

Sansiñena, Marina

Otras biotecnologías y su aplicación en el búfalo

Colaboración en la obra:

Reproducción en búfalas / Crudeli, Gustavo; Konrad, José Luis; Patiño, Exequiel María. Buenos Aires : Moglia Ediciones, 2016. ISBN: 978-987-619-264-4

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Sansiñena, M. Otras biotecnologías aplicadas al búfalo [en línea]. En: Reproducción en búfalas / Crudeli, Gustavo; Konrad, José Luis; Patiño, Exequiel María. Buenos Aires : Moglia Ediciones, 2016. ISBN 978-987-619-264-4
Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/greenstone/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=investigacion&d=otras-biotecnologias-aplicacion-bufalo> [Fecha de consulta: ...]

OTRAS BIOTECNOLOGÍAS Y SU APLICACIÓN EN EL BÚFALO

M. Sansinena^{1,2,*}

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, Cap. Gral. Ramón Freire 183, CABA 1426, Argentina;

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Godoy Cruz 2290, CABA 1425, Argentina;

*Correspondencia: msansinena@uca.edu.ar

En 1914, Hans Speaman demostró que el núcleo del embrión de salamandra tenía características pluripotenciales hasta el estado de desarrollo de 16 células (publicado Speaman, 1938). En este estudio clásico, el autor tomó un cabello de su hijo y lo utilizó para lograr una constricción en el cigoto recién fecundado de una salamandra. Mediante este simple mecanismo el investigador logró aislar el núcleo en un lado del embrión y observó que ese lado (con núcleo) continuaba con sus divisiones celulares hasta detenerse en las 16 células, mientras que el otro lado (sin núcleo) detenía su desarrollo. En este momento, Speaman permitió el paso de un único núcleo a la porción de citoplasma sin núcleo y utilizó la ligadura para seccionar el embrión totalmente. Esta nueva porción de embrión, ahora nuevamente con núcleo, procedió con su desarrollo normalmente hasta llegar al estado de larva.

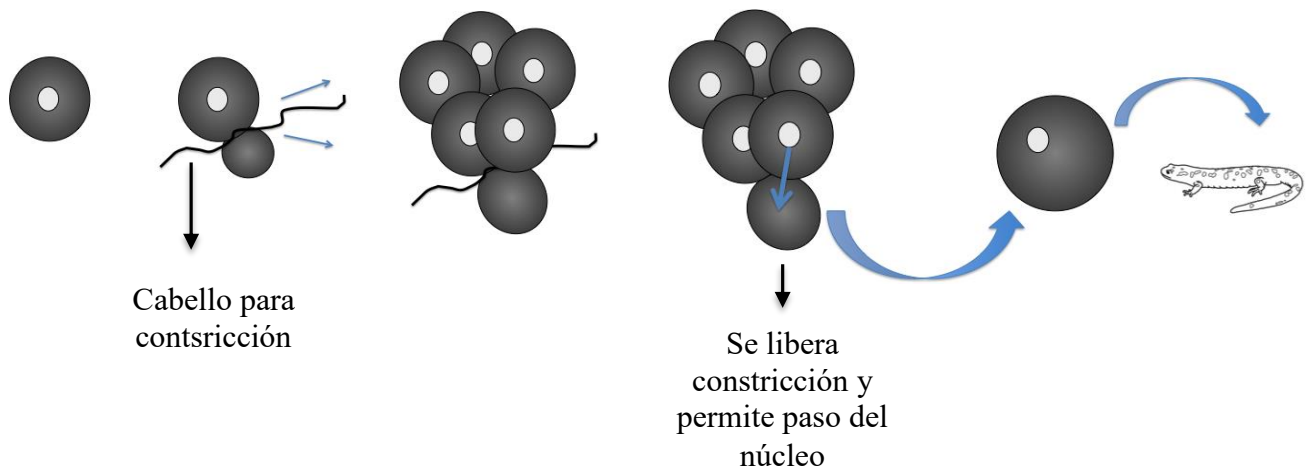


Figura 1. Experimento de Speaman, demostrando que el desarrollo del embrión se encuentra dominado por el núcleo. *Ilustración: M. Sansinena.*

Otros grupos continuaron con esta línea de investigación y demostraron que los núcleos de los anfibios tenían características de totipotencialidad cuando estos eran transferidos al citoplasma adecuado (Briggs y King, 1952; Gurdo, 1961 y 1962; McKinnell, 1962). Sin embargo, las observaciones coincidían en que si el núcleo

transferido correspondía a embriones con alto grado de desarrollo, entonces la probabilidad de éxito disminuía.

El primer reporte de transferencia nuclear con células de origen embrionario fue producido en ratones (Illmensee and Hope, 1981) mediante la inyección directa de células del macizo celular interno embrionario a cigotos cuyo núcleo había sido previamente eliminado (enucleados). Desafortunadamente, estos resultados no pudieron ser reproducidos inmediatamente por otros grupos. Luego de numerosos esfuerzos, Mac Grath y Solter (1983^a, b) concluyeron que en núcleo de células en estados avanzados de desarrollo se encontraban programadas o diferenciadas irreversiblemente y articularon la célebre frase “... *la clonación de mamíferos por transferencia nuclear es biológicamente imposible*”.

