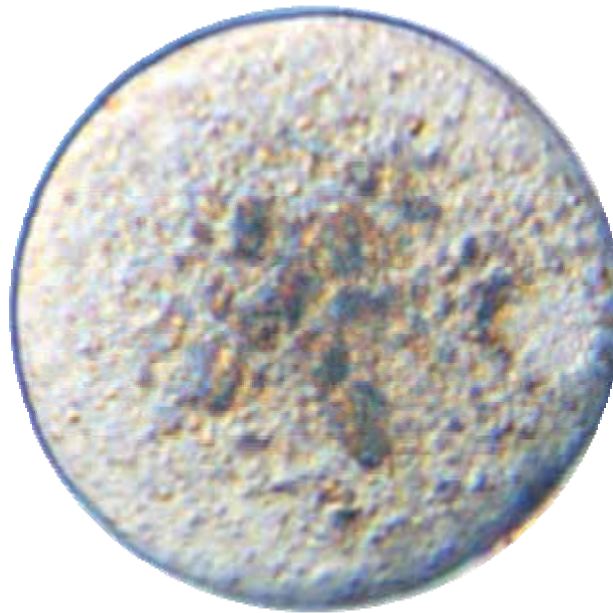


TESI DOCTORAL

**MILLORA DE LA REPROGRAMACIÓ DEL NUCLI
SOMÀTIC EN PROCEDIMENTS DE
TRANSFERÈNCIA NUCLEAR EN RATOLÍ**



Anna Mallol Domínguez

2014

Dirigida per:

Dra. Elena Ibáñez de Sans i Dr. Josep Santaló Pedro

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Biociències

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Portada: Oòcit de ratolí en metafase II. Disseny d'Elies Porta.



Universitat Autònoma de Barcelona

**MILLORA DE LA REPROGRAMACIÓ DEL NUCLI
SOMÀTIC EN PROCEDIMENTS DE
TRANSFERÈNCIA NUCLEAR EN RATOLÍ**

Anna Malloí Domínguez

Memòria presentada per optar al Grau de Doctor en Biologia Cel·lular per la
Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 2014

Directors:

Dra. Elena Ibáñez de Sans i Dr. Josep Santaló Pedro



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

Unitat de Biologia Cel·lular

La **Dra. Elena Ibáñez de Sans**, professora agregada del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i el **Dr. Josep Santaló Pedro**, catedràtic del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que **Anna Malloí Domínguez** ha realitzat sota la seva direcció el treball d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "**Millora de la reprogramació del nucli somàtic en procediments de transferència nuclear en ratolí**" per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Biologia Cel·lular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que així consti, firmen el present certificat.

Bellaterra, 25 de setembre del 2014.

Dra. Elena Ibáñez de Sans

Dr. Josep Santaló Pedro

Anna Malloí Domínguez

Aquesta tesi s'ha realitzat amb el finançament dels projectes AGL 2011-23784 del *Ministerio de Ciencia y Tecnología* i 2009 SGR 282 de la Generalitat de Catalunya. Anna Malloí Domínguez ha gaudit d'una beca predoctoral per a Personal Investigador en Formació (PIF) concedida per la Universitat Autònoma de Barcelona (456-01-4/09).

*A tots els investigadors que s'esforcen cada dia per
a què la recerca no s'aturi mai i la societat es
pugui beneficiar dels seus avenços*

*Sóc la pregunta assedegada de respostes
Sóc el desenllaç final que no coneix la trama
Sóc l'horitzó llunyà que es cerca i no s'atansa
Sóc avenç constant, sóc victòria, sóc derrota*

*Sóc l'esforç ingrat de molts que en mi hi creuen
Sóc l'esma de tants que a mi em necessiten
Sóc rastre del treball de tots els que em conformen
Sóc orfe i sóc mare, sóc filla i sóc vostre*

*Sóc ben poca cosa, ho sóc tot i no sóc res
Sóc qui sóc, per la força, la voluntat i el saber
Sóc efímera i eterna, a cada instant viva i inerta
Sóc la raó i el conèixer, per damunt de tot, sóc ciència*

Bernat

ÍNDEX

RESUM.....	3
ABSTRACT.....	5
Abreviatures i acrònims	7
Llistat de figures.....	9
Llistat de taules	11
Capítol 1. INTRODUCCIÓ.....	13
1.1. Tècniques i aplicacions del clonatge en mamífers	15
1.1.1. El concepte de clon	15
1.1.2. La partició embrionària.....	15
1.1.3. La transferència nuclear.....	18
1.1.3.1. Enucleació de la cèl·lula receptora.....	21
1.1.3.2. Transferència del nucli de la cèl·lula donadora	22
1.1.3.3. Activació partenogenètica de l'oòcit reconstruït	25
1.1.3.4. Cultiu <i>in vitro</i> i desenvolupament preimplantacional	27
1.1.3.5. Transferència embrionària i desenvolupament postimplantacional	30
1.1.3.6. Derivació de cèl·lules mare embrionàries.....	32
1.1.4. Aplicacions del clonatge.....	32
1.1.4.1. Clonatge reproductiu	33
<i>Aplicacions en la ramaderia.....</i>	<i>34</i>
<i>Aplicacions en la biotecnologia: animals transgènics.....</i>	<i>35</i>
<i>Aplicacions en la preservació d'espècies o la recuperació d'animals</i> <i>morts</i>	<i>36</i>
1.1.4.2. Clonatge terapèutic.....	37
1.2. Canvis epigenètics en la reprogramació nuclear	40

1.2.1. Modificacions epigenètiques i potencial de desenvolupament	40
1.2.2. Reprogramació nuclear dels gàmetes durant el desenvolupament embrionari en ratolí	45
1.2.3. Reprogramació del nucli somàtic en el clonatge per SCNT.....	49
1.2.4. Altres vies de reprogramació del nucli somàtic	53
1.3. Millora de la reprogramació nuclear en la SCNT mitjançant l'ús de modificadors epigenètics	57
1.3.1. Estratègies de millora de la reprogramació nuclear en la SCNT	57
1.3.2. Inhibidors de les desacetilades d'histones (HDACis).....	59
1.3.3. Inhibidors de les metiltransferases de DNA (DNMTis)	66
1.3.4. Altres modificadors epigenètics.....	68
1.3.5. Present i futur dels modificadors epigenètics en la SCNT	69
Capítol 2. OBJECTIUS.....	71
Capítol 3. RESULTATS.....	75
3.1. <i>Psammaplin A increases development and quality of somatic cell nuclear transfer mouse embryos.....</i>	77
3.2. <i>Improvement of mouse cloning efficiency by vitamin C and latrunculin A.....</i>	95
3.3. <i>Morohokinetic analysis of cloned mouse embryos treated with epigenetic modifiers and prediction of blastocyst development.....</i>	125
Capítol 4. DISCUSSIÓ GENERAL.....	165
Capítol 5. CONCLUSIONS	183
Capítol 6. BIBLIOGRAFIA	187
Agraïments.....	217

RESUM

L'èxit de la transferència nuclear de cèl·lules somàtiques (SCNT) depèn de diversos factors que fan que tingui una eficiència baixa. D'una banda, l'extensa reprogramació nuclear que ha de tenir lloc per tal que el patró d'expressió del nucli somàtic transferit sigui substituït per un patró de tipus embrionari no sempre es dona correctament. El tractament dels embrions clonats amb inhibidors de les desacetilases d'histones (HDACis) corregeix el seu estat hipoacetilat i hipermetilat, facilitant l'accés dels factors reprogramadors de l'òocit al nucli transferit i afavorint així la reprogramació nuclear. En canvi, el paper positiu d'altres modificadors epigenètics, p. ex. les desmetilases d'histones (HDMs), és objecte de controvèrsia. D'altra banda, l'òocit ha de patir una sèrie de manipulacions durant la SCNT que afecten la viabilitat dels embrions. En aquest sentit, s'ha vist que l'ús de latrunculina A (LatA) enlloc de citocalasina B com inhibidor de la polimerització d'actina millora el desenvolupament a terme dels embrions clonats tractats amb HDACis, però es desconeix el seu efecte sobre el desenvolupament *in vitro* i els embrions no tractats. A més, els embrions clonats són molt sensibles a les condicions de cultiu i actualment no es disposa de mètodes no invasius per a la predicció del seu potencial de desenvolupament que puguin incrementar les taxes d'èxit obtingudes.

En aquesta tesi s'ha aconseguit millorar l'eficiència del clonatge de la soca de ratolí B6CBAF1 del 0-0,5 %, en embrions no tractats, al 3-5 % en embrions tractats amb la psamaplina A (PsA), un HDACi que no havia estat mai utilitzat en estudis de reprogramació nuclear, i/o la vitamina C (VitC), un antioxidant que a més s'ha descrit que actua com a cofactor de les HDMs amb domini *Jumonji* i de les proteïnes de translocació deu-onze. A més, s'ha vist que la VitC incrementa significativament l'obtenció de cèl·lules mare embrionàries a partir dels embrions clonats. En canvi, no s'han pogut millorar els resultats prèviament obtinguts amb l'HDACi àcid valproic (VPA), malgrat l'increment de la concentració i durada del tractament testat. Així com s'ha vist que tant el VPA com la PsA milloren la reprogramació nuclear mitjançant un increment general dels nivells d'acetilació de les histones, no s'ha pogut detectar un efecte equivalent per a la VitC.

D'altra banda, s'ha vist que la LatA millora les taxes de desenvolupament *in vitro*, sobretot en els embrions no tractats amb modificadors epigenètics. No obstant, aquest efecte no es tradueix en un millor desenvolupament a terme si la LatA no es combina amb un modificador epigenètic com la PsA o la VitC. Per tant, la LatA podria estar involucrada en la reprogramació nuclear i exercir un efecte sinèrgic amb els modificadors epigenètics en la SCNT.

Finalment, els embrions clonats han estat monitoritzats amb un sistema de *time-lapse* que no perjudica el seu desenvolupament *in vitro*. S'ha demostrat que aquests embrions es desenvolupen més lentament que els fecundats a partir de la segona divisió, i que el tractament amb modificadors epigenètics afecta la cinètica de desenvolupament. En concret, quan els embrions clonats són tractats amb la PsA la seva divisió s'alenteix i el retard es manifesta abans. En canvi, quan són tractats amb la VitC es divideixen més ràpidament i són més semblants als embrions fecundats. S'ha pogut establir un model de predicció del potencial de desenvolupament de tots aquests embrions basat en el moment de la divisió cap a l'estadi de quatre cèl·lules, sol o combinat amb la durada de la compactació i/o la fragmentació per augmentar-ne la potència. La validació d'aquest model podria permetre la selecció dels embrions amb major potencial de desenvolupament abans de la seva transferència a femelles receptores.

ABSTRACT

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) success depends on a wide range of factors which limit its efficiency. On one hand, the vast nuclear reprogramming that the somatic nucleus transferred must undergo for gene expression to change from a differentiated to an embryonic pattern is often defective. It is well known that treatment of SCNT embryos with histone deacetylase inhibitors (HDACis) corrects the hypoacetylation and hypermethylation of their genome, and this helps reprogramming factors in the ooplasm to gain access to the transferred nucleus, improving nuclear reprogramming. But the role of other epigenetic modifiers, such as histone demethylases (HDMs), is unclear. On the other hand, the manipulations performed on the oocyte during the SCNT protocol affect its viability. In this sense, the use of latrunculin A (LatA) instead of cytochalasin B for actin polymerization inhibition significantly improves the development to term of HDACi-treated SCNT embryos. However, its effect on *in vitro* development and on untreated embryos is unknown. In addition, SCNT embryos are especially sensible to *in vitro* culture conditions and a non-invasive method for the prediction of their developmental potential, which could increase success rates, is lacking.

In this thesis, the cloning efficiency of B6CBAF1 mice has been improved from 0-0.5 %, in untreated embryos, to 3-5 % in embryos treated with psammaplin A (PsA), an HDACis never used in nuclear reprogramming studies before, and/or vitamin C (VitC), an antioxidant reported to act as a cofactor of Jumonji-domain-containing HDMs and ten eleven translocation enzymes. Both epigenetic modifiers have also proved to improve embryonic stem cell derivation from SCNT embryos. However, the cloning efficiency previously achieved treating SCNT embryos with the HDACi valproic acid (VPA) has not been improved, in spite of the increase of its concentration and exposure time tested. PsA and VPA have been shown to improve nuclear reprogramming through the increase of histone acetylation levels in SCNT embryos, but an effect of VitC on the nuclear reprogramming of SCNT embryos has not been detected.

In addition, it has been shown here that LatA improves *in vitro* developmental rates, especially of those embryos non-treated with epigenetic modifiers. However, in order to improve full-term development, LatA has to be combined with an epigenetic modifier such as PsA or VitC. Thus, LatA could be involved in the nuclear reprogramming of SCNT embryos and might exert a synergistic effect with epigenetic modifiers.

Finally, the development of SCNT embryos has been assessed with a time-lapse system that does not reduce their viability. We observed that SCNT embryos are delayed, from the second division, in comparison with fertilized embryos, and that the epigenetic modifier treatment has an effect on embryo kinetics. In particular, when embryos are treated with PsA the delay is more pronounced and appears earlier. In contrast, VitC accelerates the developmental kinetics of SCNT embryos, making them more similar to fertilized ones. A prediction model for the developmental potential of SCNT embryos (both untreated and treated) has been established, based on the time of division to the four-cell stage, alone or combined with compaction duration and/or fragmentation to increase prediction accuracy. The validation of this model would allow the selection of SCNT embryos with higher developmental potential prior to their transfer to recipient females.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

5-aza-dC	(5-aza-2'-deoxycytidine) 5-aza-2'-deoxicitidina.
5hmeC	(5-hydroxymethylcytosine) 5-hidroximetilcitosina.
5meC	(5-methylcytosine) 5-metilcitosina.
6-DMAP	(6-dimethylaminopurine) 6-dimetilaminopurina.
APHA	(Aroyl Pyrrolyl Hydroxamide) Hidroxiamida d'arroil-pirrol.
ATP	(Adenosin Triphosfat) Trifosfat d'adenosina.
BSA	(Bovine Serum Albumine) Albúmina sèrica bovina.
CB	(Cytochalasin B) Citocalasina B.
CBHA	(M-Carboxycinnamic Acid BisHydroxamide) Bis-hidroxiamida d'àcid m-carboxicinàmic.
CpG	(DNA regions rich in Cytosine and Guanine nucleotides) Regions del genoma riques en citosina i guanina.
DMSO	(Dimethylsulfoxide) Dimetilsulfòxid.
DNMT(s)	(DNA Methyltransferase(s)) Metiltransferasa/es de DNA.
DNMTi(s)	(DNA Methyltransferase Inhibitor(s)) Inhibidor(s) de les metiltransferases de DNA.
Dpc	(Day Postcoitum) Dies post coitum.
EDTA	(Ethylenediaminetetraacetic Acid) Àcid etilendiamintetraacètic.
EGA	(Embryonic Genome Activation) Activació del genoma embrionari.
ESC(s)	(Embryonic Stem Cell(s)) Cèl·lula/es mare embrionàries.
GSH	(Reduced Glutathione) Glutatió reduït.
GSK-3	(Glycogen Synthase Kinase 3) Glicogen sintetasa quinasa 3.
HAT(s)	(Histone Acetyltransferase(s)) Acetil transferasa/es d'histones.
hCG	(Human Chorionic Gonadotropin) Gonadotropina coriònica humana.
HCZB	(Hepes-buffered CZB medium) Medi CZB tamponat amb hepes.
HDAC(s)	(Histone Deacetylase(s)) Desacetilasa/es d'histones.
HDACi(s)	(Histone Deacetylase Inhibitor(s)) Inhibidor(s) de les desacetilases d'histones.
HDM(s)	(Histone Demethylase(s)) Desmetilasa/es d'histones.
HMT(s)	(Histone Methyltransferase(s)) Metiltransfera/es d'histones.
HMTi(s)	(Histone Methyltransferase Inhibitor(s)) Inhibidors de les metiltransferases d'histones.
ICM	(Inner Cell Mass) Massa Cel·lular interna.
ICSI	(Intracytoplasmic Sperm Injection) Injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides.
iPSC(s)	(Induced Pluripotent Stem Cell(s)) Cèl·lula/es mare pluripotents induïdes.
iSCNT	(Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer) Transferència nuclear de cèl·lules somàtiques interespecífica.
IU	(International Units) Unitats internacionals.
KSOM	(Potassium Simplex Optimized Medium) Medi simple de potassi optimitzat.
LatA	(Latrunculin A) Latrunculina A.
LIF	(Leukemia Inhibiting Factor) Factor inhibidor de la leucèmia.
LOS	(Large Offspring Syndrome) Síndrome del <i>large offspring</i> .
MII	(Metaphase II) Metafase II.
MBD2	(Methyl CpG Binding Domain protein 2) Proteïna 2 amb domini d'unió a la metil CpG.
MCB	(Monochlorobimane) Monoclorobimà.
MPF	(Maturation Promoting Factor) Factor promotor de la mitosi.

NaBu	(<i>Sodium Butyrate</i>) Butirat sòdic.
NT	(<i>Non-Treated</i>) No tractat.
ntESC(s)	(<i>Nuclear Transfer Embryonic Stem Cell(s)</i>) Cèl·lula/es mare embrionàries de transferència nuclear.
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Reacció en cadena de la polimerasa.
PGCs	(<i>Primordial Germ Cells</i>) Cèl·lules primordials germinals.
PMSG	(<i>Pregnant Mare's Serum Gonadotropin</i>) Gonadotropina sèrica d'euga prenyada.
PsA	(<i>Psammalin A</i>) Psamaplina A.
PVP	(<i>Polyvinylpyrrolidone</i>) Polivinilpirrolidona.
ROS	(<i>Reactive Oxygen Species</i>) Espècies reactives d'oxigen.
RT	(<i>Room Temperature</i>) Temperatura ambient.
SAH	(<i>S-Adenosyl-Homocysteine</i>) S-adenosil-homocisteïna.
SAHA	(<i>Suberoylanilide Hydroxamic Acid</i>) Àcid hidroxàmic suberoilànida.
SCNT	(<i>Somatic Cell Nuclear Transfer</i>) Transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.
TALENs	(<i>Transcription Activator-Like Effectors Nucleases</i>) Nucleases efectores de transcripció de tipus activador.
TE	(<i>Trophectoderm</i>) Trofèctoderm.
TET	(<i>Ten-Eleven Translocation proteins</i>) Proteïnes de translocació deu-onze.
TSA	(<i>Trichostatin A</i>) Tricostatina A.
VitC	(<i>Vitamin C or Ascorbic Acid</i>) Vitamina C o àcid ascòrbic.
VPA	(<i>Valproic Acid</i>) Àcid valproic.
ZFNs	(<i>Zinc-finger Nucleases</i>). Nucleases de dit de zinc.

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. Imatges representatives de les dues tècniques de clonatge, en ratolí.....	17
Figura 2. Coordinació entre el nucli donador i l'oòcit receptor per mantenir la ploidia.	24
Figura 3. Comparació de l'eficiència d'obtenció d'animals clonats i de línies de ntESCs en diverses soques de ratolí.	31
Figura 4. Clonatge reproductiu i terapèutic.	33
Figura 5. Esquema del clonatge terapèutic en humans.	37
Figura 6. Representació de diversos tipus de modificacions d'histones i de les funcions biològiques que s'hi associen.....	41
Figura 7. Regulació de la conformació de la cromatina.	42
Figura 8. Relació entre l'estat epigenètic i el potencial de desenvolupament.	44
Figura 9. Evolució dels nivells de metilació durant l'oogènesi i el desenvolupament preimplantacional del ratolí.	46
Figura 10. Reprogramació nuclear durant el desenvolupament embrionari en ratolí.	47
Figura 11. Reprogramació nuclear en la transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.....	50
Figura 12. Vies de reprogramació del nucli somàtic.	54
Figura 13. Ús de modificadors epigenètics per regular la conformació de la cromatina.	58
Figura 14. Efecte d'alguns HDACis sobre el desenvolupament a terme en diferents soques de ratolí.	65

LLISTAT DE TAULES

Taula 1. Resum dels treballs de clonatge terapèutic en humans.....	39
Taula 2. Efecte del tractament amb l'inhibidor de les desacetilases d'histones (HDACi) TSA sobre el desenvolupament dels embrions de diverses espècies de mamífer generats per transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.....	61
Taula 3. Efecte dels tractament amb inhibidors de les desacetilases d'histones (HDACis) diferents de la TSA sobre el desenvolupament dels embrions de diverses espècies de mamífer generats per transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.....	63
Taula 4. Efecte dels tractaments amb inhibidors de les metiltransferases de DNA (DNMTis) i d'histones (HMTis) sobre el desenvolupament dels embrions de diverses espècies de mamífer generats per transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.....	67

Capítol

1

INTRODUCCIÓ

1.1. TÈCNIQUES I APLICACIONS DEL CLONATGE EN MAMÍFERS

1.1.1. El concepte de clon

El terme clon prové de la paraula grega κλών que vol dir brot i va ser utilitzat per primera vegada amb un sentit biològic pel científic Herbert J. Webber fent referència al sorgiment d'una nova planta idèntica a la planta original mitjançant una reproducció no sexual (Webber 1903).

Avui en dia, la paraula clon en el camp de la biologia fa referència a una copia idèntica, ja sigui d'una molècula, d'una cèl·lula o d'un organisme, la qual es genera mitjançant un procés de clonatge (Mittwoch 2002). Els anticossos produïts per limfòcits idèntics que reconeixen exactament el mateix epítol, la molècula de DNA resultant de la replicació d'una molècula que actua de motlle, les cèl·lules resultants d'una divisió mitòtica, els organismes uni- o pluricel·lulars que es reproduïxen per gemmació, les plantes resultants dels esqueixos d'una planta original, els bessons monozigòtics, etc. són exemples de clons que es produeixen de manera natural. A més, però, existeix la possibilitat de generar clons de manera artificial gràcies al desenvolupament de noves tècniques moleculars i cel·lulars. Per exemple, la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permet clonar una molècula de DNA i la tècnica de la partició embrionària permet clonar un embrió. En aquesta tesi, ens centrarem en el clonatge d'embrions i animals. Per això, a partir d'ara ens referirem al clonatge com al procés mitjançant el qual es generen embrions o organismes genèticament idèntics a un altre embrió o organisme. Aquest procés es pot dur a terme artificialment mitjançant dues tècniques diferents: la partició embrionària o la transferència nuclear.

1.1.2. La partició embrionària

Els primers experiments de partició embrionària varen ser realitzats l'any 1928 per Hans Sepmann utilitzant cabells del seu fill per estrènyer embrions de salamandra que, a conseqüència de la constricció, es desenvolupaven en salamandres parcialment dobles, amb dos caps i una cua. A causa de la transcendència dels seus experiments, va ser premiat amb el Nobel de Fisiologia i Medicina l'any 1935. Els treballs d'aquest investigador alemany, publicats en el seu llibre *Embryonic development and induction* (1938), variant la regió de l'embrió on es realitza la constricció, el temps que es manté i el grau d'aquesta constricció, el varen portar a desenvolupar una teoria d'inducció embrionària basada en la capacitat d'autoregulació de les cèl·lules de l'embrió (Wellner 2010).

Tal i com el seu nom indica, el mètode de la partició embrionària consisteix en partir un embrió per tal que les parts generades continuïn desenvolupant-se de manera independent, donant lloc a embrions i després organismes genèticament idèntics entre ells. Atès que els blastòmers

d'embrions en estadi de dues i quatre cèl·lules són totipotents, és a dir, tenen la capacitat de donar lloc a tots els teixits embrionaris i extraembrionaris, poden ser aïllats individualment per obtenir nous embrions amb un potencial de desenvolupament complet. En primer lloc, s'elimina la zona pel·lúcida i s'incuben els embrions en un medi sense calci ni magnesi, on les unions intercel·lulars entre blastòmers queden afeblides. D'aquesta manera, els blastòmers se separen els uns dels altres, i es posen en cultiu de manera independent. Si els embrions clonats es volen transferir, cal introduir els blastòmers aïllats en zones pel·lúcides buides mitjançant tècniques de micromanipulació (Willadsen 1979) (figura 1.A).

En canvi, quan els embrions a clonar es troben en estadis de desenvolupament preimplantacional més avançats, les seves cèl·lules ja no són totipotents i, a més, els embrions partits resultants arriben a l'estadi de blastocist amb molt poques cèl·lules. Per això, cal realitzar algunes modificacions en la tècnica de partició embrionària per poder clonar-los. Per exemple, es poden aïllar un o dos blastòmers d'embrions de ratolí en estadi de vuit o setze cèl·lules i combinar-los amb entre quatre i sis blastòmers tetraploides "portadors", els quals restableixen el nombre de cèl·lules de l'embrió afavorint el seu desenvolupament però no contribueixen als futurs teixits embrionaris (Tarkowski *et al.* 2005). A més, també és possible dividir embrions en estadi de morula o de blastocist en dues parts iguals per a generar dos embrions clònics (Reichert i Niemann 1994). En el cas del blastocist, però, ja s'ha produït el primer fenomen de diferenciació cel·lular i l'embrió està format per les cèl·lules del trofocoderm (TE), que donaran lloc als teixits extraembrionaris, i per les cèl·lules de la massa cel·lular interna (ICM), que donaran lloc al fetus (Marikawa i Alarcón 2009). Per això, la partició del blastocist s'ha de realitzar de tal manera que les dues meitats generades continguin tant cèl·lules del TE com de la ICM (Ozil *et al.* 1983; Mitalipov *et al.* 2002).

Mitjançant la partició embrionària s'han pogut clonar animals de diferents espècies de mamífer, com ratolins (Tarkowski *et al.* 1959), conills (Moore *et al.* 1968), ovelles (Willadsen *et al.* 1979), vaques (Willadsen i Polge 1981), cavalls (Allen i Pashen 1984), cabres (Tsunoda *et al.* 1985), rates (Matsumoto *et al.* 1989), porcs (Saito i Niemann 1991) i monos (Mitalipov *et al.* 2002), entre altres. Ara bé, malgrat es tracta d'una tècnica relativament senzilla, aquest mètode presenta com a principals desavantatges que un embrió només pot ser partit un nombre reduït de vegades, i per tant es poden generar pocs clons, i que les característiques fenotípiques dels futurs clons no es coneixen. Per això, avui en dia la partició embrionària s'utilitza rarament i només a nivell experimental.

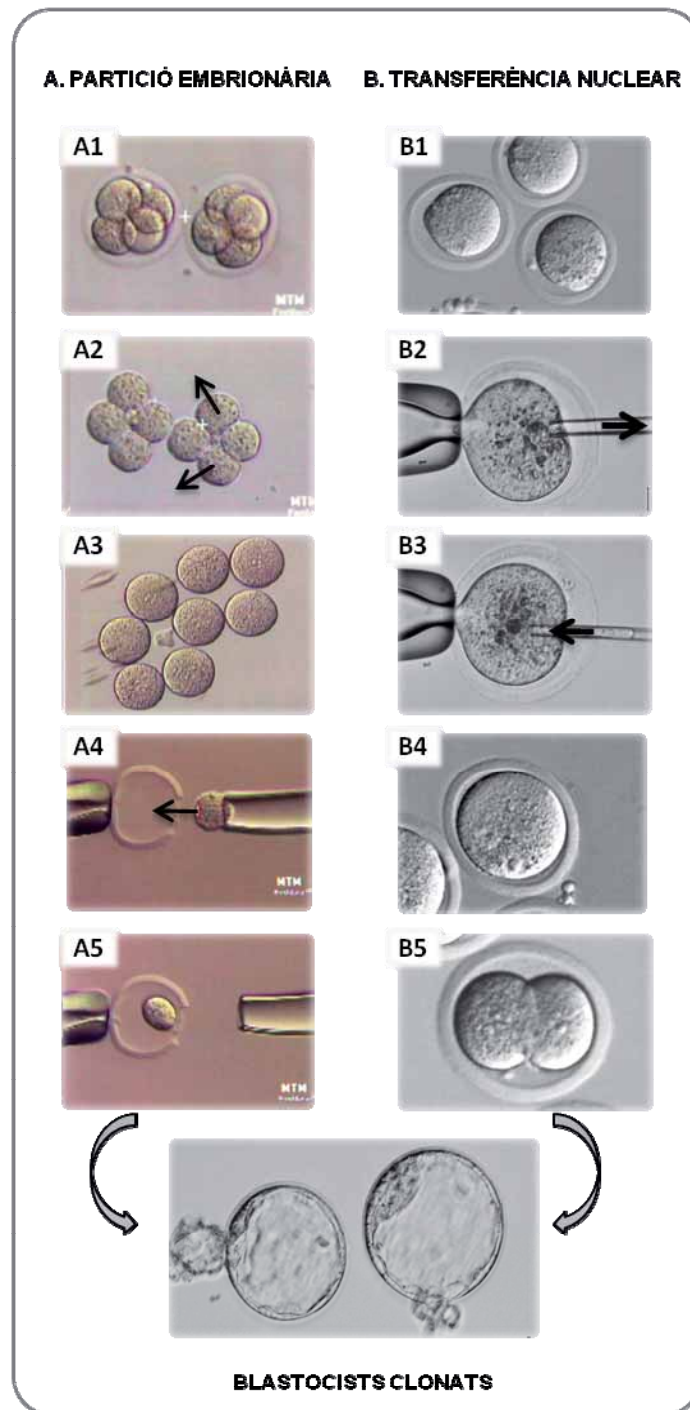


Figura 1. Imatges representatives de les dues tècniques de clonatge en ratolí. A) Clonatge per partició embrionària: separació dels blastòmers d'un embrió a quatre cèl·lules (A1-A3) i col·locació de cada blastòmer dins d'una zona pel·lúcida buida per a que es desenvolupi de manera independent i pugui ser transferit donant lloc a un clon de l'embrió donador del blastòmer (A4-A5). Imatges modificades de Tang *et al.* (2012). **B)** Clonatge per transferència nuclear: eliminació de la metafase II de l'òcit madur (B1-B2) i reconstrucció de l'òcit amb el nucli d'una cèl·lula embrionària o somàtica (B3). Activació partenogenètica per a que s'iniciï el desenvolupament embrionari (B4-B5).

1.1.3. La transferència nuclear

La transferència nuclear és un altre mètode de clonatge que, a diferència de l'anterior, permet generar clons a partir de qualsevol tipus cel·lular, sigui quin sigui el seu estadi de desenvolupament o de diferenciació (Heyman *et al.* 1998). Per tant, en poder utilitzar cèl·lules somàtiques, i no tant sols blastòmers d'embrions, aquest mètode permet generar un elevat nombre de còpies d'un individu. A més, si les cèl·lules somàtiques provenen d'un individu adult, les característiques fenotípiques dels futurs clons seran conegudes, tot i que per efecte dels factors ambientals i epigenètics el fenotip dels clons podria diferir del de l'individu original.

Aquest mètode es basa en eliminar el material genètic nuclear d'una cèl·lula receptora, normalment un oòcit, i reconstruir-la amb el nucli d'una cèl·lula donadora (embrionària o somàtica). Seguidament, l'oòcit reconstruït s'activa partenogenèticament per a què s'iniciï el desenvolupament embrionari (figura 1.B). L'únic desavantatge de la transferència nuclear respecte la partició embrionària, a banda de la seva major complexitat tècnica, és que els clons generats per transferència nuclear no són genèticament idèntics al 100 %, a causa de que l'oòcit receptor, tot i haver estat enucleat, posseeix RNA matern, proteïnes i orgànuls, entre ells els mitocondris amb el seu propi DNA, que difereixen dels de la cèl·lula donadora. Pel que fa al DNA mitocondrial, la transferència nuclear genera una heteroplàsmia ja que l'embrió clonat posseeix una petita part del DNA mitocondrial de la cèl·lula donadora però també una gran part del DNA mitocondrial de l'oòcit receptor, i aquest DNA mitocondrial serà diferent per a cada oòcit utilitzat. Malgrat aquestes diferències, els embrions i els animals generats per transferència nuclear es consideren clons, doncs el seu DNA nuclear, que en el cas dels mamífers representa més del 99 % del DNA de la cèl·lula, és idèntic.

Hans Spemann va ser el primer en proposar un experiment "fantàstic" de trasplantament d'un nucli d'una cèl·lula diferenciada al citoplasma d'un zigot per tal d'investigar si aquest nucli pot iniciar un desenvolupament normal, l'any 1938 (Wellner 2010). Anys més tard, es varen realitzar els primers experiments de substitució del nucli d'una cèl·lula per un de diferent en oòcits de *Rana pipiens*, utilitzant blastòmers d'embrions en estadis primerencs com a cèl·lules donadores del nucli (Briggs i King 1952). Els mateixos investigadors varen observar que l'eficiència del procés disminuïa a mesura que les cèl·lules donadores del nucli es trobaven en etapes més avançades del desenvolupament, i varen concloure que els nuclis de cèl·lules posteriors a l'estadi de gàstrula no permetien el desenvolupament embrionari (Briggs i King 1957). Posteriorment, utilitzant el model de *Xenopus*, Gurdon *et al.* (1962a,b) varen aconseguir per primera vegada el desenvolupament a terme de granotes clonades, però només utilitzant cèl·lules diferenciades de capgròs com a donadores del nucli, no amb cèl·lules d'individus adults (Gurdon *et al.* 1975) (revisat per Gurdon *et al.* 2013). El procés mitjançant el qual es reverteix l'estat diferenciat del nucli transferit cap a un estadi embrionari totipotènt es va anomenar reprogramació nuclear i juga un paper clau en l'èxit de la transferència nuclear, tal i com s'explica més endavant (vegeu l'apartat 1.2).

Pel que fa a la transferència nuclear en mamífers, els primers experiments es varen realitzar utilitzant zigots enloc d'òocits com a cèl·lules receptores. En el model del ratolí, Illmensee *et al.* (1981) varen publicar l'obtenció de ratolins clonats a partir d'un zigot enucleat i reconstruït amb el nucli d'una cèl·lula de la ICM. No obstant, estudis posteriors no varen poder reproduir aquests resultats i només varen aconseguir ratolins clonats a partir de nuclis de zigots o de blastòmers d'embrions en l'estadi de dues cèl·lules primerenc, però no a partir de nuclis de cèl·lules d'embrions en estadi de dues cèl·lules tardans, de quatre i vuit cèl·lules o de la ICM (Howlett *et al.* 1987; McGrath i Solter 1983a,b, 1984). Similarment, es va aconseguir clonar ovelles (Robl *et al.* 1987) i porcs (Prather *et al.* 1989) a partir de nuclis de zigots trasplantats a zigots enucleats, però no amb nuclis d'embrions en estadis posteriors. D'altra banda, en el model del ratolí també es varen realitzar estudis de transferència nuclear a embrions en estadi de dues cèl·lules, aconseguint en aquest cas la reprogramació de nuclis d'embrions en estadi de quatre i vuit cèl·lules (Howlett *et al.* 1987; Tsunoda *et al.* 1987). No obstant, la transferència nuclear a òocits va donar els millors resultats, i va permetre el clonatge a partir de nuclis d'embrions en estadis d'entre dues i trenta-dos cèl·lules en ovella (Willadsen *et al.* 1986), vaca (Prather *et al.* 1987), conill (Stice i Robl 1988), porc (Prather *et al.* 1989) i ratolí (Kono *et al.* 1991).

Fins aleshores, el clonatge de mamífers mitjançant transferència nuclear utilitzant nuclis de cèl·lules que han iniciat o completat el procés de diferenciació, com és el cas de les cèl·lules que provenen d'un organisme adult, semblava biològicament impossible. Es creia que el procés de diferenciació era unidireccional i que els canvis que les cèl·lules havien patit durant el procés de diferenciació eren irreversibles (McGrath i Solter, 1984). Però finalment, després de gairebé 50 anys de recerca en el camp del clonatge per transferència nuclear, Campbell *et al.* (1996) varen aconseguir el primer mamífer clonat utilitzant cèl·lules d'una línia embrionària i, poc més tard, el mateix grup publicava el naixement del primer mamífer clonat a partir d'una cèl·lula adulta, la famosa ovella Dolly (Wilmut *et al.* 1997). El naixement d'aquesta ovella va demostrar per primera vegada que els canvis en el nucli no eren permanents i que l'estat de diferenciació d'una cèl·lula de glàndula mamària, en aquest cas, es podia revertir fins a la totipotència de manera que el desenvolupament a terme d'un nou individu fos possible (revisat a Wells *et al.* 2013). A partir d'aleshores, la transferència nuclear de cèl·lules somàtiques (SCNT), tècnica en la qual ens centrarem a partir d'ara, ha estat aplicada amb èxit en múltiples espècies de mamífer. En l'actualitat, mitjançant SCNT s'ha aconseguit clonar vaques (Cibelli *et al.* 1998a; Kato *et al.* 1998), ratolins (Wakayama *et al.* 1998), cabres (Baguisi *et al.* 1999), porcs (Polejaeva *et al.* 2000), gaus (Lanza *et al.* 2000), muflons (Loi *et al.* 2001), gats (Shin *et al.* 2002), conills (Chesné *et al.* 2002), rates (Zhou *et al.* 2003), mules (Woods *et al.* 2003), cavalls (Galli *et al.* 2003), cérvols (Berg *et al.* 2007), gats salvatges (Gómez *et al.* 2004), gossos (Lee *et al.* 2005), fures (Li *et al.* 2006), llops (Kim *et al.* 2007b), búfals (Shi *et al.* 2007) i camells (Wani *et al.* 2010), entre altres.

Per tal de corroborar que la diferenciació cel·lular és totalment reversible en el context de la transferència nuclear, Hochedlinger i Jaenisch (2002) varen reconstruir oòcits amb nuclis de cèl·lules terminalment diferenciades (limfòcits) i varen demostrar que els embrions generats també tenen capacitat per desenvolupar-se en un organisme sencer, obtenint ratolins monoclonals (revisat per Gurdon 2006; Meissner i Jaenisch 2006).

Pel que fa a la SCNT utilitzant altres cèl·lules receptores diferents de l'oòcit, en ratolí es va veure que els zigots (Wakayama *et al.* 2000) i els blastòmers d'embrions de dues i quatre cèl·lules (Eckard *et al.* 2005) no eren uns bons receptors del nucli somàtic transferit. En canvi, Schurmann *et al.* (2006) varen aconseguir clonar vaques mitjançant la transferència d'un nucli somàtic a zigots enucleats, tot i què amb menor eficiència que quan s'utilitzen oòcits com a receptors (7-18 vs. 80 %). Per tant, semblava que alguns factors importants per a la reprogramació del nucli somàtic probablement es perdien a partir de la fecundació i no eren presents en el zigot (Campbell 2007; Van thuan 2010). Més recentment, però, els treballs d'Egli i col·laboradors en ratolí varen demostrar que el zigot i el blastòmer de l'embrió a dues cèl·lules poden ser uns bons receptors sempre i quan es trobin en mitosi, ja que d'aquesta manera els seus factors reprogramadors no es troben segregats al nucli sinó repartits pel citoplasma, i no són eliminats durant el procés d'enucleació (Egli *et al.* 2007, 2008, 2009). No obstant, aquests estudis no es varen poder reproduir en humans utilitzant zigots en mitosi i el fracàs es va relacionar amb una activació del genoma embrionari defectuosa característica dels clons d'aquesta espècie (Egli *et al.* 2011). Finalment, un estudi recent ha demostrat en ratolí que, en contra del que defensen els treballs d'Egli i col·laboradors, els blastòmers d'embrions en estadi de dues cèl·lules en interfase sí poden ser uns bons receptors, sempre i quan es sincronitzi molt bé el cicle cel·lular de la cèl·lula donadora del nucli i de la cèl·lula receptora (Kang *et al.* 2014). Per tant, a diferència del que s'havia pensat inicialment, sembla que la SCNT es podrà realitzar utilitzant embrions en estadi d'una i dues cèl·lules, a més d'oòcits, com a cèl·lules receptores. No obstant, de moment això només ha estat demostrat en ratolí.

A continuació es detallen els passos necessaris per aconseguir generar embrions clonats mitjançant la tècnica de la SCNT amb l'ús de sistemes de micromanipulació (revisat per Campbell *et al.* 2007) i per generar animals clonats o cèl·lules mare embrionàries (ESCs) a partir d'aquests embrions. En general, es tracta d'un protocol tècnicament complicat que requereix un llarg període d'aprenentatge (Fulka *et al.* 2004a). Per això, alternativament s'ha desenvolupat un procediment tècnicament més senzill que prescindeix dels micromanipuladors per a realitzar la SCNT, anomenat *hand-made cloning* (Vajta *et al.* 2001). Però malgrat el protocol és més senzill, el fet d'haver d'eliminar la zona pel·lúcida, entre altres, limita l'aplicació d'aquesta tècnica (revisat per Vajta *et al.* 2005; Elsheikh 2007).

1.1.3.1. Enucleació de la cèl·lula receptora

Tot i que es poden utilitzar embrions en estadi d'una i dues cèl·lules com a cèl·lules receptores per la transferència nuclear, tal i com s'ha indicat anteriorment, en la majoria de casos s'han utilitzat oòcits madurs, és a dir, aturats en la metafase de la segona divisió meiótica (MII), que són les cèl·lules receptores que han donat els millors resultats fins el moment. Per això, ens centrarem en aquest tipus de cèl·lula receptora. Els oòcits de rossegadors, de conills, o de primats normalment s'obtenen ja madurs, aplicant un protocol de superovulació oocitària. En canvi, en altres espècies com en bovins i porcs, els oòcits normalment s'obtenen en estadis previs, a partir d'ovaris d'escorxador, i aleshores s'aplica un protocol de maduració *in vitro*.

Una vegada es disposa de l'oòcit madur, cal eliminar-ne la MII retirant la menor quantitat d'ooplasma possible (Wakayama *et al.* 2008a) i mantenint la integritat de l'oòcit, és a dir, evitant la destrucció d'òrgànuls, la lisi de la membrana plasmàtica, etc. (Greising i Jonas 1999). Per exemple, en *Xenopus* els cromosomes de l'oòcit es destrueixen amb una exposició a radiació ultraviolada sense necessitat de tenyir-los ni extreure'ls (Gurdon i Wilmut 2011). En altres espècies, però, cal emprar tècniques de micromanipulació per enuclear els oòcits, com s'explica a continuació (revisat per Fulka *et al.* 2004a; Li *et al.* 2004).

El més habitual és l'enucleació mecànica, que consisteix en aspirar directament el fus de l'oòcit amb tots els cromosomes. Per a poder retirar-lo eliminant la menor quantitat possible de citoplasma, primer cal esbrinar la seva posició. En diverses soques de ratolí es possible visualitzar el fus meiótic mitjançant l'ús d'una òptica determinada (Hoffman o Nomarski), sense necessitat de tenyir els cromosomes (Kishigami *et al.* 2006a). En canvi, en altres soques de ratolí i en la resta d'espècies domèstiques com la vaca, la cabra, el porc, etc. el fus no és visible i, per tant, es pot suposar la seva localització adjacent al primer corpuscle polar i eliminar el citoplasma en aquesta posició de l'oòcit (enucleació "a cegues"), o es poden utilitzar colorants vitals per tenyir els cromosomes (Dominko *et al.* 2000). Normalment s'utilitza el Hoechst 33342, que és un colorant nuclear fluorescent vital, però aleshores cal irradiar l'oòcit amb llum ultraviolada per visualitzar els cromosomes i això comporta uns efectes adversos (Velilla *et al.* 2002). Alternativament, gràcies a l'estructura molecular altament organitzada del fus que fa que presenti unes propietats òptiques característiques, s'han desenvolupat sistemes de visualització del fus mitjançant microscopis de llum polaritzada com el *Oosight™*, l'*Octax polarAIDE™* o el *Polscope™* (Keefe *et al.* 2003). En general, l'enucleació mecànica és el mètode d'enucleació més utilitzat perquè presenta unes taxes d'enucleació molt elevades, sobretot en el cas de les soques de ratolí en les quals la MII és visible sense necessitat de tenyir-la (95-100 %). No obstant, s'ha descrit la pèrdua de factors associats al fus meiótic durant l'enucleació mecànica (Simerly *et al.* 2003), provocant una distribució aberrant d'aquests factors, com la gamma-tubulina (Zhong *et al.* 2007), o la desorganització del mateix fus (Van Thuan *et al.* 2006) i, consegüentment, la generació d'aneuploidies en els embrions clonats (Simerly *et al.* 2004).

Per intentar solucionar les complicacions associades a l'enucleació mecànica s'han desenvolupat tècniques alternatives d'enucleació, com l'enucleació química, que permet enuclear els oòcits de qualsevol espècie de mamífer sense necessitat de tenyir els cromosomes i sense haver d'eliminar tot el fus. L'enucleació química consisteix en tractar l'oòcit amb inhibidors de la polimerització dels microtúbuls (p. ex: colcemid, nocodazol) abans d'enuclear-lo, i pot ser assistida o induïda en funció de si els oòcits són preactivats o no abans de l'enucleació. L'enucleació químicament assistida consisteix en exposar directament els oòcits en MII als agents despolimeritzants dels microtúbuls per provocar l'aparició d'una protuberància cortical que conté una massa densa amb tots els cromosomes i que pot ser fàcilment eliminada per aspiració amb una micropipeta (Hayes *et al.* 2001; Yin *et al.* 2002a). En canvi, l'enucleació químicament induïda consisteix en preactivar els oòcits en MII i seguidament utilitzar els inhibidors de la polimerització dels microtúbuls per aconseguir l'extrusió de tots els cromosomes amb el segon corpuscle polar (Baguisi i Overström 2000). La possibilitat que aquest segon corpuscle no sigui extruït del tot o sigui reabsorbit, però, fa que sovint aquest mètode es combini amb l'aspiració mecànica del segon corpuscle polar per aconseguir l'enucleació permanent de l'oòcit (Fischer-Rusell *et al.* 2005). Per aplicar l'enucleació química amb èxit, primer cal optimitzar els protocols d'exposició als agents despolimeritzants dels microtúbuls i d'activació segons l'espècie i la soca, i així aconseguir la correcta eliminació de tots els cromosomes sense comprometre el desenvolupament posterior de l'oòcit (Costa-Borges *et al.* 2009, 2011a; Ibáñez *et al.* 2002, 2003). Donada la facilitat amb la qual els cromosomes de l'oòcit poden ser identificats i retirats, ambdues tècniques d'enucleació química, però sobretot l'assistida, han estat considerades com una alternativa a l'enucleació mecànica, la qual és més agressiva per l'oòcit i tècnicament més complicada (Costa-Borges *et al.* 2011b).

1.1.3.2. Transferència del nucli de la cèl·lula donadora

En principi qualsevol cèl·lula pot ser utilitzada com a donadora del nucli per la transferència nuclear. Diversos treballs han demostrat que l'oòcit és capaç de reprogramar cèl·lules en diferents estadis de diferenciació i de múltiples tipus cel·lulars i genotips, i que tots tres factors tenen un efecte sobre l'eficiència del procés. En general, com més indiferenciada es troba la cèl·lula donadora del nucli més eficient és el procés de clonatge (Bluelloch *et al.* 2006), però aquesta regla no sempre es compleix. Per exemple, mentre que aquesta hipòtesi ha estat confirmada en la línia cel·lular neuronal, en l'hematopoètica s'ha vist que els limfòcits T o B són molt més difícils de clonar que els *natural killer T* (limfòcits terminalment diferenciats) o les cèl·lules mare hematopoètiques. Per tant, a banda del genotip, el tipus cel·lular i el grau de diferenciació, l'estructura epigenètica i/o el patró d'expressió gènica específics de cada tipus de cèl·lula donadora també jugarien un paper clau en la seva reprogramabilitat (revisat per Ogura *et al.* 2013).

El moment del cicle cel·lular en el qual es troba la cèl·lula donadora també és molt important, ja que s'ha de donar una correcta sincronització amb l'oòcit per mantenir la diploïdia en l'embrió reconstruït (revisat per Campbell i Albeiro 2003; Campbell *et al.* 2005). En general, l'oòcit és capaç de reprogramar cèl·lules en tots els estadis del cicle cel·lular sempre i quan es mantingui aquesta coordinació. Per exemple, s'ha de tenir en compte que l'oòcit en MII posseeix uns nivells alts del factor promotor de la mitosi (MPF), de manera que en transferir-hi el nucli de la cèl·lula donadora aquest pateix el trencament de l'embolcall nuclear i la condensació de la cromatina independentment de la fase del cicle cel·lular en la qual es trobi. En canvi, en l'oòcit preactivat els nivells de MPF ja han disminuït i l'embolcall nuclear del nucli transferit es manté. El manteniment o no de l'embolcall nuclear determina el grau d'accessibilitat al DNA del nucli transferit dels factors presents al citoplasma de l'oòcit, entre ells els factors de reprogramació o els factors de replicació. A la figura 2 es resumeixen les diferents combinacions possibles per tal de coordinar el nucli transferit amb l'oòcit receptor. Donada la importància d'aquesta sincronització, cal aplicar per exemple una privació de sèrum o un inhibidor dels microtúbuls al cultiu de les cèl·lules donadores del nucli, normalment fibroblasts, per poder sincronitzar-les en les fases G0 o M, respectivament, i controlar així la fase del cicle cel·lular en la qual es troben (revisat per Campbell i Albeiro 2003 i Campbell 2005). En el cas del ratolí, però, les cèl·lules del cúmulus s'obtenen fàcilment a la vegada que els oòcits i, a més, es troben aturades en la fase G0/G1 del cicle cel·lular, per tant, no cal aplicar passos de sincronització i selecció previs a la seva utilització. Per això, són les cèl·lules donadores del nucli que més s'utilitzen en aquesta espècie a nivell experimental (Kishigami *et al.* 2006a; Wakayama *et al.* 1998).

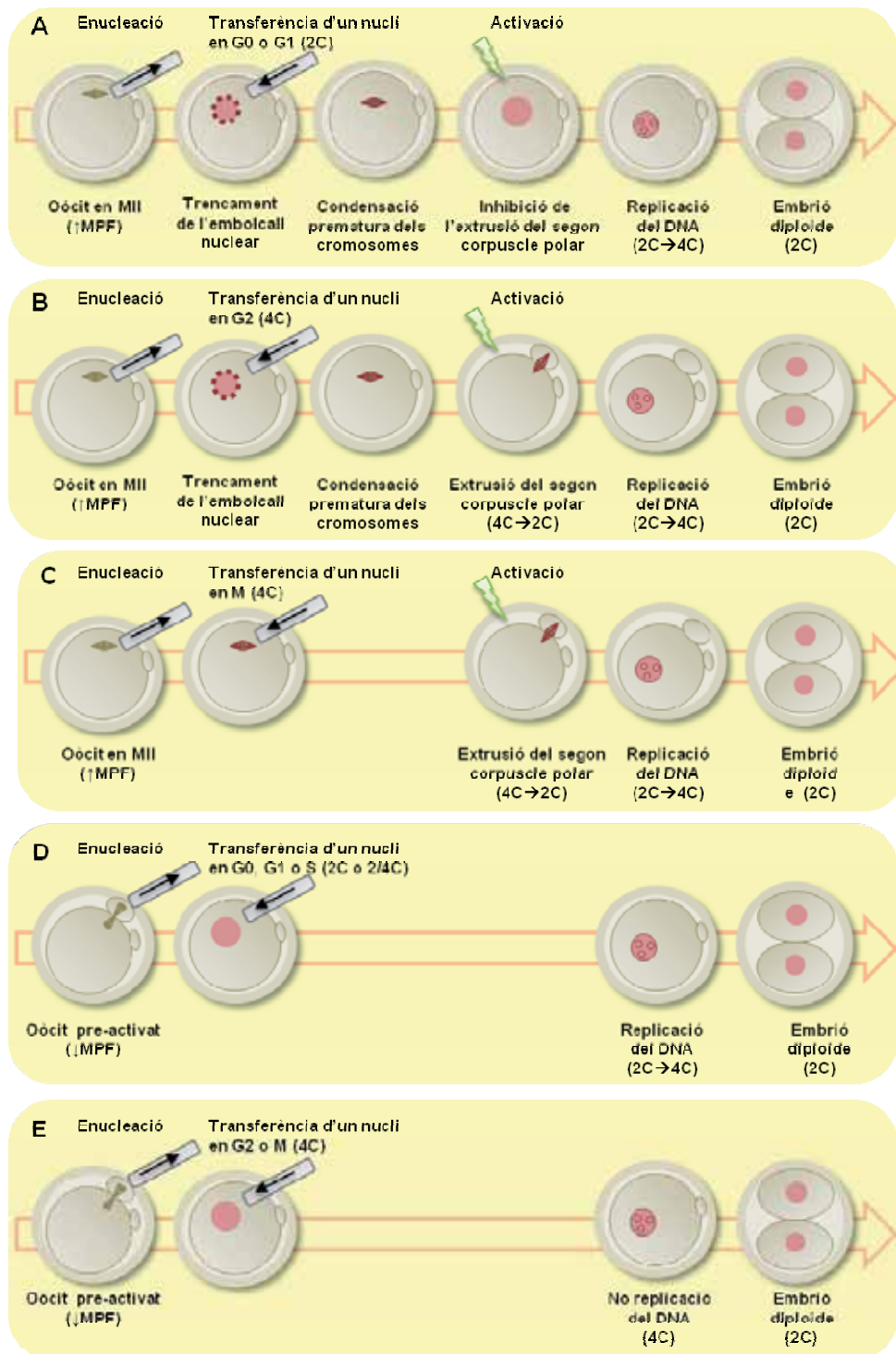


Figura 2. Coordinació entre el nucli donador i l'oòcit receptor per mantenir la ploïdia. A,B,C) Transferència a un oòcit en MII. Els alts nivells de MPF de l'oòcit provoquen el trencament de l'embolcall del nucli transferit i els factors ooplasmàtics tenen accés al nucli transferit, remodelant-lo i iniciant la replicació del DNA independentment de la fase del cicle cel·lular en la qual es trobi el nucli. Per mantenir la ploïdia de l'embrió és necessari inhibir l'extrusió del segon corpuscle polar quan s'utilitza el nucli d'una cèl·lula en G0 o G1, i permetre'n l'extrusió quan s'utilitza una cèl·lula en fase G2 o M. No es poden utilitzar cèl·lules en fase S com a donadores del nucli perquè es generarien aneuploïdies per re-replicació. **D,E)** Transferència a un oòcit pre-activat. Com que els nivells de MPF són baixos, l'embolcall nuclear es manté i per tant la replicació del DNA només depèn del cicle cel·lular de la cèl·lula donadora. Es poden utilitzar cèl·lules donadores en qualsevol fase del cicle cel·lular.

Per tal de realitzar la transferència del nucli a l'òocit enucleat existeixen diverses metodologies. En la transferència nuclear per injecció, el nucli de la cèl·lula somàtica és aïllat i injectat directament dins de l'ooplasma. Per poder travessar la zona pel·lúcida i la membrana plasmàtica, en la majoria d'espècies domèstiques i en humans es pot utilitzar una pipeta bisellada. En canvi, en el ratolí, la zona pel·lúcida és més elàstica i la membrana plasmàtica és més sensible, i per evitar la lisi de l'òocit cal utilitzar un sistema piezo elèctric (Kishigami *et al.* 2006a). Aquest sistema permet crear un forat a la zona pel·lúcida i trencar la membrana plasmàtica, mitjançant un pols piezo elèctric transmès a través de la pipeta d'injecció. Aleshores la pipeta entra dins l'ooplasma i s'hi diposita el nucli. Aquest mètode és agressiu perquè els polsos elèctrics que genera han estat associats a la inducció de trencaments de doble cadena en el nucli transferit (Yu *et al.* 2007b), i a més comporta, com qualsevol microinjecció, la introducció dins de l'òocit d'una petita quantitat del medi en el qual es resuspenen les cèl·lules donadores dins de l'òocit, sovint medi amb polivinilpirrolidona (PVP) (Kishigami *et al.* 2006a).

En la transferència nuclear per fusió elèctrica, en primer lloc la cèl·lula donadora del nucli es col·loca a l'espai perivitel·lí de l'òocit de tal manera que les membranes plasmàtiques de les dues cèl·lules entrin en contacte, i després s'aplica un pols elèctric que provoca la fusió de les dues membranes plasmàtiques. Aquest mètode de transferència nuclear s'utilitza més que el d'injecció (excepte en el cas del ratolí) ja que la micromanipulació és tècnicament més senzilla, és menys agressiva per l'òocit i, a més, quan es combina amb la presència de Ca^{2+} en el medi de fusió permet la reconstrucció i activació simultànies dels oòcits (vegeu l'apartat 1.1.3.3).

