., KUBOTA, C., TANEJA, M., DINNYES, A., DAI, Y., LEVINE, H., PEREIRA, L.V. & YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature Genetics* 31: 216–220. 2002.

YANG, X., SMITH, S.L., TIAN, X.C., LEWIN, H.A., RENARD, J.P. & WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genetics* 39: 295–302. 2007.

YIN, X.J., KATO, Y. & TSUNODA, Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. *Reproduction* 124: 41–47. 2002a.

YIN, X.J., KATO, Y. & TSUNODA, Y. Effect of delayed enucleation on the developmental potential of nuclear-transferred oocytes receiving adult and fetal fibroblast cells. *Zygote* 10: 217–222. 2002b.

ZAKHARTCHENKO, V., STOJKOVIC, M., BREM, G. & WOLF, E. Karyoplast-cytoplast volume ratio in bovine nuclear transfer embryos: effect on developmental potential. *Molecular Reproduction and Development* 48: 332–338. 1997.