Es de destacar que la investigación en reproducción en especies domesticas siempre ha sido guiada por su valor económico. En este sentido, no es sorprendente que años más tarde, el primer reporte de clonación por transferencia nuclear o clonación, utilizando una célula embrionaria o blastómero como célula donante, haya ocurrido en ovejas (Willadsen 1981, 1986). Este gran logro científico fue replicado en un esfuerzo por clonar ganado vacuno y otras especies de interés agropecuario: oveja (Willadsen, 1986), vaca (Prather et al., 1987; Bondioli et al., 1990), conejo (Stice y Roble, 1988; Collas et al., 1992), cerdo (Prather et al., 1989), raton (Kono y Tsunoda, 1989), cabra (Young y Yuquiang, 1998) y mono (Meng et al., 1997).

El primer animal nacido por transferencia nuclear utilizando una célula de una línea celular cultivada in vitro fue informado por Campbell et al. en 1996. En este trabajo, células derivadas del disco embrionario de un embrión de oveja de 9 días fueron aisladas y cultivadas hasta desarrollar una línea celular de tipo epitelial (entre 6 y 13 repiques in vitro); estas células fueron utilizadas como célula donante en el experimento que culminó con un nacimiento. Este extraordinario trabajo tuvo gran impacto por tres motivos: a) contradujo el dogma de Mac Garth y Solter, demostrando que una célula diferenciada terminalmente SI podía ser reprogramada; b) demostró que las células en cultivo podían ser inducidas a acumularse en el estadio de G₀ o latencia y 3) abrió el camino para el nacimiento de Dolly, que se produciría un año después.

En 1997, el mundo fue sorprendido por el anuncio del nacimiento de Dolly, una oveja de raza Finn Dorset originada no de la fusión de un espermatozoide con un ovocito, sino de la transferencia nuclear o clonación a partir de una célula adulta completamente diferenciada (Wilmut et al., 1997). Este anuncio marcó de alguna manera el renacimiento de la clonación, esta vez con objetivo comercial ya que al utilizar una célula diferenciada de un animal adulto en lugar de un embrión, entonces se abría la posibilidad de clonar individuos cuya potencial genético hubiera sido evaluado y demostrado en su performance productiva.

Desde aquel anuncio de la oveja Dolly, al menos otras veinte especies han sido clonadas (Tabla 1):

Tabla 1. Especie, año y cita del primer reporte en la literatura científica de clonación en diferentes especies.

ESPECIE	AÑO*	CITA
Oveja	1997	<i>Wilmut et al.</i>
Mono	1997	<i>Meng et al.</i>
Conejo	1998	<i>Stice et al.</i>
Vaca	1998	<i>Kato et al.</i>
Ratón	1998	<i>Wakayama et al.</i>
Cerdo	1999	<i>Prather et al.</i>
Cabra	1999	<i>Baguisi et al.</i>
Gaur (interespecie)	2000	<i>Lanza et al.</i>
Gato	2002	<i>Shin et al.</i>
Mula	2003	<i>Woods et al.</i>
Caballo	2005	<i>Lagutina et al.</i>
Perro	2005	<i>Lee et al.</i>
Búfalo	2007	<i>Shin et al.</i>
Ciervo colorado	2007	<i>Berg et al.</i>
Lobo gris	2007	<i>Kim</i>
Muflón (interespecie)	2009	<i>Loi et al.</i>
Ibex (interespecie)	2009	<i>Folch et al.</i>
Camello	2010	<i>Wani et al.</i>
Rata	2012	<i>Renard et al.</i>
Coyote	2013	<i>Hwang et al.</i>
Ciervo cola blanca	2013	<i>Kraemer et al.</i>

*Correspondiente al año de publicación en revista científica; en algunos casos la difusión a los medios de prensa puede haber sido anterior.

La técnica de clonación consiste en la remoción del núcleo de un ovocito por micromanipulación ,seguido de la inyección de una única célula de aquel animal donante que se desea clonar. De esta manera, el nuevo núcleo de la célula donante es expuesto a factores de reprogramación presentes en el ooplasma, los cuales causan que aquella información genómica que fuera silenciada durante la diferenciación celular terminal sea nuevamente activada, resultando en re-inicio de desarrollo embrionario (Campbell, 1999). El equipamiento necesario para los procedimientos de clonación tiene como base aquel equipamiento necesario para un laboratorio de producción in vitro de embriones, a los cual se suma otro equipamiento de mayor complejidad:

- Microscopio invertido, con sistemas de micromanipulación y microinyección^a
- Lámpara de mercurio, para excitación de fluorocromos en el rango ultravioleta
- Sistema de electrofusión celular (electroprador)^b

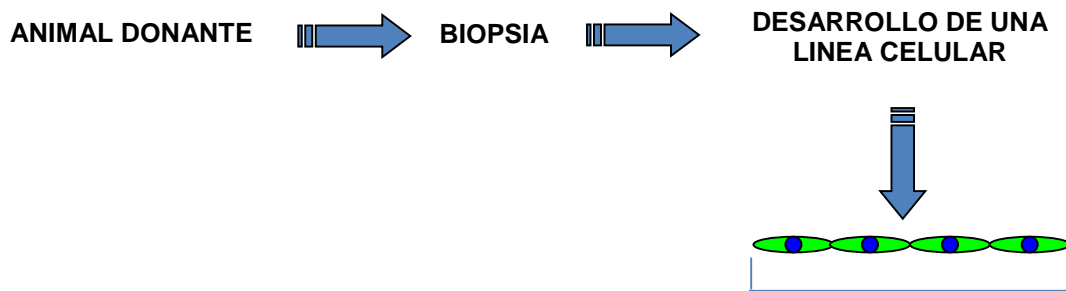


Si bien este equipamiento es el utilizado rutinariamente para el procedimiento de clonación, existen variantes como la denominada “hands-free cloning” que, con modificaciones de la técnica original, producen similares resultados sin la necesidad de utilizar un micromanipulador ni un microscopio de alta complejidad (Vajta et al., 2003).