Finalment, en la transferència nuclear per fusió viral, les cèl·lules donadores del nucli s'incuben breument en un extracte viral hemaglutinant inactivat (p. ex. virus Sendai) abans de ser col·locades a l'espai perivitel·lí de l'òocit, com en el cas de la fusió elèctrica. Però en aquest cas la fusió de les dues membranes plasmàtiques es produeix espontàniament, sense haver d'aplicar un pols elèctric. Es tracta d'un mètode utilitzat recentment amb èxit en oòcits humans, en els quals l'aturada meiótica és molt sensible a les manipulacions de l'òocit i això permet evitar l'activació prematura d'aquest (Tachibana *et al.* 2009, 2013a).

1.1.3.3. Activació partenogenètica de l'òocit reconstruït

Per tal que s'iniciï el desenvolupament embrionari cal que l'òocit rebi un senyal d'activació. En condicions normals, els oòcits en MII són fecundats per un espermatozoide que, en penetrar la membrana plasmàtica de l'òocit, posa en marxa diverses vies moleculars que culminen en l'increment dels nivells de Ca^{2+} i la disminució dels nivells del MPF intracel·lulars, entre altres (Lee *et al.* 2013; Schultz i Kopf 1995; Toth *et al.* 2006). En canvi, en la SCNT els oòcits reconstruïts han de rebre un estímul artificial, que tant pot ser físic com químic, que comporti l'increment en els nivells de Ca^{2+} intracel·lular i la conseqüent activació. A més, sovint cal inhibir l'extrusió del segon corpuscle polar per evitar la generació d'un embrió haploide (figura 2) i per

això els mètodes d'activació es combinen sovint amb el cultiu dels embrions amb inhibidors de la citocinesi, en la majoria de casos l'inhibidor de la polimerització dels filaments d'actina citocalasina B (CB) (Kishigami *et al.* 2006a; Wakayama *et al.* 1998). Recentment, però, la substitució de la CB pel també inhibidor de la polimerització dels filaments d'actina latrunculina A (LatA) ha suposat un increment en les taxes de desenvolupament a terme dels embrions clonats de porc (Himaki *et al.* 2010) i de ratolí (Terashita *et al.* 2012). Aquest millor desenvolupament ha estat atribuït a una major reversibilitat de la inhibició de la polimerització dels filaments d'actina exercida per la LatA en comparació amb la CB (Terashita *et al.* 2012), i també a la correcció de la distribució anormal de la F-actina en embrions clonats amb CB, la qual resulta en una menor incidència de segregacions cromosòmiques anormals i un major desenvolupament a terme (Terashita *et al.* 2013). Per tant, a diferència del que s'havia pensat inicialment (Wakayama i Yanagimachi 2001), la reversibilitat d'aquests inhibidors podria ser molt important pel correcte desenvolupament dels embrions i l'eficiència de la SCNT.

A continuació es detallen els mètodes d'activació més emprats en la SCNT (revisat per Alberio *et al.* 2001; Campbell *et al.* 2007; Macháty i Prather 1998):

L'activació per electroporació normalment s'utilitza quan la transferència de la cèl·lula donadora del nucli es realitza mitjançant fusió elèctrica. Consisteix simplement en utilitzar un medi de cultiu amb Ca^{2+} durant la reconstrucció de l'oòcit. En aplicar el pols elèctric, a més de la fusió de la cèl·lula donadora amb l'oòcit receptor, es produeix la formació temporal de porus de membrana per on entra el Ca^{2+} dins l'oòcit i desencadena la reacció d'activació (Kawano *et al.* 2004; Tan *et al.* 1997).

Alternativament, l'activació es pot aconseguir amb ionòfors de calci, com el A23187 o la ionomicina, o amb etanol, els quals també provoquen l'augment dels nivells de calci intracel·lular (Ilyin i Parker 1992; Morgan i Jacob 1994). Sovint, però, aquests tractaments no són suficients i cal combinar-los amb inhibidors de fosforilació (p. ex. la 6-dimetilaminopurina o 6-DMAP) o de la síntesi de proteïnes (p. ex. la cicloheximida o la puomicina), els quals assegurin la davallada de l'activitat del MPF (Susko-Parrish *et al.* 1994; Yang *et al.* 1994).

Finalment, l'activació amb clorur d'estronci s'utilitza en ratolí i consisteix en incubar els oòcits reconstruïts en un medi lliure de calci que conté clorur d'estronci (Ma *et al.* 2005). El clorur d'estronci s'uneix i activa els llocs d'unió al calci del receptor inositol 1,4,5-trifosfat, molt important per desencadenar l'activació en ratolí (Mehlmann *et al.* 1996). A diferència dels mètodes d'activació anteriors, el clorur d'estronci presenta l'avantatge que provoca l'alliberament del calci intracel·lular en onades repetitives, de manera similar a la situació natural que té lloc quan l'oòcit s'activa per fecundació (Ducibella i Fissore 2008; Lee *et al.* 2013), i potser per això proporciona millors resultats que l'activació elèctrica o amb etanol en ratolí (Kishikawa *et al.* 1999).

1.1.3.4. Cultiu *in vitro* i desenvolupament preimplantacional

Una vegada activats, els embrions de les espècies en les quals es disposa de bons sistemes de cultiu es poden deixar en cultiu per tal de caracteritzar el seu desenvolupament *in vitro*. Per exemple, existeixen medis adequats per al cultiu dels embrions murins, com el CZB i el medi simple de potassi optimitzat (KSOM) (Biggers *et al.* 2000; Chatot *et al.* 1989; Lawitts i Biggers 1991a,b), i per al cultiu dels embrions bovins (Gandhi *et al.* 2000). En canvi, els embrions de porc normalment es transfereixen directament a femelles receptores per falta d'un bon sistema de cultiu *in vitro* (Petersen *et al.* 2008). Val a dir, però, que la sensibilitat als medis de cultiu varia entre els embrions fecundats i els embrions SCNT (Heindryckx *et al.* 2001, 2006; Latham *et al.* 2005; Xiong *et al.* 2014), i, en ratolí, també entre soques (Gao *et al.* 2004a). A més, els requeriments nutricionals dels embrions clonats depenen del tipus de cèl·lula somàtica utilitzada com a donadora del nucli (Gao *et al.* 2003). En els embrions obtinguts per SCNT ha de tenir lloc una profunda reprogramació nuclear que silenciï el genoma del nucli donador, però aquest silenciament sovint és incomplet o es dona progressivament al llarg del desenvolupament embrionari. En concordança, s'ha vist que a l'inici del cultiu els embrions clonats es desenvolupen millor en el medi de cultiu de la cèl·lula somàtica utilitzada com a donadora del nucli que en medis embrionaris com el KSOM i el CZB (Gao *et al.* 2003). També s'ha vist que petites modificacions en la composició del medi de cultiu, com un increment en el percentatge de glucosa del medi CZB (Chung *et al.* 2002; Gao *et al.* 2003; Kwong *et al.* 2012), o la retirada de l'àcid etilendiamintetraacètic (EDTA) i la glutamina dels medis CZB i M16 (Dai *et al.* 2009) o dels aminoàcids del medi KSOM (Gao *et al.* 2003), milloren les taxes de desenvolupament dels embrions obtinguts per SCNT. A més, s'ha demostrat que els embrions clonats es desenvolupen adequadament en concentracions atmosfèriques d'oxigen (Gao *et al.* 2003; Wakayama *et al.* 1998). En canvi, els embrions fecundats no necessiten glucosa en el medi de cultiu i es desenvolupen millor en medi KSOM amb aminoàcids i en concentracions reduïdes d'oxigen (revisat per Latham *et al.* 2005). D'altra banda, s'ha observat que el tipus de medi de cultiu utilitzat no només afecta les taxes de desenvolupament *in vitro* si no també exerceix un efecte significatiu sobre altres paràmetres com, per exemple, l'expressió del gen de pluripotència *Oct4* (Arias *et al.* 2013; Boiani *et al.* 2005). Per tant, caldrà tenir en compte la cèl·lula donadora del nucli i el medi de cultiu emprats a l'hora d'utilitzar el cultiu *in vitro* per a la caracterització dels embrions clonats.

Les tècniques de caracterització d'embrions preimplantacionals s'utilitzen per obtenir informació de la seva qualitat i per poder predir quins embrions tenen més potencial de desenvolupament. A més, la comparació amb embrions fecundats permet detectar anomalies derivades del procés de SCNT i poder així desenvolupar estratègies per millorar el desenvolupament dels embrions generats per SCNT. Aquestes tècniques es classifiquen en invasives o no invasives en funció de si afecten a la viabilitat embrionària o no, respectivament (revisat per Van Soom *et al.* 2001).

Les tècniques no invasives són útils per seleccionar els millors embrions per transferir. Es basen normalment en l'anàlisi de la morfologia embrionària i les taxes de desenvolupament *in vitro*. Es pot analitzar, per exemple, el nombre de cèl·lules de l'embrió, la simetria entre elles, la presència de fragmentació, el grau de compactació cel·lular, etc. També es pot tenir en compte el temps de cultiu necessari per assolir un estadi de desenvolupament concret, la capacitat d'eclosió de la zona pel·lúcida, etc. Mitjançant aquestes tècniques no invasives s'ha vist que, en general, els embrions provinents de la SCNT presenten unes taxes de desenvolupament preimplantacional inferiors a les dels embrions fecundats, tot i que la magnitud d'aquesta diferència varia molt en funció de l'espècie, la soca o el laboratori (Yang *et al.* 2007b). En el cas de la vaca, per exemple, pràcticament no hi ha diferències entre les taxes de blastocists dels embrions clonats i dels embrions obtinguts per fecundació *in vitro*, que en general es troben entre el 30 i el 60 %. En canvi, en el cas del ratolí, les taxes de desenvolupament *in vitro* dels embrions fecundats es troben entre el 80 i el 90 %, mentre que en els embrions clonats es troben entre el 30 i el 80 %. Aquest darrer rang és molt ampli a causa de les importants diferències detectades entre soques de ratolí. Per exemple, la taxa de blastocists dels embrions clonats de la soca B6D2F1 és molt alta (60-80 %) i per això és una de les soques més utilitzades en experiments de SCNT (Ogura *et al.* 2013). En canvi, els embrions de la soca B6CBAF1 obtinguts per SCNT presenten una taxa de blastocists menor (20-40 %) (Costa-Borges *et al.* 2010, 2011b; Maalouf *et al.* 2009).

En general, però, la morfologia de l'embrió o les taxes de blastocist no són bons marcadors per a la predicció del desenvolupament a terme dels embrions clonats. A més, donat que el desenvolupament embrionari és un procés dinàmic i continu, les observacions puntuals dels embrions durant el cultiu comporta inevitablement una pèrdua d'informació. En aquest sentit, el recent desenvolupament de sistemes de *time-lapse* específics per al cultiu d'embrions està suposant un gran avenç, doncs permet el seguiment individualitzat i continu dels embrions al llarg de tot el període de cultiu i sense alternar-ne les condicions. Aquests sistemes han permès introduir nous marcadors de qualitat embrionària basats en paràmetres cinètics, com la durada de les divisions cel·lulars o d'un estadi embrionari concret (Kirkegaard *et al.* 2012). En embrions humans, per exemple, s'ha descrit un alt valor predictiu del moment en el qual es produeixen les primeres divisions embrionàries, el que permet seleccionar precoçment els embrions amb més potencial de desenvolupament sense haver-ne d'allargar el cultiu *in vitro* (Arav *et al.* 2008; Cruz *et al.* 2012). També s'han pogut correlacionar certes anomalies en la cinètica de divisió amb la presència d'aneuploidies (Aparicio *et al.* 2013). L'aplicació dels sistemes de *time-lapse* al cultiu d'embrions no humans és encara molt reduïda i, en el cas específic dels embrions clonats, els estudis són molt escassos i limitats al ratolí. En comparar la cinètica de desenvolupament dels embrions fecundats i clonats, s'ha vist que aquests últims presenten una sèrie d'alteracions, com un increment del temps necessari per assolir l'estadi de quatre cèl·lules, una compactació prematura o una major asincronia (Balbach *et al.* 2010, 2012). D'altra banda, la metodologia desenvolupada per l'equip de T. Wakayama i col·laboradors amb la qual, a més de la morfologia i la cinètica de desenvolupament, es pot analitzar l'expressió de

tubulina α i histona H2B, ha permès una millor selecció dels embrions de ratolí clonats que són cromosòmicament normals i ha resultat en unes taxes de naixement superiors (Mizutani *et al.* 2012).

Les tècniques invasives sí que afecten la viabilitat de l'embrió, doncs la majoria requereixen una fixació i/o tinció de l'embrió que després es combina amb tècniques moleculars o de microscòpia (revisat per Van Soom *et al.* 2001). Per aquest motiu només poden utilitzar-se en l'àmbit de la recerca, per definir aquells procediments que generen els millors embrions. Aquestes tècniques permeten analitzar característiques embrionàries com el nombre de cèl·lules del blastocist i la seva distribució en els dos llinatges cel·lulars (TE i ICM), la integritat cromosòmica, la distribució dels orgànuls cel·lulars, o bé l'organització del citoesquelet de l'embrió. Per exemple, les diferents tècniques de tinció diferencial del blastocist permeten fer el recompte del nombre de cèl·lules del TE i la ICM en el blastocist (Mallol *et al.* 2013). Aquest recompte s'utilitza habitualment en la caracterització de tot tipus d'embrions perquè la quantitat de cèl·lules de la ICM, que donaran lloc al futur fetus (Yamanaka *et al.* 2006), s'associa directament a la qualitat del blastocist (Leppens *et al.* 1996). En embrions clonats s'han descrit recomptes més baixos de cèl·lules de la ICM i s'ha hipotetitzat que la distribució desproporcionada dels llinatges de la ICM i el TE en embrions bovins clonats resulta en pèrdues fetals durant el desenvolupament postimplantacional subseqüent (Koo *et al.* 2002). Pel que fa a la integritat cromosòmica, en embrions SCNT de ratolí s'ha observat una major incidència d'aberracions estructurals i numèriques en comparació a embrions fecundats (Osada *et al.* 2009). També s'ha descrit que els embrions SCNT de primats (Simery *et al.* 2003), de conills (Yin *et al.* 2002b) i de ratolí (Van Thuan *et al.* 2006) presenten anomalies estructurals en el nucli. D'altra banda, tant la tinció TUNEL com l'assaig "comet", que es basen en la detecció dels trencaments de doble cadena de DNA, permeten detectar els nivells d'apoptosi en embrions (Opiela 2009), però la tinció TUNEL presenta l'avantatge que es pot combinar amb la tinció diferencial (Fouladi-Nashta *et al.* 2005). En general, amb aquestes tècniques s'ha vist que els embrions clonats presenten nivells d'apoptosi més elevats, que es correlacionen amb un increment de l'estrés oxidatiu (Esteves *et al.* 2012) i uns recomptes cel·lulars inferiors en aquests embrions (Park *et al.* 2004; Ju *et al.* 2010).

A més, es poden utilitzar tècniques moleculars (p. ex. PCR) o de immunocitoquímica per estudiar la reprogramació nuclear en els embrions clonats. Per exemple, es poden utilitzar anticossos per detectar modificacions epigenètiques que se sap que pateixen canvis durant el desenvolupament embrionari, o per detectar l'expressió de gens essencials per a la viabilitat de l'embrió. *Oct4* és un gen de pluripotència que s'expressa fortament en les cèl·lules de la morula i de la ICM del blastocist fecundat (Yamanaka *et al.* 2006). En embrions clonats, s'ha descrit una expressió anormal d'aquest marcador i per tant una menor pluripotència de la ICM (Boiani *et al.* 2002, 2005; Cavaleri *et al.* 2008). En general, s'han detectat moltes anomalies en les modificacions epigenètiques dels embrions clonats, que donen lloc a perfils anormals d'expressió gènica (vegeu l'apartat 1.2.).

1.1.3.5. Transferència embrionària i desenvolupament postimplantacional

El moment idoni per realitzar la transferència dels embrions clonats a femelles receptores per aconseguir el naixement de clons varia segons l'espècie (Campbell *et al.* 2007). Per exemple, els embrions de porc s'han de transferir, un cop activats, directament als oviductes de la femella receptora, mitjançant una intervenció quirúrgica, perquè no es disposa de bons sistemes de cultiu (Petersen *et al.* 2008). En canvi, els embrions bovins normalment es transfereixen a l'estadi de morula o blastocist, sense haver de realitzar cap cirurgia. En el cas del ratolí, la transferència tant es pot realitzar a l'estadi de dues cèl·lules als oviductes mitjançant una petita intervenció, com a l'estadi de blastocist directament a l'úter per via cervical (Green *et al.* 2009), però donat que els embrions clonats són molt sensibles al medi de cultiu (Gao *et al.* 2003; Heindryckx *et al.* 2001, 2006; Latham *et al.* 2005) sovint la transferència es realitza el més aviat possible (Kishigami *et al.* 2006a; Wakayama *et al.* 1998).

D'altra banda, en espècies múltiples com el porc i el ratolí, calen un mínim d'embrions implantats a l'úter per a un correcte reconeixement i manteniment de la gestació (King *et al.* 2002; Polge *et al.* 1966). Per això, atès que els embrions clonats presenten unes taxes d'implantació molt baixes, sovint la transferència dels embrions clonats es combina amb la cotransferència d'embrions fecundats o partenogenètics, els quals s'implanten més fàcilment (De Sousa *et al.* 2002; Meng *et al.* 2008). Normalment s'utilitzen embrions partenogenètics perquè a més presenten l'avantatge que mai arriben a terme (Surani *et al.* 1984) i, per tant, no competeixen amb els embrions clonats durant etapes més avançades del desenvolupament postimplantacional.

Una vegada l'embrió s'implanta a l'úter matern, s'inicia la gestació i el desenvolupament postimplantacional d'aquest. La transferència dels embrions a femelles receptores permet determinar el seu potencial de desenvolupament a terme i és el mètode ideal d'avaluació de la qualitat dels embrions clonats, ja que permet demostrar que són capaços d'establir i mantenir una gestació, desenvolupant-se fins el moment del naixement. En aquells casos en què el desenvolupament a terme dels clons és molt improbable també es pot interrompre l'embaràs per l'estudi dels punts d'implantació, l'aparició de la línia primitiva (inici gastrulació), etc. Però si les cries arriben a néixer, després es pot caracteritzar el seu fenotip i fer un seguiment del seu desenvolupament fins l'etapa adulta, la fertilitat i l'esperança de vida. Malauradament, per motius pràctics i econòmics no sempre es possible realitzar transferències d'embrions i per això són tant importants els mètodes d'avaluació de la qualitat dels embrions preimplantacionals esmentats anteriorment.

Tot i que hi ha variabilitat en funció de la soca (figura 3), l'espècie o el tipus de cèl·lula donadora del nucli utilitzada, les taxes de gestació i naixement dels clons en general són molt baixes, i això s'associa a una reprogramació incompleta o defectuosa del nucli somàtic (vegeu l'apartat 1.2.3.) (Wakayama i Wakayama 2010; Yang *et al.* 2007b). Per exemple, en el cas del ratolí les taxes de naixement de clons són molt baixes i, quan no es tracten amb modificadors

epigenètics (vegeu l'apartat 1.3), es troben al voltant del 1-3 %, en comparació al 50-60 % obtingut amb embrions generats per fecundació *in vitro*. En les vaques, les taxes de naixement dels embrions clonats (5-15 %) i dels fecundats (40-60 %) també són molt diferents.

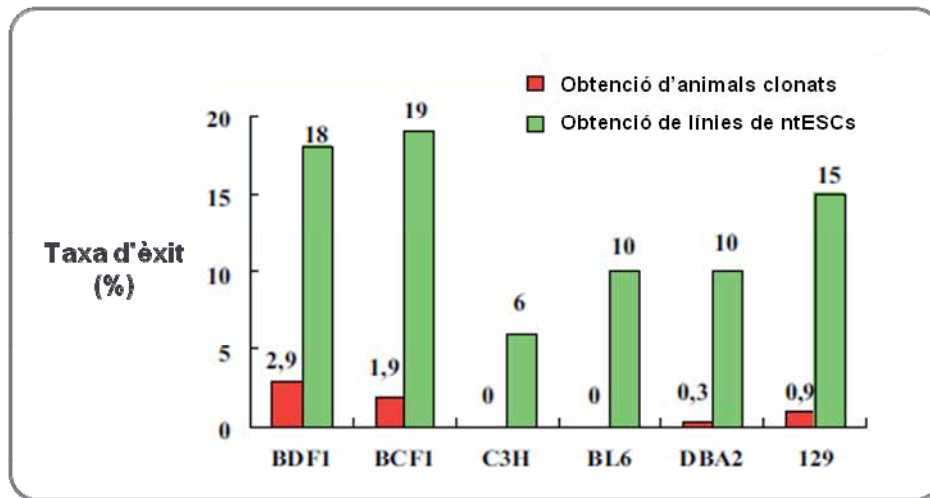


Figura 3. Comparació de l'eficiència d'obtenció d'animals clonats i de línies de ntESCs en diverses soques de ratolí. Les taxes d'èxit varien en funció de la soca, però en general l'eficiència d'obtenció de les ntESCs és al voltant de 10 vegades superior a l'obtenció de ratolins clonats. A més, s'han pogut obtenir línies de ntESCs en soques de ratolí on el clonatge reproductiu no és possible (C3H o C57BL/6 (BL6)). Figura modificada de Wakayama i Wakayama (2010).

Els embrions clonats solen presentar greus anomalies en la formació de la placenta i per això la majoria (80-99 %) no superen els primers estadis de desenvolupament postimplantacional (Chavatte-Palmer *et al.* 2012; Joneau *et al.* 2006; Suemizu *et al.* 2003; Tanaka *et al.* 2001; Wakayama i Yanagimachi 1999). L'origen dels problemes en la formació de la placenta dels clons ha estat àmpliament estudiat, però encara no està clar si es deuen a defectes en els teixits embrionaris o extraembrionaris o a una mala comunicació entre ambdós teixits (revisat per Ogura *et al.* 2013 i Whitworth i Prather 2010). No obstant, alguns clons arriben a néixer i la majoria presenten la síndrome del *large offspring* (LOS), que es caracteritza per uns períodes de gestació més llargs i placentes i cries anormalment grans, entre altres (revisat per Niemann i Lucas-Hahn 2012; Whitworth i Prather 2010; Yang *et al.* 2007b). Molt sovint, l'esperança de vida dels clons és menor a causa dels problemes cardiovasculars o respiratoris i l'obesitat adulta derivats de la LOS, o a causa de problemes específics detectats com deficiències immunològiques o pneumònia (Ogonuki *et al.* 2002; Ogura *et al.* 2002). Per exemple, en el cas de la vaca, s'ha descrit que el 42 % dels clons nascuts moren abans dels 150 dies de vida (Panarace *et al.* 2007) i la mort prematura en els clons d'aquesta espècie ha estat relacionada amb el pes en el moment de néixer (Akagi *et al.* 2013). En canvi, en el cas del ratolí, tot i que tots els clons nascuts pesen més i presenten placentes anormalment grans, només una minoria no supera les primeres setmanes de vida. Afortunadament, malgrat totes aquestes anomalies

en el desenvolupament postimplantacional, la majoria dels clons que arriben a l'etapa adulta són saludables i fèrtils (Cibelli *et al.* 2002).

1.1.3.6. Derivació de cèl·lules mare embrionàries

El desenvolupament de les tècniques de derivació i caracterització d'ESCs obtingudes a partir d'embrions fecundats ha aportat un nou mètode de caracterització dels embrions clonats en funció de si són capaços de donar lloc a línies de cèl·lules mare (ntESCs). No obstant, actualment només és possible obtenir línies autèntiques de ntESCs en el ratolí (Wakayama i Wakayama 2010), el macac (Byrne *et al.* 2007) i en humans (Tachibana *et al.* 2013b; Yamada *et al.* 2014). En altres espècies, com la vaca, les cèl·lules obtingudes són només parcialment pluripotents (Cibelli *et al.* 1998b). Les eficiències d'obtenció de les ntESCs en ratolí varien molt entre soques (figura 3) però, en general, el procés és molt més eficient (5-20 %) que l'obtenció d'animals clonats (Wakayama i Wakayama 2010; Yang *et al.* 2007b). Això es deu a què a vegades la reprogramació nuclear que té lloc en la SCNT no és suficient per poder obtenir el desenvolupament a terme dels embrions clonats, però sí per poder derivar-ne una línia de ntESC. Per això, per poder obtenir el naixement de clons d'una cèl·lula o organisme concrets a vegades és necessari derivar primer ntESCs a partir dels embrions clonats i utilitzar després aquestes cèl·lules com a donadores del nucli en una segona ronda de transferència nuclear (Wakayama i Wakayama 2010).

En ratolí, el procés de derivació s'inicia quan els embrions, normalment en estadi de blastocist i lliures de la zona pel·lúcida, s'enganxen a sobre d'una monocapa de fibroblasts embrionaris de ratolí inactivats, en un medi que conté factor inhibidor de la leucèmia (LIF) i β -mercaptoetanol, els quals afavoreix la proliferació i formació de colònies de cèl·lules de la ICM. Posteriorment, aquestes colònies continuen propagant-se donant lloc a línies de cèl·lules pluripotents (Brook i Gardner 1997). Una vegada establertes les línies, es pot caracteritzar la seva pluripotència estudiant els perfils epigenètics i d'expressió gènica, la inactivació del cromosoma X, el potencial de formació de quimeres, la transmissió a la línia germinal, etc. (Calloni *et al.* 2013), i es poden comparar els resultats amb els obtinguts amb les ESCs que provenen d'embrions fecundats. La majoria d'aquests estudis han conclòs que no existeixen diferències significatives entre les ntESCs i les ESCs a nivell postranscripcional (Brambrink *et al.* 2006; Ding *et al.* 2009; Wakayama *et al.* 2006) ni en quant a la seva capacitat de diferenciació (Kobolak *et al.* 2012).

1.1.4. Aplicacions del clonatge

El fenomen de la reprogramació nuclear que té lloc durant la SCNT constitueix una eina molt important per a l'estudi dels processos epigenètics que tenen lloc durant el desenvolupament embrionari, la diferenciació cel·lular i l'envelliment (Kishigami *et al.* 2013). Per exemple, la SCNT ha contribuït enormement a l'estudi dels mecanismes d'inactivació del cromosoma X

(Oikawa *et al.* 2014) o d'esborrament de les marques d'impressió genètica en les cèl·lules primordials germinals (Lee *et al.* 2002) (vegeu l'apartat 1.2).

Però a part de ser una tècnica utilitzada com a eina per a la investigació bàsica, existeixen moltes altres aplicacions de gran interès en els camps de la ramaderia, la biotecnologia, la biomedicina, etc. En general, quan els embrions obtinguts mitjançant SCNT són transferits a femelles receptores per a l'obtenció d'individus clonats es parla de clonatge reproductiu. En canvi, quan els embrions clonats són utilitzats per a la derivació de ntESCs aleshores es defineix com clonatge terapèutic (figura 4). A continuació es detallen algunes de les aplicacions que presenten els dos tipus de clonatge.

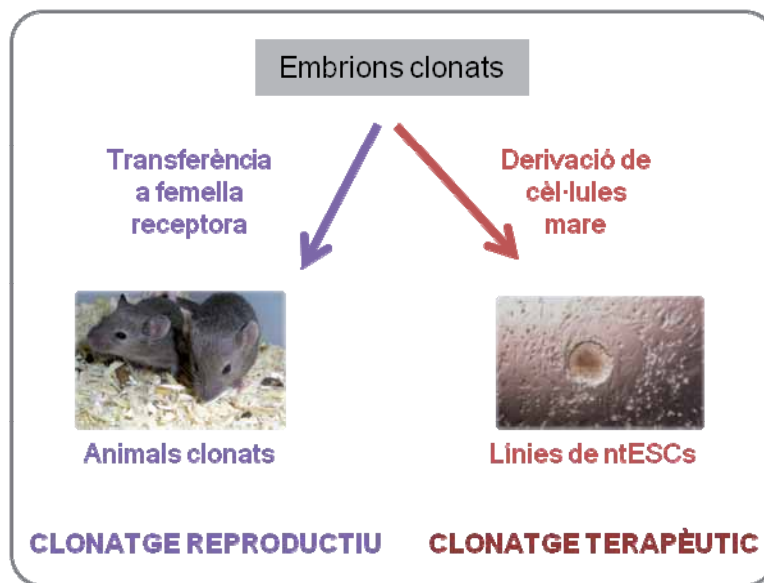


Figura 4. Clonatge reproductiu i terapèutic. Quan els embrions clonats són transferits a femelles receptores per a l'obtenció d'individus clonats es parla de clonatge reproductiu. En canvi, quan els embrions clonats són utilitzats per a la derivació de ntESCs aleshores es defineix com clonatge terapèutic .

1.1.4.1. Clonatge reproductiu

Tot i que, en principi, el clonatge reproductiu es podria aplicar tant en humans com en animals, es considera que la reproducció d'individus humans mitjançant el clonatge atemptaria contra la dignitat i integritat humanes i per això està prohibida per llei en tot el món. En el cas de la legislació espanyola, la llei 14/2006 del 26 de maig sobre tècniques de reproducció humana assistida, redactada seguint les directrius del conveni europeu sobre drets humans i biomedicina signat a Oviedo el 20 d'Octubre de 1999, diu textualment "*se prohíbe la clonación en seres humanos con fines reproductivos*". A més, en la moratòria emesa per l'organització d'experts que conformen la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (www.eshre.eu), entre altres, es posen de manifest les objeccions pràctiques i ètiques sobre la

possibilitat de clonar humans. Idealment, el clonatge d'individus humans es podria utilitzar com una tècnica per a l'obtenció de descendència de parelles infèrtils o de parelles homosexuals, per a la substitució d'un fill mort o fins i tot per aconseguir la immortalitat. Òbviament, es tracta d'aplicacions teòriques. A més, la possibilitat d'aconseguir clonar individus humans ha estat àmpliament qüestionada donats els fracassos obtinguts en altres espècies de primats (Sparman *et al.* 2010). Malgrat això, arrel del naixement de l'ovella Dolly, al 1997 es va fundar una companyia anomenada *Clonaid* que oferia el servei de clonatge d'humans i que va proclamar el naixement de diversos bebès clonats. Però el fet que fos una pràctica totalment prohibida i la falta de proves, entre altres, resten credibilitat a les fites teòricament aconseguides per la companyia.

Pel que fa al clonatge reproductiu d'animals, de la mateixa manera que la inseminació artificial o la fecundació *in vitro*, la SCNT és una altra tècnica de reproducció assistida que permet la propagació d'animals amb característiques desitjables pels humans. Però a diferència de les altres tècniques, la SCNT presenta com a avantatge la possibilitat d'obtenir còpies genèticament idèntiques (a excepció del DNA mitocondrial).

A continuació es descriu el gran ventall d'aplicacions del clonatge reproductiu en animals (Niemann i Lucas-Hahn 2012).

Aplicacions en la ramaderia

El clonatge ha estat realitzat amb èxit en la majoria de les espècies utilitzades en ramaderia, com l'ovella (Wilmut *et al.* 1997), la vaca (Cibelli *et al.* 1998a; Kato *et al.* 1998), la cabra (Baguisi *et al.* 1999), el porc (Polejaeva *et al.* 2000) o el cavall (Galli *et al.* 2003), entre d'altres. En conseqüència, existeix la possibilitat de generar còpies d'aquests animals amb un interès comercial i això constitueix una eina molt important per la ramaderia (Campbell *et al.* 2005, 2007; Paterson *et al.* 2003). Per exemple, es poden clonar vaques amb una bona producció de llet (Yonai *et al.* 2005) o cavalls de carreres que han estat castrats i no es podrien reproduir d'altra manera (Galli *et al.* 2008). Empreses com *ViaGen* (Texas, EEUU), *Cryozootech* (Sonchamp, França) o *Embryotools* (Barcelona, Espanya) es dediquen a oferir el clonatge d'aquests animals a nivell comercial.

Per tal de fer possible el consum de productes d'origen clònic, s'han realitzat diversos estudis que no han trobat diferències significatives entre els productes d'origen clonat i no clonat (Fox 2008; Rudenko *et al.* 2007; Takahashi i Ito 2004; Tomé *et al.* 2004; Yamaguchi *et al.* 2007). Per tant, s'ha demostrat que els productes provinents d'animals clonats i els seus descendents són igual de segurs que els que provenen dels seus homòlegs produïts de manera convencional. Però les agències reguladores de cada país controlen l'aplicació d'aquesta tècnica en animals de ramaderia i el consum dels productes derivats. Per exemple, mentre que als EEUU es poden consumir avui en dia la carn i la llet derivades dels animals clonats i la seva descendència, a Europa ha estat una qüestió debatuda en els darrers anys i actualment

existeix una prohibició del consum de clons i productes provinents de clons (2011-2016).
<http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm116836.htm>
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/cloning.htm>.

Aplicacions en la biotecnologia: animals transgènics

Els animals transgènics constitueixen una eina de recerca i de producció amb molt potencial. Per exemple, són molt útils per estudiar la funció d'un gen i la seva regulació o participació en processos biològics com la infecció, el desenvolupament de malalties, etc. A més, s'utilitzen com a models de malalties genètiques conegudes o com a bioreactors per a la producció de proteïnes d'interès o fins i tot d'òrgans per a xenotrasplantaments (Luo *et al.* 2012). Alternativament, també es poden generar animals transgènics amb un major interès comercial en front els seus homòlegs naturals. Per exemple, s'han generat vaques transgèniques sense proteïnes priòniques (Richt *et al.* 2007) o amb una sobreexpressió de caseïna en la llet (Brophy *et al.* 2003). El primer producte provinent d'un animal transgènic aprovat com a fàrmac va ser la antitrombin III (Atryn[®]) de *GTC-Biotherapeutics*, USA, produït per la glàndula mamària de cabres transgèniques. Actualment, s'utilitza per tractar als pacients resistents a l'heparina (Niemann i Lucas-Hahn 2012).

La microinjecció de DNA als pronuclis d'un zigot va ser la primera tècnica que permetia la generació d'animals transgènics (Hammer *et al.* 1985). Però tot i que es tracta d'una tècnica disponible en totes les espècies d'interès domèstic, la integració del transgen és aleatòria i per tant en moltes de les gestacions produïdes l'animal no ha incorporat el transgen o s'ha alterat algun gen endògen. Posteriorment, amb el desenvolupament de les ESCs, va sorgir la possibilitat de modificar genèticament les ESCs mitjançant recombinació homòloga i després injectar-les a la ICM del blastocist per generar animals transgènics quimèrics. Aquest mètode permet realitzar una integració dirigida del transgen, i per tant la generació d'animals *knock-in* i *knock-out*, ja que permet seleccionar les ESCs que han integrat el transgen abans de realitzar la injecció embrionària (Capecchi *et al.* 2005). Però, malauradament, les ESCs són una tecnologia que de moment no està disponible en cap de les espècies d'interès productiu (Mitalipov i Wolf 2009) i, per tant, la generació d'animals transgènics presentava fins ara moltes limitacions en aquestes espècies (Houdebine *et al.* 2002). Amb el desenvolupament de la SCNT, va sorgir la possibilitat de modificar genèticament qualsevol cèl·lula i després utilitzar-la com a donadora del nucli per generar un individu transgènic. De la mateixa manera que amb la injecció d'ESCs a l'embrió, en la transgènesi per SCNT també es pot caracteritzar molt bé la modificació genètica abans de generar l'embrió transgènic, però aquesta tècnica a més presenta l'avantatge que està disponible en totes les espècies domèstiques. I, a diferència de la injecció a pronuclis i la injecció d'ESCs, el clonatge és l'única tècnica que permet que el 100 % dels animals nascuts presentin la modificació genètica en totes les seves cèl·lules (revisat per Lai i Prather 2003; Luo *et al.* 2012; Paterson *et al.* 2003). Per tant, malgrat les baixes taxes de naixement que presenta, la SCNT era fins fa poc la millor tècnica per a la generació d'animals

transgènics disponible avui en dia en espècies domèstiques (revisat per Luo *et al.* 2012; Niemann i Lucas-Hahn 2012; Vajta i Gerris 2006). Molt recentment, però, s'han desenvolupat nous sistemes d'edició de genomes com les nucleases de dit de zinc (ZFNs) o efectores de transcripció de tipus activador (TALENs) o el sistema CRISPR/Cas, els quals permeten aconseguir la modificació genètica de manera més precisa i eficient que per recombinació homòloga (Gaj *et al.* 2013). Per exemple, l'ús d'un d'aquests nous sistemes, les TALENs, en combinació amb la SCNT ha permès l'obtenció de tres clons de porc miniatura sense epítops *Gal* a la superfície de les seves cèl·lules, els òrgans dels quals serien uns bons candidats per a xenotrasplantaments (Xin *et al.* 2013) (revisat per Niemann i Lucas-Hahn 2012).

Aplicacions en la preservació d'espècies o la recuperació d'animals morts

El clonatge és una tècnica que permet incrementar la població d'animals d'espècies en perill d'extinció o fins i tot recuperar espècies animals ja extingides mitjançant la SCNT interespecífica (iSCNT). Per a la iSCNT, cal disposar de femelles d'una espècie el més propera possible perquè actuïn com a donadores dels oòcits i puguin gestar els embrions clonats. Malauradament, aquesta compatibilitat entre l'espècie a clonar i l'espècie receptora no sempre és possible i sembla que l'heteroplàsmia mitocondrial generada en la iSCNT té un gran efecte sobre la seva eficiència (revisat per Beyhan *et al.* 2007; Loi *et al.* 2011; Ogura *et al.* 2013; St John i Lovell-Badge 2007). No obstant, s'ha aconseguit el clonatge interespecífic en diverses espècies. Per exemple, el gaur, un bòvid asiàtic, va ser la primera espècie salvatge clonada i es va aconseguir mitjançant la iSCNT utilitzant femelles de vaca, tot i que l'únic exemplar clonat obtingut va morir a les poques hores de néixer a causa d'una infecció intestinal (Lanza *et al.* 2000). Posteriorment, es va aconseguir clonar el mufló, el gat salvatge o el llop, utilitzant femelles d'ovella, de gat domèstic i de gos, respectivament, com a donadores dels oòcits i receptores dels embrions clonats (revisat per Beyhan *et al.* 2007). En quant a espècies animals ja extingides, l'única en ser clonada fins ara ha estat l'herc, una subespècie de cabra hispànica dels Pirineus, però malauradament va morir minuts després d'haver nascut per problemes físics als pulmons (Folch *et al.* 2009). Actualment, s'està realitzant un ambiciós projecte entre investigadors de Rússia i del Japó per intentar clonar un mamut a partir de restes congelades trobades a Sibèria, utilitzant oòcits d'elefant, però encara no s'ha donat a conèixer cap resultat.

Evidentment, cal haver conservat teixit de l'individu a clonar per poder utilitzar les seves cèl·lules originals com a donadores del nucli. La possibilitat d'obtenir clons a partir d'un organisme congelat sense crioprotector durant molts anys va ser demostrada per primera vegada en el ratolí (Wakayama *et al.* 2008b). En aquest cas, el ratolí donador del nucli havia estat congelat sencer a -20°C i l'obtenció del ratolí clonat no es va poder realitzar en un sol pas, sinó que es varen derivar ntESCs del primer embrió clonat, que després varen ser utilitzades com a donadores de nucli en una segona ronda de transferència nuclear. Poc més tard, també es va aconseguir clonar un bou a partir d'òrgans que havien estat congelats 10 anys a -80°C sense crioprotector (Hoshino *et al.* 2009).

A més d'espècies en perill d'extinció o ja extingides, també és possible clonar mascotes, com gats i gossos, després de la seva mort. Això va donar peu al sorgiment d'empreses privades que oferien aquest servei com per exemple *Sooam Biotech*, *Genetic Savings&Clone* i *BioArts-International*. No obstant, la falta de demanda i les diferències entre la mascota original i el clon (Mastromonaco i King 2007) han portat a les dues darreres a la desaparició al 2006 o al cessament del servei al 2009, respectivament.

1.1.4.2. Clonatge terapèutic

Mentre que el clonatge reproductiu no es contempla en l'espècie humana, la possibilitat de generar embrions humans per SCNT a partir dels quals es podrien obtenir ntESCs que podrien donar lloc a qualsevol tipus de cèl·lula isogènica, i per tant, histocompatible amb l'individu donador del nucli somàtic, té un gran potencial en el camp de la teràpia cel·lular per a la regeneració de teixits, ja que aquestes cèl·lules no generarien un rebuig després del trasplantament (figura 5).

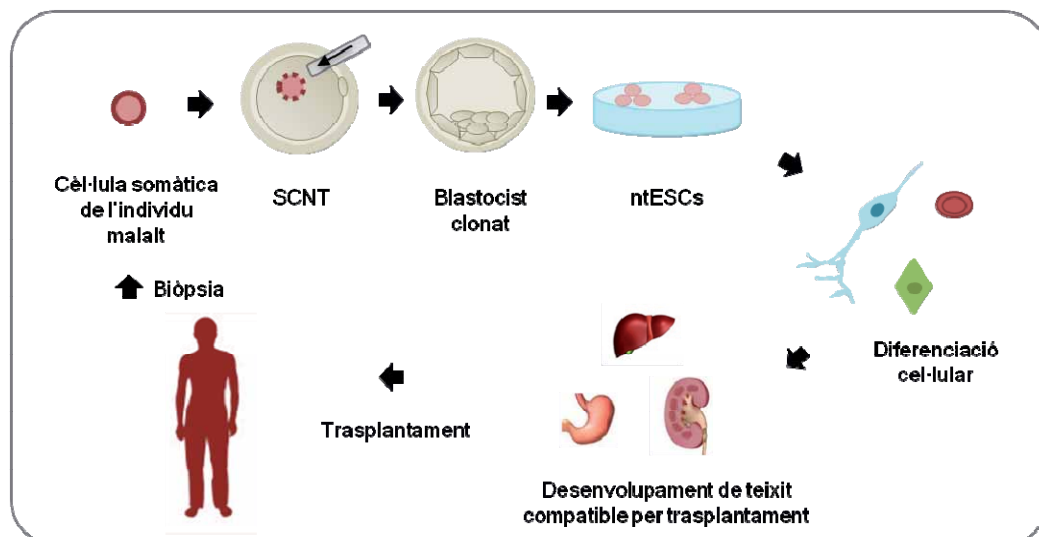


Figura 5. Esquema del clonatge terapèutic en humans. La SCNT permetria la generació d'embrions a partir dels quals es podrien derivar ntESCs específiques de pacient potencialment diferenciables a qualsevol tipus cel·lular sense risc de rebuig del pacient.

Les ESCs es varen derivar per primera vegada en ratolí (Evans i Kauman 1981; Martin 1981) i més tard en el macac (Thomson *et al.* 1995) i en humans (Thomson *et al.* 1998). Des d'aleshores no s'ha deixat de fer recerca en els processos biològics que permeten la seva obtenció i la seva posterior diferenciació a qualsevol tipus cel·lular. Malgrat els avenços realitzats en les ESCs de ratolí i de primats, l'obtenció d'ESCs en altres espècies ha estat molt limitada. Així, només ha estat possible obtenir cèl·lules parcialment pluripotents, que no mantenen l'estat indiferenciat durant llargs períodes de cultiu, en ovella (Handyside *et al.* 1987),

vaca (Evans *et al.* 1990), porc (Notarianni *et al.* 1990), conill (Giles *et al.* 1993) i rata (Iannaccone *et al.* 1994).

Les ntESCs també es varen generar per primera vegada a partir d'embrions de ratolí (Kawase *et al.* 2000; Munsie *et al.* 2000) i, poc després, es varen utilitzar en el primer experiment de teràpia regenerativa per tractar amb èxit ratolins immunodeficients, un cop reparada la mutació per recombinació homòloga en les ntESCs i diferenciades a precursors hematipoiètics (Rideout *et al.* 2002). La comparació dels perfils d'expressió gènica, de la capacitat de diferenciació i del potencial terapèutic entre les ntESCs i les ESCs de ratolí no ha resultat en cap diferència significativa (Brambrink *et al.* 2006; Ding *et al.* 2009; Kobolak *et al.* 2012; Wakayama *et al.* 2006) i per això aquestes cèl·lules tenen un gran potencial en la medicina regenerativa.

Byrne *et al.* (2007) varen aconseguir línies de ntESCs en el primat *Rhesus macaque* i aquest treball va suposar la reprogramació, per primera vegada, de cèl·lules somàtiques d'un primat adult a ESCs. No obstant, la derivació de línies de ntESCs humanes no s'ha aconseguit fins molt recentment (taula 1). Això es deu a què, tot i el seu gran potencial, la recerca en el camp del clonatge humà s'ha vist limitada per la baixa disponibilitat d'oòcits humans de bona qualitat i per les diferències entre l'espècie humana i altres espècies de mamífers on el protocol de SCNT s'ha pogut optimitzar prèviament. Per exemple, molts estudis s'han realitzat utilitzant oòcits de mala qualitat descartats per a procediments de fecundació *in vitro* o injecció intracitoplasmàtica d'espermatozoides (ICSI) (revisat per Fulka *et al.* 2013). D'altra banda, les objeccions ètiques sobre l'ús d'embrions humans per a experimentació també ha limitat el desenvolupament d'aquesta tecnologia (Burgin 2009) i ha motivat el desenvolupament de tècniques alternatives per obtenir cèl·lules mare prescindint d'embrions (vegeu l'apartat 1.2.4.). Malgrat tot, els avenços realitzats en els darrers anys han permès la millora del protocol de SCNT en humans i la recent obtenció de ntESCs humanes amb una eficiència relativament elevada, al menys una línia de ntESCs per cada cicle de donació d'oòcits. Les claus d'aquest recent èxit han estat l'ús de la cafeïna per evitar l'activació prematura dels oòcits, l'ús d'un extracte viral hemaglutinant inactivat per a la transferència del nucli donador (Tachibana *et al.* 2009) i el tractament dels embrions clonats amb modificador epigenètics per millorar la reprogramació nuclear (Tachibana *et al.* 2013b). A més, s'ha pogut obtenir una línia de ntESCs d'una dona amb diabetis de tipus I, que després s'ha pogut diferenciar a diferents tipus cel·lulars com neurones, cèl·lules precursors del pàncrees i cèl·lules productores d'insulina. Per tant, aquesta línia proporciona una eina de treball per l'estudi del desenvolupament i el tractament de la diabetis tipus I (Yamada *et al.* 2014). La manca de diferències en la comparació dels nivells de metilació del DNA i dels perfils de transcriptòmic d'aquestes ntESCs humanes amb les ESCs obtingudes a partir d'embrions fecundats fa pensar que les cèl·lules somàtiques humanes es reprogramen de manera fidel cap a l'estat pluripotent mitjançant la SCNT, i per tant les ntESCs serien ideals per a la teràpia cel·lular (Ma *et al.* 2014).

Taula 1. Resum dels treballs de clonatge terapèutic en humans.

Font d'òocits/zigots	Cèl·lula donadora del nucli	Tractament amb modificador epigenètic	Nombre d'òocits/zigots reconstruïts	Taxa de blastocist	Taxa de línies NT-ESC	Referència
Oòcits descartats	hESC	-	10	0-1 %	-	Stojkovic <i>et al.</i> 2005
Oòcits descartats	Fibroblasts i hESC	-	1-18	0 %	-	Hall <i>et al.</i> 2007
Oòcits descartats o madurats in vitro	Cèl·lules del cúmulus	-	6-27	0 %	-	Heindryckx <i>et al.</i> 2007
Oòcits madurats in vivo	Fibroblasts adults	-	21	23 %	-	French <i>et al.</i> 2008
Oòcits madurats in vitro i in vivo	Cèl·lules del cúmulus	-	49	0 %	-	Chung <i>et al.</i> 2009
Oòcits d'estimulació ovàrica	Fibroblasts i limfòcits adults	-	26	19,2 %	-	Li <i>et al.</i> 2009
Oòcits d'estimulació ovàrica	Fibroblasts adults	-	56	7-1 %	-	Yu <i>et al.</i> 2009
Zigots congelats donats a la recerca	Fibroblasts adults	-	53	0 %	-	Egli <i>et al.</i> 2011
Oòcits d'estimulació ovàrica	Fibroblasts adults	-	14	8,3 %	-	Fan <i>et al.</i> 2011
		TSA (HDACi)	22	22,2 %	-	
Oòcits madurats in vivo	Cèl·lules de biòpsia de pell	-	32	0 %	-	Noggle <i>et al.</i> 2011
		-	63	21 % (3N)	15 % (3N)	
Zigots descartats (amb 3 pronucleis)	Cèl·lules del cúmulus	-	45	0 %	-	Sun <i>et al.</i> 2012
		5-aza-2-dC (DNMTi)	52	0 %	-	
Oòcits madurats in vitro	Fibroblasts d'origen fetal	-	58-100	4-23 % *	0 %	Yu <i>et al.</i> 2012
Oòcits d'estimulació ovàrica	Fibroblasts d'origen fetal	TSA (HDACi)	5-60	23,5 – 75 %	25 – 50 %	Tachibana <i>et al.</i> 2013b
Oòcits d'estimulació ovàrica	Fibroblasts adults	-	77	6,5 %	40 %	Chung <i>et al.</i> 2014
Oòcits d'estimulació ovàrica	Fibroblasts d'origen fetal	Scriptaid i nch-51	-	10 %	0 %	Yamada <i>et al.</i> 2014
	Fibroblasts d'origen adult	(HDACi)	-	10 %	1-3 línies	

HDACi: inhibidor de les desacetilases d'histones; 3N: triploides (la transferència nuclear es va realitzar a oòcits no enucleats); DNMTi: inhibidor de les metiltransferases de DNA.

*l'article no distingeix entre els embrions que van arribar a l'estadi de blastocist i els que van quedar aturats a l'estadi de mòrula.

1.2. CANVIS EPIGENÈTICS EN LA REPROGRAMACIÓ NUCLEAR

1.2.1. Modificacions epigenètiques i potencial de desenvolupament

En el nucli de les cèl·lules eucariotes, la molècula de DNA es troba associada a moltes proteïnes, entre elles les histones, en forma de cromatina, i l'estructura d'aquesta cromatina es troba altament regulada mitjançant mecanismes epigenètics. Per exemple, les cues N-terminals de les proteïnes histones són susceptibles de patir una sèrie de modificacions postraduccionals reversibles, i cadascuna té un efecte concret en l'estructura de la cromatina (figura 6). Exemples d'aquestes modificacions són l'acetilació o metilació de les lisines i la fosforilació de les serines de les cues N-terminals. Els nivells d'acetilació de les histones són regulats pels enzims nuclears acetil transferasa d'histones (HATs) i desacetilasa d'histones (HDACs), els quals afegeixen o eliminen, respectivament, grups acetil, en diferents posicions de les cues N-terminals. Es tracta d'enzims amb molts subtipus altament especialitzats. Per exemple, la superfamília d'enzims HDACs està formada per cinc tipus diferents (HDACs de tipus I, II, III IV o V) amb un total de divuit membres (Blackwell *et al.* 2008; Ruijter *et al.* 2003). D'altra banda, els nivells de metilació de les histones són regulats pels enzims nuclears metiltransferasa d'histones (HMTs) i desmetilasa d'histones (HDMs), els quals transfereixen o eliminen, respectivament, entre un i tres grups metil als residus lisina i arginina de les cues N-terminals de les histones (Black *et al.* 2012; Del Rizzo i Trievel 2014; Wood i Shilatifard 2004).

A més, la pròpia molècula de DNA també pot patir modificacions reversibles, com la metilació de les citosines de les regions del genoma riques en citosina i guanina (illes CpG) en la posició 5 (5meC), duta a terme pels enzims metiltransferasa de DNA (DNMTs). En mamífers, les DNMTs es classifiquen en tres famílies, cadascuna amb el seu paper en el desenvolupament (revisat per Dean *et al.* 2005). L'eliminació dels grups metil de les citosines es pot produir de manera passiva, quan la metilació no es renova en la nova cadena de DNA després de la replicació, o de manera activa, independentment de la replicació. El mecanisme de desmetilació activa del DNA ha sigut objecte de moltes investigacions i actualment pot atribuir-se a diversos mecanismes. Per exemple, el grup metil podria ser eliminat directament per l'acció d'un enzim que el reconegués de manera específica, però l'únic candidat proposat fins el moment, la proteïna 2 amb domini d'unió a la metil CpG (MBD2), no és imprescindible per a què els embrions de ratolí presentin una viabilitat i uns patrons de metilació normals (Hendrich *et al.* 2001), la qual cosa ha generat molta controvèrsia (Wu i Zhang 2010). D'altra banda, la citosina metilada podria ser convertida a un estadi intermediari, i després substituïda per una citosina no metilada, per mecanismes com la reparació per escissió de bases. Aquest seria el cas de l'oxidació de la 5meC donant lloc a la 5-hidroximetilcitosina (5hmeC), la qual ha estat

detectada tant en cèl·lules pluripotents, ESCs i embrions, com en cèl·lules diferenciades. Estudis recents indiquen que aquesta acció la portaria a terme principalment la família de proteïnes de translocació deu-onze (TET), la qual està formada per tres enzims: TET1, TET2 i TET3 (Bagci i Fisher 2013; Pastor *et al.* 2013).

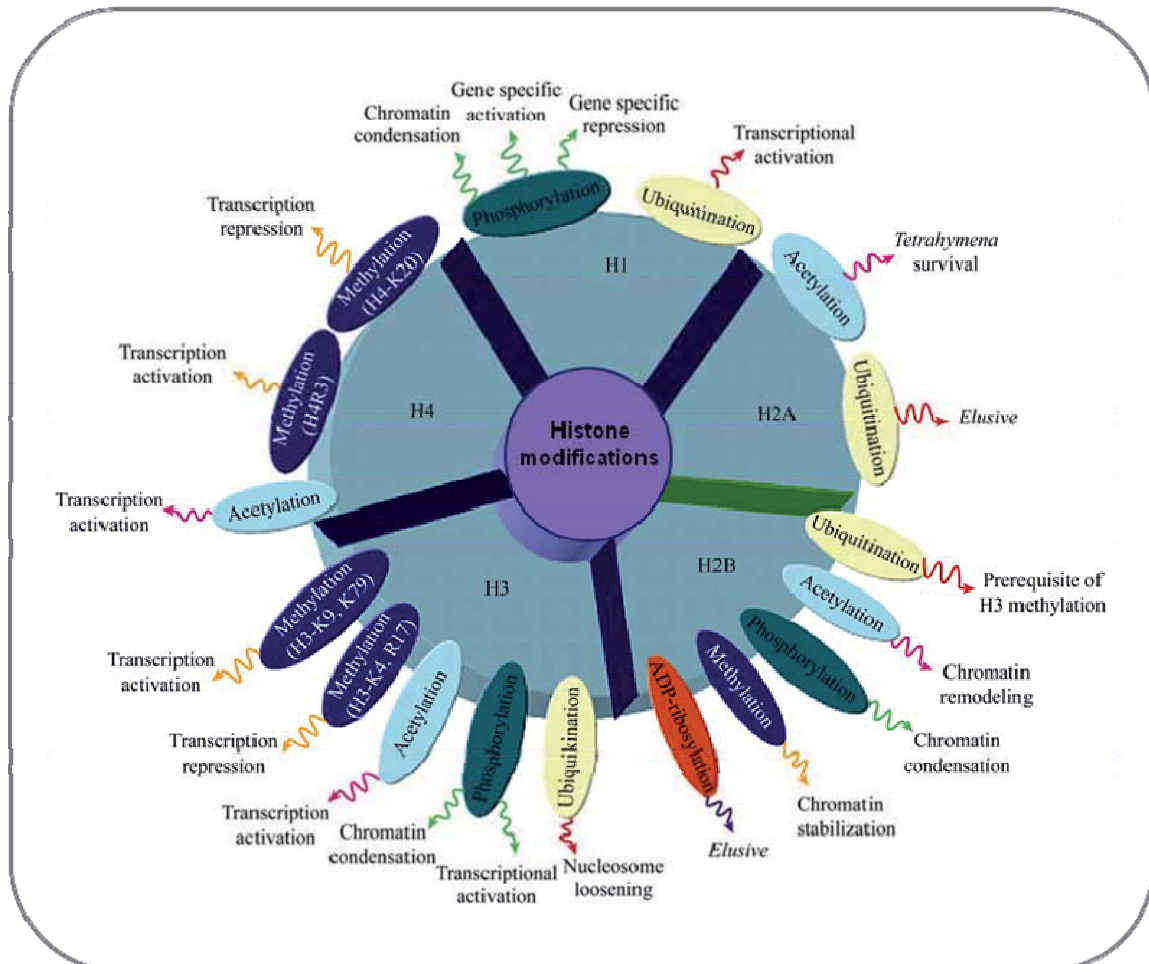


Figura 6. Representació de diversos tipus de modificacions de les cues N-terminals de les histones i de les funcions biològiques que s'hi associen . Imatge de Munshi *et al.* (2009).