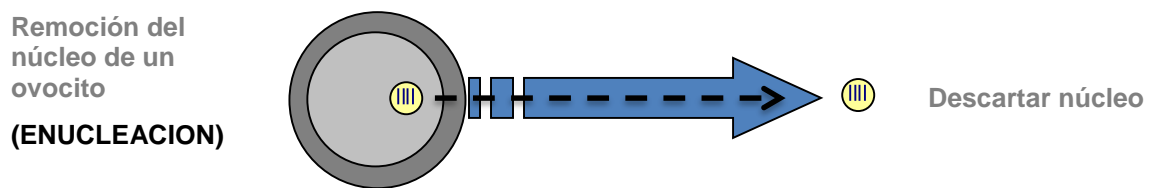
El proceso de clonación

El proceso de clonación consta de distintas etapas, de acuerdo a lo detallado a continuación. Estas etapas pueden tener algunas modificaciones, de acuerdo a los requerimientos específicos de la especie a clonar.

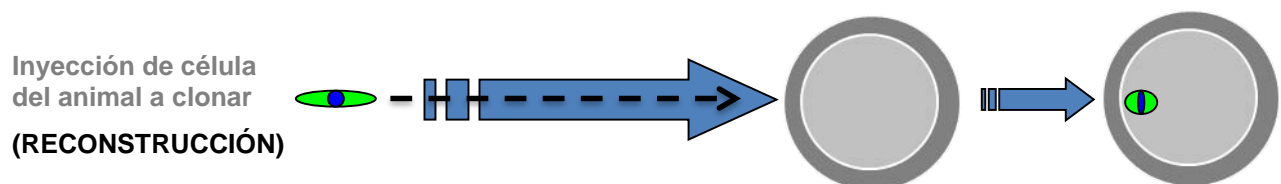
Paso 1: Obtención de muestra del animal a clonar, desarrollo de una línea celular. No es necesario que suceda el día de la clonación, la línea celular puede congelarse hasta su utilización.



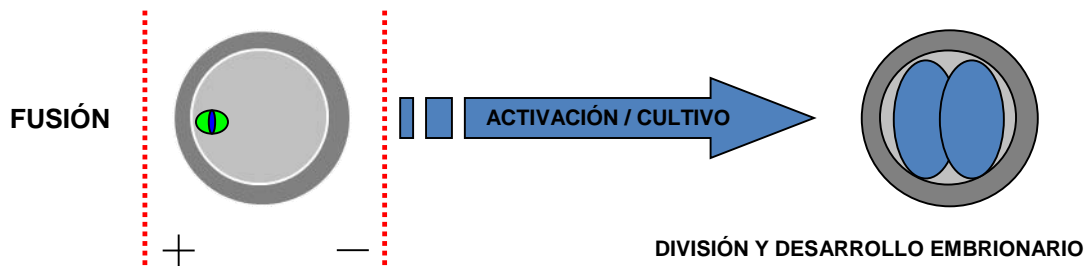
Paso 2: Por medio de micromanipulación, extraer el núcleo de un ovocito maduro



Paso 3: Por medio de micromanipulación, inyectar una célula donante dentro del ovocito enucleado previamente.



Paso 4: Electrofusión de célula donante, activación química, desarrollo embrionario y transferencia a receptora.



Factores que afectan la eficiencia de la clonación

a) *Enucleación y Reconstrucción*

El paso de la enucleación es crítico en la eficiencia del proceso. Debido a que los cromosomas de la mayoría de las especies domésticas (no primates o murinas) son indiscernibles con la mayoría de las técnicas de microscopía de campo claro o contraste de fase, la posición del corpúsculo polar es utilizada como un indicativo de la proximidad de los cromosomas del plato metafásico. Sin embargo, esto no es suficiente en el 100% de los casos ya que en ocasiones el primer corpúsculo polar y el plato metafásico se encuentran disociados. Por lo tanto, en clonación es práctica habitual la tinción del material nuclear previo a la enucleación con fluorocromos específicos para ADN (por ejemplo Hoechst 33342) seguido con iluminación con lámpara dentro del rango de emisión adecuado (generalmente ultravioleta), a fin de confirmar el éxito de la remoción del material nuclear.