Totes aquestes modificacions epigenètiques no alteren la seqüència del DNA però sí l'estructura de la cromatina. Mentre que l'efecte que provoquen les metilacions en els residus de les histones és més variable (figura 6), uns nivells elevats d'acetilació de les histones s'associen a una cromatina amb una conformació oberta i accessible als factors de transcripció, i, pel contrari, uns nivells de metilació del DNA elevats s'associen a una cromatina més compactada i inaccessible (figura 7). Val a dir, però, que es tracta d'un model general que no és vàlid en tots els casos, donada la gran varietat de modificacions epigenètiques possible i els diferents efectes que aquestes provoquen en conjunt en la conformació de la cromatina (Dobosy i Selker 2001).

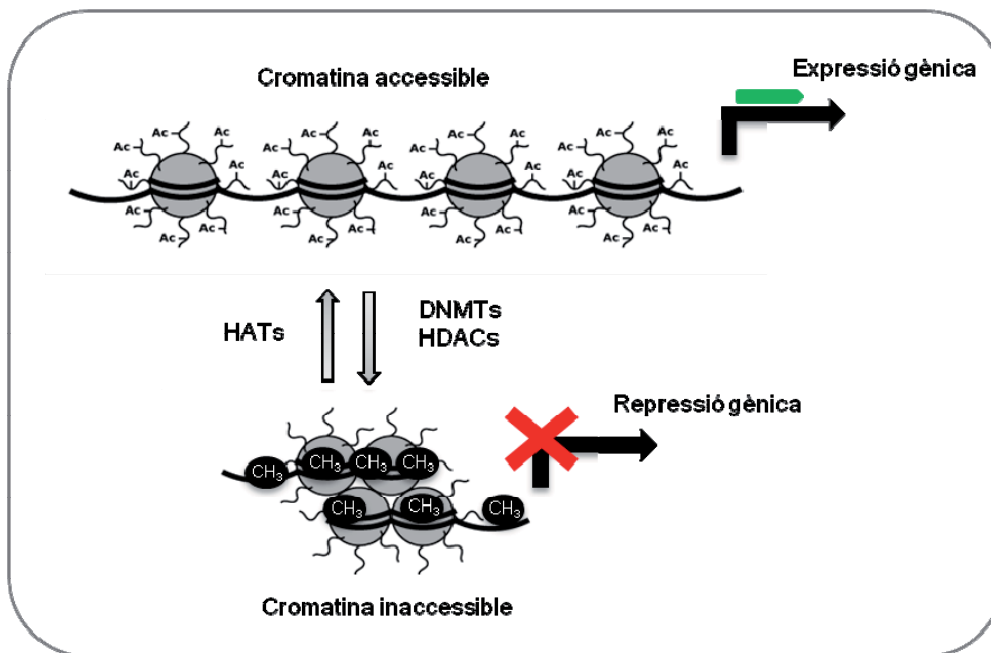


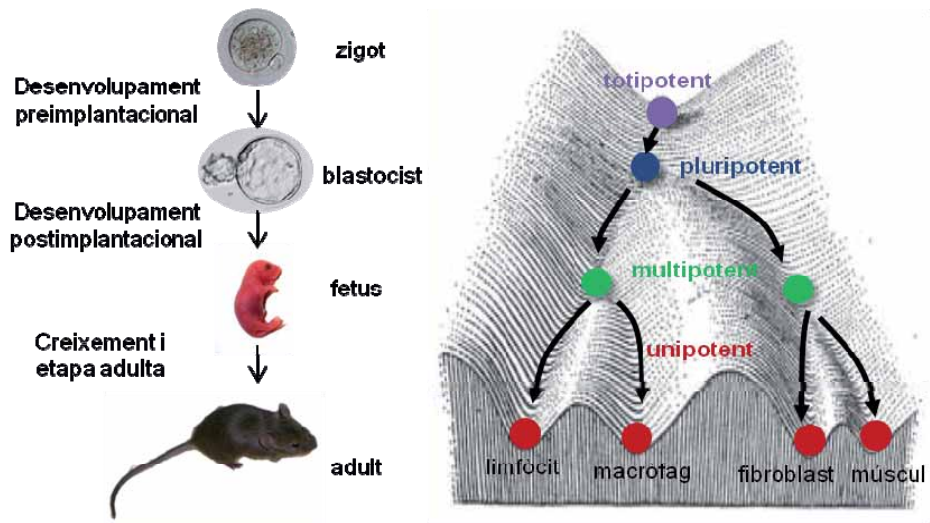
Figura 7. Regulació de la conformació de la cromatina (model general no vàlid en tots els casos). L'acetilació de les histones s'associa a una conformació oberta i accessible de la cromatina. En canvi, la metilació del DNA s'associa a una conformació tancada i inaccessible. Aquests dos estats de la cromatina es troben regulats per un equilibri dinàmic on hi participen diversos enzims com les HATs i les HDACs, que regulen l'acetilació de les histones, o les DNMTs, que afegeixen grups metil a les citosines del DNA.

Per acabar, hi ha altres mecanismes epigenètics que també actuen durant les diferents fases del cicle cel·lular regulant la conformació de la cromatina. D'una banda, el procés de silenciament de l'expressió gènica mitjançant RNA d'interferència ha estat correlacionat amb certes modificacions epigenètiques. Per exemple, s'ha observat una disminució de les modificacions d'histona associades a transcripció, un increment de les modificacions d'histona associades a silenciament i un increment de la metilació del DNA en els promotors diana de certs *RNA* no codificants petits, els quals inhibirien l'expressió gènica a nivell transcripcional (Hawkins i Morris 2008; Morris *et al.* 2009a,b). D'altra banda, els factors remodeladors de la cromatina també modifiquen la seva composició i estructura. Es tracta de proteïnes que utilitzen la hidròlisi de trifosfat d'adenosina (ATP) per alterar els contactes histona-DNA. Es classifiquen en quatre famílies en funció de les diferents subunitats i dominis catalítics que presenten, entre ells un domini ATPasa que és similar, i cada família està especialitzada en funcions i contexts biològics particulars. Per exemple, la subunitat SWR1 de la família de complexos remodeladors de la cromatina INO80 està implicada en la reestructuració del nucleosoma amb la variant d'histona H2A.Z, substituint els dímers H2A-H2B per dímers H2A.Z-B (revisat per Clapier i Cairns 2009).

Com a conseqüència de la seva acció sobre l'estructura de la cromatina, les modificacions epigenètiques juguen un paper clau en la regulació de l'expressió gènica i, per tant, en processos cel·lulars com el manteniment de la pluripotència o la diferenciació i la transmissió d'aquest caràcter a les cèl·lules filles. En general, com més oberta i dinàmica és l'estructura de la cromatina d'una cèl·lula, més activitat transcripcional i més possibilitat de donar lloc a diferents tipus cel·lulars té. Aquest és el cas de la cromatina de les ESCs, a diferència de les cèl·lules somàtiques que presenten un estat epigenètic molt estable (Gaspar-Maia *et al.* 2011; Meissner 2010). Durant la diferenciació, les cèl·lules inicialment totipotents van adquirint una sèrie de modificacions epigenètiques, entre elles un increment global dels nivells de metilació del DNA, que limiten el seu potencial i defineixen les seves característiques fenotípiques o funcionals (Gan *et al.* 2007; Hemberger *et al.* 2009; Jenuwein i Allis 2001) (figura 8.A).

Quan el que té lloc és precisament el contrari, i les modificacions epigenètiques que conformen un estat epigenètic concret són esborrades i substituïdes per unes de diferents per tal de donar lloc a una nova identitat cel·lular, aleshores es parla de reprogramació nuclear (figura 8.B). Exemples de reprogramació nuclear que tenen lloc de manera natural són la reprogramació que pateixen les cèl·lules primordials germinals (PGCs) per donar lloc als gàmetes (Guibert *et al.* 2012; Seisenberger *et al.* 2012) i la reprogramació dels gàmetes durant la fecundació (vegeu l'apartat 1.2.2.). També la desdiferenciació que té lloc en les cèl·lules que originen un tumor en un procés cancerigen és un exemple de reprogramació nuclear (Feinberg i Tycko 2004; Jones i Baylin 2002). A més, però, s'han desenvolupat una sèrie d'estratègies que permeten reprogramar qualsevol nucli somàtic de manera artificial, entre les quals hi ha la SCNT (vegeu l'apartat 1.2.4).

A. DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR



B. REPROGRAMACIÓ NUCLEAR

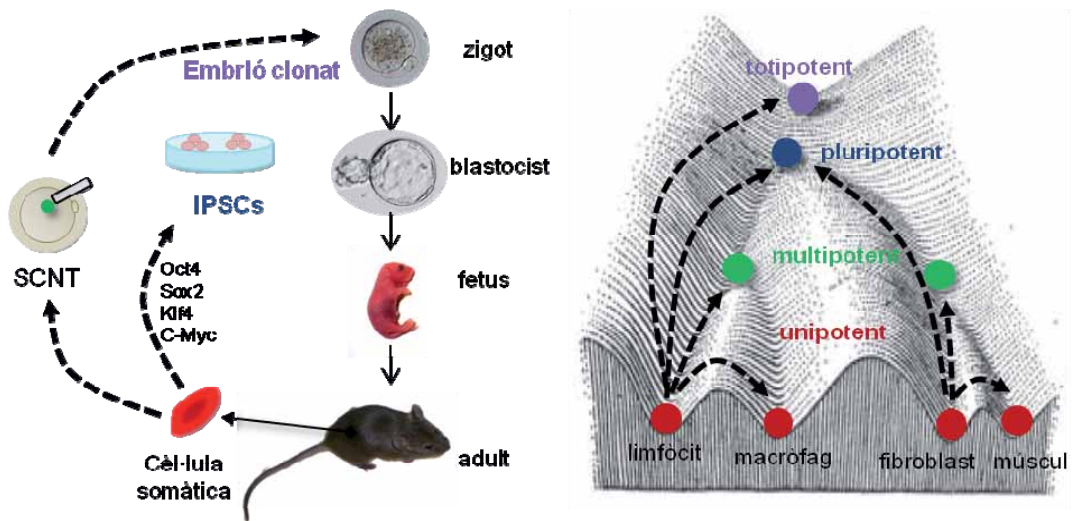


Figura 8. Relació entre l'estat epigenètic i el potencial de desenvolupament. A) A mesura que les cèl·lules es diferencien van adquirint una sèrie de modificacions epigenètiques que limiten el seu potencial i impedeixen que canviïn de destí cel·lular. El zigot totipotent es desenvolupa fins l'estadi de blastocist, on s'hi troben les cèl·lules pluripotents de la ICM, les quals es diferencien gradualment per donar lloc al fetus, i posteriorment a l'individu adult, perdent el seu potencial de desenvolupament (els colors indiquen els diferents graus de potencial de desenvolupament de les cèl·lules que rodolen vall avall al llarg de la diferenciació). **B)** El fenomen de diferenciació cel·lular només és revertit per processos de reprogramació nuclear (línia discontinua) que canvien l'estat epigenètic de la cèl·lula i permeten que adopti un nou destí. En general, quan la reprogramació nuclear del nucli somàtic comporta un increment en la plasticitat cel·lular es parla de desdiferenciació; i quan comporta un canvi de tipus cel·lular concret es parla de transdiferenciació. Mitjançant tècniques com la SCNT o les iPSCs s'aconsegueix reprogramar cèl·lules somàtiques a cèl·lules totipotents o pluripotents, respectivament. Imatge modificada de Hochedlinger i Plath (2009).

1.2.2. Reprogramació nuclear dels gàmetes durant el desenvolupament embrionari

Els gàmetes presenten una sèrie de modificacions epigenètiques característiques que adquireixen durant la gametogènesi i que fan possible una correcta reprogramació nuclear una vegada fusionats en la fecundació. Aquesta reprogramació culmina amb l'activació del genoma embrionari (EGA), que té lloc a l'estadi de dues cèl·lules en el cas del ratolí. Per a què això sigui possible, prèviament les marques epigenètiques de diferenciació establertes des de la implantació són esborrades en les cèl·lules precursoras dels gàmetes, les PGCs. De fet, només en aquestes cèl·lules es produeix l'esborrament complet de totes les marques epigenètiques de cèl·lula somàtica (Hajkova *et al.* 2002, 2011), i l'establiment de les marques d'impressió genètica (*imprinting* en anglès) que asseguren una expressió específica d'al·lel d'origen matern o patern en determinats gens mitjançant la metilació de les regions diferencialment metilades (DMRs) en aquests gens (Reik i Walter 2001).

En el ratolí, el nucli de l'espermatozoide es caracteritza per una cromatina altament compactada on les histones han estat substituïdes per protamines (Rathke *et al.* 2013) i els nivells globals de metilació del DNA són elevats, però molts promotors importants pel posterior desenvolupament embrionari es troben hipometilats (Farthing *et al.* 2008). A més, presenta les marques d'impressió genètica masculina (Bartolomei i Ferguson-Smith 2011) i altres marques epigenètiques característiques, com l'acetilació d'H4K8 i d'H4K12 (van der Heijden *et al.* 2006). En canvi, el nucli de l'oòcit es troba globalment hipometilat (Smith *et al.* 2012), però presenta més variabilitat en la metilació dels promotors dels gens estudiats (revisat per Hales *et al.* 2011). A més, també presenta les marques d'impressió genètica (Bartolomei i Ferguson-Smith 2011), entre les quals n'hi ha una en el cromosoma X que impedeix l'expressió de *Xist* (Oikawa *et al.* 2014), i variants d'histona específiques com l'H1FOO (Clarke *et al.* 1998; Furuya *et al.* 2007) i la macroH2A (Chang *et al.* 2005).

Quan l'oòcit i l'espermatozoide es fusionen durant la fecundació, els genomes matern i patern pateixen una sèrie de modificacions epigenètiques exercides pel citoplasma de l'oòcit que confereixen la totipotència al nou zigot. Es tracta d'un procés molt complex i altament específic, ja que les modificacions epigenètiques que es donen estan estrictament regulades tant a nivell espacial com temporal (Burton i Torres-Padilla 2010). Principalment, aquestes modificacions afecten a les histones i als nivells de metilació del DNA, però altres elements importants en l'epigenètica com els RNA no codificants també tenen un paper clau en la regulació de l'expressió gènica durant el desenvolupament embrionari (revisat per Hales *et al.* 2011 i Shi i Wu 2009). Aquesta reprogramació comporta l'esborrament de l'estat epigenètic dels gàmetes, mantenint però les marques d'impressió genètica, i l'establiment de modificacions epigenètiques específiques de l'embrió (Beaujean 2014; Cantone i Fisher 2013).

En el genoma patern, mentre el nucli de l'espermatozoide comença a descondensar-se per formar el pronucli masculí, es dona la desmetilació activa del DNA (figura 9) i el canvi de les protamines per histones d'origen matern, en general hiperacetilades i desmetilades (figura 10.A). Concretament, algunes de les marques epigenètiques característiques del pronucli masculí són l'acetilació transitòria d'H4K5 i K16 i d'H3K27, la fosforilació de gamma-H2AX, i la presència d'H3.3 i H1FOO. Per tant, la cromatina del genoma patern adquireix un estat hiperacetilat i hipometilat, que resulta en una petita onada de transcripció en el pronucli masculí al final de l'estadi d'una cèl·lula. Posteriorment, es produeix una disminució en l'acetilació de les histones i un increment en les histones metilades com H3K4me1, me2 i me3, H3K27me2 i me3 i H4K20me1 (Beaujean 2014; Hales *et al.* 2011). Pel que fa a la desmetilació activa del genoma patern, en ratolí s'ha vist que la desaparició de 5mC coincideix amb l'aparició de la seva forma oxidada 5hmeC en el pronucli masculí (Iqbal *et al.* 2011). A més del ratolí, la 5hmeC també ha estat detectada en el zigot de vaca i conill (Wossidlo *et al.* 2011) i en el de porc (Cao *et al.* 2014). Aquesta oxidació probablement la porta a terme l'enzim TET3 de la família TET, que està molt expressat en oòcits i zigots. Si bé que encara no es coneix com la 5hmeC es transforma en una citosina no modificada, el mecanisme de reparació per escissió de bases podria participar-hi (revisat per Cantone i Fisher 2013; Kohli i Zhang 2013). Aquesta desmetilació activa té lloc en tot el genoma masculí excepte en els gens amb impressió genètica, alguns tipus de seqüències repetitives i les illes CpG del cromosoma X, regions que només són desmetilades en les PGCs (Guibert *et al.* 2012; Seisenberger *et al.* 2012).

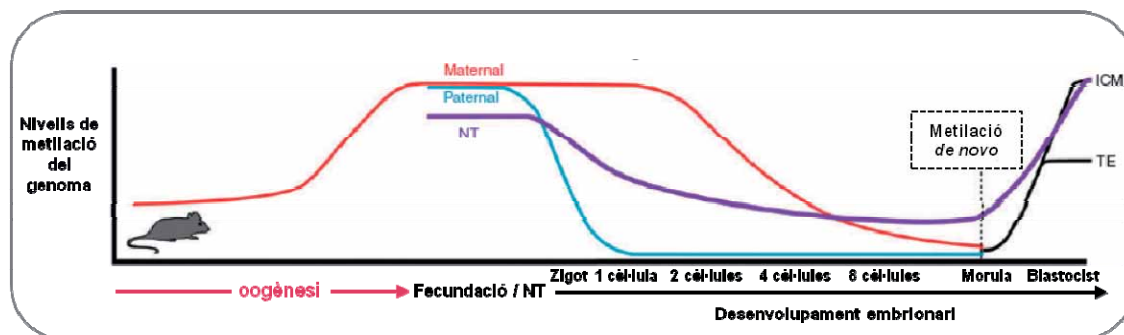


Figura 9. Evolució dels nivells de metilació durant l'oogènesi i el desenvolupament embrionari preimplantacional del ratolí. El color vermell representa els nivells de metilació del genoma matern, que incrementen durant l'oogènesi i després es redueixen de manera passiva amb el desenvolupament de l'embrió fecundat. El color blau representa els nivells de metilació del genoma patern, que disminueixen ràpidament després de la fecundació mitjançant la desmetilació activa i romanen baixos durant el desenvolupament de l'embrió fecundat. A partir de l'estadi de morula s'inicia la metilació *de novo* i, com a resultat, a l'estadi de blastocist l'embrió fecundat presenta uns nivells de metilació més elevats en la ICM que en el TE. El color lila representa els nivells de metilació del genoma somàtic en un embrió produït per transferència nuclear (NT). Tot i que hi ha una certa desmetilació durant el desenvolupament de l'embrió clonat, aquest es troba hipermetilat en comparació a l'embrió fecundat en tots els estadis de desenvolupament. Imatge modificada de Yang *et al.* (2007b).

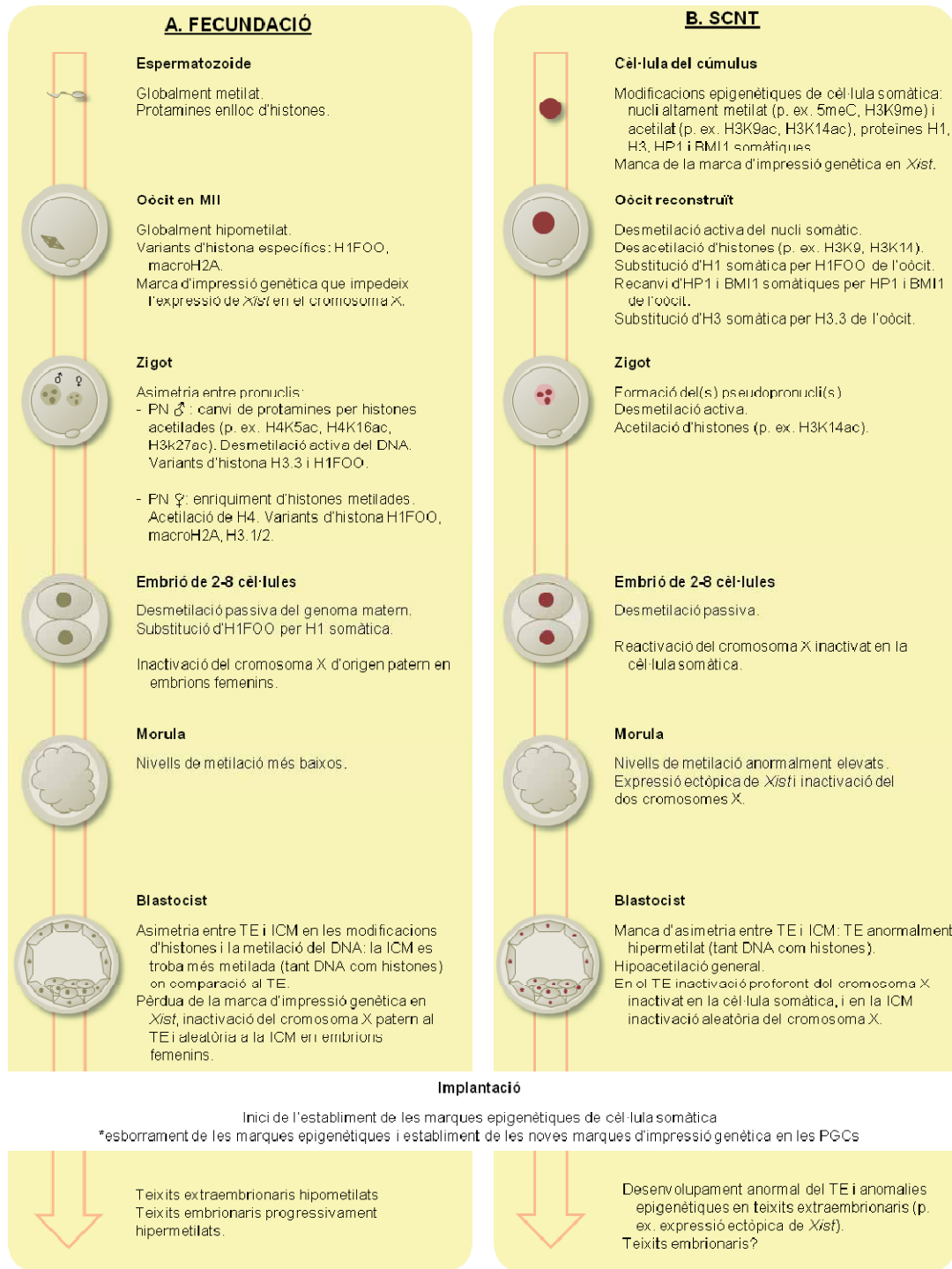


Figura 10. Reprogramació nuclear durant el desenvolupament embrionari en ratolí. A) Embrions obtinguts per fecundació. **B)** Embrions obtinguts per SCNT utilitzant una cèl·lula del cúmulus (amb dos cromosomes X) com a donadora del nucli.

En el genoma matern, en canvi, no es dona la desmetilació activa. Això es possible gràcies a uns nivells elevats d'histones metilades en residus repressius (p. ex. H3K9me_{2,3} i H3K27me_{1,2} i me₃) (Morgan *et al.* 2005; Santos *et al.* 2005) i a factors protectors com la proteïna Dppa3/PGC7/Stella, que s'uneix a l'H3K9me₂ en la cromatina materna i la protegeix de l'acció de TET3 (Nakamura *et al.* 2007, 2012). A més, el pronucli femení presenta acetilació en diverses lisines de l'H4 i variants d'histona específics com la macroH2A, l'H3.1/2, i l'H1FOO (revisat per Hales *et al.* 2011).

Per tant, el zigot es caracteritza per una asimetria entre el pronuclis masculí i femení que es correlaciona amb una expressió gènica també asimètrica (s'inicia abans en el pronucli masculí) (Burton i Torres-Padilla 2010; Santos i Dean 2004). Totes aquestes modificacions, que corresponen al model del ratolí, permeten una correcta EGA a l'estadi de dues cèl·lules i fan possible el desenvolupament subseqüent. En altres espècies, la EGA té lloc també a l'estadi de dues cèl·lules (p. ex. en humans) o en estadis embrionaris posteriors (p. ex. a l'estadi de quatre-vuit cèl·lules en porc i cavall, i de vuit-setze cèl·lules en vaca, conill, ovella i mono) (Vassena *et al.* 2011). Però tot i que la seqüència de modificacions epigenètiques que hi tenen lloc és diferent, en general es compleix l'adquisició d'un estat hiperacetilat i hipometilat abans de la EGA (Mason *et al.* 2012).

En l'embrió de ratolí a l'estadi de dues cèl·lules té lloc la substitució d'H1FOO per l'H1 somàtica (abans de la EGA) i comença la desmetilació passiva en el genoma matern a mesura que l'embrió es va dividint (figura 9 i 10.A). Una hipòtesi per aquest mecanisme és l'exclusió de la DNMT1 del nucli, la qual és responsable de metilar la nova cadena de DNA per mantenir els nivells de metilació. Però sembla aquest enzim no seria totalment exclòs, sinó que estaria present a nivells baixos actuant sobre els gens amb impressió genètica que es mantenen metilats. Per tant, el mecanisme mitjançant el qual té lloc la desmetilació passiva del genoma matern encara no està clar (revisat per Burton i Torres-Padilla 2010).

A l'estadi de quatre cèl·lules continua la desmetilació passiva del genoma matern i té lloc el silenciament del cromosoma X d'origen patern en totes les cèl·lules dels embrions femenins (Okamoto *et al.* 2004). La inactivació del cromosoma X és un mecanisme epigenètic que es dona en les cèl·lules femenines dels mamífers per assegurar una expressió monoal·lèlica dels seus gens i és mediada pel RNA no codificant *Xist* d'origen patern (Augui *et al.* 2011). En canvi, el cromosoma X d'origen matern no s'inactiva perquè una marca d'impressió genètica impedeix l'expressió de *Xist* (Oikawa *et al.* 2014). A l'estadi de morula, els nivells de metilació del genoma embrionari són els més baixos (figura 9). Aleshores té lloc la formació del blastocist i el primer fenomen de diferenciació cel·lular, que dona lloc a les cèl·lules del TE i la ICM, acompanyat d'un increment en els nivells de metilació tant del DNA com de les histones (p. ex. H3K9me₃, H3K27me₃), sobretot en les cèl·lules de la ICM. Per tant, es genera una asimetria epigenètica entre els dos llinatges cel·lulars del blastocist (Cantone i Fisher 2013; Morgan *et al.* 2005). Durant el desenvolupament del blastocist (femení) de ratolí, en la ICM també té lloc la

reactivació del cromosoma X d'origen patern que s'havia inactivat prèviament i la pèrdua de les marques d'impressió genètica en el cromosoma X d'origen matern. Posteriorment es dona una inactivació aleatòria del cromosoma X d'origen matern o patern en les cèl·lules de la ICM. En canvi, en el TE es manté la inactivació del cromosoma X patern tot i l'esborrament de la marca d'impressió genètica del cromosoma X matern que impedia la seva inactivació (Oikawa *et al.* 2014) (figura 10.A).

A partir de l'estadi de blastocist i la seva implantació, l'establiment de modificacions epigenètiques específiques de línia cel·lular aniran restringint les possibilitats transcripcionals de cada cèl·lula fixant-ne el seu destí cel·lular (Hemberger *et al.* 2009) (figura 8.A).

1.2.3. Reprogramació del nucli somàtic en el clonatge per SCNT

Amb l'obtenció de les primeres granotes per SCNT utilitzant cèl·lules diferenciades d'intestí, l'any 1962 es va demostrar per primera vegada que tots els gens necessaris per donar lloc a un organisme es troben en les cèl·lules especialitzades, i que l'ooplasma de l'oòcit madur pot reprogramar el nucli d'aquestes cèl·lules a un estadi totipotent en un període de temps molt curt (Gurdon 1962a,b). Des d'aleshores, es varen començar a estudiar els mecanismes epigenètics desenvolupats al llarg de la diferenciació cel·lular que mantenen de manera estable el patró d'expressió gènica d'un tipus cel·lular concret, però que poden ser esborrats durant la reprogramació nuclear (revisat per Yamanaka i Blau 2010; Wells 2013).

Per a què el desenvolupament dels clons sigui possible, s'ha de donar la reprogramació nuclear d'una cèl·lula somàtica diferenciada, la qual té les seves pròpies marques epigenètiques, molt estables, i generalment es troba altament metilada. És a dir, les marques tant estables de la cèl·lula somàtica han de ser substituïdes per les de tipus embrionari abans del moment de la EGA per a una correcta expressió gènica i posterior desenvolupament embrionari. Aquest procés de reprogramació nuclear el porten a terme components naturals presents en l'oòcit (Awe i Byrne 2013; Egli *et al.* 2008; Gao *et al.* 2007; Jullien *et al.* 2011; Rodriguez-Osorio *et al.* 2012), els quals promouen una sèrie de modificacions epigenètiques en el nucli transferit, com canvis en els nivells d'acetilació de les histones i de metilació de les histones i del DNA, tal i com es detalla a continuació. Aquesta reprogramació resulta en el silenciament dels gens somàtics i l'activació dels gens de pluripotència (Whitworth i Prather 2010) (figura 11). En el cas del ratolí, per exemple, ha de tenir lloc en un període de temps molt curt, ja que la EGA té lloc a l'estadi de dues cèl·lules (Zuccotti *et al.* 2000).

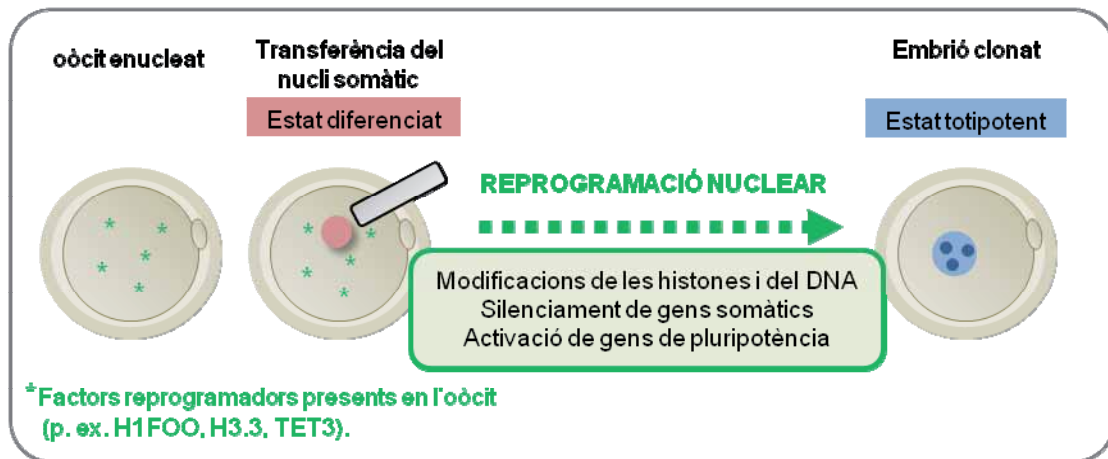


Figura 11. Reprogramació nuclear en els embrions generats per SCNT. Els factors reprogramadors presents en l'oòcit promouen una sèrie de modificacions epigenètiques que donen lloc al silenciament dels gens somàtics expressats en la cèl·lula donadora i l'activació dels gens de pluripotència necessaris per a un correcte desenvolupament embrionari, revertint així l'estat diferenciat del nucli somàtic a un estat totipotent.

De manera similar al procés que té lloc en els embrions fecundats amb els nuclis de l'oòcit i l'espermatozoide, la cromatina del nucli somàtic transferit s'ha d'obrir i descondensar (Gao 2007; Gurdon i Wilmot 2011). Un dels primers esdeveniments que tenen lloc és el intercanvi de proteïnes entre el nucli somàtic i l'oòcit (Jullien *et al.* 2011; Latham *et al.* 2005). Per exemple, s'observa la completa substitució de la histona somàtica H1 per la histona específica de l'oòcit, H1FOO en el cas del ratolí o la vaca (Gao *et al.* 2004b; Teranishi *et al.* 2004; Yun *et al.* 2012) i B4 en el cas de *Xenopus* (Jullien *et al.* 2010). En *Xenopus*, aquesta substitució és imprescindible per a la reactivació d'*Oct4*, i per això la variant de l'H1 específica de l'oòcit es considera un dels factors reprogramadors presents en aquest (Jullien *et al.* 2010, 2011). L'H3 somàtica també és substituïda per la variant H3.3 sintetitzada en l'oòcit. La presència d'H3.3 és imprescindible per a què tingui lloc la reprogramació nuclear i la correcta expressió de gens de pluripotència en la SCNT en ratolí. Per això, l'H3.3 també es considera un dels factors reprogramadors presents en l'oòcit (Wen *et al.* 2014b). A més, té lloc l'intercanvi de proteïnes relacionades amb la repressió de la cromatina, com l'HP1 o la BMI1, però en aquest cas es tracta d'un canvi quantitatiu i no qualitatiu (Jullien *et al.* 2011). També es produeix la desacetilació de certes marques d'histona acetilades en el nucli somàtic però desacetilades en l'oòcit com l'H3K9, l'H3K14 i l'H4K16 (figura 10.B). Globalment, aquests canvis resulten en una cromatina més dinàmica (Jullien *et al.* 2011).

A partir del senyal d'activació partenogenètica comença la formació dels pseudopronuclis, els quals s'assemblen als pronuclis formats durant la fecundació però contenen cromosomes materns i paterns repartits aleatòriament. Sovint es formen dos pseudopronuclis però en el ratolí també s'ha descrit la formació d'un sol o de més de dos (Latham *et al.* 2007). Durant l'activació s'observa com continua la remodelació de les histones i augmenten els nivells d'acetilació d'alguns residus d'histona, com l'H3K14 i l'H3K9. Tot i això, els embrions clonats

presenten nivells d'acetilació d'H3K14 inferiors als controls (Wang *et al.* 2007). D'altra banda, l'enzim TET3 es concentra en els pseudopronuclis formats per realitzar l'oxidació de la 5meC a 5hmeC, mecanisme de desmetilació del DNA involucrat en l'activació del gen de pluripotència *Oct4* (Gu *et al.* 2011), i s'observa una disminució del senyal de 5meC i un increment del de 5hmeC (Cao *et al.* 2014; Wossidlo *et al.* 2001). Per això, TET3 també es considera un dels factors reprogramadors presents en l'oòcit. Pel que fa a la inactivació del cromosoma X, el treball de Eggan *et al.* (2000) va demostrar que, en ratolí, quan s'utilitzen cèl·lules somàtiques femenines com a donadores del nucli es produeix la reactivació del cromosoma X inactivat i els dos cromosomes X es troben actius durant les primeres divisions embrionàries de l'embrió clonat. Per tant, el poder reprogramador de l'oòcit és capaç d'eliminar també les marques epigenètiques en el cromosoma X.

Molt sovint, la desmetilació del genoma somàtic es dona de manera defectuosa i, per exemple, s'han descrit patrons de metilació aberrants en embrions clonats de vaca (Bourchis *et al.* 2001; Dean *et al.* 2001; Kang *et al.* 2002), de ratolí (Ohgane *et al.* 2001) o de porc (Cao *et al.* 2014). A l'estadi de morula, la desmetilació és incompleta i els nivells de metilació no s'han reduït a nivells comparables a les mòrules fecundades (figura 9). A més, la cèl·lula somàtica utilitzada com a donadora del nucli, a diferència de l'oòcit, no presenta la marca d'impressió genètica en el cromosoma X d'origen matern que impedeix l'expressió de *Xist*. Per això, s'observa una expressió ectòpica de *Xist* en els dos cromosomes dels embrions femenins obtinguts per SCNT, que causa la seva inactivació a l'estadi de mòrula (Oikawa *et al.* 2014).

Finalment, té lloc la formació del blastocist, el qual presenta un patró de metilació anormal. Mentre que els nivells de metilació de la ICM són semblants als dels embrions fecundats, el TE generalment es troba hipermetilat (Dean *et al.* 2001). Per tant, en comparació als embrions fecundats, els embrions clonats es troben globalment hipoacetilats i hipermetilats en tots els estadis de desenvolupament preimplantacional (Rodríguez-Osorio *et al.* 2012; Yang *et al.* 2007b) (figura 10.B). Per exemple, s'ha descrit que els nivells de metilació tant de l'H3K9 com del DNA són superiors en embrions clonats respecte als controls fecundats (Kang *et al.* 2002; Santos *et al.* 2003; Santos i Dean 2004; Wang *et al.* 2007).

Totes aquestes anomalies en els perfils epigenètics dels clons resulten en patrons d'expressió gènica globalment alterats. Per exemple, s'ha descrit una important alteració en el transcriptoma dels embrions clonats de ratolí durant els dos primers cicles cel·lulars i una activació deficient del genoma embrionari (Vassena *et al.* 2007a). També es detecten sovint anomalies espaials i temporals en l'expressió de gens de pluripotència (Boiani *et al.* 2002; Bortvin *et al.* 2003); o l'expressió persistent de gens específics de la cèl·lula donadora del nucli en l'embrió clonat (Ng i Gurdon 2005), fenomen anomenat memòria epigenètica (revisat per Halley-Stott i Gurdon 2013). No obstant, alguns estudis han descrit un patró d'expressió gènica en blastocists de vaca clonats similar al dels embrions fecundats (Smith *et al.* 2005; Somers *et al.* 2006).

A més, en els blastocists femenins de ratolí s'ha vist que les cèl·lules del TE mantenen la inactivació del cromosoma X que estava silenciada en la cèl·lula somàtica, el qual es reactiva posteriorment en la placenta (Eggan *et al.* 2000; Nolen *et al.* 2005). Aquest error específic podria ser l'origen de les anomalies que presenten les placentes dels clons, ja que molts gens associats amb el seu desenvolupament es localitzen al cromosoma X (Hemberger *et al.* 2002), i podria explicar l'elevada mortalitat postimplantacional en els clons (Yang *et al.* 2007b). En canvi, en la ICM es dona la inactivació aleatòria del cromosoma X, de manera similar al que té lloc en els embrions fecundats (Eggan *et al.* 2000). Val a dir, però, que no sempre és així, com es va demostrar amb la primera gata clonada, anomenada Cc, la qual no presentava coloració taronja a diferència de la gata utilitzada com a donadora del nucli. En aquest cas, la cèl·lula donadora del nucli que es va utilitzar tenia inactivat el cromosoma X amb l'al·lel que codificava per aquest color taronja i la inactivació es va mantenir en totes les cèl·lules del clon (Holden 2002).

Pel que fa a les marques d'impressió genètica, establertes durant la gametogènesi i mantingudes en les cèl·lules somàtiques, no està clar si es veuen alterades durant la reprogramació nuclear en la SCNT. Per exemple, Inoue *et al.* (2002) varen trobar una correcta expressió de gens amb impressió genètica en fetus clonats de ratolí. Per contra, Mann *et al.* (2003) varen detectar una metilació i expressió anormals d'aquests gens en estadis preimplantacionals d'embrions de ratolí clonats, i Yang *et al.* (2005) varen demostrar que els gens amb impressió genètica *Igf2*, *Igf2r*, i *H19* mostraven una expressió anormal en diversos òrgans de vaques clonades que varen morir poc després de néixer però, en canvi, una expressió majoritàriament normal en els òrgans de clons que varen sobreviure fins l'etapa adulta.

Com és d'esperar, la progressió del desenvolupament dels embrions clonats es veu condicionada per la fidelitat amb la qual es produeix la reprogramació nuclear. Com que aquesta sovint és defectuosa, la majoria dels embrions clonats no s'implanten o moren durant la gestació (75-95 % en el cas del ratolí). No obstant, alguns arriben a néixer i superen els primers dies de vida, arribant a l'etapa adulta. En conclusió, si bé la reprogramació nuclear té lloc en la SCNT i l'òocit és capaç de desmetilar el nucli transferit i eliminar altres marques epigenètiques en un cert grau, el procés sovint és defectiu o incomplet, generant-se molts errors epigenètics que s'associen a les baixes taxes de naixement i les anomalies en els clons (Yang *et al.* 2007b). Val a dir, però, que en la majoria de casos es tracta d'anomalies no heretables, ja que quan els clons que les presenten arriben a l'etapa adulta i es reproduïen donen lloc a descendència totalment normal, per tant, les anomalies epigenètiques són corregides durant la gametogènesi (Shimozawa *et al.* 2002; Tamashiro *et al.* 2002).

1.2.4. Altres vies de reprogramació del nucli somàtic

Les ESCs humanes tenen un gran potencial en el camp de la medicina regenerativa, però les que es deriven a partir d'embrions fecundats serien al·logèniques als pacients i per tant generarien problemes de rebuig immunològic. Les que es deriven a partir d'embrions clonats, en canvi, podrien ser isogèniques als pacients (figura 5), però fins fa molt poc s'obtenien amb eficiències molt baixes (vegeu l'apartat 1.1.4.2.). A més, existeix una gran problemàtica associada a l'ús d'oòcits i embrions humans per derivar ESCs (Caulfield *et al.* 2010; Rao i Condic 2008). Per aquests motius, al llarg del temps han anat sorgint estratègies alternatives a la SCNT per a reprogramar el nucli somàtic i poder obtenir ESCs específiques de pacient prescindint d'oòcits i embrions humans (revisat per Gurdon i Melton 2008; Halley-Stott *et al.* 2013; Yamanaka i Blau 2010) (figura 12.B-D).

Per exemple, es pot aconseguir la reprogramació del nucli somàtic mitjançant la fusió de la cèl·lula somàtica amb una ESC pluripotent (figura 12.B). L'ESC exerceix un paper dominant sobre la cèl·lula somàtica, provocant-li una sèrie de canvis epigenètics i transcripcionals que li confereixen certa pluripotència (Tada *et al.* 1997, 2001). La cèl·lula resultant de la fusió s'anomena heterocarion ja que conté dos nuclis, un de cadascuna de les cèl·lules inicials. Però quan es produeix la replicació i divisió d'aquesta cèl·lula, aleshores es parla d'híbrids amb un nucli tetraploide.

Alternativament, la reprogramació nuclear també té lloc quan es tracta la cèl·lula somàtica amb un extracte cel·lular d'ESCs o d'oòcits en vesícula germinal o madurs (Albeiro *et al.* 2005; Bru *et al.* 2008; Collas i Taranger 2006; Tang *et al.* 2009; Taranger *et al.* 2005) (figura 12.C). Per exemple, l'extracte d'oòcits en vesícula germinal de *Xenopus* és capaç de reprogramar nuclis somàtics bovins, porcins, ovins i murins (Miyamoto *et al.* 2007; Rathbone *et al.* 2010, 2013). Aquest potencial de l'oòcit de *Xenopus* en vesícula germinal es va demostrar prèviament en experiments de SCNT, utilitzant cèl·lules somàtiques de ratolí i humana com a donadores del nucli. Es va veure que el seu citoplasma conté una sèrie de factors reprogramadors que actuen sobre el nucli transferit donant lloc a un canvi en l'estat epigenètic i una transcripció activa del gen de pluripotència *Oct4* en un període de temps molt curt (al voltant de 24 h), però la replicació del DNA i el desenvolupament de l'oòcit reconstruït cap a estadis posteriors no tenen lloc (Byrne *et al.* 2003). La reprogramació amb extractes d'oòcits en vesícula germinal no només s'ha observat en amfibis, també emprant oòcits i cèl·lules somàtiques de ratolí (Bui *et al.* 2008) i porc (Bui *et al.* 2012). En general, però, quan s'utilitzen extractes cel·lulars per reprogramar cèl·lules somàtiques es detecten canvis epigenètics i la transcripció de gens de pluripotència en el nucli tractat però la reprogramació és només parcial i a més es reverteix (Rathbone *et al.* 2013).

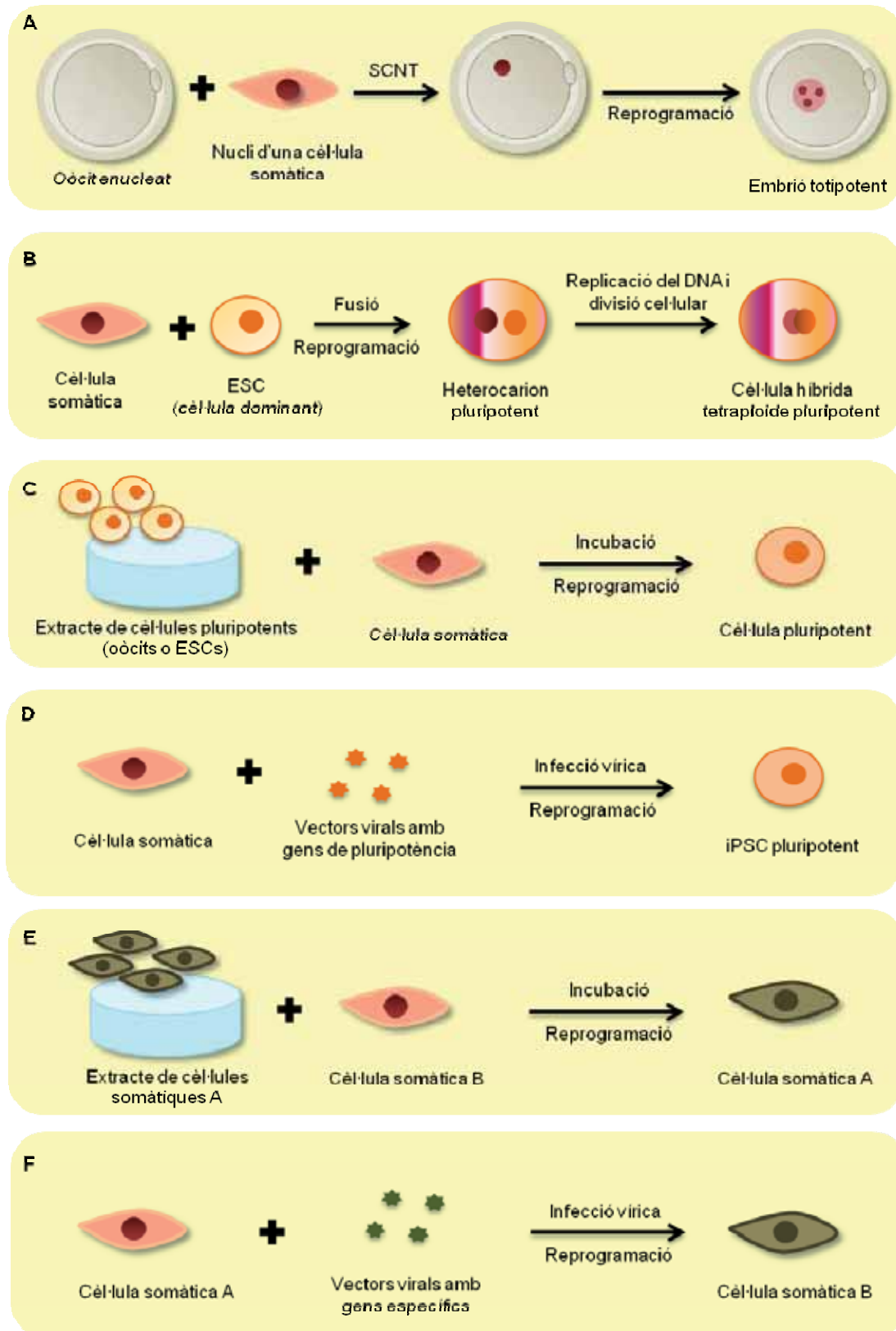


Figura 12. Vies de reprogramació del nucli somàtic. Mitjançant la SCNT (A), la fusió amb cèl·lules pluripotents (B), el tractament amb extractes cel·lulars (C) o la infecció viral amb factors de transcripció de pluripotència (D) s'aconsegueix desdiferenciar una cèl·lula somàtica. En canvi, mitjançant el tractament de la cèl·lula somàtica amb l'extracte d'un altre tipus cel·lular (E) o la infecció viral amb factors de transcripció específics d'un altre tipus cel·lular (F) s'aconsegueix la transdiferenciació.

Finalment, amb l'obtenció de les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) en ratolí, l'any 2006, es va demostrar per primera vegada que la reprogramació nuclear de cèl·lules somàtiques es podia aconseguir prescindint de l'ús de cèl·lules pluripotents, mitjançant la infecció de les cèl·lules amb uns retrovirus que incorporaven 4 factors de transcripció de pluripotència (*c-Myc*, *Sox2*, *Oct-4* i *Klf4*) (Takahashi i Yamanaka 2006) (figura 12.D). Tant la metodologia de SCNT com la de les iPSCs permeten generar cèl·lules mare isogèniques i immunològicament compatibles amb l'organisme donador del nucli somàtic, per tant específiques de pacient per a la medicina regenerativa i personalitzada (Mitalipov i Wolf 2009). La gran transcendència del descobriment d'aquestes dues tècniques per part dels investigadors John Gurdon i Shinya Yamanaka els va portar a guanyar el premi Nobel de Fisiologia i Medicina l'any 2012 (Colman *et al.* 2013). Però, en prescindir totalment de cèl·lules pluripotents, les iPSCs presentaven un gran avantatge enfront la SCNT i per això en els últims anys han estat objecte de nombroses investigacions.

Per exemple, poc després del treball de Takahashi i Yamanaka (2006), les iPSCs de ratolí es varen obtenir en altres laboratoris i varen ser utilitzades amb èxit per tractar ratolins amb anèmia falciforme (Hanna *et al.* 2007). Simultàniament, també es va aconseguir reprogramar cèl·lules somàtiques humanes a iPSCs (Takahashi *et al.* 2007; Yu *et al.* 2007a), les quals recentment han estat diferenciades a estructures hepàtiques tridimensionals que són funcionals una vegada trasplantades a ratolins (Takebe *et al.* 2013). No obstant, tot i que aquesta tècnica presenta com a avantatge que prescindeix totalment d'oòcits i embrions, el procés d'obtenció de les iPSCs és molt ineficient (al voltant del 0,1 % d'èxit) i molt més llarg que la SCNT. Per exemple, l'expressió endògena d'*Oct4* i *Nanog* en les iPSCs de ratolí s'observa a partir del setzè dia després de la infecció (Brambrink *et al.* 2008), mentre que els embrions de ratolí clonats expressen *Oct4* dos dies després de la SCNT, a l'estadi de quatre cèl·lules (Boiani *et al.* 2002). Probablement aquesta diferència es deu a què la reprogramació nuclear en les iPSCs ha de tenir lloc a partir de només quatre factors de transcripció, els quals han de canviar totalment el patró d'expressió de la cèl·lula en qüestió i substituir-lo pel d'una cèl·lula pluripotent, a diferència de la SCNT on en la reprogramació nuclear probablement intervenen nombrosos factors presents al citoplasma de l'oòcit. D'altra banda, les iPSCs presenten altres desavantatges. Per exemple, la seva aplicació terapèutica és incerta a causa de la introducció de les múltiples còpies dels transgens, que pot provocar mutacions per inserció afectant la funció de gens endògens. A més, les iPSCs poden generar tumors a conseqüència de la reactivació dels transgens (Maherali *et al.* 2007; Okita *et al.* 2007), i presenten inestabilitat epigenètica en el cromosoma X (Papp i Plath 2013), entre altres. Per això, s'han realitzat diversos estudis per poder millorar l'eficiència del procés i reduir el nombre de factors de transcripció necessaris per a la generació de les iPSCs (Feng *et al.* 2009; Hussein *et al.* 2011; Lister *et al.* 2011; Nakagawa *et al.* 2008; Warren *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2009), així com per buscar estratègies alternatives de producció de iPSCs que no impliquin la manipulació genètica de les cèl·lules. Per exemple, la reprogramació de les cèl·lules somàtiques mitjançant la incubació amb proteïnes o RNAs (O'Doherty *et al.* 2013). Malgrat tot, s'ha vist que les iPSCs

són diferents a les ESCs tant molecularment (Chin *et al.* 2009; Doi *et al.* 2009; Munoz *et al.* 2011; Stadtfeld *et al.* 2010), com pel que fa a la seva capacitat de diferenciació (Feng *et al.* 2010; Hu *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010; Park *et al.* 2008; Polo *et al.* 2010), ja que sembla que retenen una certa memòria epigenètica (Hochedlinger i Plath 2009) i presenten anomalies epigenètiques induïdes per errors en el propi procés de reprogramació (Ma *et al.* 2014). Per tant, sembla que el potencial terapèutic de les iPSCs podria ser inferior al de les ESCs. En canvi, les ntESCs, que recentment han estat obtingudes en humans amb eficiències elevades (Tachibana *et al.* 2013b; Yamada *et al.* 2014), són més similars a les ESCs en comparació a les iPSCs (Byrne 2011; Ma *et al.* 2014). Per tant, sembla que la capacitat reprogramadora de l'òocit és superior a la dels factors de transcripció de les iPSCs i, per tant, el futur de la medicina regenerativa podria dependre dels avenços en la tècnica de SCNT en humans (Ma *et al.* 2014; Yamada *et al.* 2014).

Totes les tècniques de reprogramació nuclear descrites (figura 12.A-D) permeten desdiferenciar una cèl·lula somàtica per a què esdevingui una cèl·lula pluripotent i són eines molt útils per a l'estudi dels esdeveniments moleculars que tenen lloc durant la reprogramació nuclear. Val a dir, però, que només en el cas de la transferència nuclear a oòcits les cèl·lules reprogramades arriben a ser totipotents (revisat per Gurdon i Melton 2008; Halley-Stott *et al.* 2013; Yamanaka i Blau 2010).

Finalment, la reprogramació nuclear també pot donar lloc a un canvi de tipus de cèl·lula somàtica, o transdiferenciació, és a dir, el canvi directe d'un estat diferenciat a un altre sense passar per un estat de pluripotència (figura 12.E-F). Per exemple, s'han utilitzat extractes cel·lulars de limfòcits T o de precursors neuronals per reprogramar fibroblasts humans (Hakelien *et al.* 2002), i s'han utilitzat vectors virals que enlloc d'incorporar gens de pluripotència posseeixen factors de transcripció específics d'un altre tipus cel·lular, per exemple, de cèl·lules cardiovasculars (Sayed *et al.* 2013) o de cèl·lules beta pancreàtiques (Pagliuca i Melton 2013). Per tant, la transdiferenciació també podria tenir moltes aplicacions en la medicina regenerativa.

1.3. MILLORA DE LA REPROGRAMACIÓ NUCLEAR EN LA SCNT MITJANÇANT L'ÚS DE MODIFICADORS EPIGENÈTICS

1.3.1. Estratègies de millora de la reprogramació nuclear en la SCNT

Com s'ha comentat anteriorment (apartat 1.2.3), la reprogramació nuclear en la SCNT sovint és incorrecta o defectuosa, probablement a causa de què els factors reprogramadors presents en l'òocit accedeixen amb dificultat a la cromatina del nucli somàtic, la qual es troba altament metilada i amb una conformació tancada (Gurdon i Wilmut 2011). Com a conseqüència, els embrions clonats presenten nombroses anomalies epigenètiques, que donen lloc a patrons anormals d'expressió gènica i comprometen el seu potencial de desenvolupament (Yang *et al.* 2007b). La identificació d'aquestes anomalies en el procés de reprogramació ha estat clau pel desenvolupament d'estratègies que permetin incrementar l'eficiència del procés de reprogramació nuclear en la SCNT i, d'aquesta manera, millorar el desenvolupament dels embrions clonats.

Una de les estratègies és l'ús d'extractes cel·lulars d'òocits per modificar l'estat epigenètic de la cèl·lula donadora abans de ser utilitzada per la transferència nuclear. D'aquesta manera el nucli somàtic es sotmet a una reprogramació prèvia a la reprogramació exercida per l'òocit una vegada realitzada la transferència nuclear. Per exemple, Bui *et al.* (2008) varen demostrar que el citoplasma de l'òocit en vesícula germinal del ratolí, a diferència del citoplasma de l'òocit madur, és capaç d'eliminar la metilació en H3K9, la qual és important per a la reprogramació nuclear. Així, mitjançant el tractament de la cèl·lula donadora del nucli amb un extracte del citoplasma d'òocits en vesícula germinal abans de la transferència nuclear a un òocit madur varen aconseguir triplicar la taxa del clonatge en ratolí (3,1 % vs. 0,9 %). Posteriorment, els mateixos investigadors varen utilitzar l'extracte d'òocits de porc en estadi de vesícula germinal per tractar la cèl·lula somàtica abans de la transferència nuclear i varen obtenir una taxa de blastocists més elevada (27 % vs. 10 %) i uns blastocists de major qualitat en quant als nivells de metilació i acetilació d'H3K9 i l'expressió d'*Oct4* i *Nanog* (Bui *et al.* 2012). En canvi, Tang *et al.* (2009) varen observar un increment de la taxa i la qualitat dels blastocists bovins obtinguts per transferència nuclear de fibroblasts prèviament tractats amb l'extracte d'òocits madurs, però no amb l'extracte d'òocits en vesícula germinal.

D'altra banda, també s'ha descrit l'ús de RNA d'interferència per reduir l'expressió ectòpica de *Xist* en els embrions clonats. Aquesta tècnica va suposar la normalització dels perfils globals d'expressió gènica a l'estadi de mòrula i un increment del 10 % en les taxes de naixement en ratolí (Inoue *et al.* 2010; Matoba *et al.* 2011).

Finalment, també es poden utilitzar modificadors epigenètics per tractar la cèl·lula donadora del nucli i/o de l'embrió clonat. Aquesta estratègia ha sigut objecte de nombrosos estudis i ha donat lloc a grans millores en la tècnica de SCNT, tal i com es detalla a continuació. En general, els modificadors epigenètics utilitzats en experiments de SCNT promouen un increment en els nivells d'acetilació de les histones o una disminució en els nivells de metilació del DNA o d'aquells residus d'histona associats a heterocromatina. Aquestes modificacions alteren l'estructura de la cromatina del nucli donador, fent-la més accessible als factors reprogramadors presents en l'òocit. Es tracta de compostos químics que actuen a nivell de tot el genoma i principalment s'inclouen en un d'aquests tres tipus: inhibidors de les desacetilases d'histones (HDACis), inhibidors de les metiltransferases d'histones (HMTis), o inhibidors de les metiltransferases de DNA (DNMTis) (figura 13) (revisat per Ogura *et al.* 2013; Wakayama i Wakayama 2010).

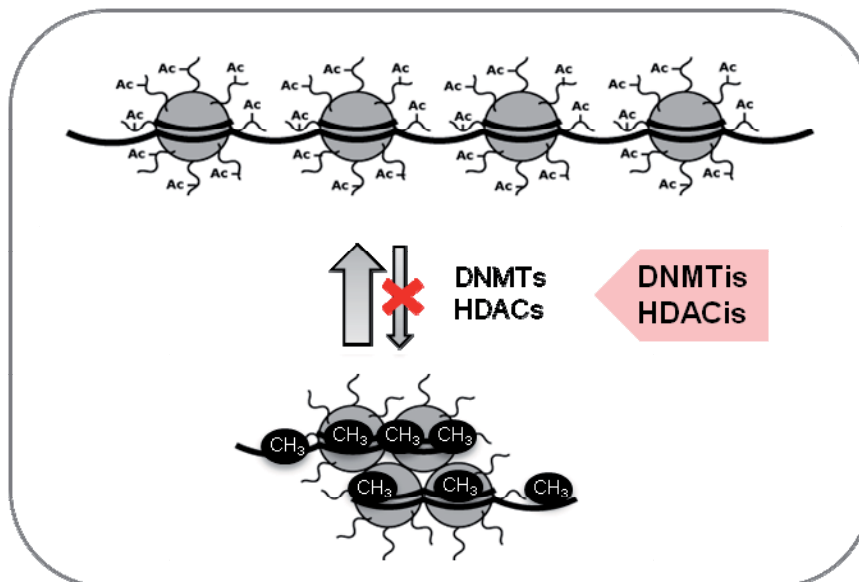


Figura 13. Ús de modificadors epigenètics per regular la conformació de la cromatina. Els inhibidors de les desacetilases d'histones (HDACis) o de les metiltransferases de DNA (DNMTis) promouen un estat de la cromatina més obert i accessible.

El treball de Wakayama i Yanagimachi (2001) afegint dimetilsulfòxid (DMSO) al medi d'activació d'òocits de ratolí enucleats i reconstruïts amb una cèl·lula del cúmulus va demostrar per primera vegada que el tractament dels embrions clonats amb agents químics incrementava el seu desenvolupament, probablement a través d'un efecte de millora de la reprogramació nuclear. Posteriorment, es va veure que el DMSO incrementa els nivells de mRNA i de proteïna DNMT3a i altera l'estat de metilació del DNA de múltiples loci (Iwatani *et al.* 2006). Per tant, es pot considerar que el DMSO va ser el primer modificador epigenètic utilitzat en experiments de transferència nuclear. Més endavant, en experiments de SCNT en vaca, es va veure que el tractament de la cèl·lula donadora del nucli amb els HDACis tricostatina A (TSA) (Enright *et al.* 2003) o butirat sòdic (NaBu) (Shi *et al.* 2003) incrementava les taxes de desenvolupament *in*

vitro dels embrions clonats. Tot i això, no va ser fins l'any 2006, amb el descobriment dels efectes beneficiosos de la TSA sobre l'obtenció de ratolins per SCNT (Kishigami *et al.* 2006b; Rybouchkin *et al.* 2006), que els modificadors epigenètics varen ser incorporats definitivament als protocols de SCNT per millorar-ne l'eficiència. Des d'aleshores, s'han realitzat múltiples estudis amb diferents tipus de modificadors epigenètics, tractant-ne les cèl·lules donadores del nucli de forma prèvia a la transferència nuclear o, més freqüentment, els embrions reconstruïts. Aquests modificadors epigenètics tenen un efecte general sobre l'estat epigenètic de tot el nucli, i això fa que tinguin una certa toxicitat embrionària. És precís ajustar molt bé la concentració i el temps d'exposició de la cèl·lula/embrió al modificador epigenètic aplicat per tal d'aconseguir els millors resultats en l'eficiència de la SCNT i els mínims efectes perjudicials en la viabilitat dels embrions clonats. A continuació es resumeixen els estudis realitzats amb els diferents tipus de modificadors epigenètics, la majoria amb HDACis o DNMTis.

1.3.2. Inhibidors de les desacetilades d'histones (HDACis)

Arran dels treballs de Kishigami *et al.* (2006b) i Rybouchkin *et al.* (2006), que demostraven per primera vegada que el tractament dels embrions clonats de ratolí amb la TSA altera l'estat epigenètic del nucli transferit i augmenta l'eficiència de la SCNT, varen sorgir nombrosos estudis per tal d'augmentar l'eficiència d'aquesta tècnica, en ratolí i en altres espècies, mitjançant l'ús d'HDACis (revisat per Wakayama i Wakayama 2010). En el cas del ratolí, la majoria de treballs han aplicat el tractament amb HDACis durant les primeres hores després de la reconstrucció dels embrions. Aquests treballs han demostrat que el tractament dels embrions abans, durant i/o després de l'activació partenogenètica millora sovint el desenvolupament dels clons tant pre- com postimplantacional. Concretament, els dos treballs publicats l'any 2006 varen utilitzar protocols diferents per al tractament d'embrions clonats de la soca de ratolí B6D2F1 amb TSA. Kishigami *et al.* (2006b) varen exposar els embrions a TSA durant les 6 h d'activació i 4 h del posterior cultiu embrionari, i varen obtenir un increment de 3 vegades en la taxa de blastocists (60-80 % vs. 20-30 %), un increment de més de 10 vegades en el desenvolupament a terme (6 % vs. 0,5 %) i un increment de 4 vegades en la taxa de derivació de ntESCs (40 % vs. 10 %). Per contra, Rybouchkin *et al.* (2006) varen obtenir els millors resultats en la taxa de blastocists (81 % vs. 40 %) i en el desenvolupament a terme (2,8 % vs. 0,8 %) tractant els embrions amb TSA durant 2-3 h abans de l'activació i les 6 h d'activació. En canvi, quan varen provar d'aplicar la TSA només abans de l'activació partenogenètica no varen observar una millora en el desenvolupament dels embrions clonats. Per tant, varen concloure que era necessari exposar els embrions clonats a la TSA durant l'activació per obtenir l'efecte beneficiós d'aquest modificador epigenètic. D'altra banda, Rybouchkin *et al.* (2006) també varen estudiar la dinàmica d'acetilació d'H4K12 en els embrions clonats en estadi d'una cèl·lula tractats amb TSA, demostrant que la TSA provoca un increment en els nivells d'acetilació de les histones en aquests embrions. Des d'aleshores, s'han realitzat molts altres estudis sobre l'efecte de la TSA en la SCNT en ratolí, sempre tractant els embrions clonats durant el període

d'activació partenogenètica (taula 2). Per exemple, s'ha vist que també augmenta l'acetilació d'H3K9 i K14, i d'H4K8, K12 i K16 (Wang *et al.* 2007), millora la remodelació de l'heterocromatina constitutiva (Maalouf *et al.* 2009), afavoreix la replicació del DNA i la transcripció de nou RNA (Bui *et al.* 2010) i incrementa l'expressió de gens importants pel desenvolupament embrionari com *Oct4*, *Nanog*, *Cdx2*, etc. (Hai *et al.* 2011; Kang i Roh 2011; Li *et al.* 2008b), donant lloc a perfils d'expressió gènica més semblants als dels embrions control fecundats (Kodha *et al.* 2012).

Tot i que en els estudis realitzats en ratolí només es contemplava tractar l'oòcit reconstruït o l'embrió clonat, els estudis realitzats en vaca han demostrat que la TSA també millora el desenvolupament *in vitro* dels embrions clonats quan es tracta la cèl·lula donadora del nucli (Ding *et al.* 2008; Enright *et al.* 2003; Jafarpour *et al.* 2011; Wee *et al.* 2007) (taula 2). En canvi, en vaques, l'efecte beneficiós de tractar l'embrió clonat amb TSA no està tant clar. Entre els treballs que han analitzat el desenvolupament a terme dels embrions clonats tractats amb TSA (Sangalli *et al.* 2012; Sawai *et al.* 2012; Srirattana *et al.* 2012; Wang *et al.* 2011d), només en el de Wang *et al.* (2011d), en el qual tant la cèl·lula donadora del nucli com l'embrió clonat varen ser tractats amb TSA en combinació amb el DNMTi 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-dC), es va observar un increment en la taxa de naixement dels clons (13,4 % vs. 3 %).

Pel que fa a l'ús de la TSA en el clonatge de porcs, el tractament de la cèl·lula donadora del nucli no va millorar la taxa de blastocists (Cong *et al.* 2013). En canvi, tot i haver-hi una excepció (Kim *et al.* 2011), en general el tractament dels embrions clonats de porc amb TSA millora el seu desenvolupament *in vitro* (Beebe *et al.* 2009; Cong *et al.* 2013; Li *et al.* 2008a; Yamanaka *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2007) i *in vivo* (Martínez-Díaz *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2010) (taula 2).

En el cas del clonatge de conills, el tractament dels embrions amb TSA va donar resultats variables en quant a les taxes de desenvolupament *in vitro* (Chen *et al.* 2013a; Meng *et al.* 2009; Shi *et al.* 2008), i no va resultar en una millora del desenvolupament a terme en l'únic estudi realitzat, on es va obtenir una eficiència de clonatge del 3-5 % però cap dels conills tractats amb TSA va arribar a l'etapa adulta (Meng *et al.* 2009).

Finalment, en ovella, un treball recent ha demostrat que el tractament dels embrions clonats amb TSA millora les taxes de blastocists (17 % vs. 9 %) (Wen *et al.* 2014a). En canvi, la TSA no va millorar el desenvolupament a terme dels embrions de rata generats per SCNT (Sterthaus *et al.* 2009) (taula 2).

Taula 2. Efecte del tractament amb l'inhibidor de les desacetilases d'histones (HDACi) tricostatina A (TSA) sobre el desenvolupament dels embrions de diverses espècies de mamífer generats per transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.

Tractament	Espècie	Cèl·lula tractada	Efecte sobre el desenvolupament		Referència	
			<i>in vitro</i>	a terme		
TSA	Ratolí	Embrió clonat	Millora	Millora	Kishigami <i>et al.</i> 2006b; Rybouchkin <i>et al.</i> 2006; Tsuji <i>et al.</i> 2009; Van Thuan <i>et al.</i> 2009; Bui <i>et al.</i> 2010	
			Millora	-	Li <i>et al.</i> 2008b; Kang i Roh 2011	
			No millora	Millora	Maalouf <i>et al.</i> 2009	
			Millora	No millora	Costa-Borges <i>et al.</i> 2010; Dai <i>et al.</i> 2010	
			-	Millora	Ono <i>et al.</i> 2010	
	Vaca	Cèl·lula donadora	Millora	-	Enright <i>et al.</i> 2003; Wee <i>et al.</i> 2007; Ding <i>et al.</i> 2008; Jafarpour <i>et al.</i> 2011	
			No millora	-	Shi <i>et al.</i> 2003; Wu <i>et al.</i> 2008	
		Embrió clonat	No millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008; Iager <i>et al.</i> 2008; Cui <i>et al.</i> 2011	
			Millora	-	Akagi <i>et al.</i> 2011; Lee <i>et al.</i> 2011; Song <i>et al.</i> 2014a	
			Millora	No millora	Sawai <i>et al.</i> 2012; Srirattana <i>et al.</i> 2012;	
			No millora	No millora	Sangalli <i>et al.</i> 2012	
		Cèl·lula donadora i embrió clonat	Millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008	
		Cèl·lula donadora del nucli	No millora	-	Cong <i>et al.</i> 2013	
		Porc	Embrió clonat	Millora	-	Zhang <i>et al.</i> 2007; Li <i>et al.</i> 2008b; Beebe <i>et al.</i> 2009; Yamanaka <i>et al.</i> 2009; Cong <i>et al.</i> 2013
				Millora	Millora	Martínez-Díaz <i>et al.</i> 2010; Zhao <i>et al.</i> 2010
	No millora			-	Kim <i>et al.</i> 2011	
		Cèl·lula donadora i embrió clonat	No millora	-	Cong <i>et al.</i> 2013	
	Ovella	Embrió clonat	Millora	-	Wen <i>et al.</i> 2014a	
	Conill	Embrió clonat	Millora	-	Shi <i>et al.</i> 2008	
			No millora	No millora	Meng <i>et al.</i> 2009	
		Millora	-	Chen <i>et al.</i> 2013a		
Rata	Embrió clonat	-	No millora	Sterthaus <i>et al.</i> 2009		
TSA + 5-aza-dC (DNMTi)	Ratolí	Embrió clonat	-	No millora	Van Thuan <i>et al.</i> 2009	
			No millora	-	Shi <i>et al.</i> 2003	
	Vaca	Cèl·lula donadora	Millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008	
			No millora	No millora	Sangalli <i>et al.</i> 2012	
		Embrió clonat	Millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008	
			Millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008	
	Cèl·lula donadora i embrió clonat	Millora	Millora	Wang <i>et al.</i> 2011d		
TSA + Scriptaid (HDACi)	Conill	Embrió clonat	Millora	-	Chen <i>et al.</i> 2013a	

DNMTi: inhibidor de les desacetilases d'histones.

A banda de la TSA, s'han realitzat estudis menys nombrosos amb molts altres HDACis (taula 3). Per exemple, el scriptaid va resultar molt significatiu en ratolí perquè no només va incrementar l'eficiència del clonatge fins a 15 vegades (7,6 % vs. 0,5 %), sinó que, a més, va permetre clonar per primera vegada diverses soques endogàmiques com C57BL/6, C3H/He, DBA/2, i 129/Sv amb una eficiència del 0,9-9,8 % (Van Thuan *et al.* 2009). Isaji *et al.* (2013) també varen tractar els embrions clonats de ratolí amb scriptaid, però no varen obtenir una millor taxa de desenvolupament *in vitro*, només una major qualitat dels blastocists en la soca B6D2F1 (no es va analitzar el desenvolupament a terme). En la majoria d'estudis realitzats en vaques, porcs, ovelles i conills, el scriptaid sol (Akagi *et al.* 2011; Chen *et al.* 2013a; Wang *et al.* 2011a; Wen *et al.* 2014a; Xu *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2009, 2010) o en combinació amb TSA (Chen *et al.* 2013a) o amb els DNMTi s-adenosil-homocisteïna (SAH) (Zhang *et al.* 2014) o RG108 (Xu *et al.* 2013) millora les taxes de blastocists. Només en un estudi amb vaques (Zhang *et al.* 2014) i un amb porcs (Park *et al.* 2012) no es va detectar un efecte de millora. Pel que fa al desenvolupament a terme, el scriptaid només ha estat testat en porcs, on es va obtenir un increment d'aproximadament dues vegades en la taxa de naixement, assolint una taxa del 3,7 % (Zhao *et al.* 2009, 2010). A més, val a dir que el tractament tant amb la TSA com amb el scriptaid ha estat clau per a les millores aconseguides recentment en el clonatge en humans (Tachibana *et al.* 2013b; Yamada *et al.* 2014).

Un altre dels HDACis emprats en estudis de SCNT ha estat l'àcid valproic (VPA). En ratolí, Costa-Borges *et al.* (2010) varen observar una millora significativa de la taxa i la qualitat dels blastocists (38 % vs. 23 %) i un lleu increment del desenvolupament a terme (0,7 % vs. 0 %) en els embrions de ratolí de la soca B6CBAF1 tractats amb VPA. En canvi, Ono *et al.* (2010) no varen observar un increment en el desenvolupament *in vitro* ni *in vivo* en la soca B6D2F1. A més, Isaji *et al.* (2013) tampoc varen obtenir una millor taxa, només una major qualitat dels blastocists, tractant els embrions amb VPA (no es va analitzar el desenvolupament a terme). Pel que fa als estudis realitzats en altres espècies, utilitzant vaques i tractant la cèl·lula donadora del nucli (Selokar *et al.* 2013) o l'embrió clonat (Song *et al.* 2014a; Xu *et al.* 2012), o utilitzant porcs i tractant els embrions clonats (Huang *et al.* 2011a; Kang *et al.* 2013; Kim *et al.* 2011; Miyoshi *et al.* 2010), s'ha demostrat que el VPA millora el desenvolupament *in vitro*. Però pel que fa al desenvolupament a terme, només ha estat analitzat en un estudi en vaca, en el qual no es va observar un efecte de millora tractant la cèl·lula donadora del nucli (Sangalli *et al.* 2014), i en dos estudis en porc, en els quals es varen obtenir resultats contradictoris (Huang *et al.* 2011a; Kang *et al.* 2013). Finalment, la combinació de VPA amb el DNMTi hidralasina no va millorar el desenvolupament *in vitro* ni *in vivo* dels embrions clonats de vaca (Sangalli *et al.* 2012) (taula 3). Per tant, caldrà realitzar més estudis per clarificar si el VPA té un efecte beneficiós sobre el clonatge.

Taula 3. Efecte dels tractament amb inhibidors de les desacetilases d'histones (HDACis) diferents de la tricostatina A (TSA) sobre el desenvolupament dels embrions de diverses espècies de mamífer generats per transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.

HDACi	Espècie	Cèl·lula tractada	Efecte sobre el desenvolupament		Referència
			<i>in vitro</i>	a terme	
APHA	Ratolí	Embrió clonat	No millora	No millora	Van Thuan <i>et al.</i> 2009
CBHA	Ratolí	Embrió clonat	Millora	Millora	Dai <i>et al.</i> 2010
	Porc	Embrió clonat	Millora	No millora	Song <i>et al.</i> 2014b
CUDC-101	Porc	Embrió clonat	Millora	Millora	Jin <i>et al.</i> 2013
	Ratolí	Embrió clonat	No millora	-	Isaji <i>et al.</i> 2013
NaBu	Vaca	Cèl·lula donadora	Millora	-	Shi <i>et al.</i> 2003; Jafarpour <i>et al.</i> 2011
	Porc	Cèl·lula donadora	No millora	-	Das <i>et al.</i> 2010
		Embrió clonat	Millora	-	Das <i>et al.</i> 2010
	Conill	Cèl·lula donadora	Millora	No millora	Yang <i>et al.</i> 2007a
Oxamflatina	Ratolí	Embrió clonat	No millora	Millora	Ono <i>et al.</i> 2010
	Vaca	Embrió clonat	Millora	.	Su <i>et al.</i> 2011
	Porc	Embrió clonat	Millora	Millora	Park <i>et al.</i> 2012
SAHA	Ratolí	Embrió clonat	Millora	Millora	Ono <i>et al.</i> 2010
Scriptaid	Ratolí	Embrió clonat	Millora	Millora	Van Thuan <i>et al.</i> 2009
			No millora	-	Isaji <i>et al.</i> 2013
	Vaca	Embrió clonat	Millora	-	Akagi <i>et al.</i> 2011; Wang <i>et al.</i> 2011a
			No millora	-	Zhang <i>et al.</i> 2014
	Porc	Embrió clonat	Millora	Millora	Zhao <i>et al.</i> 2009, 2010
			No millora	-	Park <i>et al.</i> 2012
			Millora	-	Xu <i>et al.</i> 2013
	Ovella	Embrió clonat	Millora	-	Wen <i>et al.</i> 2014a
	Conill	Embrió clonat	Millora	-	Chen <i>et al.</i> 2013a
	Scriptaid +SAH (DNMTi)	Vaca	Embrió clonat	Millora	-
Scriptaid +RG108 (DNMTi)	Porc	Embrió clonat	Millora	-	Xu <i>et al.</i> 2013
Scriptaid +TSA	Conill	Embrió clonat	Millora	-	Chen <i>et al.</i> 2013a
Sirtinol	Ratolí	Embrió clonat	Millora	-	Hirata <i>et al.</i> 2008
Sirtinol (* i TSA)	Ratolí	Embrió clonat	Millora	-	Hirata <i>et al.</i> 2008
VPA	Ratolí	Embrió clonat	Millora	No millora	Costa-Borges <i>et al.</i> 2010
			No millora	No millora	Ono <i>et al.</i> 2010
			No millora	-	Isaji <i>et al.</i> 2013
	Vaca	Cèl·lula donadora	Millora	-	Selokar <i>et al.</i> 2013
			No millora	No millora	Sangalli <i>et al.</i> 2014
	Vaca	Embrió clonat	Millora	-	Xu <i>et al.</i> 2012; Song <i>et al.</i> 2014a
			No millora	-	Mizutani <i>et al.</i> 2011
			Millora	-	Miyoshi <i>et al.</i> 2010; Kim <i>et al.</i> 2011
	Porc	Embrió clonat	Millora	Millora	Huang <i>et al.</i> 2011a
			Millora	No millora	Kang <i>et al.</i> 2013
VPA +Hidralasina (DNMTi)	Vaca	Cèl·lula donadora	No millora	No millora	Sangalli <i>et al.</i> 2012

DNMTi: inhibidor de les desacetilases d'histones.

*tant el grup control com el grup tractat varen ser tractats amb TSA

El treball de Ono *et al.* (2010) també va demostrar l'efecte positiu dels HDACis àcid hidroxàmic suberoilànilda (SAHA) i oxamflatina en el desenvolupament a terme dels embrions de ratolí de la soca B6D2F1 (9,4 % i 7,5 % vs. 2,6 %, respectivament). A més, varen determinar que el SAHA i l'oxamflatina també milloren la qualitat dels blastocists clonats, els quals presenten més cèl·lules de la ICM, una taxa d'apoptosi més baixa (semblant a la dels embrions tractats amb TSA), i major eficiència de derivació de línies de ntESCs (56-60 % vs. 17-21 %). En vaques, l'oxamflatina millora les taxes de blastocists (40 % vs. 30 %) (Su *et al.* 2011) i, en porcs, també el desenvolupament a terme (1-3 % vs. 0-2 %) (Park *et al.* 2012) (taula 3).

El tractament de la cèl·lula donadora del nucli amb l'HDACi NaBu millora el desenvolupament *in vitro* dels embrions clonats en vaques (Jafarpour *et al.* 2011; Shi *et al.* 2003) (59 % vs. 26 % i 40-47 % vs. 29 %, respectivament) i en conills (49 % vs. 33 %) (Yang *et al.* 2007a) però no en porcs (12-14 %) (Das *et al.* 2010). El desenvolupament a terme només es va analitzar en el treball amb conills i no es va obtenir cap clon. En canvi, el tractament dels embrions clonats amb NaBu millora el seu desenvolupament *in vitro* en porcs (18 % vs. 11 %) (Das *et al.* 2010), i la seva qualitat en termes d'expressió d'*Oct4* en els blastocists en la soca de ratolí B6D2F1 (Isaji *et al.* 2013) (taula 3).

Altres exemples d'HDACis que han demostrat un efecte positiu en la SCNT són la bis-hidroxiamida d'àcid m-carboxicinàmic (CBHA), que millora el desenvolupament *in vitro* i *in vivo* d'embrions clonats de ratolí (Dai *et al.* 2010) i el desenvolupament *in vitro* però no *in vivo* d'embrions clonats de porc (Song *et al.* 2014b); el CUDC-101, que millora el desenvolupament *in vitro* i *in vivo* en porcs (Jin *et al.* 2013); i el sirtinol, sol o combinat amb TSA, que millora el desenvolupament *in vitro* en ratolí (Hirata *et al.* 2008). Per contra, el també HDACi hidroxiamida d'arroil-pirrol (APHA) no millora el desenvolupament *in vitro* ni *in vivo* dels embrions clonats de ratolí (Van Thuan *et al.* 2009) (taula 3).

Tal i com hem vist, en el ratolí tots els HDACis emprats han demostrat incrementar l'eficiència de la SCNT i/o la qualitat dels embrions clonats almenys en algun treball (taules 2 i 3). Només l'APHA ha donat resultats negatius. Pel que fa al seu mecanisme d'acció, a nivell global s'ha vist que el tractament dels embrions clonats amb HDACis provoca com a efecte directe un increment en els nivells d'acetilació de diferents histones (Wang *et al.* 2007). A més, com a resultat del tractament, els embrions solen presentar nivells de metilació de les histones i del DNA més semblants als controls, major expressió de gens de pluripotència, i un patró d'expressió gènica també més semblant als embrions control fecundats. Tot i això, s'ha demostrat que existeixen importants diferències en l'eficiència de la SCNT i en l'efecte de millora per part del modificador epigenètic en funció de la soca (figura 14) i de la cèl·lula donadora del nucli emprada (revisat per Ogura *et al.* 2013 i Wakayama i Wakayama 2010).

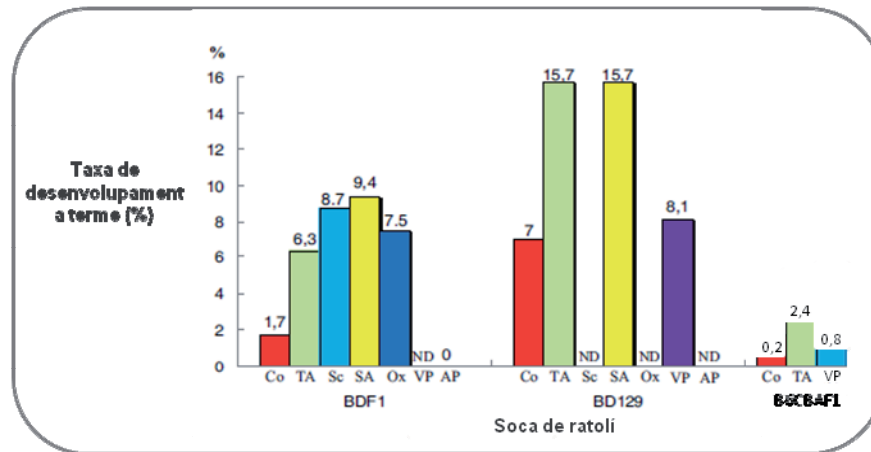


Figura 14. Efecte d'alguns inhibidors de les desacetilases d'histones (HDACis) sobre el desenvolupament a terme en diferents soques de ratolí. Sense aplicar el tractament amb HDACi (Co) l'eficiència del clonatge és molt baixa. Però quan s'utilitzen HDACis com la tricostatina A (TA), el scriptaid (Sc), l'acid hidroxàmic suberoilànilida (SA) o l'oxamflatina (Ox), s'observa un increment en la taxa de clonatge que varia segons la soca. En canvi, quan s'utilitza l'acid valproic (VP) l'eficiència no millora significativament, i quan s'utilitza l'hidroxiàmida d'arroil-pirrol (AP) no s'obtenen clons. Figura modificada de Wakayama i Wakayama (2010). Dades de la soca B6CBAF1 extretes de Maalouf *et al.* 2009 i Costa-Borges *et al.* 2010, 2011b.

En porc també hi ha diversos estudis que abonen l'efecte positiu dels modificadors epigenètics en l'eficiència del clonatge. En canvi, en els treballs de clonatge en vaques, l'efecte dels HDACis sobre les taxes de blastocists són més diversos i pocs treballs han analitzat el desenvolupament a terme dels embrions clonats (revisat per Akagi *et al.* 2013). En altres espècies, com l'ovella o el conill, la quantitat de treballs realitzats fins el moment encara és més reduïda. Però tenint en compte tots aquests estudis en diferents models animals, a nivell global es pot concloure que els HDACis milloren l'eficiència de la SCNT, tot i que amb lleugeres diferències segons l'espècie (taula 2 i 3).

Tot i que tots els HDACis incrementen els nivells generals d'acetilació de les histones, aquests compostos tenen diferents especificitats pels diversos subtipus d'HDAC (Blackwell *et al.* 2008; Ruijter *et al.* 2003) i, per tant, podrien exercir papers diferents en el nucli de l'embrió clonat. Per exemple, la TSA és un inhibidor de les HDAC de classe I, IIa i IIb, mentre que el VPA només inhibeix la classe I i IIa. La importància d'aquestes diferències entre els HDACis va ser plantejada per primera vegada per Ono *et al.* (2010) (revisat per Wakayama i Wakayama 2010), però encara no se sap la inhibició de quin dels subtipus d'HDACs és clau per millorar l'eficiència de la SCNT. A més, a banda de l'acció HDACi, aquests modificadors epigenètics podrien estar exercint un paper significatiu en altres vies cel·lulars, el que també podria explicar els diferents resultats obtinguts entre espècies o entre HDACis dins d'una mateixa espècie. Per exemple, la TSA ha estat relacionada amb la via de l'apoptosi en embrions de vaca i de porc (Cui *et al.* 2011; Ji *et al.* 2013), mentre que el VPA sembla que també exerceix una inhibició

sobre la glicogen sintetasa quinasa 3 GSK-3 (Williams *et al.* 2002), la qual podria tenir un efecte sobre la via de Wnt/ β -catenina, també relacionada amb la reprogramació nuclear (Isaji *et al.* 2013).

1.3.3. Inhibidors de les metiltransferases de DNA (DNMTis)

Mentre que ha estat àmpliament demostrat que, en general, els HDACi milloren l'eficiència del clonatge, l'efecte d'altres modificadors epigenètics com els DNMTi està més discutit i s'han realitzat menys estudis al respecte. Per exemple, el tractament amb el DNMTi 5-aza-dC de les cèl·lules donadores del nucli en vaca (Ding *et al.* 2008; Enright *et al.* 2003; Jafarpour *et al.* 2011) o en porc (Huan *et al.* 2013), i de l'embrió clonat o d'ambdós en vaca (Ding *et al.* 2008), no va millorar el desenvolupament *in vitro* (en cap dels estudis es va analitzar el desenvolupament a terme). I el tractament amb 5-aza-dC, combinada amb TSA, de la cèl·lula donadora en vaca (Sangalli *et al.* 2012) o de l'embrió clonat en ratolí (Tsuji *et al.* 2009) tampoc va millorar el seu desenvolupament a terme. A més, el tractament de la cèl·lula donadora del nucli amb el també DNMTi hidralasina combinat amb VPA, tampoc no va millorar el desenvolupament *in vitro* ni *in vivo* dels embrions clonats de vaca (Sangalli *et al.* 2012). En canvi, el tractament dels embrions clonats de porc amb 5-aza-dC va millorar el seu desenvolupament *in vitro* (Huan *et al.* 2013), i el tractament de la cèl·lula donadora del nucli i de l'embrió clonat de vaca amb 5-aza-dC combinada amb TSA va millorar el desenvolupament *in vivo* (Wang *et al.* 2011d) (taula 4).

Per una altra banda, en experiments de SCNT en vaca, el tractament de les cèl·lules donadores amb SAH (Jeon *et al.* 2008), o de l'embrió clonat amb SAH combinat amb l'HDACi scriptaid (Zhang *et al.* 2014), va millorar el desenvolupament *in vitro* dels embrions clonats. En canvi, el tractament dels embrions clonats amb SAH va donar resultats contradictoris (Jafari *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2014). Però en cap d'aquests casos no es varen realitzar transferències embrionàries i per tant es desconeix l'efecte d'aquest DNMTi sobre el desenvolupament a terme dels embrions clonats (taula 4).

Finalment, el tractament dels embrions clonats amb un altre DNMTi anomenat RG108 va millorar la qualitat dels blastocists de ratolí obtinguts per SCNT i la derivació de ntESC, però no el desenvolupament *in vitro* ni *in vivo* (Li *et al.* 2012). De manera similar, tampoc va millorar la taxa de blastocists en porc, només en combinació amb l'HDACi scriptaid (Xu *et al.* 2013) (taula 4).

Taula 4. Efecte dels tractaments amb inhibidors de les metiltransferases de DNA (DNMTis) i d'histones (HMTis) sobre el desenvolupament dels embrions de diverses espècies de mamífer generats per transferència nuclear de cèl·lules somàtiques.

Modificador epigenètic	Espècie	Cèl·lula tractada	Efecte sobre el desenvolupament		Referència	
			<i>in vitro</i>	a terme		
DNMTi	5-aza-dC	Cèl·lula donadora	No millora	-	Enright <i>et al.</i> 2003; Ding <i>et al.</i> 2008; Jafarpour <i>et al.</i> 2011	
		Vaca	Embrió clonat	No millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008
			Cèl·lula donadora i embrió clonat	No millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008
		Porc	Cèl·lula donadora	No millora	-	Huan <i>et al.</i> 2013
			Embrió clonat	Millora	-	Huan <i>et al.</i> 2013
		Ratolí	Embrió clonat	-	No millora	Van Thuan <i>et al.</i> 2009
	5-aza-dC + TSA(HDACi)	Vaca	Cèl·lula donadora	No millora	-	Shi <i>et al.</i> 2003
				Millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008
				No millora	No millora	Sangalli <i>et al.</i> 2012
			Embrió clonat	Millora	-	Ding <i>et al.</i> 2008
			Cèl·lula donadora i embrió clonat	Millora	Millora	Wang <i>et al.</i> 2011d
	Hidralasina + VPA (HDACi)	Vaca	Cèl·lula donadora	No millora	No millora	Sangalli <i>et al.</i> 2012
	RG108	Ratolí	Embrió clonat	No millora	No millora	Li <i>et al.</i> 2012
		Porc	Embrió clonat	No millora	-	Xu <i>et al.</i> 2013
	RG108 + scriptaid (HDACi)	Porc	Embrió clonat	Millora	-	Xu <i>et al.</i> 2013
	SAH	Vaca	Cèl·lula donadora	Millora	-	Jeon <i>et al.</i> 2008
			Embrió clonat	No millora	-	Zhang <i>et al.</i> 2014
				Millora	-	Jafari <i>et al.</i> 2011
SAH+scriptaid (HDACi)	Vaca	Embrió clonat	Millora	-	Zhang <i>et al.</i> 2014	
HMTi	BIX-01294	Ovella	Embrió clonat	No millora	-	Fu <i>et al.</i> 2013
	BIX-01294 (*+TSA (HDACi))	Ratolí	Embrió clonat	No millora	No millora	Terashita <i>et al.</i> 2013

HDACi: inhibidor de les desacetilases d'histones

*tant el grup control com el grup tractat varen ser tractats amb TSA

Per tant, l'efecte beneficiós dels DNMTi sobre la SCNT no està clar ja que de moment cap dels DNMTi estudiats ha demostrat incrementar les taxes de desenvolupament a terme dels embrions clonats (Li *et al.* 2012), només en combinació amb un HDACi com la TSA (Wang *et al.* 2011d), i no sempre (Sangalli *et al.* 2012; Van Thuan *et al.* 2009). Pel que fa al seu efecte sobre el nucli, a més d'una reducció en els nivells globals de metilació del DNA (Wang *et al.* 2011c), s'ha vist que el tractament previ de la cèl·lula donadora del nucli amb els DNMTis SAH i 5-aza-dC provoca una reexpressió d'al·lels silenciats i una replicació més primerenca del cromosoma X. És a dir, aquests tractaments podrien afavorir la reactivació del cromosoma X en embrions clonats (revisat per Niemann *et al.* 2008), però caldrà realitzar més estudis per esbrinar si realment exerceixen un paper positiu sobre l'eficiència de la SCNT.

1.3.4. Altres modificadors epigenètics

Els HMTis són un altre tipus de modificadors epigenètics que també han estat emprats, amb menor freqüència, en experiments de SCNT. De moment, però, no han demostrat un efecte positiu en l'eficiència de la tècnica. Per exemple, el inhibidor de la metiltransferasa d'histones G9a anomenat BIX-01294 va resultar tòxic pel clonatge d'embrions d'ovella (Fu *et al.* 2012) i tampoc no va millorar el desenvolupament *in vitro* ni *in vivo* dels embrions de ratolí clonats tractats amb TSA (Terashita *et al.* 2013). En aquests darrers embrions, però, el tractament amb BIX-01294 va reduir els nivells anormalment elevats d'H3K9me2 i va afavorir l'expressió del gen *Magea2*, essencial pel desenvolupament normal.

Finalment, existeixen altres modificadors epigenètics que també milloren l'eficiència de la SCNT. Aquest és el cas de l'àcid ascòrbic o Vitamina C (VitC), un reconegut antioxidant que s'ha vist que també actua com a cofactor de les HDMS amb domini Jumonji (Klose *et al.* 2006) i dels enzims TET (revisat per Krishnakumar i Bluelloch, 2013 i Monfort i Wutz 2013). En un estudi de SCNT realitzat en porc s'ha demostrat que la VitC no només millora les condicions de cultiu gràcies al seu paper antioxidant sinó que, a més, exerceix un paper sobre la reprogramació nuclear (Huang *et al.* 2011b). En canvi, en un estudi molt recent realitzat en vaca, s'ha descrit un possible efecte perjudicial de l'ús de VitC per al cultiu dels embrions de vaca obtinguts per SCNT, ja que el seu efecte sobre la reprogramació nuclear podria afectar negativament la formació dels blastocists en aquesta espècie (Li *et al.* 2014).

1.3.5. Present i futur dels modificadors epigenètics en la SCNT

Tal i com hem vist, l'ús dels modificadors epigenètics, sobretot els HDACis, ha suposat un increment general de l'eficiència de la SCNT en moltes espècies, i actualment les taxes de desenvolupament *in vitro*, les taxes de desenvolupament *in vivo* i les taxes de derivació de ntESCs són més elevades que ara fa 10 anys, abans de començar a utilitzar els modificadors epigenètics. Per exemple, en el cas del ratolí, els intervals d'èxit s'han desplaçat del 20-40 % al 40-80 % per al desenvolupament *in vitro*, del 1-2 % al 2-15 % per al desenvolupament a terme i del 20-30 % al 40-60 % per a la derivació de ntESC, aproximadament. El mateix ha tingut lloc en el cas de la SCNT en boví, on els intervals d'èxit s'han desplaçat del 20-40 % al 30-60 % per al desenvolupament *in vitro* i del 2-10 % a 5-15 % per al desenvolupament a terme; o en el cas de la SCNT en porcí, on s'han desplaçat del 10-20 % al 20-60 % per al desenvolupament *in vitro* i del 0-2 % a 1-4 % per al desenvolupament a terme, també aproximadament. A més, cal destacar les millores aconseguïdes recentment en el clonatge en humans gràcies, entre altres, a l'ús d'HDACis (Tachibana *et al.* 2013b; Yamada *et al.* 2014).

No obstant, malgrat el tractament amb modificadors epigenètics incrementa les taxes d'èxit de la SCNT i la qualitat dels embrions clonats a nivell dels perfils epigenètics o d'expressió gènica, els animals clonats segueixen presentant una sèrie d'anomalies característiques com el sobrepès del fetus i la placenta o l'obesitat adulta (Nieman *et al.* 2008; Van Thuan *et al.* 2010; Yang *et al.* 2007b). Addicionalment, l'eficiència del clonatge reproductiu, tot i haver millorat, continua sent massa baixa com per poder implementar totes les aplicacions comercials de la SCNT en la ramaderia i la indústria (vegeu l'apartat 1.1.4.1.).

Per això, cal continuar investigant amb modificadors epigenètics en la SCNT per tal d'esbrinar amb més detall mitjançant quin mecanisme epigenètic incrementen l'eficiència d'aquesta tècnica, i per trobar nous tractaments que donin encara millors resultats. Per exemple, l'ús de modificadors epigenètics amb major especificitat per determinats subtipus d'HDACs o de DNMTs, o amb una acció sobre regions específiques del genoma, o el tractament amb noves combinacions d'aquests modificadors epigenètics, podrien suposar una gran millora en l'eficiència de la SCNT que permetria treure més profit de totes les aplicacions que presenta aquesta tècnica. A més, tots aquests treballs contribuirien de forma significativa al coneixement sobre els mecanismes de la reprogramació nuclear i de l'adquisició i manteniment de la pluripotència.

Capítol

2

OBJECTIUS

El principal objectiu d'aquesta tesi és millorar els resultats obtinguts en la tècnica de SCNT en ratolí mitjançant l'aplicació de modificacions en el protocol de SCNT i la predicció del potencial de desenvolupament dels embrions clonats.

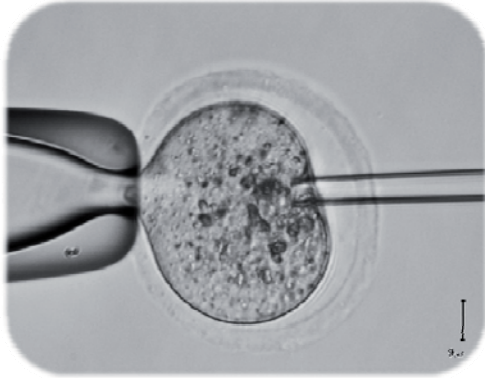
Per tal d'aconseguir aquest objectiu principal, s'han plantejat una sèrie d'objectius parcials:

1. Optimitzar els protocols de tractament dels embrions de ratolí obtinguts mitjançant SCNT amb els modificadors epigenètics VPA, PsA i VitC i explorar el seu efecte en el desenvolupament *in vitro* i la reprogramació nuclear.
2. Determinar si el tractament dels embrions clonats amb aquestes molècules millora les taxes de naixement i de derivació de línies de ntESCs.
3. Investigar si el tractament combinat amb PsA i VitC té un efecte positiu additiu sobre la SCNT.
4. Determinar si l'ús de LatA enlloc de CB com a inhibidor de la polimerització dels filaments d'actina en la SCNT millora les taxes de blastocist i de naixement dels embrions no tractats o tractats amb modificadors epigenètics.
5. Estudiar la morfocinètica de desenvolupament dels embrions clonats i determinar quins paràmetres poden predir el seu potencial de desenvolupament.
6. Investigar l'efecte de la PsA i la VitC sobre la morfocinètica de desenvolupament dels embrions clonats.

Capítol

3

RESULTATS



3.1. PSAMMAPLIN A INCREASES DEVELOPMENT AND QUALITY OF SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER MOUSE EMBRYOS

Psammaplin A Improves Development and Quality of Somatic Cell Nuclear Transfer Mouse Embryos

Anna Mallol, Josep Santaló, and Elena Ibáñez

Abstract

Faulty reprogramming of the donor somatic nucleus to a totipotent embryonic state by the recipient oocyte is a major obstacle for cloning success. Accordingly, treatment of cloned embryos with epigenetic modifiers, such as histone deacetylase inhibitors (HDACi), enhances cloning efficiency. The purpose of our study was to further explore the potential effect of valproic acid (VPA), used in previous studies, and to investigate the effect of psammaplin A (PsA), a novel HDACi, on the development and quality of cloned mouse embryos. To this aim, cloned embryos were treated with 5, 10, and 20 μ M PsA or 2 and 4 mM VPA for 8–9 h (before and during activation) or 16 h or 24 h (during and after activation), and their *in vitro* developmental potential and blastocyst quality were evaluated. Treatments with 10 μ M PsA and 2 mM VPA for 16 h were selected as the most optimal, showing higher blastocyst rates and quality. These treatments had no significant effects on the expression of *Nanog*, *Oct4*, and *Cdx2* or on global histone and DNA methylation levels at the blastocyst stage, but both increased global levels of histone acetylation at early developmental stages. This was correlated with a two-fold (for VPA) and four-fold (for PsA) increase in full-term development, and a 11.5-fold increase when PsA was combined with the use of latrunculin A instead of cytochalasin B. In conclusion, PsA improves mouse cloning efficiency to a higher extent than VPA.

Introduction

UPON FERTILIZATION, THE PATERNAL and maternal genomes undergo significant epigenetic modifications (DNA demethylation and histone modifications) essential to confer totipotency to the newly formed zygote and to allow subsequent embryonic development (Cantone and Fisher, 2013). This epigenetic reprogramming, which involves the erasure of gamete-specific epigenetic marks and the establishment of embryo-specific epigenetic marks, is exerted by reprogramming factors present in the cytoplasm of the metaphase II (MII) oocyte.

Cloning of a variety of mammalian species through somatic cell nuclear transfer (SCNT) has proved that mature oocytes have the ability to reprogram somatic genomes in addition to gametic genomes. It has been suggested that reprogramming factors in the oocyte may be involved in loosening the highly compacted somatic chromatin through epigenetic modifications, allowing additional remodeling and transcription factors to access the genome and establish the embryo developmental program (Gurdon and Wilmut, 2011). This situation is similar, in fact, to the acquisition of a hyperacetylated and hypomethylated chromatin state in the gametic genomes, which

increases their accessibility during normal development (Cantone and Fisher, 2013). However, as manifested by the low developmental capacity of SCNT embryos and the many abnormalities reported in cloned animals (Van Thuan et al., 2010; Yang et al., 2007), the oocyte ability to reprogram a somatic nucleus is limited. It is possible that, due to the different nature or the higher presence of epigenetic marks in a somatic genome in comparison with a gametic genome, the reprogramming machinery that effectively sets the developmental program after fertilization encounters major difficulties when acting upon somatic chromatin, resulting in its incomplete or incorrect reprogramming (Ogura et al., 2013). Indeed, abnormal epigenomes have been reported in SCNT embryos (Chan et al., 2012; Dean et al., 2001; Kang et al., 2001, 2002; Maalouf et al., 2008), leading to aberrant gene expression profiles (Bortvin et al., 2003; Humpherys et al., 2002; Mann et al., 2003), which in turn cause developmental arrest or the birth of animals with abnormalities, such as fetal and placental overweight, abnormal organ size, adult obesity, respiratory problems, or immunological deficiencies (Nieman et al., 2008; Van Thuan et al., 2010; Yang et al., 2007).

Current strategies to improve SCNT efficiency are focused on helping the oocyte in its reprogramming task, mainly

through chemical treatment of the donor cells or the reconstructed oocytes with epigenetic modifiers. In particular, inhibitors of histone deacetylases (HDACi) and DNA methyltransferases (DNMTi), which result in increased levels of histone acetylation and reduced levels of DNA methylation, respectively, could help to open up the chromatin of the transferred nucleus and make it more accessible to the reprogramming factors present in the ooplasm. Trichostatin A (TSA), a potent HDACi, was the first epigenetic modifier successfully used in SCNT protocols. Treatment of either donor bovine somatic cells or reconstructed mouse oocytes with TSA resulted in improved embryonic development *in vitro* and, in the latter case, in a significant increase in the success rate of mouse cloning and of derivation of embryonic stem cells (ESCs) from the cloned embryos (Enright et al., 2003; Kishigami et al., 2006a; Rybouchkin et al., 2006). Since then, many other HDACis, such as Scriptaid, valproic acid (VPA), or oxamflatin, have been applied to SCNT protocols to enhance reprogramming and increase cloning rates (Van Thuan et al., 2010; Wakayama and Wakayama, 2010). VPA, for instance, is a short-chain fatty acid with HDACi activity that has proved to increase development and quality of mouse, bovine, and porcine SCNT embryos to a similar or even higher extent than TSA (Costa-Borges et al., 2010; Huang et al., 2011; Isaji et al., 2013; Kim et al., 2011; Miyoshi et al., 2010; Xu et al., 2012). Although the effects of each particular HDACi may vary among strains and species and some of the tested HDACis, such as aroyl pyrrolyl hydroxamide, have shown no beneficial effects (Van Thuan et al., 2009), it is clear from numerous reports that most HDACis improve nuclear reprogramming and cloning efficiency. However, whether the same applies for other epigenetic modifiers, such as DNMTis or inhibitors of histone methyltransferases (HMTi), is still uncertain.

In search for new epigenetic modifiers that could potentially improve nuclear reprogramming and increase cloning efficiency to a higher extent than those currently used in SCNT protocols, we selected psammaphin A (PsA), a promising anticancer agent that has never been used in nuclear reprogramming studies. PsA is a natural compound isolated from a marine sponge and originally reported as an inhibitor of mycothiol-S-conjugate amidase and topoisomerase II (Kim et al., 1999a, 1999b; Nicholas et al., 2002). More recently, it has been shown to inhibit proliferation of several cancer lines at nanomolar concentrations and with a low cytotoxicity through selective induction of genes related to cell cycle arrest and apoptosis (Ahn et al., 2008; Kim et al., 2007; Piña et al., 2003). Several studies have found PsA to be a potent inhibitor of HDACs *in vitro* (Kim et al., 2007; Piña et al., 2003), specifically of HDAC1 (Baud et al., 2012), and to induce the accumulation of highly acetylated H3 in treated HeLa cells (Kim et al., 2007). Piña et al. (2003) also reported a potent DNMTi activity of PsA *in vitro* in addition to its HDACi activity, but later studies found no evidence for this dual action (Baud et al., 2012; García et al., 2011).

The main aim of the present study was to test the effect of PsA on mouse cloning efficiency. In addition, we aimed to further explore the potential effect of VPA, which in previous studies by our group demonstrated a beneficial effect on both *in vitro* and *in vivo* SCNT embryo development when applied at 2 mM concentration for 8–9 h starting immediately after nuclear injection (Costa-Borges et al., 2010).

Given the results of more recent studies, higher VPA concentrations and/or longer treatment durations could further increase the beneficial effects of VPA (Huang et al., 2011; Isaji et al., 2013; Kim et al., 2011; Xu et al., 2012). Therefore, in the first part of the study, we sought to determine the optimal concentration and treatment duration for both PsA and VPA in terms of *in vitro* development of cloned mouse embryos and blastocyst quality. Next, we investigated the effects of PsA and VPA on nuclear reprogramming by assessing the expression of pluripotency (*Oct4* and *Nanog*) and trophectoderm (*Cdx2*) genes and the presence of epigenetic modifications (H3K14 acetylation, H3K9 dimethylation, and DNA methylation) in the cloned embryos. Finally, full-term development of PsA- or VPA-treated cloned embryos was determined.

Materials and Methods

Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma (Madrid, Spain).

Animals

Mouse care and procedures were conducted according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona and by the Departament de Medi Ambient i Habitatge of the Generalitat de Catalunya.

Hybrid B6CBAF1 (C57Bl/6 × CBA/J) female mice aged 6–12 weeks were used as oocyte and cumulus cell donors and, after mating with males of the same strain, for the collection of *in vivo*-fertilized embryos used as controls in the embryo transfer and immunostaining procedures. Outbred CD-1 females mated with normal or vasectomized CD-1 males were used as foster or surrogate mothers, respectively. All animals were purchased from Charles River (L'Arbresle, France).

Collection of oocytes, embryos, and cumulus cells

Females were induced to superovulate by intraperitoneal injection of 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Intervet, Barcelona, Spain) followed 48 h later by 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Farma-Lepori, Barcelona, Spain). MII oocytes and one-cell embryos were collected from the oviducts 14–15 h or 23–24 h, respectively, after hCG administration in HEPES-buffered CZB medium (HCZB) (Chatot et al., 1989) and treated with 300 U/mL (oocytes) or 150 U/mL (embryos) hyaluronidase in HCZB at 37°C until dispersion of cumulus cells. Denuded oocytes and embryos were then washed and kept in drops of KSOM culture medium (MR-106-D; Millipore, Madrid, Spain) covered with mineral oil at 37°C under 5% CO₂. Dispersed cumulus cells recovered from oocytes were removed from hyaluronidase, diluted in HCZB, and centrifuged for 5 min at 250 × g. Finally, the pellet was resuspended in a small volume of 3% (vol/vol) polyvinylpyrrolidone in HCZB and kept at 4°C until use.

Production of cloned embryos by SCNT

Oocytes were enucleated mechanically and injected with a cumulus cell nucleus using blunt-end mercury-filled pipettes (outer diameter 8–10 μm and 5–6 μm, respectively)

attached to a piezo impact drill (Burleigh, Mississauga, Canada) driven by a micromanipulation device (Transfer-Man NK 2, Eppendorf, Hamburg, Germany) installed on an Olympus IX71 microscope (Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain). Micromanipulations were performed in groups of 25–30 oocytes in drops of HCZB containing 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cytochalasin B (CB), except in one of the experimental groups in the last set of experiments (embryo transfers) in which CB was replaced with 5 μM latrunculin A (LatA; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Afterward, the reconstructed oocytes were washed extensively and cultured for 1–3 h in KSOM supplemented or not with PsA or VPA before activation.

Parthenogenetic activation of oocytes

Chemical activation of reconstructed and intact MII oocytes was performed by incubating them for 6 h (37°C, 5% CO_2) in 10 mM SrCl_2 in Ca^{2+} -free CZB medium supplemented with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CB (or 5 μM LatA in one of the experimental groups in the last set of experiments) to prevent second polar body extrusion. After activation, oocytes showing at least one pronucleus were washed extensively and cultured in KSOM with or without the epigenetic modifier.

Epigenetic modifier treatments

PsA (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to prepare a 3 mM stock solution and stored frozen. VPA was dissolved in 3 \times distilled water to prepare a 0.2 M stock solution, filtered, and stored at 4°C for 3 weeks. The final concentrations of both epigenetic modifiers were prepared by dilution of the stock solutions in the culture or activation media, depending on the experimental procedure. Three different protocols were used for the treatment of reconstructed oocytes with the epigenetic modifiers: Embryos were exposed to PsA or VPA for 2–3 h after reconstruction and 6 h of activation (8–9 h treatment) or during 6 h of activation and 10 h or 18 h of the posterior culture (16 h and 24 h treatments, respectively). At the end of the treatment, embryos were extensively washed in drops of KSOM culture medium.

Blastocyst differential staining and cell counts

Cloned embryos that reached the blastocyst stage 96 h postactivation were used for the differential staining of trophoctoderm (TE) and inner cell mass (ICM) cells. Following the protocol described by Thouas et al. (2001), blastocysts were first incubated for 12 sec in a permeabilization solution consisting of 1% (vol/vol) Triton X-100 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (PI) in HEPES-buffered KSOM. They were then quickly transferred to a fixative solution of 100% ethanol with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, Spain) and stored at 4°C overnight. Finally, embryos were washed in a drop of glycerol and mounted onto a glass microscope slide in a microdrop of glycerol. A little pressure was exerted on the mounted samples to flatten the blastocysts to obtain a two-dimensional projection of the blastocyst cells and facilitate cell counting without the use of a confocal microscope (Mallol et al., 2013). Samples were examined with an Olympus IX71 epifluorescence microscope fitted with a filter that allows the visualization of PI and

Hoechst staining simultaneously (U-MNV, Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain) and an image capture system (Cell A 2.6, Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain). ImageJ software (Image J 1.45q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) was used for cell counting.

Immunofluorescence staining and image analysis

Cloned and *in vivo*-fertilized embryos at different developmental stages were removed from KSOM culture medium, washed in phosphate-buffered saline (PBS), fixed in 4% (vol/vol) paraformaldehyde in PBS for 15 min, permeabilized with 0.1% (vol/vol) Triton X-100 in PBS for 30 min at room temperature (RT), and stored in 0.01% (vol/vol) Tween 20 and 0.2% (wt/vol) sodium azide in PBS until approximately 15–25 embryos per stage were accumulated for each marker to be evaluated. Then both control (fertilized) and cloned embryos were blocked overnight at 4°C in PBS containing 1% (wt/vol) bovine serum albumin (BSA) and 0.05% (vol/vol) Tween 20 and stained simultaneously to reduce experimental variability.

For the detection of the pluripotency markers NANOG and OCT4, morulae and blastocysts were first incubated with either a 1:200 dilution of rabbit polyclonal anti-NANOG antibody (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h at RT or a 1:50 dilution of rabbit polyclonal anti-OCT4 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) for 1.5 h at RT, and then with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 secondary antibody (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, Spain) for 2 h or 30 min, respectively, at RT. In the case of blastocysts, a double OCT4 and CDX2 detection was performed, in which OCT4 staining was preceded by an overnight incubation at 4°C with a 1:100 dilution of a mouse monoclonal anti-CDX2 primary antibody (BioGenex, Fremont, CA, USA), followed by a 2-h incubation at RT with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chicken anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary antibody (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, Spain). In all cases, DNA was stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, Spain) before mounting the samples onto a glass microscope slide in a microdrop of Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

Acetylation of H3K14 (H3K14ac) was analyzed in cloned embryos at 10 min and 1 h after nuclear transfer and at 6 and 16 h after parthenogenetic activation, and in cloned and control fertilized embryos at the two-cell and blastocyst stages, by incubating the embryos for 1 h at RT with a 1:500 dilution of rabbit polyclonal anti-H3K14ac antibody (Millipore, Madrid, Spain). DNA was stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 before mounting the samples. Dimethylation of H3K9 (H3K9me2) was detected in cloned and control fertilized morulae and blastocysts by incubation with a 1:500 dilution of rabbit polyclonal anti-H3K9me2 antibody (Upstate, Millipore, Madrid, Spain), for 1 h at RT. In both cases, goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, Spain) was used as secondary antibody (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 2 h at RT).