La enucleación es efectuada mediante la utilización de pipetas de vidrio de borosilicato, cuya punta ha sido elongada y afilada con el objetivo de lograr la penetración a través de la zona pelucida del ovocito (Nour y Takahashi, 1999). Un método alternativo, inicialmente desarrollado para ratones, consiste en realizar un corte en la zona pelucida en la porción inmediatamente superior a la posición del primer corpúsculo polar utilizando un capilar filoso, y aplicar presión a fin de expulsar porción del ooplasma (Tsunoda et al, 1986). Mas recientemente, una técnica de “clonación manual” fue descrita por Vajta et al. (2003).

b) *Activación química*

Durante el proceso de fecundación, el espermatozoide libera una serie de señales de calcio intracelulares transitorias, con el objetivo de activar el ovocito sacándolo del arresto ovulatorio. El calcio es liberado en forma pulsátil de reservorios celulares como el retículo endoplasmático y la mitocondria (Yanagimachi, 1994); esta elevación en los niveles de Ca^{2+} puede durar varias horas (Carroll and Swann, 1992; Kline and Kline, 1992; Miyazaki et al., 1993). Son estas oscilaciones en el Ca^{2+} intracelular las responsables de la cascada de eventos subsiguientes, que incluyen la reacción de gránulos corticales (Miyazaki et al., 1990), la reacción de la zona pelucida

(Yanagimachi, 1994), y la salida del arresto en metafase II. (Whitaker and Irvine, 1984).

Es muy importante destacar que esta serie de eventos está ausente en el proceso de clonación ya que no existe penetración del ovocito por parte de un espermatozoide; es esta ausencia de señales inducidas por el espermatozoide las que deben ser replicadas mediante una activación artificial, a fin de lograr la reprogramación nuclear y el posterior desarrollo embrionario (Wells et al., 1999).

En clonación, los ovocitos enucleados que han sido inyectados con una célula del animal donante deben ser activados químicamente para continuar su desarrollo ya que el núcleo de una célula somática no posee la capacidad de iniciar la activación ovocitaria. Por lo tanto, numerosos protocolos de activación han sido reportados para el proceso de clonación, induciendo el fenómeno de partenogénesis. Estos incluyen utilización de etanol, electroporación, ionóforos de Ca, ionomicina o inositol (Presicce and Yang, 1994; Soloy et al., 1997; Liu et al., 1998; Mitalipov et al., 1999;). Este estímulo debe ser complementado con inhibidores de la síntesis proteica, a fin de evitar que el factor promotor de la meiosis presente en el ovocito no cause la recondensación prematura de cromosomas y el ingreso de la célula a lo que se conoce como metafase III. Estos inhibidores pueden ser de aquellos que causan una inhibición general y no-específica de la síntesis proteica (cicloheximidias) o de aquellos que producen una inhibición selectiva de la fosforilación (6-dimetilaminopurina o 6-DMAP) (Soloy et al., 1997; Liu et al., 1998).

c) *Ciclo celular de la célula donante*

Los estudios realizados para comprender el grado de sincronía necesaria entre la célula del animal donante y el ovocito enucleado fueron fundamentales en el éxito alcanzado por Cambell y su grupo. Sus estudios, orientados a entender los mecanismos de regulación del ciclo celular mostraron que utilizar células donantes en estado de latencia podía posibilitar la técnica de clonación (Wilmut et al., 1997). En la literatura científica, los estadios de G0 y G1 tienden a ser agrupados como G0/G1, aunque ambos estadios presentan diferencias. Las células en G0 son aquellas que abandonan el ciclo celular y entran en un estado de “latencia” que puede ser prolongado; por el contrario, las células en estado G1 se encuentran en un momento de transición proliferativo (no en latencia) entre las fases M y S del ciclo celular.

Estos estadios o momentos coexisten en un cultivo celular, aunque pueden ser forzados por agentes externos o condiciones de cultivo (deprivación deliberada de nutrientes en medio de cultivo celular, inducción de stress por inhibición de contacto, etc.). La gran mayoría de las células donantes utilizadas para clonación ha sido presumiblemente acumulada en estadio G0 en cultivo.

Clonación en el búfalo

La aplicación de la clonación al búfalo provee una alternativa a la preservación de genética de individuos mejoradores, así como propagación de los individuos de elite. Si bien la clonación *per se* no produce progreso genético (ya que básicamente consiste en repetir un animal de valor sin recombinación- elimina la variabilidad), permite en algunos casos acelerar del mejoramiento de un rodeo al posibilitar la introducción de clones reproductores de elite.

En el búfalo, la clonación puede asistir en preservar aquellos animales de valor y podría pavimentar el camino para la producción de individuos transgénicos para características deseadas en leche o carne, así como la generación de individuos con resistencia a enfermedades o incluso a la producción de biofármacos expresados en leche de búfalo.

Existen discrepancias sobre el primer informe de un búfalo clonado. Si bien existen algunos informes en la prensa general, el primer reporte en la literatura científica de un nacimiento vivo fue realizado por Shin et al. (2007). En este estudio, investigadores Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Guangxi (China) utilizaron fibroblastos derivados de tejido fetal y células de granulosa sincronizados en su ciclo celular con afidilcolina. El trabajo resultó en la producción de 42 embriones blastocitos transferidos a 21 receptoras sincronizadas. De dichas transferencias 4 receptoras resultaron preñadas y 3 terneros nacieron luego de 338-349 días de gestación. En un informe posterior, investigadores del Laboratorio de Biotecnología Embrionaria del Instituto de Investigaciones Lecheras de India, Shah et al. (2008) utilizaron la metodología sin micromanipuladores (hand-free) para producir blastocitos clonados a partir de células fibroblastos derivadas de una biopsia de oreja de búfalo. Hasta la fecha, este instituto ha informado a la prensa general el nacimiento de 7 búfalos clonados. Más recientemente en 2015, un animal nacido fue informado por Madheshiya et al. luego de clonación utilizando células somáticas aisladas de orina con la técnica hand-free cloning.