Finally, for the detection of 5-methylcytosine (5meC), cloned and control fertilized morulae and blastocysts were treated with 4 M HCl at RT for 15 min or 1 h, respectively, and subsequently neutralized for 20 min with 100 mM Tris/HCl

buffer (pH 8.5) before blocking. Incubation with a 1:100 dilution of mouse monoclonal anti-5meC antibody (Calbiochem, Millipore, Madrid, Spain) was performed at RT and then embryos were incubated with 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chicken anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary antibody for 2 h at RT.

In morulae, a double detection of H3K9me2 and 5meC was performed, and DNA was stained with 2 μM POPO-1 iodide (Molecular Probes, Life Technologies, Alcobendas, Spain) before mounting the samples. In blastocysts, H3K9me2 and 5meC were detected separately, and whereas 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 was used as DNA stain for H3K9me2, when detecting 5meC DNA was stained with 500 nM PI.

All samples were examined with an Olympus Bx41 (Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain) epifluorescence microscope fitted with specific filters and an image-capture and analyzing system (Isis software version 5.4.5, Metasystems, Boston, MA, USA). For each antibody, images were acquired using the same exposure times and settings for all embryos and analyzed with ImageJ software for cell counting and fluorescence quantification. All individual nuclei of embryos at one-cell, two-cell, and morula stages and 30 nuclei of random regions per blastocyst were outlined for mean fluorescence intensity calculation.

Embryo transfer

CD-1 female mice were mated with vasectomized males of the same strain, and those with a vaginal plug were used as recipients at 0.5 day postcoitum (dpc). Between nine and ten two-cell cloned embryos were co-transferred with one parthenogenetic embryo into each oviduct of each female (Meng et al., 2008). As control for the embryo transfer procedure, six *in vivo*-fertilized embryos per oviduct were also transferred to other pseudopregnant recipients. The pups and their corresponding placentas were delivered by cesarian section at 19.5 dpc and weighed on an analytical scale. Finally, the cloned pups were fostered to CD-1 mothers that had given birth the day before.

Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times, and the results obtained were pooled. Data on *in vitro* and *in vivo* embryonic development were analyzed by chi-squared test or Fisher's exact test. Comparisons of blastocyst cell numbers, fluorescence intensity, and body and placenta weights were performed by Kruskal-Wallis analysis. In all cases, the GraphPad InStatTM program (v. 3.05 for Windows 95, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used. A probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Effect of different concentrations of PsA and VPA on the in vitro development and quality of cloned embryos

In a first set of experiments, cloned embryos were exposed to different concentrations of PsA (5, 10, and 20 μM) or VPA (2 and 4 mM) for 2–3 h after reconstruction and 6 h of activation (total treatment duration 8–9 h) to determine the best concentration of each epigenetic modifier in terms of embryo development *in vitro* and blastocyst quality.

In the case of PsA treatments, the highest concentration (20 μM) resulted in the lowest rates of embryonic development among the three groups, although morula and blastocyst rates were only significantly lower than those of embryos treated with the intermediate concentration (10 μM). In fact, embryos treated with 10 μM PsA had also significantly higher rates of morula and blastocyst formation than nontreated embryos and embryos treated with 5 μM PsA. Blastocysts of all three PsA-treated groups showed significantly higher ratios of ICM/total cells than those of the nontreated group (Table 1).

Cloned embryos treated with VPA showed similar rates of activation and development and similar blastocyst cell numbers irrespective of the concentration used (Table 1). When compared with nontreated embryos, both treated groups showed higher rates of blastocyst formation, although this was only significant in the case of the 2 mM treatment. As in the case of PsA, both VPA treatments resulted in significantly higher ratios of ICM/total cells when compared with nontreated embryos.

On the basis of these results, 10 μM PsA and 2 mM VPA were considered the most beneficial concentrations in terms of embryo development and were selected for subsequent experiments. Both treatments resulted in similar rates of blastocyst formation and similar ICM/total cells ratios (Table 1).

Effect of different durations of PsA and VPA treatments on the in vitro development and quality of cloned embryos

In a second set of experiments aimed at determining the best treatment duration for each epigenetic modifier, cloned embryos were exposed to either 10 μM PsA or 2 mM VPA during 8–9 h, 16 h, or 24 h, and their *in vitro* development and blastocyst quality were assessed. All treatments with PsA resulted in equivalent rates of embryo development at all stages and significantly improved morula and blastocyst rates compared with the nontreated group (Table 2). But only blastocysts from the 16-h and 24-h treatments had significantly higher numbers of ICM cells and ratios of ICM/total cells than the nontreated group (Table 2). Between these two treatments, we decided to select the shorter one (16 h) for the following experiments aimed at studying epigenetic reprogramming and full-term development.

In the VPA group, the longest treatment (24 h) resulted in a significant decrease in morula and blastocyst rates compared with the other two treatments, and development to the blastocyst stage was equivalent to that of the nontreated group (Table 2). In contrast, VPA treatments for 8–9 h and 16 h showed significantly higher rates of blastocyst formation than the nontreated group. Whereas ICM/total cell ratios were equivalent between VPA-treated and nontreated embryos, ICM cell numbers were significantly higher in the group treated with VPA for 16 h (Table 2). On the basis of these results, the optimal duration of the VPA 2 mM treatment was established at 16 h.

It is worth noting that between the two selected treatments (2 mM VPA for 16 h and 10 μM PsA for 16 h), the one with PsA resulted in significantly higher rates of blastocyst formation than the one with VPA.

TABLE 1. EFFECT OF DIFFERENT PSA AND VPA CONCENTRATIONS ON THE *IN VITRO* DEVELOPMENT AND QUALITY OF CLONED MOUSE EMBRYOS

Group	No. activated embryos developed to (%)				Mean cell number (\pm SEM)					
	No. reconstructed	No. activated (%)	Two cell	Morula	Blastocyst	No. blastocysts	ICM	TE	Total	ICM/total
NT	619	593 (95.8) ^a	511 (86.2) ^{a,b}	330 (55.6) ^{a,b}	138 (23.3) ^a	41	10.4 \pm 0.9 ^a	30.1 \pm 1.7 ^a	40.1 \pm 2.2 ^a	0.25 \pm 0.02 ^a
PsA 5 μ M	249	242 (97.2) ^a	199 (82.2) ^a	133 (55.0) ^{a,b}	67 (27.7) ^{a,b}	30	14.1 \pm 1.2 ^a	23.2 \pm 1.5 ^{a,b}	37.3 \pm 2.3 ^a	0.37 \pm 0.02 ^{b,c}
PsA 10 μ M	425	413 (97.2) ^a	368 (89.1) ^b	269 (65.1) ^c	154 (37.3) ^c	84	13.6 \pm 0.7 ^a	27.7 \pm 1.1 ^{a,b}	41.3 \pm 1.6 ^a	0.33 \pm 0.01 ^b
PsA 20 μ M	211	200 (94.8) ^a	144 (72.0) ^c	99 (49.5) ^b	43 (21.5) ^a	22	15.4 \pm 1.3 ^a	23.2 \pm 2.1 ^{a,b}	38.5 \pm 3.0 ^a	0.40 \pm 0.02 ^c
VPA 2 mM	267	258 (96.6) ^a	224 (86.8) ^{a,b}	154 (59.7) ^{a,c}	80 (31.0) ^{b,c}	47	12.1 \pm 0.9 ^a	24.8 \pm 1.6 ^{a,b}	36.9 \pm 2.1 ^a	0.33 \pm 0.02 ^{b,c}
VPA 4 mM	255	243 (95.3) ^a	209 (86.0) ^{a,b}	126 (51.9) ^{a,b}	69 (28.4) ^{a,b}	34	13.1 \pm 1.0 ^a	21.0 \pm 1.5 ^b	34.1 \pm 2.4 ^a	0.38 \pm 0.01 ^{b,c}

^{a,b,c} Values with different superscripts differ significantly within the same column ($p < 0.05$; chi-squared test for embryonic development and Kruskal–Wallis test for blastocysts cell numbers). NT, nontreated cloned embryos; PsA, psammalin A; VPA, valproic acid; SEM, standard error of the mean; ICM, inner cell mass; TE, trophectoderm.

TABLE 2. EFFECT OF DIFFERENT DURATIONS OF 10 μ M PSA AND 2 mM VPA TREATMENTS ON THE *IN VITRO* DEVELOPMENT AND QUALITY OF CLONED MOUSE EMBRYOS

Group	No. activated embryos developed to (%)				Mean cell number (\pm SEM)					
	No. reconstructed	No. activated (%)	Two cell	Morula	Blastocyst	No. blastocysts	ICM	TE	Total	ICM/total
NT	207	200 (96.6) ^a	169 (84.5) ^{a,b}	111 (55.5) ^a	40 (20.0) ^a	22	10.0 \pm 1.1 ^a	24.5 \pm 2.2 ^a	34.4 \pm 3.1 ^a	0.29 \pm 0.02 ^a
PsA 8–9 h	223	216 (96.9) ^a	188 (87.0) ^a	150 (69.4) ^b	76 (35.2) ^{b,c,d}	40	13.2 \pm 1.0 ^{a,b}	25.0 \pm 1.8 ^a	38.2 \pm 2.5 ^a	0.35 \pm 0.02 ^{a,b}
PsA 16 h	312	303 (97.1) ^a	252 (83.2) ^{a,b}	208 (68.6) ^b	131 (43.2) ^b	58	16.3 \pm 0.8 ^{b,c}	28.2 \pm 1.3 ^a	44.4 \pm 1.9 ^a	0.36 \pm 0.01 ^b
PsA 24 h	312	303 (97.1) ^a	256 (84.5) ^a	197 (65.0) ^{b,c}	127 (41.9) ^{b,c}	30	18.5 \pm 0.9 ^c	23.1 \pm 1.0 ^a	41.6 \pm 1.7 ^a	0.44 \pm 0.01 ^c
VPA 8–9 h	206	200 (97.1) ^a	169 (84.5) ^{a,b}	119 (59.6) ^{a,c}	68 (34.0) ^{c,d}	41	12.3 \pm 1.0 ^{a,d}	25.8 \pm 1.7 ^a	38.1 \pm 2.4 ^a	0.33 \pm 0.02 ^{a,b}
VPA 16 h	204	200 (98.0) ^a	167 (83.5) ^{a,b}	108 (54.0) ^a	65 (32.5) ^d	33	15.6 \pm 0.9 ^{b,c,d}	27.9 \pm 1.4 ^a	43.5 \pm 1.8 ^a	0.36 \pm 0.02 ^{a,b}
VPA 24 h	205	200 (97.6) ^a	153 (76.5) ^b	79 (39.5) ^d	38 (19.0) ^a	18	14.1 \pm 1.4 ^{a,c}	23.8 \pm 2.1 ^a	37.9 \pm 3.1 ^a	0.36 \pm 0.03 ^{a,b}

^{a,b,c} Values with different superscripts differ significantly within the same column ($p < 0.05$; chi-squared test for embryonic development and Kruskal–Wallis test for blastocysts cell numbers). NT, nontreated cloned embryos; PsA, psammalin A; VPA, valproic acid; SEM, standard error of the mean; ICM, inner cell mass; TE, trophectoderm.

Effect of PsA and VPA treatments on pluripotency and trophectoderm markers

In the third set of experiments, fertilized, nontreated cloned embryos and cloned embryos treated for 16 h with either 10 μ M PsA or 2 mM VPA were fixed at the morula and blastocyst stages and immunostained for OCT4 and NANOG pluripotency markers and the trophectoderm

marker CDX2. All groups of morulae showed equivalent signal intensities for NANOG, except for those derived from VPA-treated cloned embryos, which were less intensively stained than the fertilized morulae (Fig. 1). At the blastocyst stage, the percentages of NANOG-positive cells and NANOG signal intensities were significantly lower in the three groups of cloned embryos when compared with control fertilized ones. Significantly lower levels of OCT4 were also

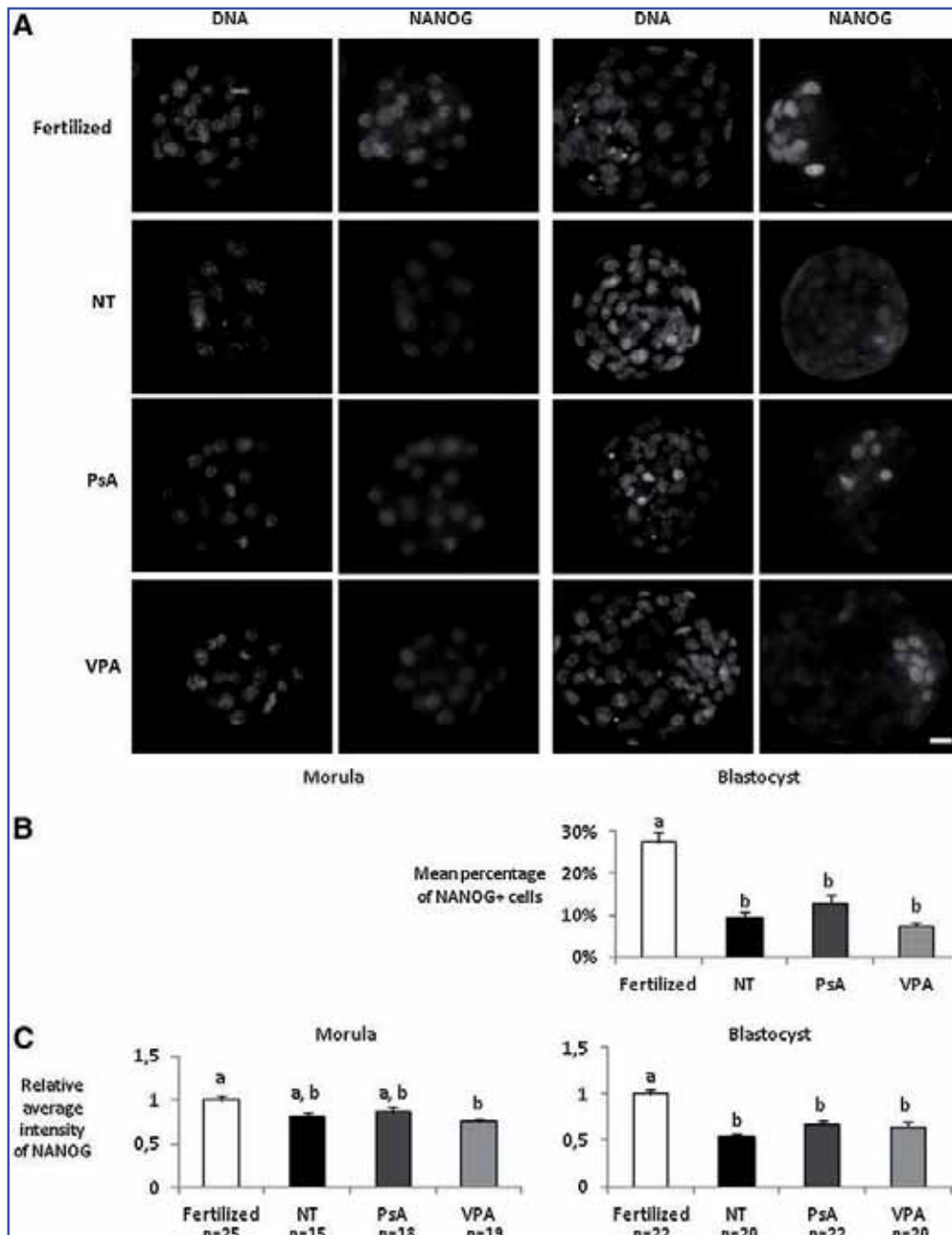


FIG. 1. NANOG analysis in fertilized embryos and cloned embryos nontreated (NT) and treated with 10 μ M PsA or with 2 mM VPA for 16 h. **(A)** Representative images of DNA and NANOG staining. Scale bar, 20 μ m. **(B)** Mean percentage of blastocysts cells [+ standard error of the mean (SEM)] positive for NANOG staining. **(C)** Average intensity of NANOG signal (+SEM) relative to fertilized embryos. Each immunofluorescence assay included embryos from three to seven experimental replicates. The number of embryos analyzed (*n*) is indicated below each bar, and bars with different letters differ significantly.

detected in all groups of cloned embryos when compared with fertilized ones, both at morula and blastocyst stages (Fig. 2). However, treated blastocysts showed a higher percentage of OCT4-positive cells than nontreated ones, although results were only significant for the PsA-treated group. Finally, with

regard to CDX2, all groups of cloned embryos showed a higher percentage of CDX2-positive cells when compared with fertilized blastocysts, but differences in signal intensities were only detected between nontreated and VPA-treated cloned blastocysts (Fig. 3).

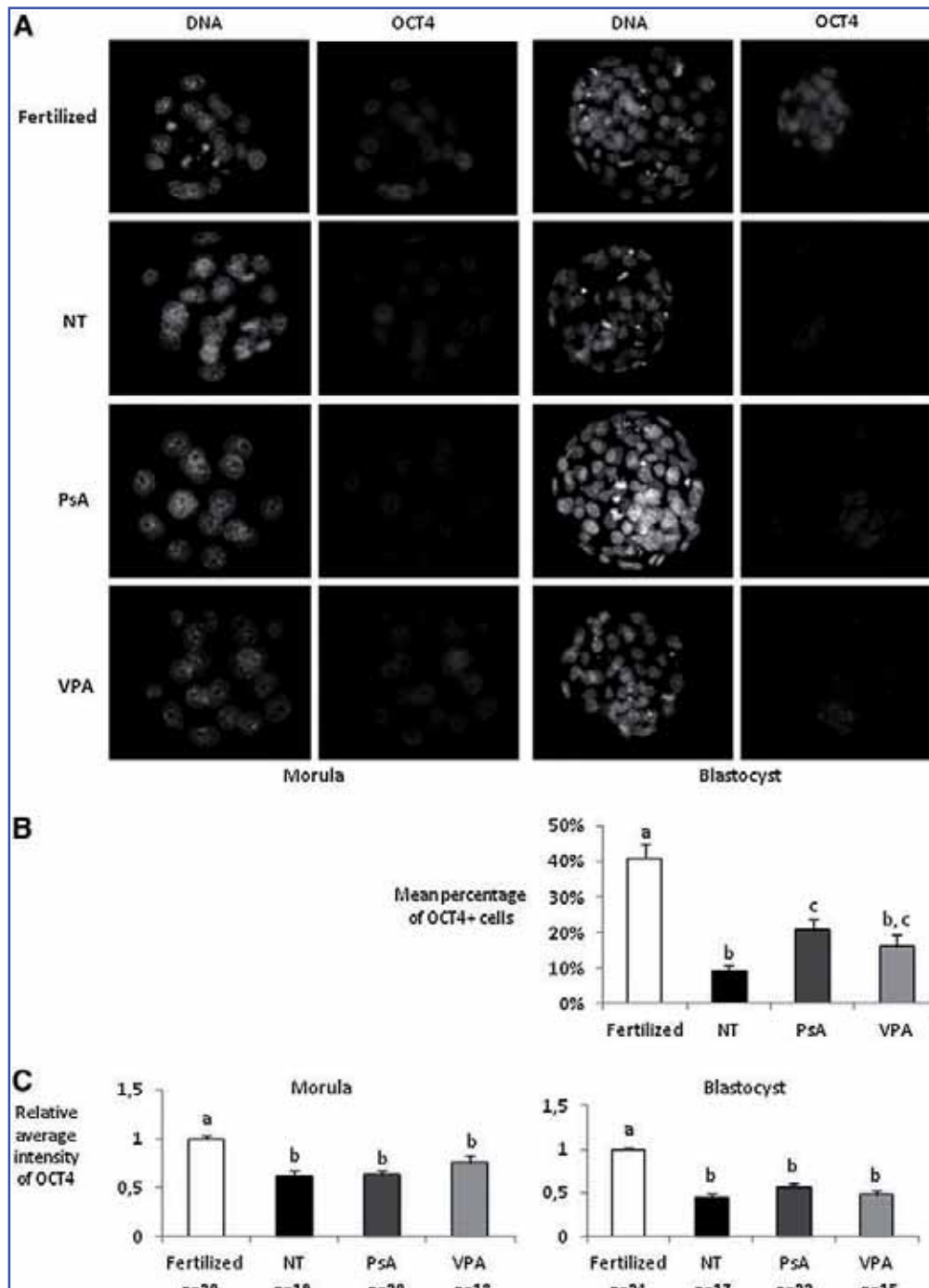


FIG. 2. OCT4 analysis in fertilized embryos and cloned embryos nontreated (NT) and treated with 10 μ M PsA) or with 2 mM VPA for 16h. (A) Representative images of DNA and OCT4 staining. Scale bar, 20 μ m. (B) Mean percentage of blastocysts cells [+standard error of the mean (SEM)] positive for OCT4 staining. (C) Average intensity of OCT4 signal (+SEM) relative to fertilized embryos. Each immunofluorescence assay included embryos from three to seven experimental replicates. The number of embryos analyzed (*n*) is indicated below each bar, and bars with different letters differ significantly.

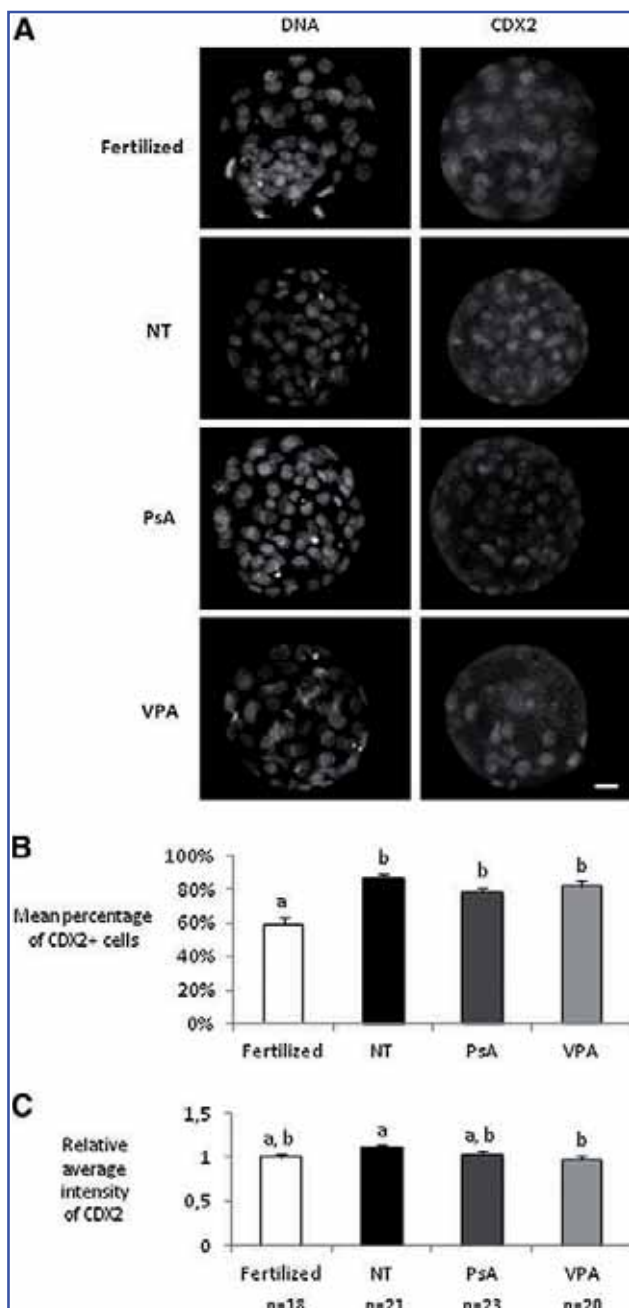


FIG. 3. CDX2 analysis in fertilized blastocysts and cloned blastocysts nontreated (NT) and treated with 10 μ M PsA or with 2 mM VPA for 16 h. (A) Representative images of DNA and CDX2 staining. Scale bar, 20 μ m. (B) Mean percentage of blastocysts cells [+ standard error of the mean (SEM)] positive for CDX2 staining. (C) Average intensity of CDX2 signal (+SEM) relative to fertilized embryos. Each immunofluorescence assay included embryos from three to seven experimental replicates. The number of embryos analyzed (*n*) is indicated below each bar, and bars with different letters differ significantly.

Effect of PsA and VPA treatments on epigenetic marks

In the fourth set of experiments, fertilized, nontreated cloned embryos and cloned embryos treated for 16 h with either 10 μ M PsA or 2 mM VPA were fixed at different

developmental stages and immunostained for H3K14ac, H3K9me2, and 5MeC marks.

We observed that H3K14 was highly acetylated in the cumulus cell nucleus 10 min after injection, but its acetylation markedly decreased 1 h after nuclear transfer into the enucleated oocyte (Fig. 4A). By the end of the parthenogenetic activation (6 h postactivation), treated and nontreated embryos displayed similar levels of H3K14ac. At the end of the treatment (16 h postactivation), both groups of treated embryos had significantly higher levels of H3K14ac than nontreated embryos, and PsA-treated embryos were significantly more acetylated than VPA-treated ones (Fig. 4). At the two-cell stage, when mouse embryonic genome activation takes place, nontreated cloned embryos were hypoacetylated when compared with fertilized controls. PsA-treated embryos still maintained significantly higher levels of H3K14ac than nontreated ones, and were more similar to control fertilized embryos, whereas H3K14ac in VPA-treated embryos had decreased to levels similar to those found in nontreated embryos. Finally, at the blastocyst stage, nontreated cloned embryos showed similar levels of H3K14ac as fertilized control embryos. PsA-treated embryos were still significantly more acetylated than VPA-treated ones and similar to fertilized embryos, although no significant differences were found at this stage between any of the treated groups and the nontreated embryos (Fig. 4).

With regard to H3K9 dimethylation, no significant differences were observed between nontreated cloned embryos and fertilized controls at any of the two developmental stages analyzed (Fig. 5). Both PsA- and VPA-treated morulae showed reduced H3K9me2 levels when compared with nontreated or fertilized ones. But at the blastocyst stage, H3K9me2 levels in the two groups of treated embryos had increased to similar levels as in the nontreated ones, and PsA-treated embryos showed even higher levels of H3K9me2 than fertilized blastocysts.

Finally, we observed that nontreated clones and fertilized embryos displayed similar levels of DNA methylation at the morula stage, but that the DNA of nontreated cloned embryos was significantly hypermethylated in blastocysts (Fig. 6). Both epigenetic modifiers reduced DNA methylation in the cloned morulae when compared with the untreated group, but at the blastocyst stage all three groups of cloned embryos showed equivalent levels of DNA methylation. Among the cloned embryos, only PsA-treated embryos had similar levels of DNA methylation as fertilized embryos at both morula and blastocyst stages.

Effect of PsA and VPA treatments on full-term development of cloned embryos

In the last set of experiments, nontreated cloned embryos and cloned embryos treated with either 10 μ M PsA or 2 mM VPA for 16 h were transferred at the two-cell stage to recipient females to assess their full-term development. We found that both treatments, but especially the PsA one, resulted in higher birth rates than those obtained in the untreated group, although the differences were not statistically significant in any case (Table 3). Residual implantation sites were detected in all groups of recipient females receiving cloned embryos, but at significantly higher rates in the PsA-treated group compared with the untreated group. One

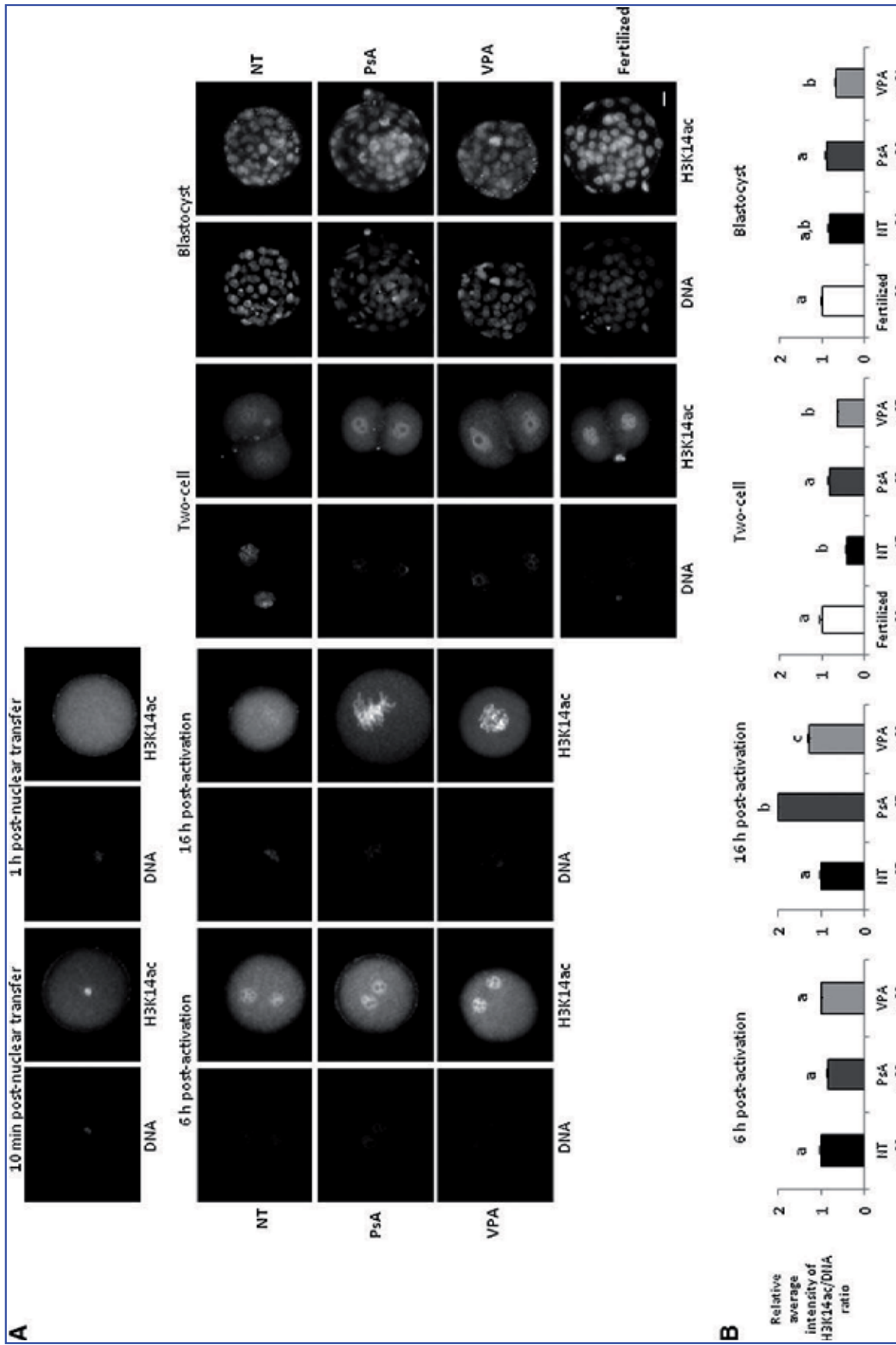


FIG. 4. H3K14 acetylation analysis in fertilized embryos and cloned embryos nontreated (NT) and treated with 10 μ M PsA or with 2 mM VPA for 16 h. **(A)** Representative images of DNA and H3K14ac staining. Scale bar, 20 μ m. **(B)** Average intensity of H3K14ac/DNA signal ratio [+ standard error of the mean (SEM)] relative to NT (6- and 16-h postactivation stages) or to fertilized embryos (two-cell and blastocyst stages). Each immunofluorescence assay included embryos from three to seven experimental replicates. The number of embryos analyzed (*n*) is indicated below each bar, and bars with different letters differ significantly.

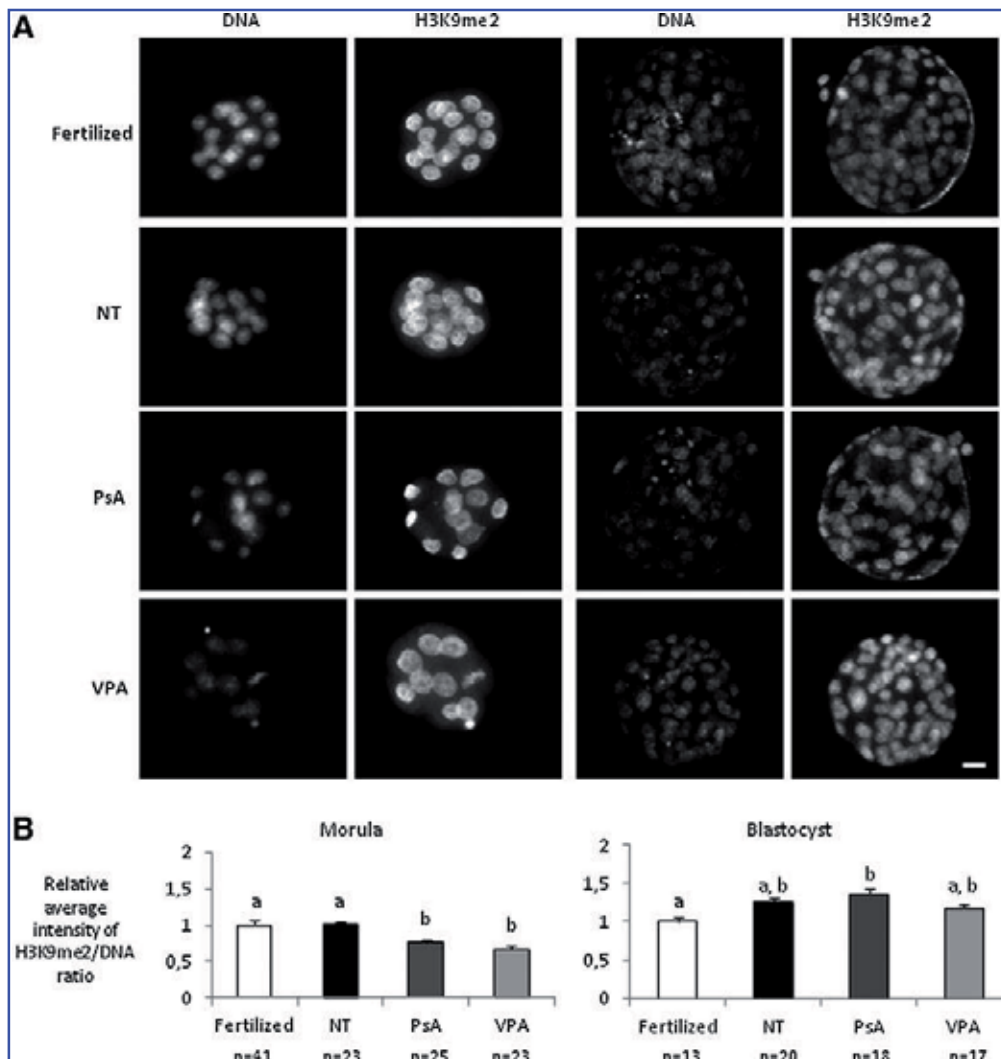


FIG. 5. H3K9 dimethylation analysis in fertilized embryos and cloned embryos nontreated (NT) and treated with 10 μ M PsA or with 2 mM VPA for 16 h. (A) Representative images of DNA and H3K9me2 staining. Scale bar, 20 μ m. (B) Average intensity of H3K9me2/DNA signal ratio [\pm standard error of the mean (SEM)] relative to fertilized embryos. Each immunofluorescence assay included embryos from three to seven experimental replicates. The number of embryos analyzed (n) is indicated below each bar, and bars with different letters differ significantly.

placenta without a fetus was detected in the VPA-treated group. Although both pups and placentas were heavier in the cloned groups when compared to the fertilized one, differences were only significant for the PsA-treated group.

When the actin polymerization inhibitor LatA was used instead of CB in the SCNT protocol during oocyte micro-manipulation and activation, we obtained a three-fold increase in the birth rate of embryos treated with PsA (Table 3). This modification of the protocol also resulted in a significant higher number of residual implantation sites. A slight decrease in mean body and placenta weights was observed when compared to the use of CB, but the difference was not significant, and the resulting 11 pups in this treatment and their corresponding placentas were still the heaviest of all groups.

Unfortunately, the only cloned pup obtained from the untreated group was accidentally injured during the cesarean section and died soon after, and two of the cloned pups in

the PsA-LatA treatment group were cannibalized by the foster mothers. Other two mice in the PsA-LatA group died prematurely due to unknown reasons. The two and four cloned pups from VPA and PsA treatments, respectively, and the remaining seven cloned pups from PsA-LatA treatment developed normally to adulthood and were able to reproduce when mated to normal B6CBAF1 males, giving rise to normal litters (6–11 pups).

Discussion

Here, we demonstrate for the first time that the epigenetic modifier PsA can improve the development and quality of B6CBAF1 cloned mouse embryos and that PsA-treated embryos can give rise to increased numbers of healthy fertile cloned mice. Furthermore, we show that PsA improves SCNT efficiency to a higher extent than the previously used HDACi VPA.

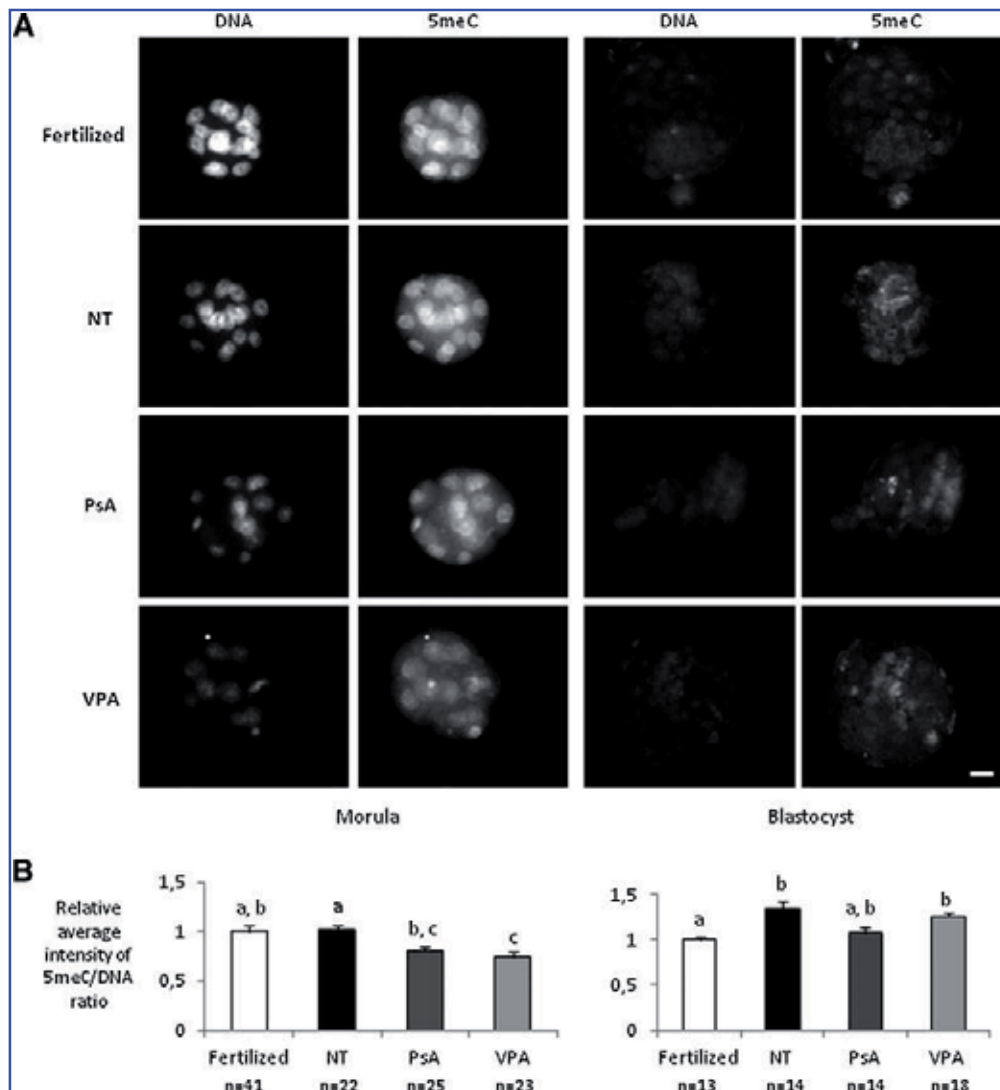


FIG. 6. DNA methylation analysis in fertilized embryos and cloned embryos nontreated (NT) and treated with 10 μM PsA or with 2 mM VPA for 16 h. (A) Representative images of DNA and 5meC staining. Scale bar, 20 μm . (B) Average intensity of 5meC/DNA signal ratio [+ standard error of the mean (SEM)] relative to fertilized embryos. Each immunofluorescence assay included embryos from three to seven experimental replicates. The number of embryos analyzed (n) is indicated below each bar, and bars with different letters differ significantly.

TABLE 3. FULL-TERM DEVELOPMENT AND BODY AND PLACENTA WEIGHTS OF FERTILIZED AND CLONED EMBRYOS

Group	No. two-cell embryos transferred (recipients)	No. of live offspring (%)	No. of dead fetuses (%)	No. of residual implantation sites (%)	No. of placenta only (%)	Average weight (mg) (mean \pm SEM)	
						Body	Placenta
Control fertilized	24 (2)	18 (75.0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^{a,c}	0 (0) ^a	1283.3 \pm 27.3 ^a	99.4 \pm 4.3 ^a
NT	216 (12)	1 (0.5) ^b	0 (0) ^a	10 (4.6) ^a	0 (0) ^a	1544.8 \pm 0 ^a	298.6 \pm 0 ^a
VPA 2 mM 16h	232 (12)	2 (0.9) ^b	0 (0) ^a	19 (8.3) ^{a,d}	1 (0.4) ^a	1620.9 \pm 103.7 ^a	309.6 \pm 91.5 ^a
PsA 10 μM 16h	224 (14)	4 (1.8) ^{b,c}	0 (0) ^a	31 (13.8) ^{c,d}	0 (0) ^a	1822.6 \pm 100.8 ^b	416.8 \pm 21.2 ^b
PsA 10 μM 16h (LatA)	208 (12)	11 (5.3) ^c	1 (0.5) ^a	68 (32.7) ^b	0 (0) ^a	1716.1 \pm 124.0 ^b	302.9 \pm 16.5 ^b

^{a-d}Values with different superscripts within the same column differ significantly (Fisher exact test for full-term development and Kruskal–Wallis test with Dunn posttest for body and placenta weights, $p < 0.05$).

NT, nontreated cloned embryos; PsA, psammoplin A; VPA, valproic acid; SEM, standard error of the mean; LatA, latrunculin A.

When treating cloned embryos with epigenetic modifiers, it is important to optimize the concentration and exposure time to obtain the maximum beneficial effects without embryotoxicity or other side effects. We chose a starting concentration of 5 μ M PsA, because García et al. (2011) had observed an increase in histone acetylation and a decrease in HDAC1 activity, among others, in human acute myeloid leukemia cells using this concentration. Although cloned mouse embryos treated with 5 μ M PsA showed an increased ICM/total cell ratio at the blastocyst stage, no improvement in *in vitro* developmental rates was observed. PsA concentration was then increased twofold (10 μ M) and fourfold (20 μ M), and whereas 10 μ M significantly increased *in vitro* development of the cloned embryos, 20 μ M did not. With regard to VPA, we previously reported a beneficial effect on both *in vitro* and *in vivo* development of cloned mouse embryos when treated at a concentration of 2 mM (Costa-Borges et al., 2010). However, the successful results obtained in recent studies with higher concentrations of VPA in porcine and bovine cloned embryos (Miyoshi et al. 2010; Kim et al. 2011; Xu et al. 2012) prompted us to investigate the effects of a higher concentration. We found that only 2 mM VPA, but not 4 mM VPA, improved embryo development. Therefore, 10 μ M PsA and 2 mM VPA seem to be the optimal concentrations of these two HDACis for mouse cloning procedures.

To optimize treatment duration, we started with an 8–9 hr treatment, as used in our previous work with VPA (Costa-Borges et al., 2010). But due to the reported potential DNMTi activity of PsA (Piña et al. 2003), we decided to increase the duration of the treatment to 16 and 24 h so that the epigenetic modifiers were present during the first S phase. Whereas the oocyte form of the maintenance methyltransferase Dnmt1 is normally excluded from the nucleus at these early preimplantation stages, cloned embryos aberrantly express the somatic form of Dnmt1, and its presence in the nucleus may maintain DNA methylation levels during DNA replication and prevent passive demethylation (Chung et al., 2003; Dean et al., 2001). In addition, these longer treatments have shown beneficial effects in VPA-treated porcine and bovine cloned embryos (Miyoshi et al., 2010; Xu et al., 2012). Indeed, the 16 h treatment resulted in significantly increased blastocyst rate and quality both for PsA and for VPA and was selected as the optimal treatment duration. Interestingly, only the number of ICM cells or the ICM/total cells ratio was significantly increased as a result of both PsA and VPA treatments, whereas total cell numbers were only marginally increased, indicating that rather than affecting cell proliferation, these treatments may be increasing blastocyst quality by favoring cell allocation toward the ICM lineage.

To determine whether the increased blastocyst rate of PsA- and VPA-treated cloned embryos was correlated with an upregulation of pluripotency-related genes, the levels of OCT4 and NANOG were analyzed. In agreement with previous studies on *Oct4* and *Nanog* expression and protein levels (Boiani et al., 2002, 2005; Cavaleri et al., 2008), we observed reduced intensities of OCT4 and NANOG signals in cloned embryos. Even though several studies have shown that treatment of cloned embryos with HDACis increases *Oct4* mRNA (Jafari et al., 2011; Su et al., 2011) and protein (Isaji et al., 2013) and VPA has been shown to increase *Oct4*

and *Nanog* expression in fertilized mouse morulae (Ver-Milyea et al., 2009), we did not observe any significant effect of either PsA or VPA on OCT4 and NANOG protein levels. A similar result was obtained by Huang et al. (2011) for *Oct4* mRNA abundance in VPA-treated cloned porcine embryos. In spite of this, both HDACis used in the present study, but especially PsA, increased the percentage of OCT4-positive cells in cloned blastocysts. Unlike with pluripotency-related markers, normal levels of mRNA and protein of the trophectoderm marker *Cdx2* are usually found in cloned embryos (Kishigami et al., 2006b; Balbach et al., 2010; Cavaleri et al., 2008; Su et al., 2011), as observed in our study for CDX2 signal intensities. Taken together, our results seem to indicate that some of the genes essential for embryonic development, such as *Cdx2*, are more efficiently reprogrammed than others, such as *Oct4* and *Nanog*, resulting in a failure to correctly establish and/or maintain the ICM lineage in most cloned embryos, as previously reported (Kishigami et al., 2006b). Neither VPA nor PsA treatments help to correct this defect. Even though these treatments increase the number of blastocyst cells allocated to the ICM lineage, they cannot rescue the normal levels of OCT4 and NANOG proteins present in fertilized embryos.

The extent of nuclear reprogramming occurring in the cloned embryos was also analyzed through the study of histone acetylation and histone and DNA methylation at several time points and developmental stages. The levels of H3K14ac, correlated with transcriptional activation, were lower in nontreated cloned embryos than in fertilized embryos at the two-cell stage, as expected (Wang et al., 2007), but equivalent at the blastocyst stage. Treatment with either PsA or VPA increased H3K14ac levels at the one-cell and two-cell stages, especially in the PsA-treated group, which may correlate with the potent activity of this HDACi (Baud et al., 2012; Kim et al., 2007; Piña et al., 2003). However, the levels of H3K14ac became equivalent to those of nontreated cloned embryos at the blastocyst stage. These results agree with those of Huang et al. (2011), reporting that VPA increases acetylation of H3K14 and H4K5 in cloned porcine embryos at pronuclear and two-cell stages, but not at the blastocyst stage. PsA and VPA treatments also transiently reduced the levels of two transcriptionally repressive chromatin marks, DNA methylation and H3K9 dimethylation, at the morula stage. Rather than a direct effect of these epigenetic modifiers on DNA and histone methylation levels, this is probably a result of histone hyperacetylation during the early stages of development, because a negative correlation between these types of epigenetic modifications has been reported (Dobosy and Selker, 2001). The lack of significant differences in DNA methylation levels between PsA- and VPA-treated cloned embryos at both morula and blastocyst stages argues against a potential effect of PsA as a DNMTi (Piña et al., 2003), in agreement with recent studies (Baud et al., 2012; García et al., 2011).

Histone hyperacetylation during the early stages of preimplantation development may promote a more open chromatin configuration, facilitating the access of reprogramming and transcription factors to the genome, and may therefore be responsible for the higher developmental potential of PsA- and VPA-treated cloned embryos. The more potent HDACi activity of PsA with regard to VPA may explain the slightly

better results obtained with this inhibitor in terms of *in vitro* and *in vivo* development. In fact, even though full-term development results were not significantly different between the two treatments or between these and the nontreated group (a very high number of embryos should be transferred to obtain a statistically significant difference with the present offspring rates), it is worth noting that VPA increased SCNT efficiency by almost two-fold, whereas the increase with PsA was almost four-fold. Alternatively, the set of genes whose expression is affected as a direct or indirect result of the treatment with either PsA or VPA may be different and this could influence the developmental potential of the treated embryos. Indeed, working with a human promyelocytic leukemia cell line, Halsall et al. (2012) have demonstrated that different HDACis alter the expression of different subsets of genes. It would be interesting to investigate whether the same applies for cloned embryos treated with different HDACis.

Although the low efficiency of SCNT is mostly attributed to faulty nuclear reprogramming, improvement of technical aspects of the SCNT procedure can also result in significant increases in the success rate, as recently proved by Terashita et al. (2012, 2013) with the use of LatA instead of CB for actin polymerization inhibition.

In our last set of experiments, we decided to incorporate this modification to the SCNT protocol and test it in a group of PsA-treated cloned embryos. We obtained an almost three-fold increase in the offspring rate compared with the PsA-treated group in which CB was used. Even though the cause of this improved development was not investigated in the present study, because it falls beyond its aims, Terashita et al. (2012, 2013) reported that abnormal F-actin localization in cloned embryos can be corrected by LatA treatment, and that this results in a decreased incidence of abnormal chromosome segregation and increased full-term development. On the other hand, given that actin is also present in the nucleus (Baarlink and Grosse, 2014) and that nuclear actin polymerization seems to be fundamental in the transcriptional reactivation of *Oct4* after transfer of mouse somatic nuclei into *Xenopus* oocytes (Miyamoto et al., 2011), the effects of LatA on nuclear actin polymerization in addition to cytoplasmic actin polymerization cannot be ruled out. Further studies should be performed to elucidate the exact mechanism by which LatA improves cloning efficiency.

In general, cloning efficiencies obtained in the present work were lower than those reported in other mouse cloning studies, but it must be pointed out that the mouse strain used in our study is the hybrid B6CBAF1, whereas the majority of previous studies have been performed with the hybrid B6D2F1 strain, and the effects of the mouse strain on SCNT efficiencies are well-known (Ogura et al., 2013).

In conclusion, we have corroborated our previous results on the positive effects of VPA on nuclear reprogramming, embryonic development, and quality of mouse cloned embryos (Costa-Borges et al., 2010) and demonstrated that 2 mM is the optimal concentration of this HDACi, even though the treatment duration can be extended from 8–9 h to 16 h. More importantly, we have successfully applied PsA, for the first time, in mouse SCNT procedures and we have shown that PsA improves mouse SCNT efficiency, even to a higher extent than VPA. Specifically, PsA increases embryo developmental rates, blastocyst quality (number of ICM cells), and nuclear reprogramming (histone acetylation) of

the cloned embryos. Furthermore, when PsA is combined with the use of LatA instead of CB, it results in an 11.5-fold increase in full-term development. Further studies should be performed to analyze whether PsA has also beneficial effects in the generation of ESCs from the cloned embryos, in the cloning efficiency of other mouse strains and mammalian species, and in the nuclear reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs), as other epigenetic modifiers do.

Acknowledgments

We thank Jonatan Lucas and M^a Jesús Álvarez for their technical assistance and the staff at the Servei d'Estabulari of the Universitat Autònoma de Barcelona for taking care of the mice. This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2011-23784) and the Generalitat de Catalunya (2009 SGR 282). A.M. is a pre-doctoral fellow of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Author Disclosure Statement

The authors declare that no conflicting financial interests exist.

References

- Ahn, M.Y., Jung, J.H., Na, Y.J., and Kim, H.S. (2008). A natural histone deacetylase inhibitor, Psammaplin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 108, 27–33.
- Baarlink, C., and Grosse, R. (2014). Formin' actin in the nucleus. *Nucleus* 5, 1–6.
- Balbach, S.T., Esteves, T.C., Brink, T., Gentile, L., McLaughlin, K.J., Adjaye, J.A., and Boiani, M. (2010). Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. *Dev. Biol.* 343, 71–83.
- Baud, M.G.J., Leiser, T., Haus, P., Samlal, S., Wong, A.C., Wood, R.J., Petrucci, V., Gunaratnam, M., Hughes, S.M., Buluwela, L., Turlais, F., Neidle, S., Meyer-Almes, F.J., White, A.J., and Fuchter, M.J. (2012). Defining the mechanism of action and enzymatic selectivity of psammaplin A against its epigenetic targets. *J. Med. Chem.* 55, 1731–1750.
- Boiani, M., Eckardt, S., Schöler, H.R., and McLaughlin, K.J. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: Consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16, 1209–1219.
- Boiani, M., Gentile, L., Gambles, V. V., Cavaleri, F., Redi, C.A., and Schöler, H.R. (2005). Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: Distinct developmental potentials in different culture environments. *Stem Cells* 23, 1089–1104.
- Bortvin, A., Eggan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D.L., Yanagimachi, R., Page, D.C., and Jaenisch, R. (2003). Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130, 1673–1680.
- Cantone, I., and Fisher, A.G. (2013). Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 282–289.
- Cavaleri, F.M., Balbach, S.T., Gentile, L., Jauch, A., Böhm-Steyer, B., Han, Y.-M., Schöler, H.R., and Boiani, M. (2008). Subsets of cloned mouse embryos and their non-random relationship to development and nuclear reprogramming. *Mech. Dev.* 125, 153–166.
- Chan, M.M., Smith, Z.D., Egli, D., Regev, A., and Meissner, A. (2012). Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. *Nat. Genet.* 44, 978–980.

- Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L., and Torres, I. (1989). An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 86, 679–688.
- Chung, Y.G., Ratnam, S., Chaillet, J.R., and Latham, K.E. (2003). Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 69, 146–153.
- Costa-Borges, N., Santalo, J., and Ibañez, E. (2010). Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on the in vitro development, blastocyst quality, and full-term development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 12, 1–10.
- Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., and Reik, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13734–13738.
- Dobosy, J.R., and Selker, E.U. (2001). Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 721–727.
- Enright, B.P., Kubota, C., Yang, X., and Tian, X.C. (2003). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 69, 896–901.
- García, J., Franci, G., Pereira, R., Benedetti, R., Nebbioso, A., Rodríguez-Barríos, F., Gronemeyer, H., Altucci, L., and de Lera, A.R. (2011). Epigenetic profiling of the antitumor natural product psammoplin A and its analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 3637–3649.
- Gurdon, J.B., and Wilmut, I. (2011). Nuclear transfer to eggs and oocytes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–14.
- Halsall, J., Gupta, V., O'Neill, L.P., Turner, B.M., and Nightingale, K.P. (2012). Genes are often sheltered from the global histone hyperacetylation induced by HDAC inhibitors. *PLoS One* 7, e33453.
- Huang, Y., Tang, X., Xie, W., Zhou, Y., Li, D., Yao, C., Zhou, Y., Zhu, J., Lai, L., Ouyang, H., and Pang, D. (2011). Histone deacetylase inhibitor significantly improved the cloning efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 13, 513–520.
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochdinger, K., Yanagimachi, R., Lander, E.S., Golub, T.R., and Jaenisch, R. (2002). Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12889–12894.
- Isaji, Y., Murata, M., Takaguchi, N., Mukai, T., Tajima, Y., Imai, H., and Yamada, M. (2013). Valproic acid treatment from the 4-cell stage improves Oct4 expression and nuclear distribution of histone H3K27me3 in mouse cloned blastocysts. *J. Reprod. Dev.* 59, 196–204.
- Jafari, S., Hosseini, M.S., Hajian, M., Forouzanfar, M., Jafarpour, F., Abedi, P., Ostadhosseini, S., Abbasi, H., Gourabi, H., Shahverdi, A.H., Dizaj, A.V., Anjomshoa, M., Haron, W., Noorshariza, N., Yakub, H., and Nasr-Esfahani, M.H. (2011). Improved in vitro development of cloned bovine embryos using S-adenosylhomocysteine, a non-toxic epigenetic modifying reagent. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 576–584.
- Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K., and Han, Y.M. (2001). Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat. Genet.* 28, 173–177.
- Kang, Y.-K., Park, J.S., Koo, D.-B., Choi, Y.-H., Kim, S.-U., Lee, K.-K., and Han, Y.-M. (2002). Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J.* 21, 1092–1100.
- Kim, D., Lee, I.S., Jung, J.H., Lee, C.O., and Choi, S.U. (1999a). Psammoplin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. *Anticancer Res.* 19, 4085–4090.
- Kim, D., Lee, I.S., Jung, J.H., and Yang, S.I. (1999b). Psammoplin A, a natural bromotyrosine derivative from a sponge, possesses the antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the DNA gyrase-inhibitory activity. *Arch. Pharm. Res.* 22, 25–29.
- Kim, D.H., Shin, J., and Kwon, H.J. (2007). Psammoplin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Exp. Mol. Med.* 39, 47–55.
- Kim, Y.J., Ahn, K.S., Kim, M., and Shim, H. (2011). 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.* 47, 283–289.
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N., Van, Wakayama, S., Bui, H.-T., and Wakayama, T. (2006a). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 183–189.
- Kishigami, S., Hikichi, T., Van Thuan, N., Ohta, H., Wakayama, S., Bui, H.-T., Mizutani, E., and Wakayama, T. (2006b). Normal specification of the extraembryonic lineage after somatic nuclear transfer. *FEBS Lett.* 580, 1801–1806.
- Maalouf, W.E., Alberio, R., and Campbell, K.H.S. (2008). Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics* 3, 199–209.
- Mallol, A., Santaló, J., and Ibañez, E. (2013). Comparison of three differential mouse blastocyst staining methods. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 1–6.
- Mann, M.R.W., Chung, Y.G., Nolen, L.D., Verona, R.I., Latham, K.E., and Bartolomei, M.S. (2003). Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol. Reprod.* 69, 902–914.
- Meng, Q., Wang, M., Stanca, C.A., Bodo, S., and Dinnyes, A. (2008). Cotransfer of parthenogenetic embryos improves the pregnancy and implantation of nuclear transfer embryos in mouse. *Cloning Stem Cells* 10, 429–434.
- Miyamoto, K., Pasque, V., Jullien, J., and Gurdon, J.B. (2011). Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. *Genes Dev.* 25, 946–958.
- Miyoshi, K., Mori, H., Mizobe, Y., Akasaka, E., Ozawa, A., Yoshida, M., and Sato, M. (2010). Valproic acid enhances in vitro development and Oct-3/4 expression of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 12, 67–74.
- Nicholas, G.M., Eckman, L.L., Ray, S., Hughes, R.O., Pfefferkorn, J.A., Barluenga, S., Nicolaou, K.C., and Bewley, C.A. (2002). Bromotyrosine-derived natural and synthetic products as inhibitors of mycothiol-S-conjugate amidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 2487–2490.
- Niemann, H., Tian, X.C., King, W.A., Lee, R.S. (2008). Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* 135, 151–163.
- Ogura, A., Inoue, K., and Wakayama, T. (2013). Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20110329.
- Piña, I.C., Gautschi, J.T., Wang, G.-Y.-S., Sanders, M.L., Schmitz, F.J., France, D., Cornell-Kennon, S., Sambucetti,

- L.C., Remiszewski, S.W., Perez, L.B., Bair, K.W., and Crews, P. (2003). Psammaplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: Inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase. *J. Org. Chem.* 68, 3866–3873.
- Rybouchkin, A., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 74, 1083–1089.
- Su, J., Wang, Y., Li, Y., Li, R., Li, Q., Wu, Y., Quan, F., Liu, J., Guo, Z., and Zhang, Y. (2011). Oxamflatin significantly improves nuclear reprogramming, blastocyst quality, and in vitro development of bovine SCNT embryos. *PLoS One* 6, e23805.
- Terashita, Y., Wakayama, S., Yamagata, K., Li, C., Sato, E., and Wakayama, T. (2012). Latrunculin A can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. *Biol. Reprod.* 86, 180.
- Terashita, Y., Yamagata, K., Tokoro, M., Itoi, F., Wakayama, S., Li, C., Sato, E., Tanemura, K., and Wakayama, T. (2013). Latrunculin a treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One* 8, e78380.
- Thouas, G.A., Korfiatis, N.A., French, A.J., Jones, G.M., and Trounson, A.O. (2001). Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod. BioMed. Online* 3, 25–29.
- Van Thuan, N., Bui, H.-T., Kim, J.-H., Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., Mizutani, E., and Wakayama, T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction* 138, 309–317.
- Van Thuan, N., Kishigami, S., and Wakayama, T. (2010). How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J. Reprod. Dev.* 56, 20–30.
- VerMilyea, M.D., O’Neill, L.P., and Turner, B.M. (2009). Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. *PLoS One* 4, e6086.
- Wakayama, S., and Wakayama, T. (2010). Improvement of mouse cloning using nuclear transfer-derived embryonic stem cells and/or histone deacetylase inhibitor. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1641–1648.
- Wang, F., Kou, Z., Zhang, Y., and Gao, S. (2007). Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 77, 1007–1016.
- Xu, W., Wang, Y., Li, Y., Wang, L., Xiong, X., Su, J., and Zhang, Y. (2012). Valproic acid improves the in vitro development competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 14, 138–145.
- Yang, X., Smith, S.L., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J.-P., and Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 39, 295–302.

Address correspondence to:

Elena Ibáñez
 Departament de Biologia Cel·lular
 Fisiologia i Immunologia
 Facultat de Biociències
 Universitat Autònoma de Barcelona
 08193 Bellaterra, Spain
 E-mail: elena.ibanez@uab.cat



3.2. IMPROVEMENT OF MOUSE CLONING EFFICIENCY BY VITAMIN C AND LATRUNCULIN A

Improved Development of Somatic Cell Cloned Mouse Embryos by Vitamin C and Latrunculin A

Anna Mallol, Josep Santaló, Elena Ibáñez

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

To whom correspondence should be addressed: Elena Ibáñez, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. Tel.: +34 93 5813728; Fax: +34 93 5812295; E-mail: elena.ibanez@uab.cat

Abstract

Impaired development of embryos produced by somatic cell nuclear transfer (SCNT) is mostly associated with faulty reprogramming of the somatic nucleus to a totipotent state and can be improved by treatment with epigenetic modifiers. Here we report that addition of 100 μ M vitamin C (VitC) to embryo culture medium for at least 16 h post-activation significantly increases mouse blastocyst formation and, when combined with the use of latrunculin A (LatA) during micromanipulation and activation procedures, also development to term. In spite of this, no significant effects on pluripotency (OCT4 and NANOG) or nuclear reprogramming markers (H3K14 acetylation, H3K9 methylation and DNA methylation) could be detected. The use of LatA alone significantly improved *in vitro* development, but no full-term development. On the other hand, the simultaneous treatment of cloned embryos with VitC and the histone deacetylase inhibitor psammaplin A (PsA), in combination with the use of LatA, resulted in cloning efficiencies equivalent to those of VitC or PsA treatments alone, and the effects on pluripotency and nuclear reprogramming markers were less evident than when only the PsA treatment was applied. These results suggest that although both epigenetic modifiers improve cloning efficiencies, possibly through different mechanisms, they do not show an additive effect when combined. Improvement of SCNT efficiency is essential for its applications in reproductive and therapeutic cloning, and identification of molecules which increase this efficiency should facilitate studies on the mechanism of nuclear reprogramming and acquisition of totipotency.

Introduction

Somatic cell nuclear transfer (SCNT), to be successful, requires the transferred somatic nucleus to undergo an orchestrated array of epigenetic modifications leading to changes in the structure and composition of chromatin. This epigenetic reprogramming, driven by factors present in the cytoplasm of the recipient oocyte, allows the acquisition of an undifferentiated embryo-like chromatin status compatible with embryonic gene activation and embryonic development [1, 2]. Despite the birth of cloned animals from a variety of species, the low efficiency of SCNT suggests that epigenetic reprogramming of the somatic nucleus is often incomplete or incorrect, leading to the developmental arrest of the cloned embryos. Indeed, aberrant DNA methylation and histone modification patterns have been frequently reported in SCNT embryos [3-9].

In light of the epigenetic abnormalities found in cloned embryos, a new SCNT protocol was developed to improve reprogramming of the somatic nucleus: the treatment of the donor somatic cells or, more often, the reconstructed oocytes with epigenetic modifiers. So far, the most significant results have been achieved with inhibitors of histone deacetylases (HDACi), such as trichostatin A, scriptaid, valproic acid or oxamflatin [10-17]. These HDACi treatments increase histone acetylation levels, resulting in improved chromatin remodeling and accessibility for replication and transcription factors and, consequently, in significantly higher cloning efficiencies [18]. The effects on nuclear reprogramming and cloning efficiencies of other epigenetic modifiers, such as inhibitors of DNA or histone methyltransferases, is still uncertain [19-22]. Other recent technical improvements to the SCNT protocol, such as the use of the actin polymerization inhibitor latrunculin A (LatA) instead of cytochalasin B (CB) to prevent second polar body extrusion, have also contributed to enhanced cloning efficiencies when combined with HDACi treatments [23-25]. But despite these advancements, the developmental potential of cloned embryos is still suboptimal, hindering the widespread application of SCNT technology.

Vitamin C (VitC), also known as L-ascorbic acid, is a well-known antioxidant that protects the cells against oxidative stress. Many reports have shown its beneficial effects when added to oocyte maturation or embryo culture media [26-31]. Recent studies have shown that VitC has also a positive role in nuclear reprogramming of differentiated cells towards a pluripotent state. In particular, VitC improves the generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from both mouse and human somatic cells [32] and promotes the conversion of partially reprogrammed mouse iPSCs to a fully reprogrammed state [33]. The effect of VitC on reprogramming seems to be independent of its antioxidant effect and may rather be explained by a combined enhancement of Jumonji-domain-containing histone demethylases (JHDMs) and ten-eleven translocation (TET) methylcytosine dioxygenases activities [34-37], which promote histone and DNA demethylation, respectively, and lead to changes in chromatin structure and gene expression [38, 39]. The positive role of VitC on the *in vitro* development of SCNT porcine embryos and their nuclear reprogramming, in terms of histone acetylation and pluripotency markers expression, has also been proved [29, 40], but its effects on DNA and histone methylation and full-term development of the cloned embryos has yet to be

demonstrated. On the other hand, VitC seems not to improve the development of SCNT embryos from other mammalian species, but rather negatively affect it [41, 42].

We have recently reported that the HDACi psammalin A (PsA), a natural compound isolated from a marine sponge [43], results in enhanced rates of full-term development of cloned mouse embryos [25]. Given that PsA and VitC act on different epigenetic modifying enzymes, and that the cooperation of multiple pathways is needed to coordinate reprogramming of various epigenetic modifications during SCNT [39], we hypothesized that both compounds could act synergistically in improving nuclear reprogramming of SCNT embryos. On the other hand, the antioxidant role of VitC may enhance the HDAC inhibitory activity of PsA, as it has been reported that reduction of PsA after its uptake into cells is essential for its HDACi activity [44].

Thus, the aims of this study were to explore the effect of VitC on mouse SCNT efficiency, and to investigate whether the combination of VitC and PsA treatments has a synergistic effect. To this aim, SCNT mouse embryos were treated with VitC, PsA or the combination of both (VitC-PsA) and *in vitro* development, blastocyst cell numbers, epigenetic modifications (H3K14 acetylation, H3K9 dimethylation and DNA methylation), levels of pluripotency (OCT4 and NANOG) and trophectoderm (CDX2) markers, reduced glutathione content, and full-term development were assessed. Additionally, the effect of LatA on both *in vitro* and *in vivo* development of untreated and treated embryos was investigated.

Material and Methods

Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma (Madrid, Spain).

Animals

Mouse care and procedures were conducted according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the *Universitat Autònoma de Barcelona* and by the *Departament de Medi Ambient i Habitatge* of the *Generalitat de Catalunya* (Permit numbers: 6064 and 5044).

Hybrid B6CBAF1 (C57Bl/6xCBA/J) mice aged 6-12 weeks were used as sperm, oocytes and cumulus cells donors. Outbred CD1 females mated with normal or vasectomised CD1 males were used as foster or surrogate mothers, respectively. All animals were purchased from Charles River (L'Arbresle, France).

Collection of sperm, oocytes and cumulus cells

Spermatozoa were collected from the cauda epididymes in a drop (500 μ l /epididymis) of Hepes-buffered CZB medium (HCZB) [45] covered with oil, and were allowed to disperse during 20 min at 37°C. The sperm suspension was then diluted in vials of fresh HCZB (1:2 dilution), which were directly plunged into liquid nitrogen without cryoprotection. Sperm samples were stored at -80°C for up to one month.

Oocytes and cumulus cells were collected just before use. Females were induced to superovulate by intraperitoneal injection of 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (Intervet, Barcelona, Spain) followed 48 h later by 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Farma-Lepori, Barcelona, Spain). Metaphase II oocytes were collected from the oviducts 14-15 h after hCG administration in HCZB, and treated with 300 U/ml hyaluronidase in HCZB at 37°C until dispersion of cumulus cells. Denuded oocytes were then washed and kept in drops of KSOM culture medium (MR-106-D; Millipore, Madrid, Spain) covered with mineral oil at 37°C under 5% CO₂. Dispersed cumulus cells were removed from hyaluronidase, diluted in HCZB and centrifuged for 5 min at 250 g. The pellet was then resuspended in a small volume of 3% (v/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) in HCZB and kept at 4°C until use.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

Sperm samples were thawed at room temperature and 5-10 μ l of the concentrated sperm suspension were introduced into a microdrop of 3% PVP. Oocytes were transferred to a microdrop of HCZB and injected with a sperm head, decapitated by the freeze/thaw procedure [46]. Injections were performed using blunt-end mercury-filled pipettes (outer diameter 5-6 μ m) attached to a piezo impact drill (Burleigh, Mississauga, Canada) driven by a micromanipulation device (TransferMan NK2; Eppendorf, Hamburg, Germany) installed on an Olympus IX71 microscope (Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain). Injected oocytes were allowed to recover for 15 min and then were extensively washed and cultured in KSOM.

Somatic cell nuclear transfer (SCNT)

Oocytes were enucleated and injected with a cumulus cell nucleus using blunt-end mercury-filled pipettes (outer diameter 8-10 μm and 5-6 μm , respectively) attached to a piezo impact drill driven by the aforementioned micromanipulation equipment. Micromanipulations were performed in groups of 25-30 oocytes in drops of HCZB containing either 5 $\mu\text{g/ml}$ CB or 5 μM LatA (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Afterwards, the reconstructed oocytes were extensively washed and cultured for 1-3 h in KSOM supplemented or not with the epigenetic modifiers before activation.

Chemical activation of reconstructed oocytes was performed by incubating them for 6 h (37°C, 5% CO_2) in 10 mM SrCl_2 in Ca^{2+} -free-CZB medium supplemented with either 5 $\mu\text{g/ml}$ CB or 5 μM LatA to prevent second polar body extrusion. After activation, oocytes showing at least one pronucleus were extensively washed and cultured in KSOM with or without the epigenetic modifiers.

Epigenetic modifier treatments of cloned embryos

VitC (L-ascorbic acid, Sigma A5960) was dissolved in tri-distilled water to prepare a 5 mg/ml stock solution, filtered, and stored at 4°C for up to 3 weeks. PsA (Santa Cruz Biotechnology 258049, Heidelberg, Germany) was dissolved in DMSO to prepare a 3 mM stock solution and stored frozen. The final concentrations of both epigenetic modifiers were prepared by dilution of the stock solutions in the culture or activation media, depending on the experimental procedure. Embryos were exposed to 100 μM VitC during 2-3 h after reconstruction and 6 h of activation (8-9 h treatment) or during 6 h of activation and 10 h, 18 h or the whole duration of the posterior culture (16 h, 24 h and 120 h treatments, respectively). Embryos were exposed to 10 μM PsA or the combination of both epigenetic modifiers (VitC-PsA) during 6 h of activation and 10 h of the posterior culture (16 h treatment). At the end of the treatments, embryos were extensively washed in drops of KSOM culture medium.

Blastocyst differential staining and cell counts

Cloned embryos that reached the blastocyst stage 96 h post-activation in the first set of experiments were used for the differential staining of trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) cells, as previously described [47]. Samples were examined with an Olympus IX71 epifluorescence microscope fitted with an image capture system (Cell A 2.6, Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain). ImageJ software (Image J 1.45q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA) was used for cell counting.

Immunofluorescence staining, image analysis and cell counts

Cloned and ICSI embryos at different developmental stages were fixed and processed for immunofluorescence detection of H3K14 acetylation (H3K14ac), H3K9 dimethylation (H3K9me2), 5-methylcytosine (5meC), OCT4, NANOG and CDX2 using previously described protocols [25]. Acetylation of H3K14 (H3K14ac) was analyzed in cloned embryos at 10 min and 1 h after nuclear transfer, and in cloned and control ICSI embryos at 16 h, 24 h and 120 h after parthenogenetic activation. Dimethylation of H3K9 (H3K9me2) and 5-methylcytosine (5meC) were detected in cloned

and control ICSI embryos at 72 h and 120 h after activation. Finally, NANOG, OCT4 and CDX2 markers were analyzed in cloned and ICSI blastocysts at 120 h after activation. For each marker analyzed, 15-25 embryos were used and were stained simultaneously to reduce experimental variability.

All samples were examined with an Olympus Bx41 (Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain) epifluorescence microscope fitted with specific filters and an image capture and analyzing system (Isis software version 5.4.5, Metasystems, Boston, USA). For each antibody, images were acquired using the same exposure times and settings for all embryos and analyzed with ImageJ software (Image J 1.45q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA) for cell counts (NANOG and OCT4/CDX2 double staining of blastocysts) and fluorescence quantification. All individual nuclei of embryos at 1-cell, 2-cell and morula stages and 30 nuclei of random regions per blastocyst were outlined for mean fluorescence intensity calculation.

Quantification of reduced glutathione content in cloned embryos

Non-fluorescent monochlorobimane (MCB) binds to reduced glutathione (GSH) in a reaction catalyzed by glutathione-S-transferase and forms a fluorescent adduct whose fluorescence intensity gives a measure of GSH content. Non-treated and treated cloned embryos (18-21 embryos per group) at 16 h post-activation were incubated with 50 μ M MCB in KSOM for 40 min at 37°C. Then, embryos were washed in PBS, fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS for 15 min and mounted onto a glass microscope slide in a microdrop of Vectachield (Vector Laboratories, Inc., Peterborough, UK). Samples were examined with an Olympus Bx41 (Olympus, Hospitalet del Llobregat, Spain) epifluorescence microscope fitted with an image capture and analyzing system (Isis software version 5.4.5, Metasystems, Boston, USA). Images were acquired using the same exposure times and settings for all embryos and analyzed with ImageJ software (Image J 1.45q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA) for fluorescence quantification. All individual nuclei were outlined for mean fluorescence intensity calculation.

Embryo transfer

CD-1 female mice were mated with vasectomized males of the same strain and those with a vaginal plug were used as recipients at 0.5 day postcoitum. Between 9-10 two-cell cloned embryos were co-transferred with one parthenogenetic embryo into each oviduct of each female [48]. As control for the embryo transfer procedure, 6 *in vivo* fertilized embryos per oviduct were also transferred to other pseudo-pregnant recipients. The pups and their corresponding placentas were delivered by cesarian section at 19.5 days postcoitum and weighted in an analytical scale. Finally, the cloned pups were fostered to CD-1 mothers that had given birth the day before.

Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three times and the results obtained were pooled. Data on *in vitro* and *in vivo* embryonic development were analyzed by chi-square test or Fisher's exact test. Comparisons of blastocyst cell numbers, fluorescence intensity and body and placenta weights were performed by Kruskal-Wallis test. In all cases, the GraphPad InStat™ program (version 3.05 for

windows 95, GraphPad Software, La Jolla, USA) was used. A probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

***In vitro* development and blastocyst quality of cloned embryos treated with VitC for various durations**

In a first set of experiments, cloned embryos were treated with 100 μ M VitC during 8-9 h, 16 h, 24 h and 120 h to determine the best treatment duration in terms of embryo development *in vitro* and blastocyst quality. In these experiments, CB was used during micromanipulation and activation procedures.

We found that the addition of VitC to embryo culture medium for at least 16 h post-activation significantly increased blastocyst rates and the mean number of ICM cells at 96 h post-activation compared with non-treated cloned embryos (Table 1). Blastocyst total cell numbers were also increased, but the results were only significant for the 16 h and 120 h treatments. Blastocyst formation rates and quality were not significantly affected by extending VitC treatment beyond 16 h, as 16 h, 24 h and 120 h treatments resulted in equivalent developmental rates and blastocyst cell numbers. Based on these results, we selected the shorter of these treatments (16 h) for further experiments.

***In vitro* development of cloned embryos treated with a combination of VitC and PsA**

In a second set of experiments, aimed to investigate whether there is an additive effect between VitC and PsA treatments, cloned embryos were treated with 100 μ M VitC, 10 μ M PsA or the combination of both (VitC-PsA) during 16 h and their *in vitro* development was assessed. LatA, instead of CB, was used during micromanipulation and activation procedures in these experiments.

We found that the use of LatA significantly increased the blastocyst rate of non-treated cloned embryos (45.5%, Table 2) when compared with the use of CB in the previous experiments (26.7%, Table 1). In the case of VitC-treated embryos, blastocyst rates were also increased, but only moderately (52.1%, Table 2 vs. 42.6%, Table 1). As a result, no significant differences in blastocyst formation rates could be detected in this second set of experiments between non-treated and VitC-treated embryos. In spite of this, blastocyst rates in the non-treated group were significantly lower than those in the control ICSI group, whereas between the VitC-treated and the ICSI groups they were similar (Table 2).

The combined VitC-PsA treatment did not significantly improve the results obtained when using VitC alone, but it showed higher rates of blastocyst development than when using PsA alone (Table 2). Indeed, VitC resulted in significantly higher blastocyst rates than PsA. When compared to non-treated embryos, VitC-PsA was the only treatment in this second set of experiments producing higher blastocyst rates.

Global histone acetylation and methylation and DNA methylation levels in treated and non-treated cloned embryos

ICSI and cloned embryos were fixed at different developmental stages and immunostained for H3K14ac, H3K9me2 and 5MeC marks. With regards to histone acetylation, we observed that H3K14 was highly acetylated in the cumulus cell nucleus 10 min after injection, but its acetylation markedly

decreased 1 h after nuclear transfer into the enucleated oocyte (Fig. 1A). By the end of the treatment with the epigenetic modifiers (16 h post-activation), the VitC group displayed similar levels of H3K14ac as the non-treated group, both significantly lower than those of the ICSI group (Fig. 1). VitC-PsA-treated embryos were significantly more acetylated than embryos treated with VitC alone, at levels equivalent to those of PsA-treated cloned embryos and ICSI embryos. At the 2-cell stage (24 h post-activation), no significant differences were detected between treated and non-treated cloned embryos or among the three treated groups. In spite of this, only the three groups of treated embryos showed equivalent levels of H3K14ac to the control ICSI group. Finally, at the blastocyst stage (120 h post-activation), there were no differences between cloned and ICSI embryos, except for PsA-treated embryos which showed the highest levels of H3K14ac, even when compared with ICSI controls.

Levels of H3K9me2 were similar between ICSI and cloned embryos and between treated and non-treated cloned embryos at the two developmental stages analyzed, except for PsA-treated embryos which showed lower levels than the non-treated and the VitC-PsA groups by 72 h post-activation, and higher levels than the VitC-PsA group by 120 h post-activation (Fig. 2).

Finally, in the case of DNA methylation, we found that non-treated embryos were hypermethylated compared with ICSI embryos at both developmental stages analyzed (Fig. 3). The three treatments showed a slight tendency to reduce methylation levels, although it was only statistically significant for PsA-treated morulae (72 h post-activation), which were significantly less methylated than non-treated ones. Whereas morulae from all three treatments had similar DNA methylation levels to ICSI ones, by the blastocyst stage (120 h post-activation) only the PsA-treated group maintained this similarity.

Levels of pluripotency and trophectoderm markers in treated and non-treated cloned embryos

In another set of experiments, ICSI and cloned embryos were fixed at 120 h post-activation and immunostained for OCT4 and NANOG pluripotency markers and the trophectoderm marker CDX2.

Although ICSI and non-treated cloned blastocysts had equivalent percentages of NANOG and OCT4 positive cells, global levels of NANOG and OCT4 were significantly lower in non-treated cloned blastocysts than in ICSI ones (Fig. 4 and 5). VitC treatment alone did not improve NANOG and OCT4 levels, nor the percentage of NANOG and OCT4 positive cells. In contrast, PsA treatment alone significantly increased the level of the two pluripotency markers, especially of OCT4 (1.3-fold increase), and the percentage of OCT4 positive cells, to levels equivalent to those of ICSI embryos. Cloned embryos undergoing the combined treatment VitC-PsA showed significantly increased levels of OCT4, but not of OCT4 positive cells, and a significantly higher percentage of NANOG positive cells, but not of NANOG levels.

With regards to CDX2, all groups of cloned embryos showed similar levels, which were significantly lower than in the ICSI group, and similar percentages of positive cells, which were equivalent to those of the ICSI group, except for PsA treated embryos which showed a lower percentage of CDX2 positive cells than non-treated and VitC-treated embryos (Fig. 5).

Reduced glutathione content in treated and non-treated cloned embryos

Cloned embryos were fixed at 16 h post-activation and stained for the quantification of GSH content as a measure of their reducing potential. We found that the levels of GSH were significantly higher in embryos treated with VitC alone than in all other groups of cloned embryos. In contrast, treatment with PsA did not alter the GSH content when compared with non-treated embryos (Fig. 6).

Full-term development of treated and non-treated cloned embryos

Finally, in the last set of experiments cloned embryos were transferred, at the two-cell stage, to recipient females to assess their full-term development. We found that all three treatments resulted in significantly higher rates of full-term development when compared with the non-treated group, in which no live clones were born (Table 3). We also found a higher number of residual implantation sites in the recipient females from the treated groups. The number of pups produced was slightly higher in the VitC-PsA group, but not significantly different from the other two treatments. Irrespective of the treatment, both fetuses and placentas from the cloned groups were significantly heavier than those from the fertilized control group.

Of the 26 cloned pups produced, two apparently healthy females from the VitC treatment were cannibalized by the foster mother, one from the PsA treatment died shortly after birth due to respiratory problems, one from the VitC-PsA treatment was born prematurely by natural delivery and was found dead the next day, and three more females from the VitC-PsA treatment died prematurely at a few days of age due to unknown reasons. The other nineteen mice developed normally to adulthood and were able to reproduce when mated to normal B6CBAF1 males, giving rise to normal litters (3-12 pups).

Table 1. Effect of different durations of 100 µM VitC treatment on the *in vitro* development and quality of cloned mouse embryos

Group	No. reconstructed	No. activated (%)	No. activated embryos developed to (%)			No. blastocysts	Mean cell number (\pm SEM) 96 h p.a.		
			Two cell	Morula	Blastocyst		ICM	TE	Total
NT	186	176 (94.6) ^a	143 (81.3) ^{a,b}	111 (63.1) ^{a,b}	47 (26.7) ^a	46	10.7 \pm 0.7 ^a	24.9 \pm 1.5 ^a	35.6 \pm 2.1 ^a
VitC 8-9 h	206	200 (97.1) ^a	159 (79.5) ^a	112 (56.0) ^a	71 (35.5) ^{a,b}	39	12.8 \pm 0.9 ^{a,b}	26.2 \pm 1.7 ^{a,b}	39.0 \pm 2.4 ^{a,b}
VitC 16 h	219	209 (95.4) ^a	188 (90.0) ^c	152 (72.7) ^{b,c}	89 (42.6) ^{b,c}	45	15.0 \pm 0.7 ^b	31.5 \pm 1.3 ^{a,b}	46.4 \pm 1.8 ^b
VitC 24 h	218	208 (95.4) ^a	184 (88.5) ^{b,c}	149 (71.6) ^{b,c}	92 (44.2) ^{b,c}	43	14.3 \pm 0.7 ^b	31.4 \pm 1.5 ^{a,b}	45.7 \pm 2.1 ^{a,b}
VitC 120 h	214	207 (96.7) ^a	186 (89.9) ^c	159 (76.8) ^c	95 (45.9) ^c	47	15.3 \pm 0.8 ^b	32.8 \pm 1.5 ^b	43.1 \pm 2.1 ^b

NT: non-treated cloned embryos; p.a.: post-activation

^{a-c} Values with different superscripts differ significantly within the same column ($p < 0.05$; Chi-square test for embryonic development and Kruskal-Wallis for blastocysts cell numbers).

Table 2. Effect of different epigenetic modifier treatments on the *in vitro* development of cloned mouse embryos

Group	No. reconstructed	No. activated (%)	No. activated embryos developed to (%)		
			Two cell	Morula	Blastocyst
ICSI	252	248 (98.0) ^a	237 (95.6) ^a	170 (68.5) ^{a,b}	144 (58.1) ^a
NT	239	224 (93.7) ^b	181 (80.8) ^b	143 (63.8) ^{b,c}	102 (45.5) ^{b,c}
VitC 16 h	206	194 (94.2) ^b	174 (89.7) ^c	149 (76.8) ^a	101 (52.1) ^{a,b}
PsA 16 h	236	201 (85.2) ^c	166 (82.6) ^{b,c}	118 (58.7) ^c	83 (41.3) ^c
VitC-PsA 16 h	206	193 (93.7) ^b	164 (85.0) ^{b,c}	145 (75.1) ^a	109 (56.5) ^a

NT: non-treated cloned embryos

^{a-c} Values with different superscripts differ significantly within the same column ($p < 0.05$; Chi-square test)

Table 3. Comparative full-term development and body and placenta weights of fertilized and cloned mouse embryos

Group	No. 2-cell embryos transferred (recipients)	No. of live offspring (%)	No. of dead fetuses (%)	No. of residual implantation sites (%)	No. of placenta only (%)	Average weight (mg) (mean \pm SD)	
						Body	Placenta
Control fertilized	36 (3)	23 (63.9) ^a	0 (0) ^a	5 (13.8) ^a	0 (0) ^{a,b}	1359.77 \pm 20.12 ^a	121.08 \pm 4.78 ^a
NT	258 (16)	0 (0) ^b	1 (0.4) ^a	9 (3.5) ^b	0 (0) ^a	-	-
VitC 16h	206 (13)	8 (3.9) ^c	0 (0) ^a	46 (22.3) ^a	4 (1.9) ^b	1667.99 \pm 46.00 ^b	298.71 \pm 23.82 ^b
PsA 16h	261 (17)	8 (3.1) ^c	1 (0.4) ^a	62 (23.75) ^a	0 (0) ^a	1561.84 \pm 70.70 ^b	299.78 \pm 22.86 ^b
VitC-PsA 16h	203 (13)	10 (4.9) ^c	0 (0) ^a	38 (18.7) ^a	1 (0.5) ^{a,b}	1618.34 \pm 85.31 ^b	298.54 \pm 17.96 ^b

NT: non-treated cloned embryos.

^{a-c} Values with different superscripts within the same column differ significantly (Fisher exact test for full-term development and Kruskal-Wallis test with Dunn post-test for body and placenta weights, $p < 0.05$).

Figures

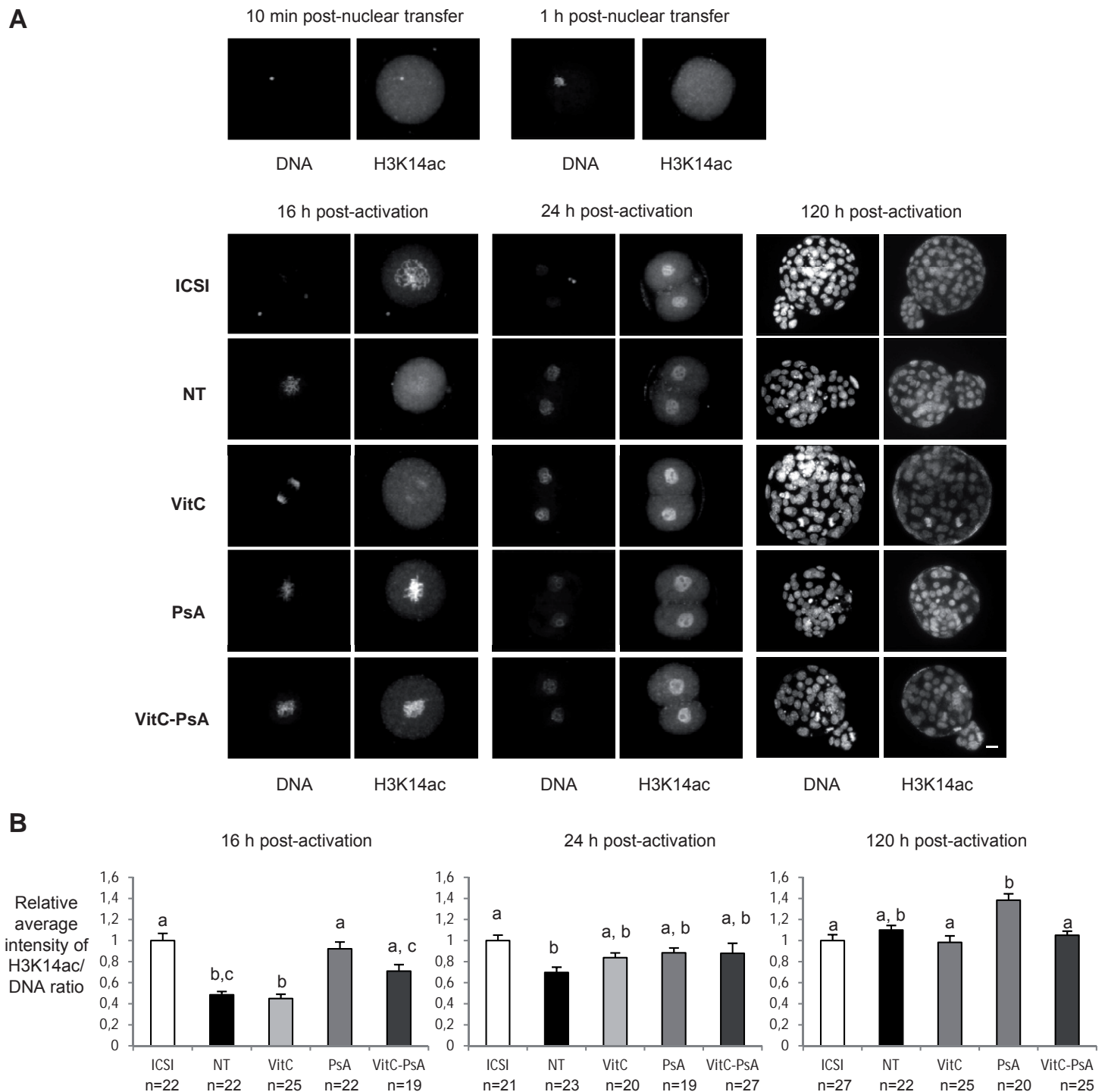


Figure 1. Psammaplin A, but not Vitamin C, increases H3K14 acetylation at 16 h post-activation. ICSI embryos and cloned embryos non-treated (NT) and treated with 100 μ M vitamin C (VitC), 10 μ M psammaplin A (PsA) or the combination of both (VitC-PsA) during 16 h were immunostained for H3K14ac and DNA detection. A) Representative images of DNA and H3K14ac staining. Scale bar = 20 μ m. B) Average intensity of H3K14ac/DNA signal ratio (+SEM) relative to ICSI embryos.

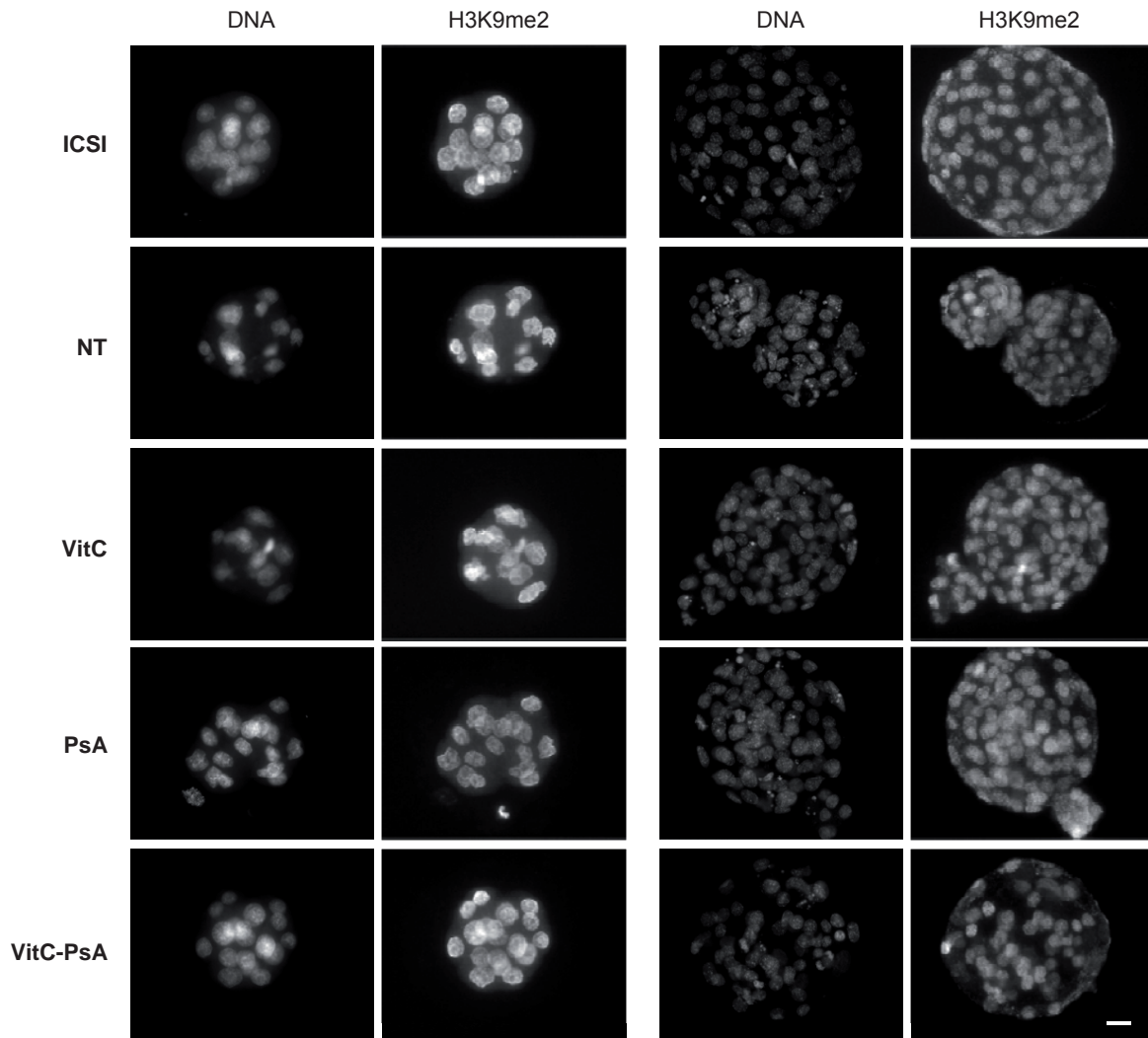
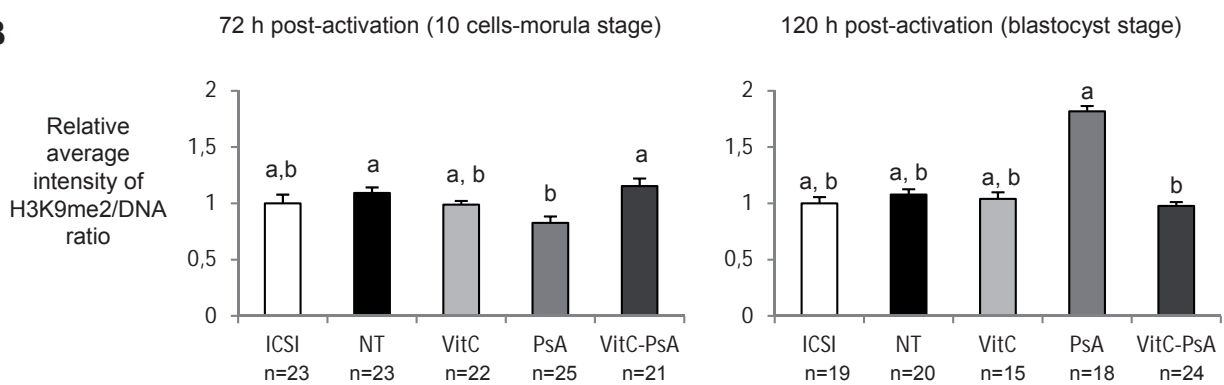
A**B**

Figure 2. Psammaplin A, but not Vitamin C, reduces H3K9 dimethylation at 72 h post-activation. ICSI embryos and cloned embryos non-treated (NT) and treated with 100 μ M vitamin C (VitC), 10 μ M psammaplin A (PsA) or the combination of both (VitC-PsA) during 16 h were immunostained for H3K9me2 and DNA detection. A) Representative images of DNA and H3K9me2 staining. Scale bar = 20 μ m. B) Average intensity of H3K9me2/DNA signal ratio (+SEM) relative to ICSI embryos.

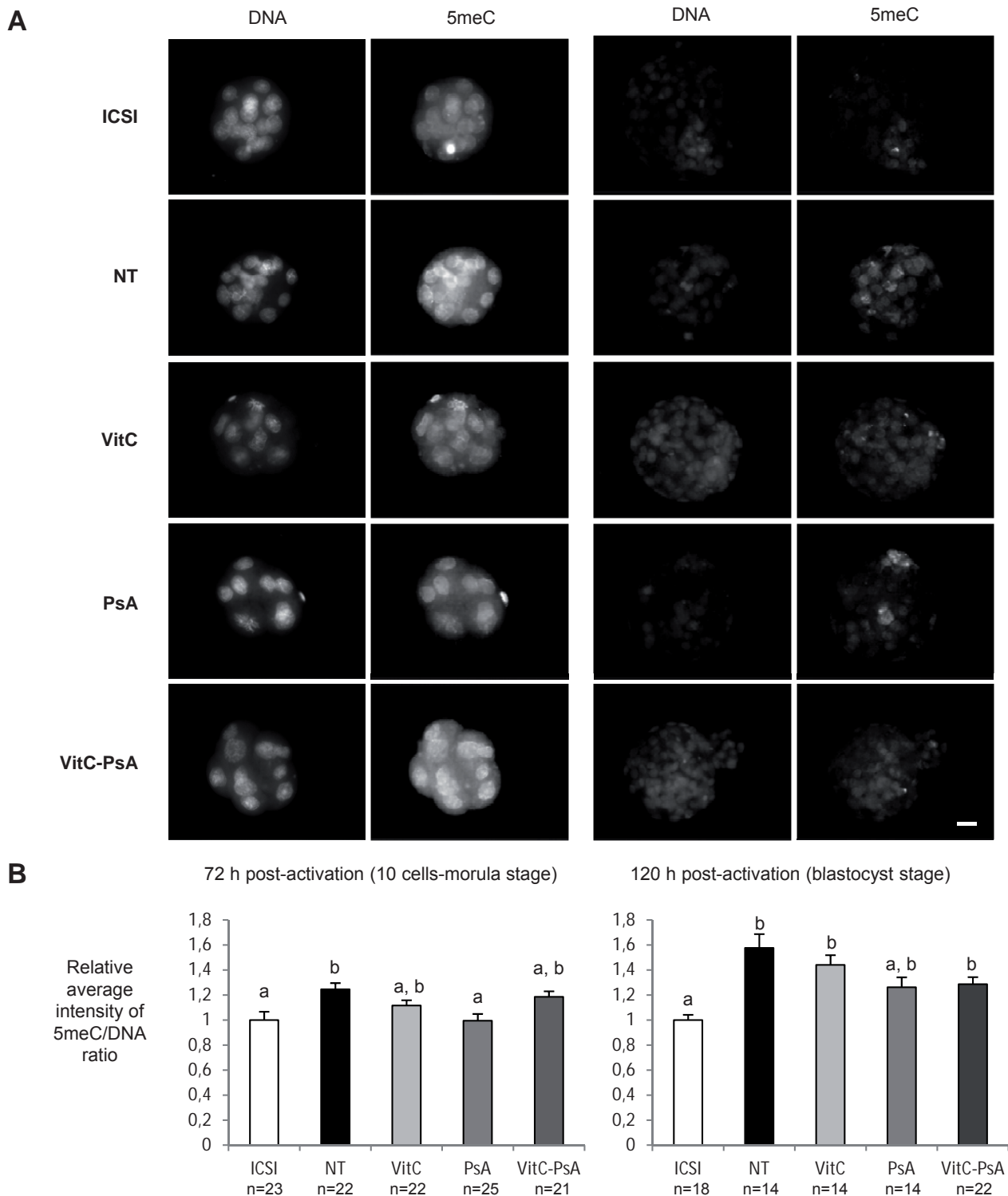


Figure 3. Psammaplin A, but not Vitamin C, reduces DNA methylation at 72 h post-activation. ICSI embryos and cloned embryos non-treated (NT) and treated with 100 μ M vitamin C (VitC), 10 μ M psammaplin A (PsA) or the combination of both (VitC-PsA) during 16 h were immunostained for 5meC and DNA detection. A) Representative images of DNA and 5meC staining. Scale bar = 20 μ m. B) Average intensity of 5meC/DNA signal ratio (+SEM) relative to ICSI embryos.

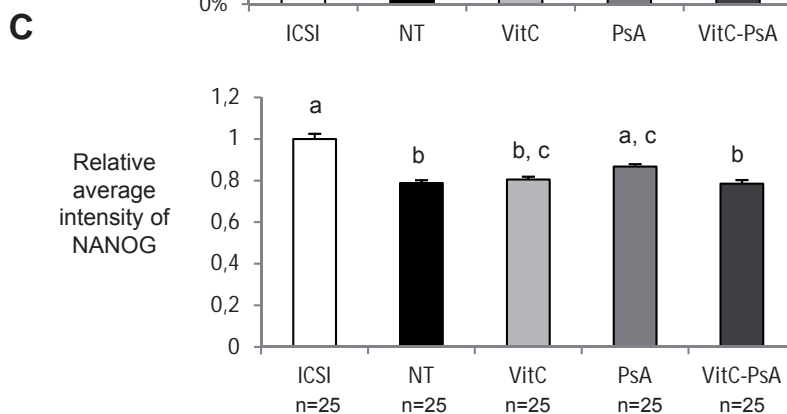
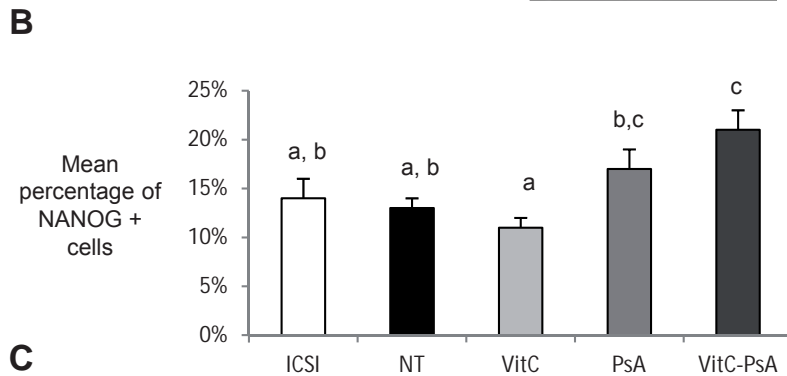
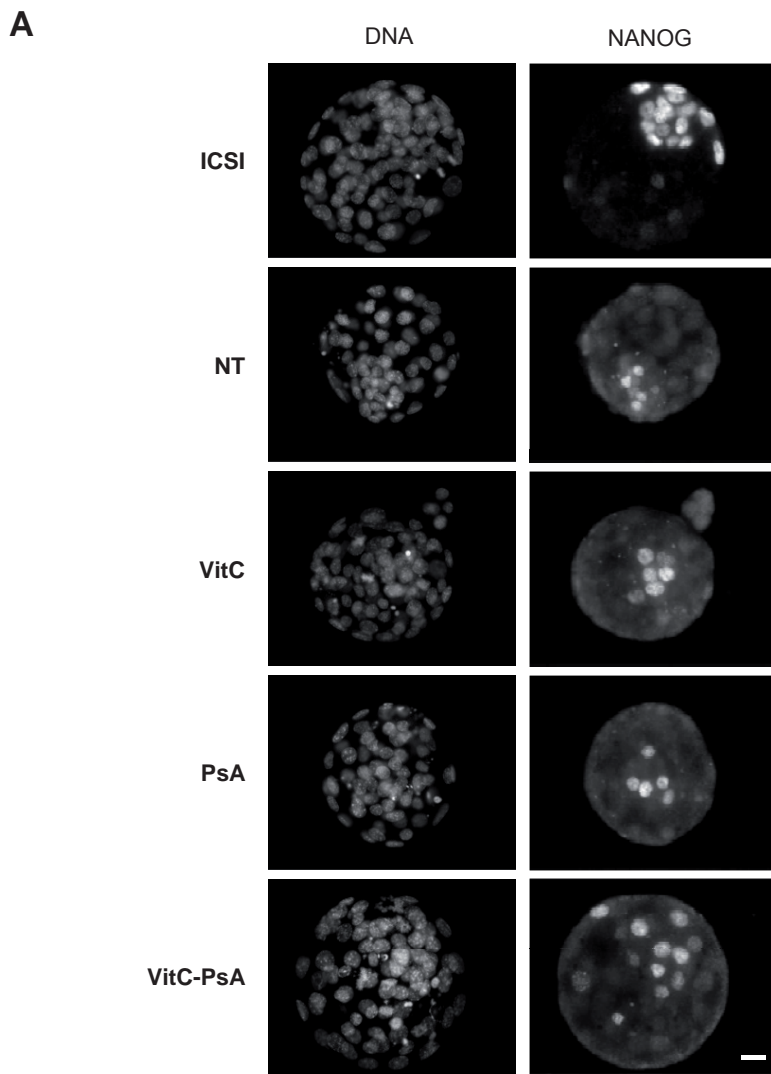
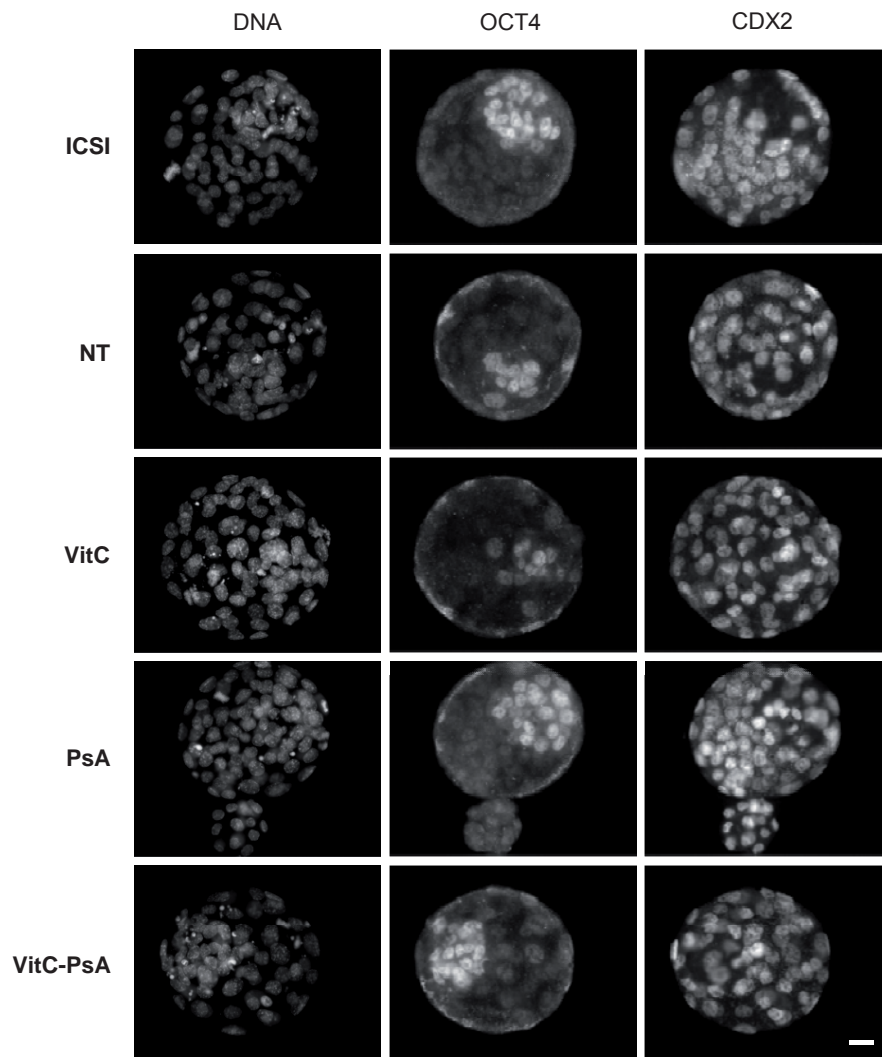
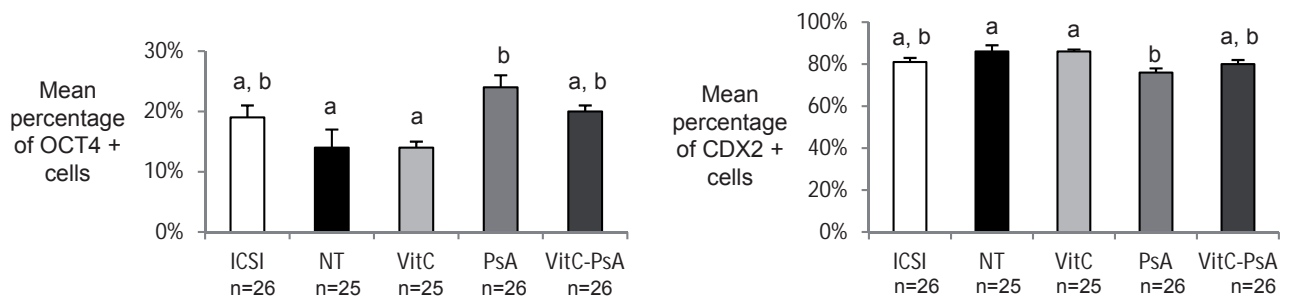


Figure 4. Psammaplin A alone or combined with vitamin C increases NANOG levels. ICSI blastocysts and cloned blastocysts non-treated (NT) and treated with 100 μ M vitamin C (VitC), 10 μ M psammaplin A (PsA) or the combination of both (VitC-PsA) during 16 h were immunostained for NANOG and DNA detection. A) Representative images of DNA and NANOG staining. Scale bar = 20 μ m. B) Mean percentage of blastocyst cells (+SEM) positive for NANOG staining. C) Average intensity of NANOG signal (+SEM) relative to ICSI embryos.

A



B



C

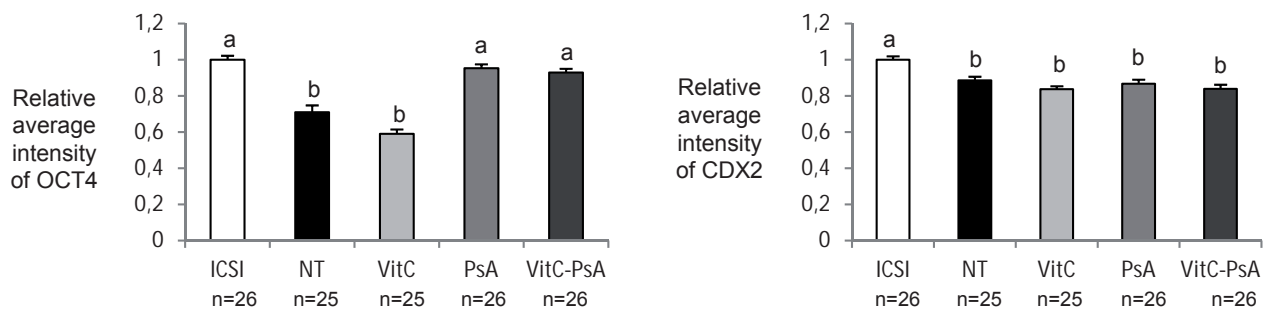


Figure 5. Psammaplin A alone or combined with vitamin C increases OCT4 but not CDX2 levels. ICSI blastocysts and cloned blastocysts non-treated (NT) and treated with 100 μ M vitamin C (VitC), 10 μ M psammaplin A (PsA) or the combination of both (VitC-PsA) during 16 h were immunostained for OCT4, CDX2 and DNA detection. A) Representative images of DNA, OCT4 and CDX2 staining. Scale bar = 20 μ m. B) Mean percentage of blastocyst cells (+SEM) positive for OCT4 or CDX2 staining. C) Average intensity of OCT4 and CDX2 signals (+SEM) relative to ICSI embryos.