Transgénesis en el búfalo

Un animal clonado es un individuo idéntico al animal donante, y NO se trata de un organismo genéticamente. Por el contrario, un animal transgénico es aquel al cual se le ha incorporado un gen que no es propio de su genoma. Una variante de esto es un “knock-out”, un individuo genéticamente modificado por eliminación de un gen de su genoma. Para producir un individuo transgénico es habitual utilizar la clonación como herramienta o método para introducir el transgen. Utilizando esta estrategia, la línea celular (que se utiliza como donante para clonación) es previamente transfectada *in vitro* mediante técnicas de biología celular recombinante con aquel transgen de interés, en general acoplado a promotores apropiados que permiten la expresión del nuevo gen introducido en el órgano blanco deseado. Un ejemplo de esta metodología son los desarrollos de ambos farmacéuticos en otras especies (ovinos, caprinos, bovinos) en los cuales se ha logrado la expresión de transgenes de interés (por ejemplo, somatotropina, pro-insulina, factores VIII y IX, antitrombina, etc., Tabla 2), en órganos blancos deseados como la glándula mamaria o las glándulas salivales.

Tabla 2. Algunos ejemplos de desarrollo de biofármacos utilizando animales transgénicos.

	Cabra	Cabra	Cerdo	Conejo	Conejo	Vacuno
Proteína y nombre comercial	Antitrombina humana (ATryn)	Butilcolinestreas a humana (Protexia)	Factor de coagulación humano VIII (Elocate)	Fibrinógeno humano recombinante (rhFIB)	Inhibidor humano de las esterasas C1	Mielina humana
Aplicación terapéutica	Agente anticoagulante	Degrada agentes neurotóxicos derivados del gas sarín	Evita hemorragia en pacientes con hemofilia A	Anticoagulante, tratamiento de la afibrinogemia	Tratamiento de angioedema hereditaria	Alivio de síntomas de esclerosis múltiples
Empresa	rEVO Biologics, USA	PharmAthene, USA	Biogen, USA	Pharming Netherlands	Pharming Netherlands	AgResearch New Zealand
Estado de desarrollo	Aprobada para comercialización por Comisión Europea en 2006 y FDA en 2009	Fase I de ensayos clínicos	Fase III de ensayos clínicos	Fase III de ensayos clínicos	Aprobado para su comercialización en USA, Israel y 28 países de la CE.	Etapas de investigación y desarrollo

En el búfalo, esta metodología aún no se encuentra desarrollada, aunque algunos grupos están realizando avances y logrando resultados preliminares necesarios para la generación de un búfalo transgénico. Huang et al. (2009) reportó la producción de embriones de búfalo transgénicos para el gen “testigo” de Green fluorescence protein (GFP). Mas recientemente, el Laboratorio de Biotecnología Embrionaria en India (Ganguli et al., 2015) ha publicado resultados en el aislamiento y caracterización del promotor de β -caseína en el búfalo, lo cual permitirá el direccionamiento de la expresión génica de transgenes de interés hacia la glándula mamaria. Es probable que en el futuro y en la medida de que la tecnología sea más accesible, el búfalo sea un modelo de trabajo para la inserción o knock-out de genes que otorguen características de interés agropecuario como eficiencia de conversión de alimento, modificaciones en el perfil de composición de la leche o resistencia a enfermedades.

Referencias

- Baguisi, A., E. Behboodi, D. T. Melican, J. S. Pollock, M. M. Destrempe, C. Cammuso, J. L. Williams, S. D. Nims, C. A. Porter, P. Midura, M. J. Palacios, S. L. Ayres, R. S. Denniston, M. L. Hayes, C. Ziomek, H. M. Meade, R. A. Godke, W. G. Gavin, E. W. Overström, and Y. Echelard. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17:456-461.
- Barcroft, L. C., A. Hay-Schmidt, A. Caveney, E. Gilfoyle, E. W. Overström, P. Hyttel, and A. J. Watson. 1998. Trophectoderm differentiation in the bovine embryo: Characterization of a polarized epithelium. *J. Reprod. Fertil.* 114:327-339.
- Bethausen, J., E. J. Forsberg, M. Augenstein, K. Childs, K. J. Eilertsen, J. Enos, T. Forsythe, P. J. Golueke, G. Jurgella, R. Koppang, T. Lesmeister, K. Mallon, G. Mell, P. Misica, M. Pace, M. Pfister-Genskow, N. Strelchenko, G. Voelker, S. Watt, S. Thompson, and M. D. Bishop. 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat. Biotechnol.* 18:1055-1059.