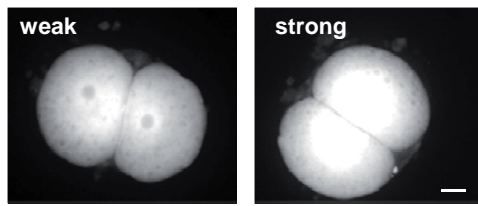
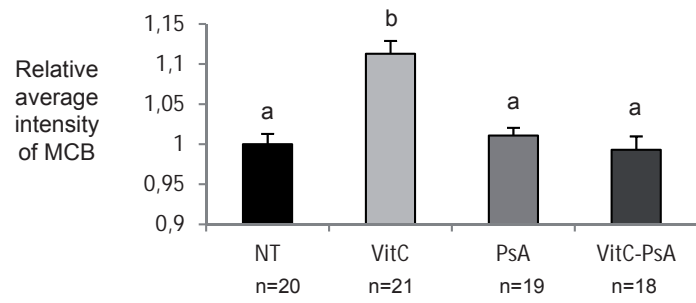
A**B**

Figure 6. Vitamin C increases reduced glutathione content. Cloned embryos non-treated (NT) and treated with 100 μ M vitamin C (VitC), 10 μ M psammaplin A (PsA) or the combination of both (VitC-PsA) during 16 h were stained for reduced glutathione content detection at 16 h post-activation. A) Representative images of monochlorobimane (MCB) staining. Scale bar = 20 μ m. B) Average intensity of MCB signal (+SEM) relative to non-treated embryos.

Discussion

In this study we were able to obtain the first mouse clones from SCNT embryos treated with VitC and with the combination VitC-PsA, using the actin polymerization inhibitor LatA during the micromanipulation and activation procedures. Along with PsA alone, all three treatments resulted in increased numbers of fertile cloned mice.

To determine the optimal duration of the VitC treatment for mouse SCNT, we chose a concentration of 100 μM , as it has been reported not to cause embryotoxicity when added to mouse embryo culture medium, whereas higher concentrations did [27, 41]. On the other hand, in spite that VitC concentrations over 200 μM have been shown to be beneficial for both *in vitro* and *in vivo* development of SCNT pig embryos in one study [40], Jeong et al. [29] found that only 100 μM VitC, but not lower (50 μM) or higher (200 μM) concentrations, improved blastocyst formation rates and blastocyst quality in porcine SCNT procedures. A VitC concentration of 227 μM has also been found to decrease the *in vitro* development rates of SCNT bovine embryos [42]. Among the different treatment durations tested in the present study, 16 h significantly increased blastocyst rates and ICM cell numbers and no further improvement was evident by extending the treatment. These results agree with the study of Huang et al. [40] in porcine SCNT embryos, in which 15 h of treatment with VitC after fusion was demonstrated to be enough for enhancing preimplantational development, but contrast with the study of Lee et al. [41] which reported that VitC does not increase the development of SCNT mouse embryos, probably due to the high concentration used.

Taking into account that reprogramming of the somatic nucleus is thought to occur mainly within a short period of time after nuclear transfer [49], whereas reactive oxygen species may accumulate during culture, the fact that a short treatment with VitC after parthenogenetic activation (16 h) is sufficient to improve cloned embryo development seems to reinforce the idea that the beneficial effects of VitC may be exerted through improvement of nuclear reprogramming rather than through its antioxidant activity [32]. Indeed, VitC has been reported to enhance JHDM and TET activities in mouse and human cells, promoting reduced levels of histone and DNA methylation [38]. In spite of this, we could not detect any clear improvement of VitC on the nuclear reprogramming markers analyzed (H3K14ac, H3K9me2 and DNA methylation), other than a slight increase in H3K14ac at 24 h post-activation and a slight decrease in DNA methylation at 72 h post-activation, to levels similar to those of ICSI embryos. Other authors have also failed to observe a substantial decrease in the global levels of 5meC in VitC-treated mouse embryonic stem cells (ESCs) [36] or cloned porcine embryos at 2-cell, 4-cell and blastocyst stages [50]. According to Blaschke et al. [36], TET-mediated VitC-induced demethylation seems to be restricted to specific genomic regions, whereas other regions such as repetitive elements, which cover a large portion of the genome, are resistant to VitC-induced DNA demethylation and can therefore obscure the results. In this sense, it is possible that the use of more sensitive and context-specific techniques of analysis than immunofluorescence would allow the detection of changes in DNA methylation levels in the treated embryos, as was indeed observed by Blaschke et al. [36] when performing 5meC immunoprecipitation followed by deep sequencing, or by Chung et al. [51] when using DNA methylation arrays in VitC-treated mouse and human ESCs,

respectively. Alternatively, it is also possible that the effect of VitC on DNA methylation levels in preimplantational embryos is more limited than in ESCs, as Blaschke et al. [36] also reported that the stronger effect of VitC in mouse ESCs was found in regions that gain methylation in cultured ESCs compared to blastocysts, and that are methylated *in vivo* only after implantation. Similar arguments could explain the lack of effects of VitC on histone methylation levels observed in the present study, which contrasts with the reduced levels of H3K9 tri- and dimethylation reported after treatment of mouse pre-iPSCs with VitC [34]. With regards to histone acetylation, Huang et al. [40] reported increased levels of H4K5 acetylation in VitC-treated porcine SCNT embryos at the 2-cell, 4-cell and blastocyst stages. As VitC has not been shown to be a cofactor for acetyltransferases, and a direct effect of VitC on histone acetylation is therefore unlikely, histone acetylation levels could be indirectly altered through the effects of VitC on other epigenetic pathways, but no other epigenetic marks were analyzed in the study by Huang et al. [40]. In contrast, and in agreement with our results, Chawalit et al. [50] did not detect changes in H3K9 and K14 acetylation levels in handmade cloned porcine embryos continuously treated with VitC at any of the stages analyzed (2-cell, 4-cell and blastocysts). These differing results could be attributed to the specific lysines analyzed (H4K5 in Huang et al. [40] vs H3K9 and K14 in Chawalit et al. [50] and the present study), and deserve further investigation.

Consistent with the epigenetic results observed, the levels of pluripotency markers OCT4 and NANOG, which are often decreased in cloned embryos [52-54], were not improved in the blastocysts produced from the VitC-treated SCNT embryos. Again, our results are similar to those of Blaschke et al. [36] in VitC-treated mouse ESCs and of Chawalit et al. [50] in VitC-treated handmade cloned porcine embryos, but in disagreement with those of Huang et al. [40] demonstrating that OCT4 and SOX2 levels were elevated after treatment of cloned porcine embryos with VitC for 15 h after activation. It is noteworthy that despite the treatment with VitC apparently did not correct the abnormal levels of histone acetylation and of histone and DNA methylation, nor the defective expression of pluripotency genes, it resulted in a significant increase in full-term development of the treated SCNT embryos compared to the untreated ones. On the other hand, treatment of cloned embryos with the HDACi PsA also resulted in increased rates of full-term development, similar to those obtained with VitC, which in this case can be explained by its positive effects on nuclear reprogramming (increased levels of H3K14 acetylation, OCT4 and NANOG; decreased levels of DNA methylation). Nevertheless, none of the two epigenetic modifiers was able to correct placental overgrowth, a typical feature observed in cloned fetuses [55]. This could be related to an altered trophoctoderm lineage, as also indicated by the low levels of CDX2, a transcription factor essential for trophoctoderm and subsequent placenta formation [56], in all groups of cloned embryos, either treated or untreated.

It has been reported by Esteban et al. [32] that VitC and the HDACi valproic acid have an additive effect in improving nuclear reprogramming and mouse iPSCs generation. In contrast, no additive effect between VitC and another HDACi, trichostatin A, on nuclear reprogramming or blastocyst development was detected in handmade cloned porcine embryos [50]. Although we observed a slightly superior rate of full-term development when VitC and PsA treatments were combined than when using VitC or PsA separately, the additive effect of these two epigenetic modifiers on mouse SCNT was not evident. When compared to embryos treated with VitC alone, embryos treated with

VitC-PsA showed some signs of improved nuclear reprogramming, such as increased levels of H3K14ac at 16 h post-activation and of OCT4 in the blastocysts produced, at levels equivalent to those of control ICSI embryos. This improvement can be attributed to the HDACi activity of PsA. Nonetheless, when compared to the treatment with PsA alone, some of the positive effects of PsA on nuclear reprogramming were not observed when the combined treatment was applied, even though *in vitro* development of the VitC-PsA treated embryos was improved. For instance, H3K14ac levels at 120 h post-activation were much lower in the VitC-PsA-treated embryos than in embryos treated with PsA alone, and the levels of NANOG, which were increased by the PsA treatment, were unaffected when VitC and PsA treatments were combined. Further investigation is required to elucidate the reasons for these unexpected results. On the other hand, the intracellular reduction of PsA is essential for its HDACi activity and it has been shown that GSH-depleted cells are not sensitive to PsA [44]. In this sense, we hypothesized that the antioxidant effect of VitC could increase embryo reducing potential, thus improving PsA reduction and, consequently, PsA-HDACi activity. However, in spite that VitC treatment increased GSH content in cloned embryos as expected from previous studies [30, 31, 50], no increase in histone acetylation levels or other synergistic effects with regards to PsA treatment were observed when VitC and PsA treatments were simultaneously applied. This suggests that the GSH content in the cloned embryos is not a limiting factor for the HDACi activity of PsA.

Another interesting finding of our study is the effect of LatA on the development of both treated and untreated cloned embryos. It has been previously reported that LatA increases full-term development of cloned mouse embryos when compared with CB [24, 25], as it corrects abnormal F-actin localization in cloned embryos and decreases the incidence of abnormal chromosome segregation [22, 24]. However, none of these previous studies analyzed the effects of LatA on *in vitro* development and in all of them the use of LatA was combined with the treatment of cloned embryos with an epigenetic modifier (either trichostatin A or PsA). To the best of our knowledge, this is the first report on the effects of LatA on the *in vitro* development of cloned embryos, both untreated and treated with an epigenetic modifier. Interestingly, we found that the use of LatA during micromanipulation and activation procedures increased blastocyst rates in the non-treated group, but not in the VitC-treated group, in which only a moderate increase was observed. A similar outcome is observed with PsA-treated embryos, in which blastocyst rates are similar with (41.3%, this study) or without (43.2%) [25] the use of LatA. In spite of their enhanced *in vitro* development, the full-term development of non-treated embryos was still suboptimal and no clones could be obtained. Therefore, our results seem to indicate that LatA enhances *in vitro* development in those groups of cloned embryos with a more impaired development (non-treated embryos), but this enhancement is not correlated with improved full-term development. It is possible that LatA corrects some abnormalities, such as chromosome segregation [22], with an impact on preimplantation development, but that other abnormalities, such as defective nuclear reprogramming, which are key for implantation and postimplantation development are not corrected by LatA. This would explain why LatA treatment is only effective in enhancing full-term rates when combined with an epigenetic modifier such as PsA, which has proved to improve nuclear reprogramming [this study and 25].

Cloning efficiencies obtained in the present study, both for non-treated and treated embryos, were not as high as those reported by other authors, which can reach up to 10% for HDACi-treated embryos. However, these reported data correspond to one of the mouse strains with higher cloning efficiencies (B6D2F1), and the effects of genotype on cloning rates are well-described [18]. Indeed, our null full-term developmental rates in the non-treated SCNT embryos agree with the results of other studies performed on the B6CBAF1 strain [14, 25, 57].

In summary, the present study demonstrates that: (1) VitC improves both *in vitro* and *in vivo* development of mouse SCNT embryos through a yet unknown mechanism, as no effects on nuclear reprogramming could be detected; (2) the combination of VitC with PsA does not show significant additive effects on mouse SCNT efficiency, although full-term development is slightly increased with regards to treatments with VitC or PsA alone; (3) the use of LatA during micromanipulation and activation procedures improves blastocyst formation in non-treated cloned embryos, but its enhancement of mouse cloning efficiencies requires the treatment of embryos with an epigenetic modifier.

Acknowledgements

We thank Jonatan Lucas and M^a Jesús Álvarez for their technical assistance and the staff at the *Servei d'Estabulari* of the *Universitat Autònoma de Barcelona* for taking care of the mice.

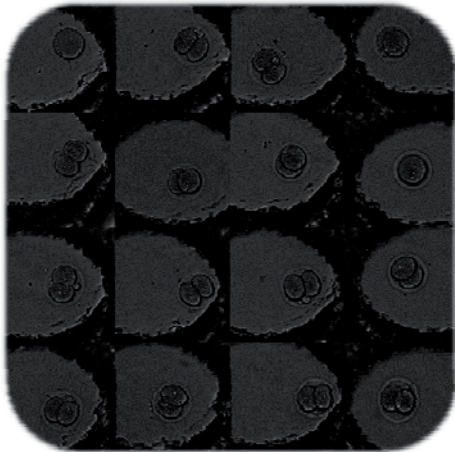
References

1. Gurdon JB, Wilmut I (2011) Nuclear transfer to eggs and oocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–14.
2. Mason K, Liu Z, Aguirre-Lavin T, Beaujean N (2012) Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. *Anim Reprod Sci* 134: 45–55.
3. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, et al. (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci* 98: 13734–13738.
4. Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, et al. (2001) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet* 28: 173–177.
5. Kang Y-K, Park JS, Koo D-B, Choi Y-H, Kim S-U, et al. (2002) Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J* 21: 1092–1100.
6. Beaujean N, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, et al. (2004) Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 71: 185–193.
7. Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S (2007) Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol Reprod* 77: 1007–1016.
8. Maalouf WE, Alberio R, Campbell KHS (2008) Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics* 3: 199–209.
9. Chan MM, Smith ZD, Egli D, Regev A, Meissner A (2012) Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. *Nat Genet* 44: 978–980.
10. Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC (2003) Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod* 69: 896–901.
11. Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan N Van, et al. (2006) Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 183–189.
12. Van Thuan N, Bui H-T, Kim J-H, Hikichi T, Wakayama S, et al. (2009) The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction* 138: 309–317.
13. Zhao J, Hao Y, Ross JW, Spate LD, Walters EM, et al. (2010) Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell Reprogram* 12: 75–83.
14. Costa-Borges N, Santalo J, Ibañez E (2010) Comparison between the Effects of Valproic Acid and Trichostatin A on the In Vitro Development, Blastocyst Quality, and Full-Term Development of Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell Reprogram* 12: 1–10.
15. Miyoshi K, Mori H, Mizobe Y, Akasaka E, Ozawa A, et al. (2010) Valproic Acid Enhances In Vitro Development and Oct-3/4 Expression of Miniature Pig Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell Reprogram* 12: 67–74.
16. Ono T, Li C, Mizutani E, Terashita Y, Yamagata K, et al. (2010) Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. *Biol Reprod* 83: 929–937.

17. Park S-J, Park H-J, Koo O-J, Choi W-J, Moon J-H, et al. (2012) Oxamflatin improves developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Reprogram* 14: 398–406.
18. Ogura A, Inoue K, Wakayama T (2013) Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20110329.
19. Tsuji Y, Kato Y, Tsunoda Y (2009) The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote* 17: 109–115.
20. Huan YJ, Zhu J, Xie BT, Wang JY, Liu SC, et al. (2013) Treating cloned embryos, but not donor cells, with 5-aza-2'-deoxycytidine enhances the developmental competence of porcine cloned embryos. *J Reprod Dev* 59: 442–449.
21. Jafari S, Hosseini MS, Hajian M, Forouzanfar M, Jafarpour F, et al. (2011) Improved in vitro development of cloned bovine embryos using S-adenosylhomocysteine, a non-toxic epigenetic modifying reagent. *Mol Reprod Dev* 78: 576–584.
22. Terashita Y, Yamagata K, Tokoro M, Itoi F, Wakayama S, et al. (2013) Latrunculin a treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One* 8: e78380.
23. Himaki T, Mori H, Mizobe Y, Miyoshi K, Sato M, et al. (2010) Latrunculin A dramatically improves the developmental capacity of nuclear transfer embryos derived from gene-modified clawn miniature pig cells. *Cell Reprogram* 12: 127–131.
24. Terashita Y, Wakayama S, Yamagata K, Li C, Sato E, et al. (2012) Latrunculin A can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. *Biol Reprod* 86: 180.
25. Mallol A, Santaló J, Ibáñez E (2014) Psammaphin A Improves Development and Quality of Somatic Cell Nuclear Transfer Mouse Embryos. *Cell Reprogram*: In press. DOI: 10.1089/cell.2014.0012
26. Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N (2001) Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. *Biol Reprod* 65: 1800–1806.
27. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, et al. (2002) Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril* 78: 1272–1277.
28. Tao Y, Zhou B, Xia G, Wang F, Wu Z, et al. (2004) Exposure to L-ascorbic acid or alpha-tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. *Reprod Domest Anim* 39: 52–57.
29. Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, et al. (2006) Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 66: 2104–2112.
30. Wongsrikeao P, Nagai T, Agung B, Taniguchi M, Kunishi M, et al. (2007) Improvement of Transgenic Cloning Efficiencies by Culturing Recipient Oocytes and Donor Cells With Antioxidant Vitamins in Cattle. *Mol Reprod Dev* 74: 694–702.
31. Kere M, Siriboon C, Lo N-W, Nguyen NT, Ju J-C (2013) Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. *J Reprod Dev* 59: 78–84.
32. Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, et al. (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6: 71–79.
33. Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, et al. (2013) H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet* 45: 34–42.
34. Chen J, Guo L, Zhang L, Wu H, Yang J, et al. (2013) Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet* 45: 1504–1509.

35. Wang T, Chen K, Zeng X, Yang J, Wu Y, et al. (2011) The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 9: 575–587.
36. Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez J a, Goyal P, et al. (2013) Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 500: 222–226.
37. Yin R, Mao S-Q, Zhao B, Chong Z, Yang Y, et al. (2013) Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc* 135: 10396–10403.
38. Monfort A, Wutz A (2013) Breathing-in epigenetic change with vitamin C. *EMBO Rep* 14: 337–346.
39. Krishnakumar R, Blelloch RH (2013) Epigenetics of cellular reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 23: 548–555.
40. Huang Y, Tang X, Xie W, Zhou Y, Li D, et al. (2011) Vitamin C enhances in vitro and in vivo development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 411: 397–401.
41. Lee AR, Matsubara K, Okuyama N, Saeki K, Matsumoto K, et al. (2010) P35. Vitamin C does not enhance reprogramming after SCNT. *Differentiation* 80: S28.
42. Li Q, Wang Y-S, Wang L-J, Zhang H, Li R-Z, et al. (2014) Vitamin C Supplementation Enhances Compact Morulae Formation but Reduces the Hatching Blastocyst Rate of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell Reprogram* 16.
43. Kim D, Lee IS, Jung JH, Yang SI (1999) Psammaplin A, a natural bromotyrosine derivative from a sponge, possesses the antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the DNA gyrase-inhibitory activity. *Arch Pharm Res* 22: 25–29.
44. Kim DH, Shin J, Kwon HJ (2007) Psammaplin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Exp Mol Med* 39: 47–55.
45. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I (1989) An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 86: 679–688.
46. Moreira PN, Jimenéz A, Fernández R, Bury-Madrid N, De la Fuente J, et al. (2003) Mouse ICSI with frozen-thawed sperm: the impact of sperm freezing procedure and sperm donor strain. *Mol Reprod Dev* 66: 98–103.
47. Mallol A, Santaló J, Ibáñez E (2013) Comparison of three differential mouse blastocyst staining methods. *Syst Biol Reprod Med* 59: 117–122.
48. Meng Q, Wang M, Stanca CA, Bodo S, Dinnyes A (2008) Cotransfer of parthenogenetic embryos improves the pregnancy and implantation of nuclear transfer embryos in mouse. *Cloning Stem Cells* 10: 429–434.
49. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard J-P, et al. (2007) Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 39: 295–302.
50. Chawalit S, Nguyen NT, Tseng J-K, Lo N-W, Tu C-F, et al. (2012) Trichostatin A and ascorbic acid assist in the development of porcine handmade cloned embryos via different physiologic pathways. *Reprod Sci* 19: 976–986.
51. Chung T-L, Brena RM, Kolle G, Grimmond SM, Berman BP, et al. (2010) Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28: 1848–1855.
52. Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, Mclaughlin KJ (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev* 16: 1209–1219.
53. Boiani M, Gentile L, Gambles V V, Cavaleri F, Redi CA, et al. (2005) Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments. *Stem Cells* 23: 1089–1104.

54. Cavaleri FM, Balbach ST, Gentile L, Jauch A, Böhm-Steuer B, et al. (2008) Subsets of cloned mouse embryos and their non-random relationship to development and nuclear reprogramming. *Mech Dev* 125: 153–166.
55. Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, et al. (2001) Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6209–6214.
56. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J (2006) Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 235: 2301–2314.
57. Maalouf WE, Liu Z, Brochard V, Renard J-P, Debey P, et al. (2009) Trichostatin A treatment of cloned mouse embryos improves constitutive heterochromatin remodeling as well as developmental potential to term. *BMC Dev Biol* 9: 11.



3.3. MORPHOKINETIC ANALYSIS OF CLONED MOUSE EMBRYOS TREATED WITH EPIGENETIC MODIFIERS AND PREDICTION OF BLASTOCYST DEVELOPMENT

Morphokinetic Analysis of Cloned Mouse Embryos Treated with Epigenetic Modifiers and Prediction of Blastocyst Development

A. Mallol, L. Piqué, J. Santaló, E. Ibáñez

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Abstract

Embryo morphokinetics is a powerful tool to predict developmental success. The application of time-lapse technology to somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos, with low developmental potential, may help to increase birth rates and derivation of embryonic stem cells (ESC). On the other hand, SCNT embryos are often treated with epigenetic modifiers to improve cloning efficiency, but the effect of these treatments on embryo morphokinetics is unknown. In the present study, development of fertilized embryos and of SCNT embryos, non-treated or treated with the epigenetic modifiers psammaplin A (PsA) or vitamin C (VitC), was assessed by time-lapse monitoring, and the ability of the resulting blastocysts to give rise to ESC lines was determined. Blastocyst rates were similar among PsA-treated (58.3%) and VitC-treated (60.9%) SCNT embryos and ICSI embryos (70.6%), but lower for non-treated SCNT embryos (45.8%). Rates of ESC derivation were higher in the two groups of treated cloned embryos (31% PsA and 40% VitC) than in non-treated clones (15.2%) or ICSI embryos (17.9%). Time-lapse analysis showed that non-treated SCNT embryos had a delayed development from second division until compaction compared with ICSI ones, which results in lower number of blastomeres at the time of compaction. Treatment of SCNT embryos with PsA further increased this delay whereas treatment with VitC slightly reduced it, suggesting that both epigenetic modifiers act through different mechanisms. In spite of these differences, slow-cleaving embryos had inferior developmental potential in all groups. Several parameters were significantly correlated with developmental success, but the time of completion of the third division, alone or combined with the duration of compaction and/or the presence of fragmentation, had a strong predictive value for blastocyst formation in all groups of embryos analyzed. In contrast, we failed to predict ESC derivation success from embryo morphokinetic parameters. Time-lapse monitoring is a powerful tool to non-invasively determine morphokinetic markers for the selection of SCNT embryos with higher developmental potential, and could help to increase cloning outcomes. Nonetheless, further studies are needed to find reliable markers for full-term development and ESC derivation success.

Introduction

The development of optimized systems for time-lapse monitoring of embryos during *in vitro* culture has allowed embryo morphokinetic analysis to become easier and more available without compromising embryo viability. As both embryo morphology and kinetics of development have been closely correlated with embryo quality and developmental competence (Wong et al. 2010; Kirkegaard et al. 2012), time-lapse monitoring is a promising tool to increase implantation and full-term development rates. Actually, it has already improved clinical results in human assisted reproduction technologies (Rienzi et al. 2011; Aparicio et al. 2013; Findikli and Oral 2014).

The precise timing and duration of embryo preimplantational development events has been studied in several non-human mammalian species, mainly bovine, hamster and mice, and candidate markers of viability have been proposed (reviewed in Kirkegaard et al. 2012). The majority of these studies have been performed with fertilized embryos, but data on the morphokinetics of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos is still scarce. SCNT is a technology with many potential applications, as it allows the generation of both cloned animals (reproductive cloning) and embryonic stem cell (ntESC) lines (therapeutic cloning) with interesting characteristics (Niemann and Lucas-Hahn 2012). However, its present use is hindered by its low efficiency. SCNT embryos suffer low implantation and full-term development rates, especially in the mouse, which are mainly due to a defective reprogramming of the somatic nucleus (Yang et al. 2007). In order to improve nuclear reprogramming, the use of epigenetic modifiers has been incorporated to SCNT protocols and this has significantly increased both reproductive and therapeutic cloning rates (Wakayama and Wakayama 2010; Ogura et al. 2013). For example, both the histone deacetylase inhibitor (HDACi) psammaplin A (PsA) and vitamin C (VitC), a cofactor of jumonji-domain-containing histone demethylases (JHDMs) and ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenases (TET), have proved to improve mouse cloning efficiency (Mallol et al. 2014a,b). However, SCNT efficiency is still low and more improvements are needed to increase the applicability of reproductive and therapeutic cloning. In this sense, the development of a method based on morphokinetic parameters for the selection of the most competent SCNT embryos prior to embryo transfer or embryo seeding would improve the birth rates per transferred embryo and the establishment of ntESC lines per seeded blastocyst, respectively.

Due to the obvious differences between fertilized and SCNT embryos, it is expected that both their kinetics of development and the potential predictive markers of developmental success significantly differ. It is well known that cloned embryos suffer from developmental delay and lower cell counts but, to the best of our knowledge, very few studies have analyzed the morphokinetics of SCNT embryos in detail. In the mouse, for example, Balbach et al. (2010) and Li et al. (2011) found that intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and SCNT mouse embryos from the B6C3F1 and B6D2F1 strains, respectively, developed synchronously to the 4-cell stage, but that at the morula stage cloned embryos were lagging behind. Later, in a more

comprehensive study, Balbach et al. (2012) reported that the second (two-cell and three-cell stages) and the third (four-cell stage) cell cycles were extended in SCNT B6C3F1 mouse embryos when compared to ICSI ones, but that only parameters later than the four-cell stage could predict development to the blastocyst stage with a reasonable accuracy (>66.7%). In spite of this, when embryos were classified as fast or slow cleaving according to the time spent until they reached the three-cell stage, they observed that fast-dividing embryos were more successful at forming blastocysts but less successful at producing ntESC lines than slow-dividing embryos. Fetal formation, however, was not different between fast and slow-dividing embryos. Similarly, Mizutani et al. (2012) reported that SCNT B6D2F1 mouse embryos were delayed from the two-cell stage, but that the speed of development was not a key factor for their full-term development, except for the very slow-developing ones. Yet, the developmental potential of the cloned embryos could be predicted based on the number of cells at 70 h post activation. It is important to note that in the two aforementioned studies (Balbach et al. 2012; Mizutani et al. 2012), the monitored embryos were exposed to both white and fluorescent light and the developmental potential of the SCNT mouse embryos was negatively affected. Further studies are needed to confirm these results and to search for putative markers of developmental competence that help to select the best embryos for embryo transfer and for ESC derivation procedures. On the other hand, given the reported differences among mouse strains in cloning efficiencies and morphokinetic parameters (Wakayama and Wakayama 2010; Ogura et al. 2013; Wolff et al. 2013), investigations should be extended to other mouse strains to detect differences/similarities among them in the kinetics of development of cloned embryos and the determination of markers of developmental potential.

In addition, even though the treatment of cloned embryos with epigenetic modifiers is at present a routine addition to SCNT protocols, it is not clear whether these treatments alter embryo kinetics and in which way. Until now, only general observations have been reported, arising from the periodical observation of the cultured embryos at given time-points. For example, Li et al. (2008) observed a delay in SCNT pig morula compaction when embryos were treated with the HDACi tricostatin A (TSA). In contrast, Dai et al. (2010) described that the onset of cavitation occurred earlier in SCNT mouse embryos treated with the HDACi m-carboxycinnamic acid bishydroxamide (CBHA), and Huang et al. (2011a) reported that SCNT pig embryos treated with the HDACi valproic acid (VPA) reached the blastocyst stage earlier than non-treated ones.

The main purpose of the present work was to obtain a detailed description of the morphokinetics of ICSI and SCNT B6CBAF1 mouse embryos, from the one-cell to the blastocyst stages, using a commercially available time-lapse monitoring system which has been shown not to compromise the development of fertilized mouse embryos (Pribenszky et al. 2010). Furthermore, we aimed to analyze the effect of the epigenetic modifiers PsA and VitC on the morphokinetics of SCNT embryos. Finally, we sought to identify morphokinetic parameters of ICSI and non-treated or treated SCNT embryos which allow to predict their successful developmental to the blastocyst stage and of ESC lines establishment.

Materials and methods

Unless otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma (Madrid, Spain).

Animals

Mouse care and procedures were conducted according to the protocols approved by the Ethics Committee on Animal and Human Research of the *Universitat Autònoma de Barcelona* and by the *Departament de Medi Ambient i Habitatge* of the *Generalitat de Catalunya*.

Hybrid B6CBAF1 (C57Bl/6xCBA/J) mice aged 6-12 weeks were used as sperm, oocytes and cumulus cells donors. All animals were purchased from Charles River (L'Arbresle, France).

Collection of sperm, oocytes and cumulus cells

Spermatozoa were collected from the cauda epididymes and were allowed to disperse during 20 min at 37°C in a drop (500 µl/epididymis) of HEPES-buffered CZB medium (HCZB) (Chatot et al. 1989) covered with oil. The sperm suspension was then diluted in vials of fresh HCZB (1:2 dilution), plunged into liquid nitrogen without cryoprotection and stored at -80°C for up to one month.

Metaphase II oocytes and cumulus cells were collected, just before use, from females induced to superovulate by intraperitoneal injection of 5 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Intervet, Barcelona, Spain) and 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG; Farma-Lepori, Barcelona, Spain), 48 h apart. Cumulus-oocyte complexes were collected from the oviducts 14-15 h after hCG administration in HCZB, and treated with 300 U/ml hyaluronidase in HCZB at 37°C until dispersion of cumulus cells. Denuded oocytes were then washed and kept in drops of KSOM culture medium (MR-106-D; Millipore, Madrid, Spain) covered with mineral oil at 37°C under 5% CO₂. Dispersed cumulus cells were diluted in HCZB, centrifuged for 5 min at 250 g, resuspended in a small volume (30 µl) of 3% (v/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) in HCZB and kept at 4°C until use.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

Sperm samples were thawed at room temperature (RT) and 5-10 µl of the concentrated sperm suspension were introduced into a microdrop of 3% PVP. Oocytes were transferred to a microdrop of HCZB and injected with a sperm head, without the tail lost by the freeze/thawing procedure (Moreira et al. 2003), using a piezodrill (Burleigh, Mississauga, Canada) micromanipulator (TransferMan NK2; Eppendorf, Hamburg, Germany). Injected oocytes were washed and cultured in KSOM (Millipore, Madrid, Spain), as described below.

Somatic cell nuclear transfer (SCNT)

Oocytes were enucleated and injected with a cumulus cell nucleus using a piezodrill micromanipulator. Micromanipulations were performed in drops of HCZB containing 5 µM latrunculin A (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After reconstruction, oocytes were cultured for 1 h in KSOM before activation during 6 h (37°C, 5% CO₂) in 10 mM SrCl₂ in

Ca²⁺-free-CZB medium supplemented with 5 µM latrunculin A to prevent second polar body extrusion and with or without the epigenetic modifiers. After activation, oocytes showing at least one visible pronucleus were extensively washed and cultured in fresh KSOM medium, as described below, with or without the epigenetic modifiers.

Epigenetic modifier treatments of cloned embryos

PsA (Santa Cruz Biotechnology) was dissolved in DMSO to prepare a 3 mM stock solution and stored frozen. VitC was dissolved in tri-distilled water to prepare a 5 mg/ml stock solution, filtered, and stored at 4°C for 2 weeks. The final concentrations of both epigenetic modifiers were prepared by dilution of the stock solutions in either the activation or culture media. Embryos were exposed to 10 µM PsA or 100 µM VitC during 6 h of activation and 10 h of the posterior culture (16 h treatment). At the end of the treatment, embryos were extensively washed in drops of KSOM culture medium and transferred to a new culture dish.

Embryo culture and time-lapse monitoring

The time-lapse monitoring system used (PrimoVision™, Vitrolife, Sweden) is a compact digital inverted microscope placed inside a regular incubator and connected to a controlling unit outside the incubator. It uses low intensity green light (550 nm) and has very short exposure times (<1 s) for image acquisition. The system was set to take a digital picture of the embryos every 5 min.

Embryos were cultured in the microwells of a specially designed well-of-the-well PrimoVision embryo culture dish (Vitrolife). The wells were filled with KSOM culture medium and covered with oil. Each well contained a single embryo and each dish contained 16 embryos from the same experimental group. The dishes were placed inside the incubator on the time-lapse monitoring microscope at 37°C and 5% CO₂, and kept undisturbed until 120 h after fertilization/parthenogenetic activation. The only exception were SCNT embryos treated with PsA or VitC, which were moved out of the incubator for media change at 16 h post-activation and then transferred to the same microwell position of another PrimoVision dish containing fresh KSOM culture medium before being returned to the incubator.

Establishment of embryonic stem cell (ESC) lines

ESC lines were derived from monitored embryos that reached the blastocyst stage. After removal of the zona pellucida with acid Tyrode's solution, blastocysts were seeded onto a feeder cell monolayer of mouse embryonic fibroblasts (ECACC, UK) inactivated with 10 µg/ml mitomycin C during 3 h (Invitrogen, Spain). The derivation medium used consisted of Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 100X non-essential aminoacids (Invitrogen), 100 µM 2-β-mercaptoethanol (Invitrogen), 20% (v/v) knockout serum replacement (Invitrogen), 10 µg/ml penicillin (Gibco, Spain), 10 µg/ml streptomycin (Gibco) and 5·10³ units/ml leukemia inhibitory factor (Millipore). The culture medium was changed every 48 h. Blastocysts were kept in culture (37°C, 5% CO₂) until outgrowths were observed approximately 7 days after seeding. Outgrowths of embryonic cells were then mechanically

disaggregated in the presence of a 1:10 dilution of trypsin (Gibco) in Hank's Balanced Salt Solution (Invitrogen), using a mouth-controlled Pasteur pipette to move the aggregates in and out of the tip of pipette until reducing them to smaller cell clumps of a few single cells. Passaging was performed approximately 6 times until ESC lines were considered to be established.

Characterization of ESC lines

ESC lines were first characterized by a morphological criterion. In this sense, lines with colonies containing round cells with a small amount of cytoplasm and without the presence of differentiated cells were classified as ESC-like lines. Then, pluripotency of the selected ESC-like lines was assessed by immunofluorescence analysis of two specific markers of undifferentiated cells, OCT-4 and SOX2. Briefly, ESC-like colonies were fixed in 4% paraformaldehyde during 15 min, washed 3 times in a phosphate buffered saline (PBS) solution and permeabilized in a PBS solution containing 0.5% (v/v) Triton X-100, 3% (v/v) goat serum and 0.2% (v/v) sodium azide during 30 min. Then, colonies were incubated overnight at 4°C in primary antibodies, washed 3 times in PBS solution and incubated with the corresponding secondary antibody during 2 h at room temperature. Primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-Sox2 (1:200, AB5603, Millipore) and rabbit monoclonal anti-Oct-4 (1:50, A13998, LifeTechnologies, Spain). Secondary antibodies were Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 chicken anti-mouse IgG (A-11037 and A-21200, Life Technologies), both used at 6 µm/ml. Finally, the samples were stained with Hoechst 33258 (Life Technologies) at 10 µg/ml as a nuclear counterstain, mounted, and examined with an epifluorescence microscope (Olympus BX60). Digital images were acquired on Isis software version 5.3.3.9 (Metasystems, Spain).

***In vitro* differentiation of ESC lines**

To confirm their pluripotency, ESC lines were subjected to differentiating culture conditions to obtain cells of the three germ layers: ectoderm, endoderm and mesoderm. ESC lines were subcultured to gelatin pre-coated dishes in the absence of feeder cells and LIF, and knockout serum replacement was substituted with fetal calf serum (Fisher Scientific, Spain). Culture was done at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere and the medium was changed every 48 h. After 7 days, the cells were fixed for immunofluorescence analysis of specific differentiation markers: the neuroepithelial stem cell protein (nestin), characteristic of the ectodermal layer; alphafetoprotein (AFP), characteristic of endoderm; and α -smooth muscle actin (α -SMA), characteristic of mesoderm. Fixation and immunofluorescence procedures were the same used for the characterization of the undifferentiated ESC lines. Primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-nestin (1:250, ab5968, Abcam), rabbit polyclonal anti-AFP (1:400, A000829-2, Dako) and mouse monoclonal anti- α -SMA (1:400, A5228, Sigma). Secondary antibodies, used at 6 µm/ml, were Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488 chicken anti-mouse IgG (Life Technologies). Finally, the cells were stained with Hoechst 33258 at 10 µg/ml as a nuclear counterstain. Mounted samples were examined with an epifluorescence microscope

(Olympus BX60) and digital images were acquired on Isis software version 5.3.3.9 (Metasystems).

Evaluation of morphokinetic parameters

Image sequences acquired for each embryo were analyzed using the PrimoVision Analyzer software (Vitrolife) to determine the precise timing of several developmental events, specifically of the disappearance of pronuclei (PNd), each cell division until compaction (div1-7), appearance of nuclei at the 2-cell stage (Na), compaction (comp) and cavitation (cav) (Table 1 and Figure 1). From these data, the duration of many developmental events was calculated, as intervals between the time points analyzed (Table 2 and Figure 1). As ICSI embryos were placed on the PrimoVision right after injection, whereas SCNT embryos were placed after the 6 h activation period, the starting point for time-lapse monitoring was not equivalent between the two groups of embryos. For this reason, the timing of the first event in common between the two groups (PNd) was set as time zero for all groups of embryos. Thus, the time of all events, except for PNd, was expressed as minutes post-PNd.

Aside from time points and durations, the frequencies of several qualitative parameters were also annotated, such as the occurrence of a direct division from 1-cell to 3- or 4-cells (directdiv) or of an abnormally early compaction at the 2-cell stage (comp2C), and the presence of fragmentation (frag) or blastomeres with asymmetric sizes (uneven) at any developmental stage. In addition, the number of cells at the beginning of compaction (cellscomp), excluding comp2C embryos, and the frequency of embryos undergoing compaction between 3- and 7-cell stage were also recorded (Figure 1).

Statistical analysis

Each experiment was repeated at least five times and the results obtained were pooled and analyzed with SAS v9.3 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

First, a bivariate analysis was performed using the group variable as the independent one. For qualitative variables Chi-square or Fisher's exact tests were used, and for quantitative variables the non-parametric Kruskal-Wallis test was used. Pairwise comparisons with Bonferroni correction were performed using a Mann-Witney test. In all cases, a probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Second, for the prediction of blastocyst formation and of ESC derivation, bivariate logistic regression models were obtained for each variable; those with $p < 0.05$ were included in a multivariate logistic regression model. The final models were obtained using the backward method for variable selection, taking into account possible multicollinearity effects among variables. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were used to test the predictive value of each model and their area under the curve (AUC) were calculated. Values of the variables providing the maximum sensitivity and specificity were also determined. Finally, F-score was calculated for determining accuracy of each predictor model ($F = 2 \times \frac{\text{precision} \times \text{sensitivity}}{\text{precision} + \text{sensitivity}}$).

Results

Blastocyst formation and ESC derivation rates

Non-treated SCNT embryos showed significantly lower rates of blastocyst formation than control ICSI embryos (Table 3). Treatment of SCNT embryos with either PsA or VitC improved developmental potential, resulting in blastocyst rates equivalent to those of ICSI embryos, though not significantly different from those of non-treated SCNT embryos.

ESC lines were derived from all four groups of embryos (Table 4). We found that both PsA and VitC treatments increased the rates of blastocyst attachment to the feeder monolayer, outgrowth formation at day 7, and ESC lines establishment compared with non-treated SCNT embryos and ICSI embryos, despite the differences between non-treated and treated SCNT embryos were only significant for the VitC group. All the ESC lines obtained were positive for the pluripotency markers analyzed and, after differentiation, were positive for the differentiation markers of the three germ layers (Figure S1).

Morphokinetic parameters of ICSI and SCNT embryos

Of the total 319 embryos analyzed, only 3 (4.0%) from the PSA-treated and 1 (1.1%) from the VitC-treated SCNT groups performed a direct transition from 1-cell to 3- or 4-cells (directdiv) and no significant differences were detected among groups for this parameter (Table S1). On the other hand, PsA-treated embryos showed a higher percentage (20%) of uneven divisions compared with ICSI embryos (4.4%) but not with non-treated (9.6%) or VitC-treated (9.7%) SCNT embryos. Abnormally early compaction at the 2-cell stage (comp2C) was observed in all groups of embryos, but especially in non-treated (18.1%) and PsA-treated (16.0%) SCNT embryos, although the differences among groups were not statistically significant (Table S1). Embryos showing comp2C either arrested to develop or decompacted and continued to develop. Furthermore, most cloned embryos ($\geq 70\%$), and in particular non-treated (84.9%) and PsA-treated ones (86.4%), underwent compaction at 3- to 7-cell stages, in contrast to ICSI embryos (30.8%), which mostly compacted at 8-cell stage. Therefore, the number of blastomeres at the beginning of compaction (cellscomp) was significantly lower in SCNT embryos compared with ICSI ones (Table 5). Finally, VitC-treated embryos showed more fragmentation (61.3%) than ICSI embryos (39.7%) and PsA-treated SCNT embryos (37.3%), but similar to non-treated SCNT embryos (54.2%) (Table S1).

A graphic representation of the time points and durations of *in vitro* development events, from PNd to cavitation, of all embryos analyzed in the ICSI and SCNT groups is shown in Figure 2, and the values and statistical comparisons are shown in Table S1.

PNd, which can be compared only among SCNT embryos, occurred more than 1 h later in PsA-treated embryos than in the other two groups, which didn't significantly differ. Although the duration of div1 was similar among all groups of embryos, div1-b and div1-e occurred later in PsA-treated SCNT embryos than ICSI ones. Because of this, the duration of the 1-cell stage and of the first cycle was significantly longer in PsA-treated SCNT embryos than in ICSI

embryos (9 and 11 min longer, respectively). However, no differences in nuclear appearance at the 2-cell stage could be detected among groups. Div2-b was delayed in all three groups of SCNT embryos compared with ICSI ones, and particularly in PsA-treated embryos, which were also more delayed than VitC-treated ones. As a result, the duration of the 2-cell stage was significantly longer in all SCNT embryos than in ICSI ones (between 2 h 45 min and 4 h 55 min longer), and again in PsA-treated embryos the 2-cell stage lasted longer than in VitC-treated ones. In addition, the duration of div2 in non-treated and PsA-treated SCNT embryos was twice as much as in the other two groups. The delay of SCNT embryos compared with ICSI embryos and of PsA-treated SCNT embryos compared with VitC-treated ones, was maintained at div3-b, even though the duration of div3 was similar in all groups. Non-treated and PsA-treated SCNT embryos showed a significant increase in 3-cell stage duration compared with ICSI ones (80 and 65 min of difference, respectively). In agreement with these results, cleavage cycle 2 was significantly longer in SCNT embryos than in ICSI ones, particularly in PsA-treated embryos, which also showed a longer cycle 2 than VitC-treated ones (2 h 44 min longer). In spite that no more significant differences in the duration of the subsequent cell stages (4-, 5-, 6- and 7-cell) were observed among groups, the beginning of divisions 4, 5, 6 and 7 was again delayed in all groups of SCNT embryos when compared with ICSI ones, and significant variations were detected among the three SCNT groups. In particular, PsA-treated embryos were the slowest to begin div4 and div5 and VitC-treated ones the fastest among the SCNT groups, whereas for div6-b and div7-b both non-treated and PsA-treated embryos were slower than VitC-treated ones. No differences were found between treated and non-treated SCNT embryos in the duration of these divisions but, compared with ICSI embryos, VitC-treated SCNT embryos showed a longer div4, all groups of SCNT embryos showed a longer div5, and both non-treated and VitC-treated SCNT embryos were slower in completing div6. In contrast, the duration of div7 was similar in SCNT and ICSI embryos. As for the duration of cycle 3, significant differences were only observed for non-treated SCNT embryos, in which it was longer than in VitC-treated SCNT embryos and in ICSI ones (2h 47 min and 2h 45 min longer, respectively).

In contrast to embryos showing comp2C, embryos starting compaction after the 2-cell stage never decompacted afterwards. Thus, beginning of compaction (comp-b) was annotated only for embryos compacting from the 3-cell stage onwards, and we distinguished compaction initiation before the 8-cell stage (comp<8C-b) from compaction initiation at the 8-cell stage (comp8C-b). We found that comp<8C-b occurred earlier in non-treated and VitC-treated SCNT embryos than in ICSI ones (3h 25 min and 5 h 49 min earlier, respectively) and in VitC-treated than in PsA-treated embryos (4 h 30 min earlier). When only those embryos compacting at the 8-cell stage were considered, the timing of compaction beginning (comp8C-b) was delayed in non-treated and PsA-treated embryos when compared to ICSI embryos (5 h 20 min and 7 h 40 min later, respectively), and PsA-treated embryos were also delayed when compared with VitC-treated ones (5 h 30 min). In contrast to all previous cell stages, the duration of the 8-cell stage was shorter in all groups of SCNT embryos (50-62 min) than in the ICSI group (102 min), even though differences were only significant for VitC-treated SCNT embryos. On the contrary,

compaction duration was longer in SCNT embryos (>5 h) than in the ICSI ones (4 h 13 min), although significant differences were only found for the non-treated (5 h 28 min) and PsA-treated groups (5 h 35 min).

Finally, no differences in the duration of the morula stage nor in cav-b and cav-e were found among groups (Figure 2A, Table S1). However, the duration of cavitation was significantly longer in non-treated (11 h) and VitC-treated embryos (9 h 10 min) than in ICSI ones (4 h 53 min), and significantly shorter in PsA-treated embryos (7 h) compared with non-treated ones.

Morphokinetic parameters of ICSI and SCNT embryos that reached the blastocyst stage

When only the embryos that developed to the blastocyst stage were considered, significant differences among groups in morphokinetic parameters were globally maintained (Figure 2C and Table S2). The only parameters for which significant differences were lost compared with the previous analysis (Table S1) were div1-b, 1-cell stage duration, cycle1 duration, div4 duration, 8-cell stage duration, and comp<8C-b (Table S2). But on the other side, significant differences in the duration of the 4-cell stage (shorter in VitC-treated than in non-treated SCNT embryos) and in cav-b (earlier in non-treated than in PsA-treated SCNT embryos) emerged. Directdiv, uneven blastomeres, comp2C and fragmentation were also detected in embryos developing to the blastocyst stage (Table S2), and the frequency of embryos undergoing compaction between the 3- and 7-cell stages was still much higher in all groups of SCNT embryos (63.6-81.0%) than in ICSI embryos (18.8%; Table 5).

When intra-group differences were analyzed, significant differences in many morphokinetic parameters were detected between embryos that developed to the blastocyst stage and those that did not, especially in the ICSI group (Table S3). In general, divisions began and ended earlier and cell stages and cycles were shorter in embryos that gave rise to blastocysts than in those that did not, though the differences were not significant in all cases. Only three parameters showed consistent significant differences in all groups between embryos that developed to the blastocyst stage and those that did not: cav-b, fragmentation and cellscomp. In particular, embryos that reached the blastocyst stage had an earlier start of cavitation than those that did not, and despite fragmentation was not incompatible with blastocyst formation, the percentage of fragmented embryos was higher in embryos that did not reach this stage (Table S3). Moreover, although undergoing compaction between the 3- and 7-cell stages did not prevent blastocyst formation, cellscompact was lower in embryos that arrested in previous stages of development (Table 5). Although less consistent, parameters related to the third division, such as div3-b, div3-e, duration of div3 and duration of the 3-cell stage, also seem important for blastocyst development because all groups of embryos showed significant differences in one or more of these parameters between embryos that formed blastocysts and embryos that did not.

Prediction of developmental success from morphokinetic parameters

In search of parameters that could predict *in vitro* developmental success in SCNT embryos, irrespectively of whether they were treated or not with an epigenetic modifier, we observed that the time point div3-e was an early good predictor of blastocyst development. To increase the sensitivity and specificity, several prediction models were proposed in which the timing of div3-e was combined with the duration of compaction and/or the presence of fragmentation (AUC 0.59-0.84) (Table 6, Figure 3). These models can also predict development to the blastocyst stage in ICSI embryos with high sensitivity and specificity (AUC 0.71-0.95). All models showed similar AUC values for each of the SCNT groups (Figure 3B-D, Table 6), but in the ICSI group those including fragmentation showed the highest AUC values (Figure 3A, Table 6).

In order to being able to classify embryos according to their developmental potential, we selected the threshold value that maximized the sensitivity and specificity of each model and developed a hierarchical classification for each group (Table 6). The threshold values were different among groups, in accordance with existing differences in cleavage timing, as previously described. Thus, PsA-treated SCNT embryos were the most delayed (Figure 2) and their threshold values were accordingly the highest (Table 6). As an example, in order to validate the prediction model including div3-e and the presence of fragmentation in PsA-treated SCNT embryos, the hierarchical classification represented in Figure 4 would be used.

Including the thresholds in the prediction models, AUC values ranged between 0.60 and 0.92 and F-scores between 0.69 and 0.95. In all groups except SCNT-VitC, an AUC or an F-score higher than 0.80 could be obtained at least with one of the proposed models. Blastocyst development of VitC-treated embryos was the most difficult to predict, as the maximum AUC value achieved was 0.65 (Table 6). However, in this group, an alternative prediction model taking into account div3 duration, comp-e and the presence of fragmentation could be more accurate (n=77, AUC=0.84). Using this alternative model, 76.6 % of embryos would be correctly classified (sensitivity=75.5, specificity=79.2).

Morphokinetic parameters of ICSI and SCNT embryos that gave rise to ESC lines and prediction of ESC derivation success

Contrary to the numerous differences in morphokinetic parameters observed among ICSI and SCNT embryos that were capable of developing to the blastocyst stage (Table S2), only one parameter was found to be significantly different among the four groups of embryos when only the embryos that gave rise to ESC lines were considered: the timing of div2-e (Table S4). In particular, the timing of div2-e was significantly delayed in SCNT embryos with regards to the ICSI group, although the difference was only significant for VitC-treated embryos. However, it must be pointed out that sample sizes for these analyses were small and this would have precluded achieving significance for many other parameters in which the timings, durations and frequencies clearly differed among groups (Table S4). A similar situation occurred when intra-group differences were analyzed.

Another important part of this study was to find predictor parameters of ESC establishment. Unfortunately, none of the variables studied resulted in a significant p-value for ESC establishment prediction. However, in the PsA- and VitC-treated groups, where the sample sizes were higher, we observed that embryos with longer 5-cell stage and div6 durations, respectively, gave rise to ntESC lines, in contrast to the fastest ones (Table S5).

Table 1. Time points of events used for time-lapse evaluation of *in vitro* development of ICSI and SCNT embryos.

Time point	Description
PNd	Disappearance of pronuclei
div1-b	Beginning of first division (1-cell to 2-cells)
div1-e	End of first division
Na	Appearance of at least one nucleus at the 2-cell stage
div2-b	Beginning of second division (2-cells to 3-cells)
div2-e	End of second division
div3-b	Beginning of third division (3-cells to 4-cells)
div3-e	End of third division
div4-b	Beginning of fourth division (4-cells to 5-cells)
div4-e	End of fourth division
div5-b	Beginning of fifth division (5-cells to 6-cells)
div5-e	End of fifth division
div6-b	Beginning of sixth division (6-cells to 7-cells)
div6-e	End of sixth division
div7-b	Beginning of seventh division (7-cells to 8-cells)
div7-e	End of seventh division
comp-b	Beginning of compaction from 3- to 8-cell stage, when fusion of at least two cells is observed
comp<8C-b	Beginning of compaction from 3- to 7-cell stage, when fusion of at least two cells is observed
comp8C-b	Beginning of compaction at 8-cell stage, when fusion of at least two cells is observed
comp-e	End of compaction, when all cells are fused and the morula is formed
cav-b	Beginning of cavitation (blastocyst formation), when a blastocoel is visible
cav-e	End of cavitation (full blastocyst), when blastocoel fills out the embryo or there is no perivitelline space

The beginning of divisions was considered as the time of appearance of cleavage furrow, and the end of divisions as the time when the complete separation of the daughter cells by a plasma membrane was observed.

Table 2. Duration of events used for time-lapse evaluation of *in vitro* development of ICSI and SCNT embryos.

Duration	Description	From time point	To time point
1-cell stage	Duration of the 1-cell stage	PNd	div1-b
div1	First division duration (1-cell to 2-cells)	div1-b	div1-e
cycle 1	Duration of the first cycle (1-cell to 2-cells)	PNd	div1-e
2-cell stage	Duration of the 2-cell stage	div1-e	div2-b
div2	Second division duration (2-cells to 3-cells)	div2-b	div2-e
3-cell stage	Duration of the 3-cell stage	div2-e	div3-b
div3	Third division duration (3-cells to 4-cells)	div3-b	div3-e
cycle 2	Duration of the second cycle (2-cells to 4-cells)	div1-e	div3-e
4-cell stage	Duration of the 4-cell stage	div3-b	div4-b
div4	Fourth division duration (4-cells to 5-cells)	div4-b	div4-e
5-cell stage	Duration of the 5-cell stage	div4-e	div5-b
div5	Fifth division duration (5-cells to 6-cells)	div5-b	div5-e
6-cell stage	Duration of the 6-cell stage	div5-e	div6b
div6	Sixth division duration (6-cells to 7-cells)	div-6b	div6-e
7-cell stage	Duration of the 7-cell stage	div6-e	div7-b
div7	Seventh division duration (7-cells to 8-cells)	div7-b	div7-e
8-cell stage	Duration of the 8-cell stage	div7-e	comp8C-b
cycle 3	Duration of the third cycle (4-cells to 8-cells)	div3-e	div7-e
compaction	Compaction duration	comp-b	comp-e
morula stage	Duration of the morula stage	comp-e	cav-b
cavitation	Cavitation duration	cav-b	cav-e

Table 3. *In vitro* development of ICSI embryos and SCNT embryos non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammalin A (PsA) or Vitamin C (VitC).

Group	No. embryos developed to (%)				
	n	Two-cells	Four-cells	Morula	Blastocyst
ICSI	68	68 (100) ^a	67 (98.5) ^a	64 (94.1) ^a	48 (70.6) ^a
SCNT-NT	83	78 (94.0) ^a	71 (85.5) ^{b,c}	72 (86.7) ^a	38 (45.8) ^b
SCNT-PsA	75	72 (96.0) ^a	57 (76.0) ^b	55 (76.4) ^b	42 (58.3) ^{a,b}
SCNT-VitC	93	92 (99.0) ^a	85 (91.4) ^c	78 (84.8) ^{a,b}	56 (60.9) ^{a,b}

^{a-c} Values with different superscripts differ significantly within the same column ($p < 0.05$).

Table 4. ESC derivation from ICSI blastocysts and SCNT blastocysts non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammalin A (PsA) or Vitamin C (VitC).

Group	n	Attached 24-48 h (%)	Outgrowths day 7 (%)	ESC lines (%)
ICSI	28	16 (57.1) ^a	7 (25.0) ^a	5 (17.9) ^{a,b}
SCNT-NT	33	16 (48.5) ^a	6 (18.2) ^a	5 (15.2) ^a
SCNT-PsA	42	27 (64.3) ^a	19 (45.2) ^{a,b}	13 (31.0) ^{a,b}
SCNT-VitC	40	38 (95.0) ^b	24 (60.0) ^b	16 (40.0) ^b

^{a-b} Values with different superscripts differ significantly within the same column ($p < 0.05$).

Table 5. Compaction initiation in ICSI embryos and SCNT embryos non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammaplin A (PsA) and Vitamin C (VitC).