- Berg, D.K., Li, C., Asher, G., Wells, D.N. and Oback, B., 2007. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biology of Reproduction*, 77(3), pp.384-394.
- Bondioli, K., M. E. Westhusin, and C. R. Looney. 1990. Production of identical twin offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33:165-174.
- Boquest, A. C., B. N. Day, and R. S. Prather. 1999. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol. Reprod.* 60:1013-1019.
- Briggs, R. and T. J. King. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 38:455-463.
- Bui, L. C., X. Vignon, E. Champion, E. Laloy, Y. Lavergne, L. V. Ty, B. X. Nguyen, and J. P. Renard. 2002. Use of interspecies nuclear transfer to study the early embryonic development and nuclear activities of the endangered species *pseudoryx nghetinhensis* (saola). *Theriogenology* 57:427. (Abstr.).
- Campbell, K. H. S. 1999. Nuclear transfer in farm animal species. *Sem. Cell Dev. Biol.* 10:245-252.
- Campbell, K. H. S., J. McWhir, W. A. Ritchie, and I. Wilmut. 1996b. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66.
- Carroll, J. and K. Swann. 1992. Spontaneous cyclic calcium oscillations driven by inositol triphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.* 267:11196-11201.
- Chesné, P., P. G. Adenot, C. Viglietta, M. Baratte, L. Boulanger, and J. P. Renard. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20:366-369.
- Cibelli, J. B., A. A. Kiessling, K. Cunniff, C. Richards, R. P. Lanza, and M. D. West. 2001. Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *J. Regen. Med.* 2:25-31.
- Cibelli, J. B., S. L. Stice, P. J. Golueke, J. J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, A. Ponce de León, and J. M. Robl. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258.
- Collas, P., C. Pinto-Correia, A. Ponce de León, and J. M. Robl. 1992a. Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transfer rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 46:501-511.
- Collas, P., E. J. Sullivan, and F. L. Barnes. 1993. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 34:224-231.
- Damiani, P., G. Wirtu, F. Miller, A. Cole, C. Pope, R. A. Godke, and B. L. Dresser. 2003. Development of giant eland (*Taurotragus oryx*) and bovine (*Bos taurus*) oocytes. *Theriogenology* 58:390. (Abstr.)

- Dominko, T., M. Mitalipova, B. Haley, Z. Beyhan, E. Memili, B. McKusick, and N. L. First. 1999a. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.* 60:1496-1502.
- Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J.I., Sánchez, P. and Echegoyen, E., 2009. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, 71(6): 1026-1034.
- Galli, C., I. Lagutina, G. Crotti, S. Colleoni, P. Turini, N. Ponderato, R. Duchi, and G. Lazzari. 2003. Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424:635.
- Ganguli N, Ganguli N, Usmani A, Majumdar SS. 2015. Isolation and functional characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) β -casein promoter for driving mammary epithelial cell-specific gene expression. *J. Biotechnol.* 198:53-59.
- Gibbons, J., S. Arat, J. Rzucidlo, K. Miyoshi, R. Waltenburg, D. Respass, A. Venable, and S. Stice. 2002. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol. Reprod.* 66:895-900.
- Gurdon, J. B. 1961. The transplantation of nuclei between two subspecies of *Xenopus laevis*. *Heredity* 16:305-315.
- Gurdon, J. B. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morph.* 10:622-640.
- Gurdon, J. B. and A. Colman. 1999. The future of cloning. *Nature* 402:743-746.
- Huang B, Cui K, Li T, Wang X, Lu F, Liu Q, da Silva FM, Shi D. 2010. Generation of buffalo (*Bubalus bubalis*) transgenic chimeric and nuclear transfer embryos using embryonic germ-like cells expressing enhanced green fluorescent protein. *Reprod. Dom. Anim.* 45(1):103-108.
- Hwang, I., Jeong, Y.W., Kim, J.J., Lee, H.J., Kang, M., Park, K.B., Park, J.H., Kim, Y.W., Kim, W.T., Shin, T. and Hyun, S.H., 2013. Successful cloning of coyotes through interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic dog oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(8): 1142-1148.
- Illmensee, K. and P. C. Hoppe. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23:9-18.
- Kato, Y., T. Tani, and Y. Tsunoda. 2000. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.* 120:231-237.
- Kato, Y., T. Tani, T. E. Spencer, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue, and Y. Tsunoda. 1998. Eight cloned calves from somatic cells of a single adult. *Science* 282:2095-2098.
- Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hwang, W.S., Hossein, M.S., Kim, J.J., Shin, N.S., Kang, S.K. and Lee, B.C., 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning and stem cells*, 9(1), pp.130-137.

- Kline, D. and J. T. Kline. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149:80-89.
- Kono, T. and Y. Tsunoda. 1989. Development of single blastomeres from four- and eight-cell mouse embryos fused into the enucleated half of a two-cell embryo. *Gamete Res.* 22:427-434.
- Kraemer, D. White-tailed deer joins the clone parade. <http://www.nbcnews.com/id/3785448/ns/health-cloning/>
- Kues, W. A., M. Anger, J. W. Carnwath, D. Paul, J. Motlik, and H. Niemann. 2000. Cell Cycle Synchronization of Porcine Fetal Fibroblasts: Effects of Serum Deprivation and Reversible Cell Cycle Inhibitors. *Biol. Reprod.* 62:412-419.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Colleoni, S., Ponderato, N., Turini, P., Crotti, G. and Galli, C., 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*, 130(4), pp.559-567.
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, and M. D. West. 1999a. Human therapeutic cloning. *Nature. Med.* 5:975-977.
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, and M. D. West. 1999b. Prospects for use of nuclear transfer in human transplantation. *Nat. Biotechnol.* 17:1171-1174.
- Lanza, R. P., J. B. Cibelli, F. Diaz, C. T. Moraes, P. W. Farin, C. E. Farin, C. J. Hammer, M. D. West, and P. Damiani. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2:79-90.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G. and Hwang, W.S., 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 436(7051), pp.641-641.
- Li, G., G. E. Seidel, and E. Squires. 2002. Interspecies cloning using fresh, stored and dead equine and bovine somatic cells as donor nuclei and bovine cytoplasts. *Theriogenology* 57:432. (Abstr.)
- Liu, L., J. C. Ju, and X. Yang. 1998. Parthenogenic development and protein patterns of newly matures bovine oocytes after chemical activation. *Mol. Reprod. Dev.* 49:298-307.
- Loi, P., G. Ptak, B. Barboni, J. Fulka, P. Cappai, and M. Clinton. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnol.* 19:962-964.
- Madheshiya PK, Sahare AA, Jyotsana B, Singh KP, Saini M, Raja AK, Kaith S, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS, Palta P. 2015. Production of a Cloned Buffalo (*Bubalus bubalis*) Calf from Somatic Cells Isolated from Urine. *Cell Reprogram* 17(3):160-169.
- McGrath, J. and D. Solter. 1983a. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development to term. *Science* 226:1317-1319.

- McGrath, J. and D. Solter. 1983b. Nuclear transplantation in the mouse embryo. *J. Exp. Zool.* 228:355-362.
- McGrath, J. and D. Solter. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37:179-183.
- McKinnell, R. G. 1962. Intraspecific nuclear transplantation in frogs. *J. Hered.* 53:199-207.
- Meng, L., J. Ely, R. L. Stouffer, and D. P. Wolf. 1997. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 57:454-459.
- Mitalipov, S., K. L. White, V. R. Farrar, J. Morrey, and W. A. Reed. 1999. Development of nuclear transfer and parthenogenic rabbit embryos activated with inositol 1,4,5 triphosphate. *Biol. Reprod.* 60:821-827.
- Miyazaki, S., H. Shirakawa, K. Nakada, and Y. Honda. 1993. Essential role of inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.* 158:62-78.
- Miyazaki, S., Y. Katayama, and K. Swann. 1990. Synergistic activation by serotonin and GTP analogue and inhibition by phorbol ester of cyclic Ca^{2+} rises in hamster eggs. *J. Physiol.* 426:209-227.
- Nour, M. S. and Y. Takahashi. 1999. Preparation of young preactivated oocytes with high enucleation efficiency for bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 51:661-666.
- Oback, B., A. T. Wiersema, P. Gaynor, G. Laible, F. C. Tucker, J. E. Oliver, A. L. Miller, H. E. Troskie, K. L. Wilson, J. T. Forsyth, M. C. Berg, K. Cockrem, L. N. Meerdo, H. R. Tervit, and D. N. Wells. 2003. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* 5:3-12.
- Polejaeva, I. A. 2001. Cloning pigs: Advances and applications. *Reprod. Suppl.* 58:293-300.
- Prather, R. S., F. L. Barnes, M. M. Sims, J. M. Robl, W. H. Eyestone, and N. L. First. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37:859-866.
- Prather, R. S., M. M. Sims, and N. L. First. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41:414-418.
- Presicce, G. A. and X. Yang. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 37:61-68.
- Ralph: the world's first cloned rat.
<http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/12949.aspx>
- Reggio, B. C., A. N. James, H. L. Green, W. G. Gavin, E. Behboodi, Y. Echelard, and R. A. Godke. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: Oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol. Reprod.* 65:1528-1533.

- Reggio, B. C., M. J. Sansinena, R. Cochran, A. Guitreau, J. Carter, R. S. Denniston, and R. A. Godke. 2000. Nuclear transfer embryos in the horse. In: Proc. 5th Intl. Sym. Equine Embryo Transf. Havermyer Foundation Monograph Series No.3. R & W Publications Limited: Newmarket, Suffolk, UK. pp 45-46.
- Sansinena, M. Hylan, D., Herbert, K., Denniston, R. and Godke, R. 2005. Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology* 63:1081-1091.
- Sansinena, M. J., B. C. Reggio, R. S. Denniston, and R. A. Godke. 2002. Nuclear transfer embryos from different equine cell lines as donor karyoplasts using the bovine oocyte as recipient cytoplasm. *Theriogenology* 58:775-777.
- Sansinena, M. J., P. Taylor, S. Taylor, R. S. Denniston, and R. A. Godke. 2003a. Production of interspecies nuclear transfer embryos using male and female llama (*Lama glama*) cell lines. *Theriogenology* 59:287. (Abstr.)
- Shah, R., George, A., Singh, M., Kumar, D., Anand, T., Chauhan, M., Manik, R., Palta, P. and Singla, S. 2009. Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 71:1215-1219.
- Shah, R., George, A., Singh, M., Kumar, T., Chauhan, M., Manik, R., Palta, P. and Singla, S. 2008. Handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: comparison of different media and culture systems. *Cloning and Stem Cells* 10:435-442.
- Shi, D., Lu, F., Wei, Y., Cui, K., Yang, S., Wei, J., Liu, Q. 2007. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod.* 77:285-291.
- Shin, T., D. Kraemer, J. H. Pryor, J. L. Liu, J. Ruglia, L. M. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons, and M. E. Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415:859.
- Soloy, E., J. Kanka, D. Viuff, S. D. Smith, H. Callesen, and T. Greve. 1997. Time course of pronuclear deoxyribonucleic acid synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 57:27-35.
- Spemann, H. 1938. Embryonic development and induction. Yale University Press: New Haven, CT.
- Steward, F. C. 1970. From cultured cells to whole plants: The induction and control of their growth and morphogenesis. *Proc. Royal Soc. Lond.* 75:1-30.
- Steward, F. C., M. O. Mapes, and K. Mears. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Botany* 45:705-708.
- Stice, S. and J. M. Robl. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39:657-664.
- Tsunoda, Y., T. Yasui, Y. Nakamura, T. Uchida, and T. Sugie. 1986. Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J. Exp. Zool.* 240:119-125.

- Ty, L. V., N. V. Hanh, N. T. Uoc, N. H. Duc, N. T. Thanh, L. C. Bui, Q. X. Huu, and B. X. Nguyen. 2003. Preliminary results of cell cryobanking and embryo production of black bear (*Ursinus thibetaus*) by interspecies somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 59:290. (Abstr.)
- Vajta, G., I. M. Lewis, A. O. Trounson, S. Purup, P. Maddox-Hyttel, M. Schmidt, H. G. Pedersen, and H. Callesen. 2003. Handmade somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol. Reprod.* 68:571-578.
- Verlhac, M. H., J. Z. Kubiak, H. J. Clarke, and B. Maro. 1994. Microtubule and chromatin behaviour follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120:1017-1025.
- Wakayama, T., A. C. F. Perry, M. Zucotti, K. R. Jhonson, and R. Yanagimachi. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
- Wani, N.A., Wernery, U., Hassan, F.A.H., Wernery, R. and Skidmore, J.A., 2010. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biology of reproduction*, 82(2), pp.373-379.
- Wells, D. N., G. Laible, F. C. Tucker, A. L. Miller, J. E. Oliver, T. Xiang, J. T. Forsyth, M. C. Berg, K. Cockrem, P. J. L'Huillier, H. R. Tervit, and B. Oback. 2003. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology* 59:45-59.
- Westhusin, M., R. C. Burghardt, J. Ruglia, L. A. Willingham, L. Liu, T. Shin, L. M. Howe, and D. Kraemer. 2001. Potential for cloning dogs. *J. Reprod. Fertil.* 57:287-293.
- Whitaker, M. J. and R. F. Irvine. 1984. Inositol 1,4,5 triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. *Nature* 312:636-639.
- White, K. L., T. D. Bunch, S. Mitalipov, and W. A. Reed. 1999. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 1:47-54.
- Willadsen, S. 1981. The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J. Embryol. Exper. Morph.* 65:165-172.
- Willadsen, S. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65.
- Willadsen, S., R. E. Janzen, R. J. McAlister, B. F. Shea, G. Hamilton, and D. McDermand. 1991. The viability of late morulae and blastocysts produced by nuclear transplantation in cattle. *Theriogenology* 35:161-170.
- Wilmot, I., A. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. S. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813.
- Wilmot, I., L. E. Young, P. De Sousa, and T. King. 2000. New opportunities in animal breeding and production: An introductory remark. *Anim. Reprod. Sci.* 60:5-14.

- Woods, G. L., K. L. White, D. K. Vanderwall, G. Li, K. I. Aston, T. D. Bunch, L. N. Meerdo, and B. J. Pate. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301:1063.
- Woods, G. L., K. L. White, D. K. Vanderwall, K. I. Aston, T. D. Bunch, K. D. Campbell, and L. N. Meerdo. 2002. Cloned mule pregnancies produced using nuclear transfer. *Theriogenology* 58:779-782.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: E. Knobil and J. Neill (eds.). *The physiology of reproduction*. Raven Press: San Diego. pp. 189-317.
- Yang, X. and G. Anderson. 1992. Micromanipulation of mammalian embryos: Principles, progress and future possibilities. *Theriogenology* 38:315-335.
- Yong, Z. and L. Yuqiang. 1998. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation: Production of goats by serially cloning embryos. *Biol. Reprod.* 58:266-269.
- Yoon, T., E. J. Choi, K. Y. Han, H. Shim, and S. Roh. 2001. In vitro development of embryos produced by nuclear transfer of porcine somatic cell nuclei into bovine oocytes using three different culture systems. *Theriogenology* 55:298. (Abstr.)
- Yu, X. S., X. S. Sun, H. N. Jiang, Y. Han, C. B. Zhao, and J. H. Tan. 2003. Studies of the cell cycle of in vitro cultured skin fibroblasts in goats: Work in progress. *Theriogenology* 59:1277-1289.
- Zhou, Q., J. P. Renard, G. Le Friec, V. Bouchard, N. Beujean, N. Cherifi, A. Fraichard, and J. Cozzi. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302:1179.
- Ziomek, C. 1998. Commercialization of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology* 49:139-144.