Category	Group	Number of blastomeres at compaction			Embryos compacting at 3-7 cell stages (%)
		Median	Q1	Q3	
All embryos	ICSI	8 ^a	7	8	20 (30.8) ^a
	SCNT-NT	4 ^b	4	6	62 (84.9) ^b
	SCNT-PsA	4 ^b	4	6	51 (86.4) ^b
	SCNT-VitC	4 ^b	4	8	57 (70.4) ^c
Embryos developed to blastocyst	ICSI	8 ^a	8	8	9 (18.8) ^a
	SCNT-NT	4.5 ^b	4	8	28 (73.7) ^b
	SCNT-PsA	4 ^b	4	7	34 (81.0) ^b
	SCNT-VitC	6 ^b	4	8	35 (63.6) ^b
Embryos not developed to blastocyst	ICSI	7	6	8	11 (64.7) ^a
	SCNT-NT	4	4	5	34 (97.1) ^b
	SCNT-PsA	4	3	4	17 (100.0) ^b
	SCNT-VitC	4	4	5	24 (85.7) ^{a,b}
Embryos producing ESC lines	ICSI	8 ^a	8	8	0 (0) ^a
	SCNT-NT	4.5 ^b	4	8	2 (100) ^b
	SCNT-PsA	4 ^b	4	7	7 (87.5) ^b
	SCNT-VitC	6 ^b	4	8	4 (40.0) ^{a,b}
Embryos not producing ESC lines	ICSI	8	8	8	4 (17.4) ^a
	SCNT-NT	5	4	8	13 (68.4) ^b
	SCNT-PsA	5	4	6.5	13 (81.3) ^b
	SCNT-VitC	7	4	8	12 (57.1) ^b

^{a-c} Values with different superscripts differ significantly within the same column for each category ($p < 0.05$).
SD: standard deviation; Q1, Q3: quartiles 1 and 3.

Table 6. Prediction models of *in vitro* developmental success based on the timing of the end of the third division (div3-e) in ICSI embryos and SCNT embryos non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammaplin A (PsA) and VitC (VitC).

Group	Prediction model	N	AUC	Simplified prediction model (with threshold)				
				div3-e threshold	AUC	Se	Sp	F-score
ICSI	div3-e	64	0.71 ^a	1400 min	0.64	70.8	56.2	0.76
	div3-e + compaction	64	0.82 ^{a,b}	1500 min	0.82	79.2	87.5	0.86
	div3-e + frag	64	0.92 ^{b,c}	1600 min	0.92	83.3	100.0	0.91
	div3-e + compaction + frag	64	0.95 ^c	1600 min	0.91	93.8	87.5	0.95
SCNT-NT	div3-e	70	0.76	1675 min	0.69	68.4	68.8	0.70
	div3-e + compaction	70	0.77	1530 min	0.73	68.4	78.1	0.73
	div3-e + frag	70	0.84	1530 min	0.81	73.7	90.6	0.81
	div3-e + compaction + frag	70	0.84	1530 min	0.80	81.6	78.1	0.82
SCNT-PsA	div3-e	52	0.72	2070 min	0.81	92.9	70.0	0.93
	div3-e + compaction	52	0.75	2000 min	0.82	83.3	80.0	0.89
	div3-e + frag	52	0.81	2100 min	0.81	73.8	90.0	0.84
	div3-e + compaction + frag	52	0.81	2100 min	0.81	73.8	90.0	0.84
SCNT-VitC	div3-e	76	0.59	1640 min	0.60	65.4	54.2	0.70
	div3-e + compaction	76	0.61	1640 min	0.63	67.3	58.3	0.72
	div3-e + frag	76	0.68	1500 min	0.61	63.5	58.3	0.69
	div3-e + compaction + frag	76	0.70	1500 min	0.65	63.5	66.7	0.71

^{a-c} Values with different superscripts differ significantly within the group ($p < 0.05$).

Frag: fragmentation; AUC: Area Under the Curve; Se: sensitivity; Sp: specificity.

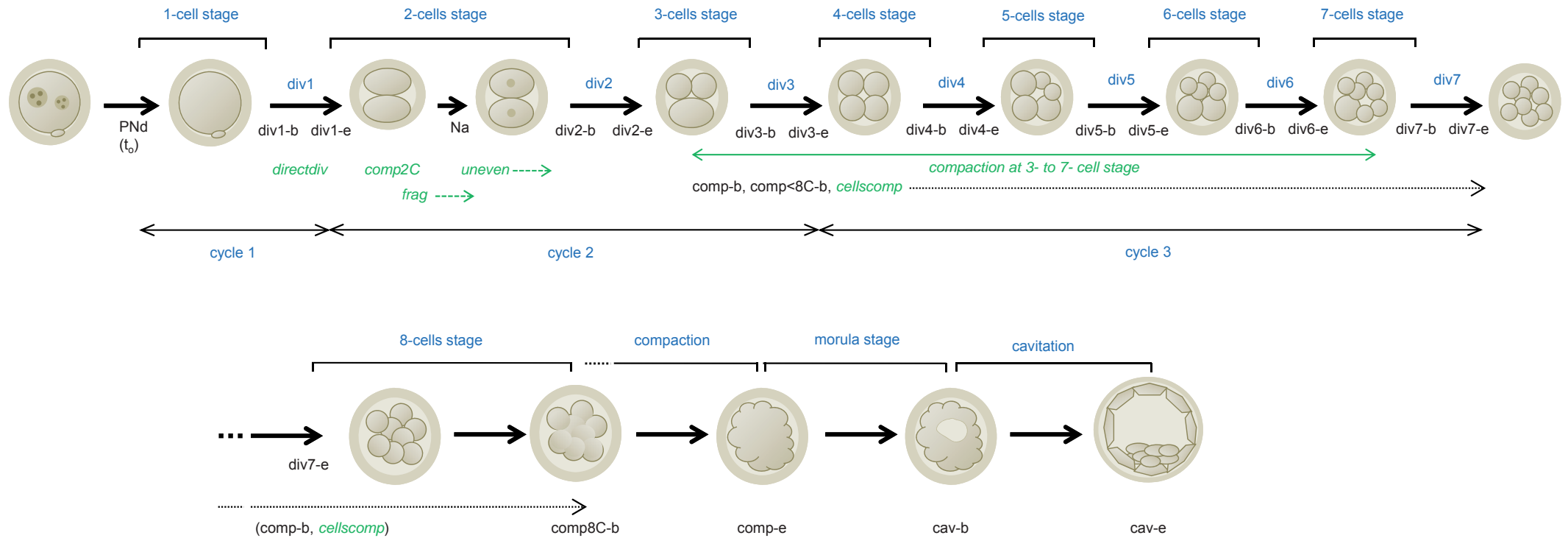


Figure 1. Schematic view of the *in vitro* development parameters analyzed, from pronuclei disappearance (PNd) to blastocyst formation. Time-points appear in black, durations in blue, and qualitative parameters in green. For a detailed description of each parameter see Tables 1 and 2.

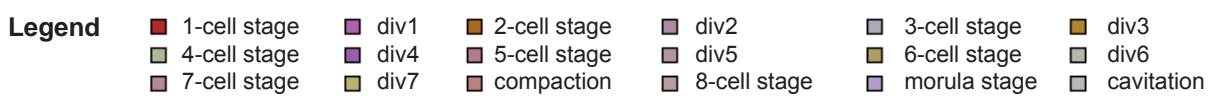
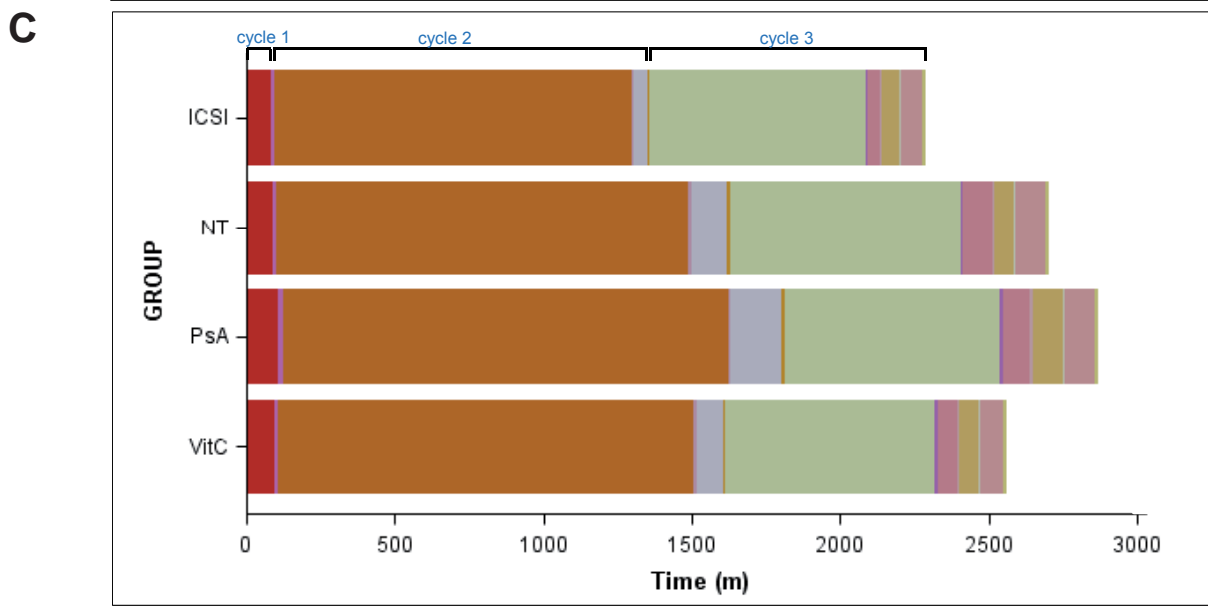
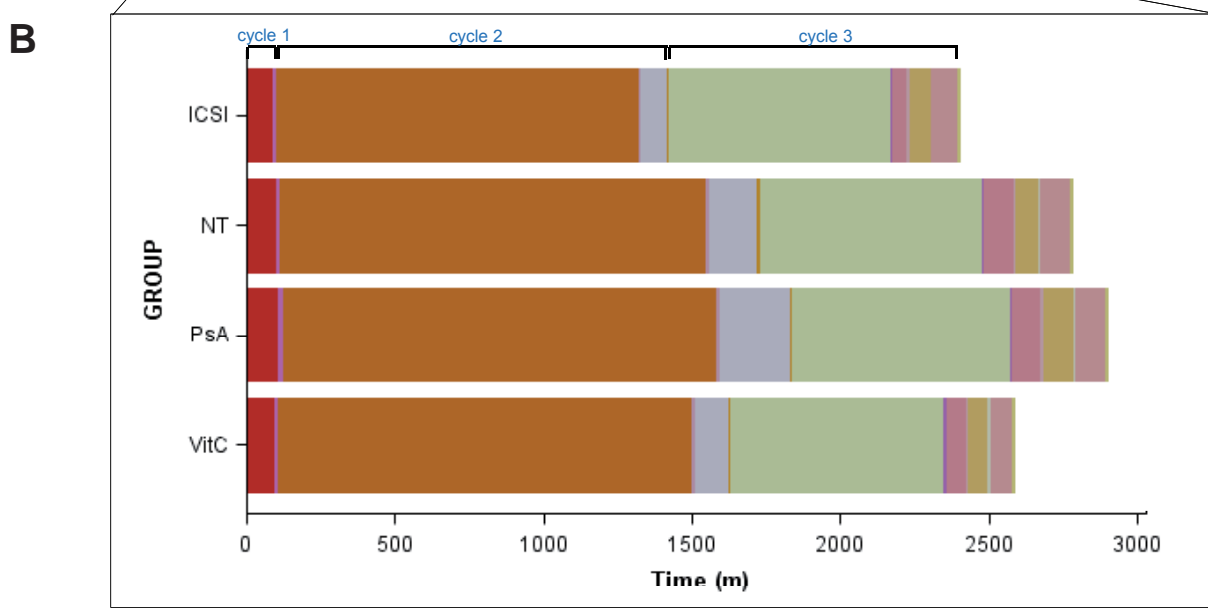
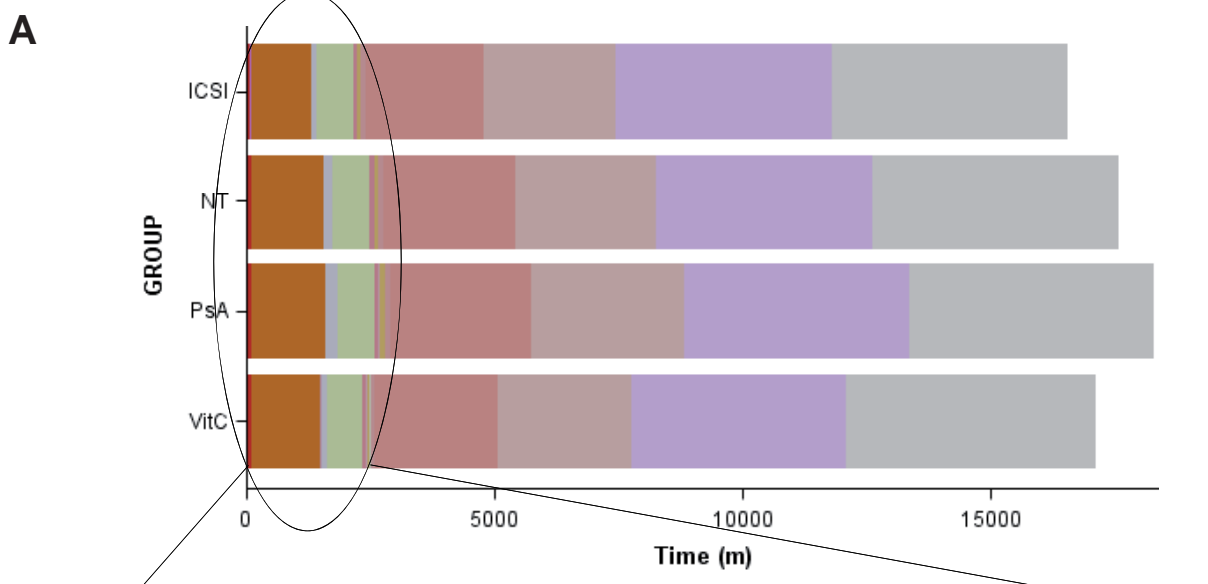


Figure 2. Duration of *in vitro* development events in ICSI and SCNT embryos non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammappin A (PsA) and Vitamin C (VitC). **A)** Data of all embryos analyzed, from PND to cavitation. For compaction, only embryos compacting at the 8-cell stage were considered. **B)** Enlarged image of events, from PND to division 7 (div7), for all embryos analyzed. **C)** Enlarged image of events, from PND to div7, only for embryos that reached the blastocyst stage.

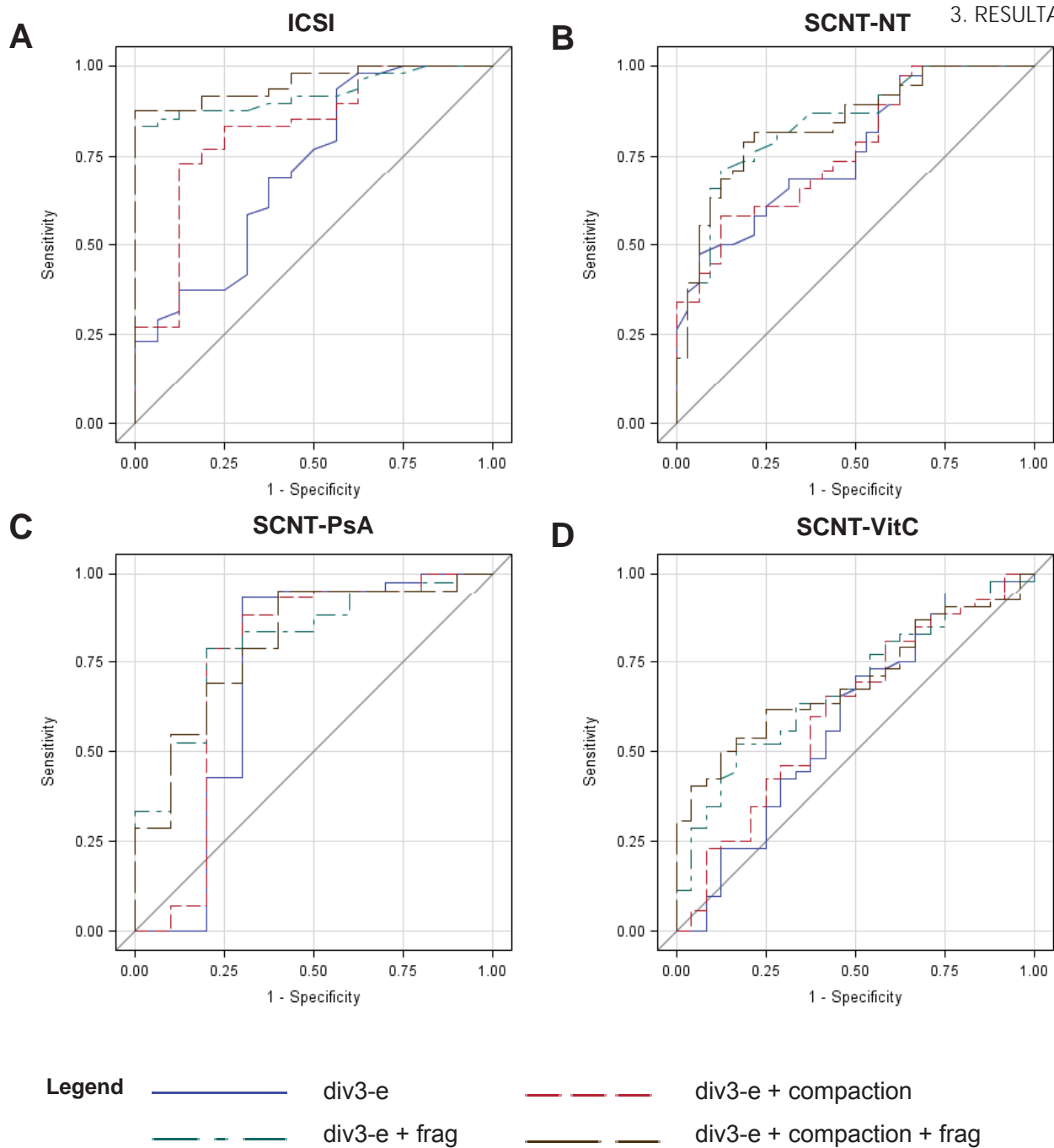


Figure 3. ROC curves for the prediction models based on the timing of the end of the third division (div3-e). NT: non-treated, PsA: psammalin A, VitC: vitamin C and frag: fragmentation.

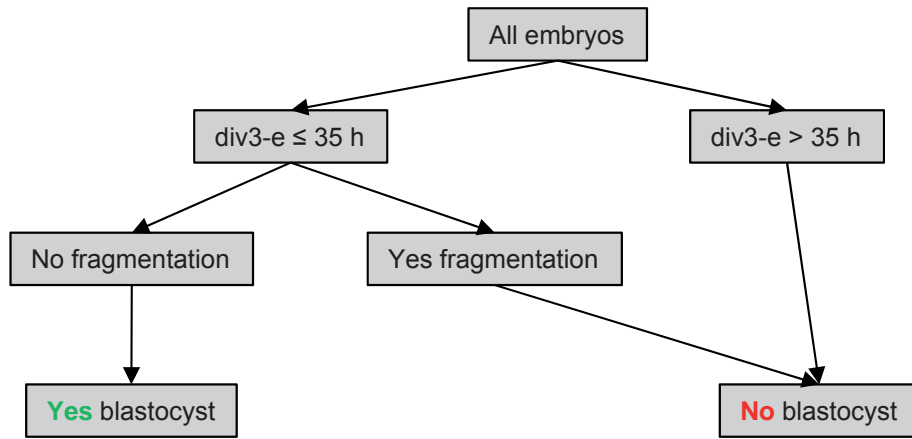


Figure 4. Hierarchical classification of SCNT embryos treated with psammaplin A according to their *in vitro* developmental success, based on the time point of the end of the third division (div3-e) and the presence of fragmentation.

Discussion

In the present study, we were able to successfully derive ntESCs from PsA- and VitC-treated SCNT embryos, demonstrating that these treatments improve ntESC derivation, 2 and 2.6-fold respectively, in addition to full term development as previously described (Mallol et al. 2014b). Other studies have already shown the positive effect of epigenetic modifiers on mouse pluripotent stem cells generation. For example, Dai et al. (2010) reported that the HDACi TSA and CBHA improved the derivation of ntESC lines from SCNT B6D2F1 embryos. In addition, VitC improved the generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from both mouse and human somatic cells (Esteban et al. 2010) and promoted the conversion of partially reprogrammed mouse iPSCs to a fully reprogrammed state (Chen et al. 2013a). However, to the best of our knowledge, this is the first time that the effect of PsA and VitC treatments on ntESC derivation is analyzed, and the derivation rates achieved are much higher than those previously reported with the HDACi VPA in the same mouse strain (11.6%; Costa-Borges et al. 2011).

We have also performed a comprehensive time-lapse monitoring study of the *in vitro* development SCNT B6CBAF1 mouse embryos, both untreated and treated with epigenetic modifiers, up to the blastocyst stage. Blastocyst rates of monitored embryos were similar, or even higher, than those previously obtained in our laboratory for non-imaged ICSI and SCNT embryos (Mallol et al. 2014b), confirming that embryo development was not compromised by the use of the Primovision imaging system, as already reported by Pribenszky et al (2010) for *in vivo* fertilized mouse embryos, which are not as sensible as SCNT embryos to culture conditions (Gao et al. 2003).

We found that, in comparison with ICSI embryos, non-treated SCNT embryos were delayed in their division timing from the second division, and this delay was maintained until compaction. In spite of this, only the duration of the 2-cell and the 3-cell stages, but no of the other cleavage stages, was significantly longer in SCNT embryos. Other studies in other mouse strains have also reported a slower development of SCNT embryos, with an extended duration of the 2-cell, 3-cell and 4-cell stages in comparison to ICSI embryos (Balbach et al. 2012; Mizutani et al. 2012). The reason for this delay in the early stages of development could be attributed to a somatic memory, due to the defective reprogramming of the transferred somatic nucleus. Indeed, somatic differentiated cells show longer cell cycles than early embryos (Hörmanseder et al. 2013). In addition, the delay appears at the 2-cell stage, when embryonic genome activation (EGA) takes place in the mouse (Zuccotti et al. 2000), switching the control of subsequent embryonic development from maternal factors present in the ooplasm to new factors expressed by the nucleus. In this sense, the incomplete EGA caused by defective reprogramming in SCNT embryos (Vassena et al. 2007) may affect the expression of key cell cycle genes, limiting and slowing the progression of cell cycle. For example, the lower expression levels of mitogenic growth factors reported in cloned embryos (Dadi et al. 2006) may be hindering cell divisions,

and reduced expression of key cytokinesis genes has been strongly correlated with aberrant cytokinesis seen in time-lapse studies of human fertilized embryos (Wong et al. 2010).

Another key event in the development of SCNT embryos detected in our study was compaction. Compaction before the 8-cell stage was detected in the majority of SCNT embryos, but it was much less frequent in ICSI embryos. These results are in agreement with those of Li et al. (2011) in B6D2F1 mouse embryos, which reported that 87% of SCNT embryos compacted between 3 and 7-cell stage. In ICSI embryos compaction before the 8-cell stage occurred chronologically later than compaction at the 8-cell stage, but the reverse situation was observed in all groups of SCNT embryos. Therefore, the reasons behind this abnormal compaction might be different between the two populations of embryos. In SCNT embryos, the molecular mechanisms controlling the beginning of compaction may not be properly reprogrammed in the majority of SCNT embryos.

The duration of compaction, and especially of cavitation, was much longer in SCNT embryos. Again, this could be related to reprogramming defects causing alterations in the molecular pathways involved in the progression and completion of these key events. The reduced cell numbers in the SCNT embryos when initiating compaction and cavitation may also be responsible for the longer duration of these events.

We also analyzed the effect of PsA and VitC treatments on the morphokinetics of SCNT mouse embryos. We found that, while both treatments increased blastocyst rates, ntESC lines derivation (the present study) and development to term (Mallol et al. 2014a,b), they showed opposite effects on embryo morphokinetics. On one hand, PsA treatment caused a more pronounced delay in the development of SCNT embryos. This delay was more evident when comparing embryos that developed to the blastocyst stage, and even though it started at the second division, PNd also occurred later in PsA-treated than in non-treated SCNT embryos. PsA has been shown to specifically inhibit DNA replication at high concentrations (Jiang et al. 2004), so the observed delay at PNd could be due to an increase in the duration of the first S-phase, when embryos are still exposed to PsA (16 h post-activation treatment). Our results in PsA-treated SCNT embryos are in agreement with previous general observations with other HDACis. For example, VPA treatment slowed the development of fertilized mouse embryos (Vermilyea et al. 2009) and Li et al. (2008) reported a 15 h delay in the compaction of cloned pig embryos treated with TSA. In addition, Halsall et al. (2012) studied cell cycle response to HDACis in human promyeloid leukaemia cells, and found that suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), TSA and VPA induced an accumulation of cells in G2/M. Therefore, the slowing effect observed here could be common for all HDACis, rather than specific for PsA treatment. Interestingly, other factors affecting nuclear reprogramming, such as caffeine or vanadate, also have an effect on cloned embryo developmental kinetics (Kwon et al. 2008). As all HDACi treatments, including PsA, improve nuclear reprogramming in SCNT embryos (Mallol et al. 2014a,b), HDACi-induced retardation of the speed of development could be related to the time needed for this more extensive nuclear reprogramming to occur. In fact, in embryos developing to the

blastocyst stage, differences in the speed of development between non-treated and PsA-treated SCNT embryos were mainly detected in the timing of the first divisions, and the bulk of nuclear reprogramming is supposed to take place during this early period (Simonsson and Gurdon 2004; Zuccotti et al. 2000).

On the other hand, VitC treatment slightly accelerated the kinetics of development. In fact, VitC-treated embryos were the fastest ones among SCNT embryos, and more similar to ICSI embryos in some of the morphokinetic parameters analyzed. Accordingly, VitC-treated embryos had increased number of cells at compaction when compared with the other two groups of SCNT embryos. Besides improving the developmental potential of SCNT embryos (Chawalit et al. 2012; Huang et al. 2011b; Jeong et al. 2006; Kere et al. 2013; Mallol et al. 2014b), VitC also enhances the generation of induced pluripotent stem cells (iPSC) from both mouse and human somatic cells. And, similar to the effects of VitC on embryo developmental kinetics observed in the present study, this enhancement is also accompanied by an accelerated timing of iPSC generation (Esteban et al. 2010). Reactive oxygen species (ROS) are genotoxic agents that damage DNA and induce a DNA repair process that may cause a delay of cell cycle (Bartek and Lukas 2007). It is known that embryos exposed to the antioxidant activity of VitC show reduced ROS (Wang et al. 2002; Hu et al. 2012; Li et al. 2014) and increased reduced glutathione content (Wongsrikeao et al. 2007; Zhang et al. 2010; Mallol et al. 2014b), which lead to lower levels of apoptosis (Jeong et al. 2006; Hu et al. 2012; Li et al. 2014), parameters which have been related to reduced speed of embryo development (Favetta et al. 2004, 2007; Wale et al. 2010). Thus, the reduction of ROS by VitC treatment could reduce DNA damage and checkpoint arrest, accelerating cell cycle progression in SCNT embryos. Moreover, it has been recently reported that VitC, in addition to its antioxidant activity, also acts as an epigenetic modifier, enhancing JHDMs and TET activities (Chen et al. 2013b; Wang et al. 2011; Blaschke et al. 2013; Yin et al. 2013). Therefore, it is also possible that VitC promotes some epigenetic changes that may ease EGA and the expression of cell cycle genes, accelerating cell division. In spite of this, the epigenetic effect of VitC on cloned embryos remains elusive (Chawalit et al. 2012; Mallol et al. 2014b) and may not be as extensive as that of PsA, which could explain in fact that the kinetics of PsA-treated SCNT embryos was much slower than that of the VitC-treated ones.

When only those embryos that reached the blastocyst stage were considered, differences between all groups of SCNT and ICSI embryos were still evident, reinforcing the idea that the precise kinetic parameters which allow blastocyst formation differ among groups, according to their developmental pace. However, in general, embryos developing to the blastocyst stage showed faster kinetics of development. These results are in agreement with those previously published for fertilized mouse (Arav et al. 2008; Pribenszky et al. 2010), bovine and human (Lechniak et al. 2008; Ivec et al. 2011) embryos, and for B6C3F1 (Balbach et al. 2010, 2012) and B6D2F1 (Mizutani et al. 2012) SCNT mouse embryos. Although the reason for this is unclear, one possibility is the presence of chromosomal abnormalities in slow developing embryos, which may delay DNA replication and increase cell cycle durations (Lechniak et al.

2008). However, Mizutani et al. (2012) developed a time-lapse system to analyze chromosome segregation in combination with kinetics and morphology, and reported that SCNT mouse embryos showing abnormal chromosome segregations did not show altered speed of development nor abnormal morphology or blastocyst cells allocation.

In spite that the requisites for blastocyst formation, in terms of morphokinetic parameters, apparently differ between ICSI and SCNT embryos and among SCNT embryos depending on their treatment, the timing of div3-e (i.e. formation of the 4-cell embryo) was identified as a good predictor parameter for blastocyst development for all groups of embryos and, alone or combined with the duration of compaction and/or the presence of fragmentation, allowed the prediction of blastocyst development with high accuracy. Although a good prediction was possible using only embryo kinetics information, the addition of morphological data, such as the presence of fragmentation, allowed us to increase the accuracy of the prediction models in all groups of embryos, achieving F-score values higher than 0.70. In contrast to our results, Balbach et al. (2012) could not identify predictor parameters for SCNT embryos before the 4-cell stage, and even when combining 2 or more earlier parameters the accuracy values (F-scores) for the prediction models were lower than 0.50. The different mouse strain, embryo culture conditions or imaging conditions could be the cause of the differing results when compared to our study. Nevertheless, when they used the timing to divide to 3-cell stage to discriminate between slow- and fast-developing SCNT mouse embryos, they found higher blastocyst rates in fast embryos. On the other hand, Pribenszky et al. (2010) found that while the time of the first and second divisions had a strong predictive value for further *in vitro* development of *in vivo* fertilized mouse embryos, cleavage from the 3-cell to the 4-cell stage had not. In spite of this, similar to our study with ICSI and SCNT embryos, they also found that the probability of reaching the blastocyst stage was significantly reduced if fragmentation occurred during development of fertilized mouse embryos.

Taking into account that cloned mouse embryos are often transferred to recipient females at the 2-cell stage to avoid *in vitro* culture detrimental effects (Gao et al. 2003), it would be interesting to assess the advantages of an extended culture in a time-lapse equipment for the application of embryo selection criteria, such as the ones established here. Transfer of only those embryos with good morphokinetic parameters could be a way to increase implantation and birth rates per transferred embryo. Indeed, Mizutani et al. (2012) performed late transfers with selected embryos and achieved higher birth rates than when no selection was applied. However, their culture conditions negatively affected the development to term of monitored SCNT mouse embryos.

Contrary to our success with prediction of blastocyst development, we failed to predict ESC derivation from embryo morphokinetics results, probably because of the more reduced sample size. In spite of this, we observed that SCNT embryos treated with PsA or VitC which gave rise to ntESC lines showed longer 5-cell stage or div6 durations, respectively, than those that did not. Balbach et al. (2012) also found that slow-developing SCNT embryos reported higher

ntESC derivation rates than fast-developing ones in the B6C3F1 mouse strain, but when considering the timing to divide to 3-cell stage. According to these authors, pluripotency-related genes may be more efficiently reprogrammed in slow-dividing cloned embryos, favouring ntESC establishment.

In summary, our results demonstrate that *in vitro* development of SCNT mouse embryos is delayed in comparison with that of fertilized embryos, from the second division until compaction, resulting in lower number of blastomeres at the time of compaction. Treatment of SCNT embryos with either PsA or VitC increases their capacity to give rise to blastocysts and ntESC lines, but alters their developmental pace in opposing ways, suggesting that they act through different mechanisms. The development of both non-treated and treated SCNT embryos to the blastocyst stage could be predicted from early morphokinetic data with relatively high accuracy, using the same parameters as for ICSI embryos. Thus, time-lapse monitoring is a promising tool to increase cloning outcomes. Nonetheless, further investigation is needed to test the reliability of the predictor models established here, and to determine whether they are able to improve embryo selection not only for blastocyst development but also for full-term development and ESC lines derivation.

Funding

This work was supported by the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación* (AGL 2011-23784) and the *Generalitat de Catalunya* (2014SGR-00524). A.M. and L.P. are predoctoral fellows of the *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Acknowledgements

We thank Jonatan Lucas and M^a Jesús Álvarez for their technical assistance, the staff at the *Servei d'Estabulari* of the *Universitat Autònoma de Barcelona* for taking care of the mice, and Oliver Valero from *Servei d'Estadística* of the *Universitat Autònoma de Barcelona* for assistance in statistical analysis.

References

- Aparicio, B., Cruz, M., and Meseguer, M. (2013). Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod. Biomed. Online* 27, 654–663.
- Arav, A., Aroyo, A., Yavin, S., and Roth, Z. (2008). Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and “shortest-half” analysis. *Reprod. Biomed. Online* 17, 669–675.
- Balbach, S.T., Esteves, T.C., Brink, T., Gentile, L., McLaughlin, K.J., Adjaye, J. a, and Boiani, M. (2010). Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. *Dev. Biol.* 343, 71–83.
- Balbach, S.T., Esteves, T.C., Houghton, F.D., Siatkowski, M., Pfeiffer, M.J., Tsurumi, C., Kanzler, B., Fuellen, G., and Boiani, M. (2012). Nuclear reprogramming: kinetics of cell cycle and metabolic progression as determinants of success. *PLoS One* 7, e35322.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 238–245.
- Blaschke, K., Ebata, K.T., Karimi, M.M., Zepeda-Martínez, J. a, Goyal, P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D.J., Hirst, M., Rao, A., et al. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 500, 222–226.
- Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L., and Torres, I. (1989). An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 86, 679–688.
- Chawalit, S., Nguyen, N.T., Tseng, J.-K., Lo, N.-W., Tu, C.-F., and Ju, J.-C. (2012). Trichostatin A and ascorbic acid assist in the development of porcine handmade cloned embryos via different physiologic pathways. *Reprod. Sci.* 19, 976–986.
- Chen, J., Liu, H., Liu, J., Qi, J., Wei, B., Yang, J., Liang, H., Chen, Y., Chen, J., Wu, Y., et al. (2013a). H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat. Genet.* 45, 34–42.
- Chen, J., Guo, L., Zhang, L., Wu, H., Yang, J., Liu, H., Wang, X., Hu, X., Gu, T., Zhou, Z., et al. (2013b). Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat. Genet.* 45, 1504–1509.
- Costa-Borges, N., Gonzalez, S., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2011). Effect of the enucleation procedure on the reprogramming potential and developmental capacity of mouse cloned embryos treated with valproic acid. *Reproduction* 141, 789–800.
- Dadi, T.D., Li, M.-W., and Lloyd, K.C.K. (2006). Development of mouse embryos after immunoneutralization of mitogenic growth factors mimics that of cloned embryos. *Comp. Med.* 56, 188–195.
- Dai, X., Hao, J., Hou, X.-J., Hai, T., Fan, Y., Yu, Y., Jouneau, A., Wang, L., and Zhou, Q. (2010). Somatic nucleus reprogramming is significantly improved by m-carboxycinnamic acid bishydroxamide, a histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 285, 31002–31010.
- Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., et al. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 71–79.

- Favetta, L.A., Robert, C., St John, E.J., Betts, D.H., and King, W.A. (2004). p66shc, but not p53, is involved in early arrest of in vitro-produced bovine embryos. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 383–392.
- Favetta, L.A., St John, E.J., King, W.A., and Betts, D.H. (2007). High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1201–1210.
- Findikli, N., and Oral, E. (2014). Time-lapse embryo imaging technology: does it improve the clinical results? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 26, 138–144.
- Gao, S., McGarry, M., Priddle, H., Ferrier, T., Gasparrini, B., Fletcher, J., Harkness, L., De Sousa, P., McWhir, J., and Wilmut, I. (2003). Effects of donor oocytes and culture conditions on development of cloned mice embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 126–133.
- Halsall, J., Gupta, V., O'Neill, L.P., Turner, B.M., and Nightingale, K.P. (2012). Genes are often sheltered from the global histone hyperacetylation induced by HDAC inhibitors. *PLoS One* 7, e33453.
- Hörmanseder, E., Tischer, T., and Mayer, T.U. (2013). Modulation of cell cycle control during oocyte-to-embryo transitions. *EMBO J.* 32, 2191–2203.
- Hu, J., Cheng, D., Gao, X., Bao, J., Ma, X., and Wang, H. (2012). Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 873–879.
- Huang, Y., Tang, X., Xie, W., Zhou, Y., Li, D., Yao, C., Zhou, Y., Zhu, J., Lai, L., Ouyang, H., et al. (2011a). Histone deacetylase inhibitor significantly improved the cloning efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 13, 513–520.
- Huang, Y., Tang, X., Xie, W., Zhou, Y., Li, D., Zhou, Y., Zhu, J., Yuan, T., Lai, L., Pang, D., et al. (2011b). Vitamin C enhances in vitro and in vivo development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 397–401.
- Ivec, M., Kovacic, B., and Vlaisavljevic, V. (2011). Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertil. Steril.* 96, 1473–1478.e2.
- Iwata, K., Yumoto, K., Sugishima, M., Mizoguchi, C., Kai, Y., Iba, Y., and Mio, Y. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 421–426.
- Jeong, Y.W., Park, S.W., Hossein, M.S., Kim, S., Kim, J.H., Lee, S.H., Kang, S.K., Lee, B.C., and Hwang, W.S. (2006). Antiapoptotic and embryotrophic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 66, 2104–2112.
- Jiang, Y., Ahn, E.-Y., Ryu, S.H., Kim, D.-K., Park, J.-S., Yoon, H.J., You, S., Lee, B.-J., Lee, D.S., and Jung, J.H. (2004). Cytotoxicity of psammalin A from a two-sponge association may correlate with the inhibition of DNA replication. *BMC Cancer* 4, 70.
- Kere, M., Siriboon, C., Lo, N.-W., Nguyen, N.T., and Ju, J.-C. (2013). Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. *J. Reprod. Dev.* 59, 78–84.
- Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., and Ingerslev, H.J. (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum. Reprod.* 27, 1277–1285.
- Kwon, D.J., Park, C.K., Yang, B.K., and Cheong, H.T. (2008). Control of nuclear remodelling and subsequent in vitro development and methylation status of porcine nuclear transfer embryos. *Reproduction* 135, 649–656.
- Lechniak, D., Pers-Kamczyc, E., and Pawlak, P. (2008). Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod. Biol.* 8, 23–42.
- Lee, A.R., Matsubara, K., Okuyama, N., Saeki, K., Matsumoto, K., Iritani, A., Wakayama, T., Kishigami, S., and Hosoi, Y. (2010). P35. Vitamin C does not enhance reprogramming after SCNT. *Differentiation* 80, S28.
- Li, C.-B., Wang, Z.-D., Zheng, Z., Hu, L.-L., Zhong, S.-Q., and Lei, L. (2011). Number of blastomeres and distribution of microvilli in cloned mouse embryos during compaction. *Zygote* 19, 271–276.
- Li, J., Svarcova, O., Villemoes, K., Kragh, P.M., Schmidt, M., Bøgh, I.B., Zhang, Y., Du, Y., Lin, L., Purup, S., et al. (2008). High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology* 70, 800–808.
- Li, Q., Wang, Y.-S., Wang, L.-J., Zhang, H., Li, R.-Z., Cui, C.-C., Li, W.-Z., Zhang, Y., and Jin, Y.-P. (2014). Vitamin C Supplementation Enhances Compact Morulae Formation but Reduces the Hatching Blastocyst Rate of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell. Reprogram.* 16.

- Mallol, A., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2014a). Psammaplin A Improves Development and Quality of Somatic Cell Nuclear Transfer Mouse Embryos. *Cell. Reprogram.*
- Mallol, A., Santaló, J., & Ibáñez, E. (2014b). Improved Development of Somatic Cell Cloned Mouse Embryos by Vitamin C and Latrunculin A (under review in *PlosOne*).
- Mizutani, E., Yamagata, K., Ono, T., Akagi, S., Geshi, M., and Wakayama, T. (2012). Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. *Dev. Biol.* 364, 56–65.
- Moreira, P.N., Jimenéz, A., Fernández, R., Bury-Madrid, N., De la Fuente, J., Pintado, B., and Gutiérrez-Adán, A. (2003). Mouse ICSI with frozen-thawed sperm: the impact of sperm freezing procedure and sperm donor strain. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 98–103.
- Niemann, H., and Lucas-Hahn, a (2012). Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod. Domest. Anim.* 47 Suppl 5, 2–10.
- Ogura, A., Inoue, K., and Wakayama, T. (2013). Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20110329.
- Pribenszky, C., Losonczi, E., Molnár, M., Lang, Z., Mátyás, S., Rajczy, K., Molnár, K., Kovács, P., Nagy, P., Conceicao, J., et al. (2010). Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod. Biomed. Online* 20, 371–379.
- Rienzi, L., Vajta, G., and Ubaldi, F. (2011). New culture devices in ART. *Placenta* 32 Suppl 3, S248–51.
- Simonsson, S., and Gurdon, J. (2004). DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat. Cell Biol.* 6, 984–990.
- Vassena, R., Han, Z., Gao, S., and Latham, K.E. (2007). Deficiency in recapitulation of stage-specific embryonic gene transcription in two-cell stage cloned mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1548–1556.
- VerMilyea, M.D., O'Neill, L.P., and Turner, B.M. (2009). Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. *PLoS One* 4, e6086.
- Wakayama, S., and Wakayama, T. (2010). Improvement of mouse cloning using nuclear transfer-derived embryonic stem cells and/or histone deacetylase inhibitor. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1641–1648.
- Wale, P.L., and Gardner, D.K. (2010). Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod. Biomed. Online* 21, 402–410.
- Wang, T., Chen, K., Zeng, X., Yang, J., Wu, Y., Shi, X., Qin, B., Zeng, L., Esteban, M.A., Pan, G., et al. (2011). The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 9, 575–587.
- Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J.M., Agarwal, A., and Sharma, R.K. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil. Steril.* 78, 1272–1277.
- Wolff, H.S., Fredrickson, J.R., Walker, D.L., and Morbeck, D.E. (2013). Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. *Hum. Reprod.* 28, 1776–1782.
- Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., and Reijo Pera, R.A. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28, 1115–1121.
- Wongsrikeao, P., Nagai, T., Agung, B., Taniguchi, M., Kunishi, M., Suto, S., and Otoi, T. (2007). Improvement of Transgenic Cloning Efficiencies by Culturing Recipient Oocytes and Donor Cells With Antioxidant Vitamins in Cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 694–702.
- Yang, X., Smith, S.L., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J.-P., and Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 39, 295–302.
- Yin, R., Mao, S.-Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., Zhang, D., Huang, H., Gao, J., Li, Z., et al. (2013). Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10396–10403.
- Zhang, B., Wang, X., and Nazarali, a J. (2010). Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of *hoxa2* and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 137–148.
- Zuccotti, M., Garagna, S., and Redi, C.A. (2000). Nuclear transfer, genome reprogramming and novel opportunities in cell therapy. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 623–629.

Supplementary table S1. Morphokinetic parameters (time points, durations and frequencies) of ICSI embryos and SCNT embryos non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammaphin A (PsA) or Vitamin C (VitC).

	ICSI	SCNT-NT	SCNT-PsA	SCNT-VitC
Time point		Median (Q1, Q3) in min		
PNd	947 (912, 987) ^a	903 (854, 951) ^b	973 (920, 1020) ^a	890 (850, 932) ^b
div1-b	90 (83, 95) ^a	90 (80, 100) ^{a,b}	99 (85, 112) ^b	91 (83, 100) ^{a,b}
div1-e	98 (90, 105) ^a	100 (90, 110) ^{a,b}	109 (93, 125) ^b	102 (95, 112) ^{a,b}
Na	140 (118, 175)	140 (125, 170)	145 (126, 164)	147 (125, 165)
div2-b	1314 (1260, 1370) ^a	1545 (1430, 1625) ^{b,c}	1637 (1490, 1784) ^b	1479 (1391, 1609) ^c
div2-e	1319 (1265, 1375) ^a	1555 (1440, 1630) ^{b,c}	1645 (1499, 1794) ^b	1484 (1397, 1617) ^c
div3-b	1365 (1300, 1445) ^a	1665 (1540, 1825) ^{b,c}	1790 (1644, 2000) ^b	1600 (1512, 1717) ^c
div3-e	1375 (1305, 1450) ^a	1675 (1550, 1830) ^{b,c}	1800 (1649, 2005) ^b	1609 (1522, 1724) ^c
div4-b	2090 (2010, 2220) ^a	2450 (2280, 2555) ^b	2575 (2450, 2691) ^c	2332 (2202, 2438) ^d
div4-e	2095 (2010, 2210) ^a	2460 (2285, 2565) ^b	2580 (2459, 2703) ^c	2332 (2204, 2439) ^d
div5-b	2128 (2035, 2260) ^a	2478 (2403, 2680) ^b	2617 (2495, 2790) ^c	2359 (2243, 2509) ^d
div5-e	2135 (2050, 2265) ^a	2485 (2408, 2685) ^b	2622 (2500, 2795) ^c	2367 (2253, 2517) ^d
div6-b	2203 (2093, 2303) ^a	2555 (2445, 2725) ^b	2680 (2602, 2897) ^b	2422 (2303, 2551) ^c
div6-e	2208 (2098, 2310) ^a	2560 (2450, 2730) ^b	2685 (2610, 2907) ^b	2430 (2311, 2558) ^c
div7-b	2235 (2130, 2485) ^a	2678 (2498, 2785) ^b	2757(2560, 2939) ^b	2440 (2328, 2595) ^c
div7-e	2240 (2135, 2490) ^a	2685 (2503, 2790) ^b	2762 (2655, 2944) ^b	2445 (2333, 2602) ^c
comp-b	2405 (2275, 2585) ^a	2370 (2190, 2590) ^{a,b}	2519 (2160, 2774) ^a	2309 (2117, 2467) ^b
comp<8C-b	2553 (2382, 2765) ^a	2348 (2150, 2505) ^{b,c}	2474 (2139, 2685) ^{a,c}	2204 (2034, 2374) ^b
comp8C-b	2335 (2230, 2500) ^a	2655 (2530, 2770) ^{b,c}	2795 (2735, 3022) ^b	2465 (2392, 2548) ^{a,c}
comp-e	2665 (2513, 2893) ^{a,c}	2810 (2658, 2933) ^{a,b}	2954 (2704, 3140) ^b	2632 (2461, 2779) ^c
cav-b	4265 (3990, 4670)	4255 (3990, 4700)	4409 (4202, 4714)	4253 (3952, 4684)
cav-e	4443 (4223, 4985)	4965 (4550, 5370)	4789 (4544, 5240)	4905 (4456, 5563)
Duration		Median (Q1, Q3) in min		
1-cell stage	90 (83, 95) ^a	90 (80, 100) ^{a,b}	99 (85, 112) ^b	91 (83, 100) ^{a,b}
div1	10 (5, 10)	5 (5, 10)	10 (5, 10)	10 (5, 15)
cycle1	98 (90, 105) ^a	100 (90, 110) ^{a,b}	109 (93, 125) ^b	102 (95, 112) ^{a,b}
2-cell stage	1215 (1160, 1255) ^a	1435 (1315, 1515) ^{b,c}	1510 (1394, 1620) ^b	1380 (1289, 1507) ^c
div2	5 (5, 10) ^a	10 (5, 10) ^b	10 (5, 10) ^b	5 (5, 10) ^{a,b}
3-cell stage	45 (15, 90) ^a	125 (60, 90) ^b	110 (40, 200) ^b	65 (38, 153) ^{a,b}
div3	5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 10)
cycle2	1280 (1205, 1345) ^a	1570 (1440, 1750) ^{b,c}	1675 (1540, 1915) ^b	1511 (1409, 1619) ^c
4-cell stage	723 (650, 808)	795 (665, 875)	758 (650, 880)	718 (638, 798)
div4	5 (5, 5) ^a	5 (5, 10) ^{a,b}	5 (5, 10) ^{a,b}	5 (5, 10) ^b
5-cell stage	33 (5, 75)	65 (10, 173)	48 (25, 110)	33 (10, 98)
div5	5 (5, 5) ^a	5 (5, 10) ^b	5 (5, 10) ^b	8 (5, 10) ^b
6-cell stage	25 (10, 120)	55 (25, 95)	78 (23, 150)	55 (30, 90)
div6	5 (5, 5) ^a	5 (5, 10) ^b	5 (5, 10) ^{a,b}	8 (5, 10) ^b
7-cell stage	45 (15, 135)	93 (40, 133)	105 (65, 120)	63 (28, 88)
div7	5 (5, 5)	5 (5, 7.5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)
cycle3	905 (770, 1110) ^a	1070 (943, 1143) ^b	988 (910, 1160) ^{a,b}	903 (855, 975) ^a
8-cell stage	102 (55, 195) ^a	50 (10, 120) ^{a,b}	62 (20, 110) ^{a,b}	52 (22, 95) ^b
compaction	253 (185, 350) ^a	328 (220, 558) ^b	335 (200, 575) ^b	275 (185, 500) ^{a,b}
morula stage	1585 (1385, 1900)	1430 (1185, 1800)	1455 (1195, 1725)	1558 (1230, 1925)
cavitation	293 (198, 508) ^a	660 (320, 1005) ^b	420 (245, 535) ^{a,c}	550 (365, 875) ^{b,c}
Frequency		n (%)		
directdiv	0 (0)	0 (0)	3 (4.0)	1 (1.1)
comp2C	4 (5.9)	15 (18.1)	12 (16.0)	8 (8.6)
frag	27 (39.7) ^a	45 (54.2) ^{a,b}	28 (37.3) ^a	57 (61.3) ^b
uneven	3 (4.4) ^a	8 (9.6) ^{a,b}	15 (20.0) ^b	9 (9.7) ^{a,b}

^{a-d} Values with different superscripts differ significantly within the same row ($p < 0.05$).

Supplementary table S2. Morphokinetic parameters (time points, durations and frequencies) of only those ICSI embryos and SCNT embryos non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammaphin A (PsA) or Vitamin C (VitC) that developed to the blastocyst stage.

	ICSI	SCNT-NT	SCNT-PsA	SCNT-VitC
Time point	Median (Q1, Q3) in min			
PNd	935 (912, 975) ^a	902 (882, 931) ^b	974 (923, 1020) ^a	881 (841, 920) ^c
div1-b	90 (83, 95)	90 (80, 95)	99 (84, 114)	95 (78, 100)
div1-e	95 (90, 105) ^a	98 (90, 105) ^{a,b}	110 (92, 125) ^b	100 (95, 115) ^{a,b}
Na	140 (120, 185)	145 (130, 155)	147 (124, 170)	152 (128, 165)
div2-b	1290 (1258, 1335) ^a	1473 (1395, 1565) ^b	1648 (1509, 1714) ^c	1474 (1403, 1598) ^b
div2-e	1295 (1263, 1340) ^a	1483 (1405, 1570) ^b	1655 (1514, 1719) ^c	1481 (1411, 1607) ^b
div3-b	1345 (1295, 1415) ^a	1598 (1485, 1775) ^b	1780 (1644, 1965) ^c	1593 (1505, 1702) ^b
div3-e	1355 (1300, 1420) ^a	1605 (1495, 1785) ^b	1787 (1649, 1970) ^c	1598 (1517, 1707) ^b
div4-b	2080 (2003, 2150) ^a	2390 (2240, 2535) ^b	2561 (2429, 2650) ^c	2298 (2179, 2412) ^b
div4-e	2088 (2008, 2155) ^a	2405 (2245, 2540) ^b	2569 (2434, 2659) ^c	2306 (2184, 2427) ^b
div5-b	2108 (2023, 2212) ^a	2453 (2350, 2680) ^b	2608 (2490, 2744) ^c	2337 (2209, 2514) ^b
div5-e	2118 (2028, 2217) ^a	2463 (2355, 2685) ^b	2613 (2497, 2754) ^c	2342 (2217, 2524) ^b
div6-b	2150 (2075, 2265) ^a	2530 (2365, 2700) ^b	2674 (2595, 2889) ^c	2414 (2289, 2567) ^b
div6-e	2155 (2080, 2270) ^a	2535 (2370, 2705) ^b	2679 (2605, 2894) ^c	2419 (2299, 2572) ^b
div7-b	2235 (2115, 2405) ^a	2640 (2430, 2780) ^{b,c}	2757 (2650, 2939) ^b	2409 (2304, 2582) ^c
div7-e	2240 (2120, 2410) ^a	2645 (2435, 2785) ^{b,c}	2762 (2655, 2944) ^b	2419 (2309, 2587) ^c
comp-b	2335 (2243, 2490) ^{a,b}	2373 (2230, 2590) ^{a,b}	2532 (2227, 2755) ^a	2316 (2174, 2492) ^b
comp<8C-b	2459 (2369, 2545)	2348 (2128, 2480)	2484 (2215, 2674)	2217 (2112, 2332)
comp8C-b	2314 (2220, 2490) ^a	2638 (2530, 2770) ^{b,c}	2795 (2735, 3022) ^b	2448 (2382, 2542) ^{a,c}
comp-e	2595 (2470, 2745) ^a	2820 (2700, 2915) ^b	2960 (2760, 3114) ^b	2696 (2554, 2792) ^a
cav-b	4125 (3963, 4488) ^{a,b}	4205 (3905, 4300) ^a	4400 (4200, 4644) ^b	4187 (3919, 4574) ^{a,b}
cav-e	4443 (4223, 4985)	4965 (4550, 5370)	4789 (4544, 5240)	4905 (4456, 5563)
Duration	Median (Q1, Q3) in min			
1-cell stage	90 (83, 95)	90 (80, 95)	99 (84, 114)	95 (78, 100)
div1	10 (5, 10)	10 (5, 10)	10 (5, 10)	7.5 (5, 15)
cycle1	95 (90, 105)	98 (90, 105)	110 (92, 125)	100 (95, 115)
2-cell stage	1199 (1160, 1235) ^a	1373 (1290, 1480) ^b	1523 (1400, 1585) ^c	1379 (1291, 1478) ^b
div2	5 (5, 10) ^a	10 (5, 10) ^b	10 (5, 10) ^{a,b}	5 (5, 10) ^{a,b}
3-cell stage	40 (10, 70) ^a	95 (55, 150) ^b	85 (30, 200) ^b	60 (23, 125) ^{a,b}
div3	5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 10)
cycle2	1260 (1200, 1318) ^a	1503 (1380, 1655) ^b	1645 (1540, 1785) ^c	1495 (1391, 1587) ^b
4-cell stage	710 (650, 770) ^{a,b}	795 (690, 875) ^a	740 (655, 860) ^{a,b}	703 (635, 795) ^b
div4	5 (5, 7.5)	5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 10)
5-cell stage	23 (5, 68)	50 (10, 215)	45 (23, 108)	35 (10, 100)
div5	5 (5, 10) ^a	5 (5, 10) ^{a,b}	5 (5, 10) ^b	5 (5, 10) ^b
6-cell stage	20 (10, 65)	60 (15, 90)	80 (15, 155)	45 (20, 80)
div6	5 (5, 5) ^a	5 (5, 10) ^b	5 (5, 10) ^{a,b}	5 (5, 10) ^b
7-cell stage	45 (15, 105)	90 (30, 145)	105 (65, 120)	65 (25, 100)
div7	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)
cycle3	890 (770, 975) ^a	1065 (920, 1160) ^b	988 (910, 1160) ^{b,c}	890 (835, 975) ^{a,c}
8-cell stage	85 (50, 165)	50 (10, 120)	62 (20, 110)	55 (22, 95)
compaction	230 (185, 293) ^a	345 (265, 560) ^b	360 (205, 575) ^b	278 (188, 513) ^{a,b}
morula stage	1543 (1363, 1860)	1378 (1180, 1610)	1455 (1195, 1650)	1470 (1230, 1815)
cavitation	292 (198, 508) ^a	660 (320, 1005) ^b	420 (245, 535) ^{a,c}	550 (365, 875) ^{b,c}
Frequency	n (%)			
directdiv	0 (0)	0 (0)	1 (2.4)	0 (0)
comp2C	3 (6.2)	5 (13.2)	2 (4.8)	3 (5.4)
frag	8 (16.7) ^a	16 (42.1) ^b	11 (26.2) ^{a,b}	28 (50.0) ^b
uneven	0 (0) ^a	3 (7.9) ^{a,b}	10 (23.8) ^b	5 (8.9) ^{a,b}

^{a-d} Values with different superscripts differ significantly within the same row (p < 0.05).

Supplementary table S3. Morphokinetic differences between embryos that developed to the blastocyst stage and those that arrested to develop before blastocyst stage of each group.

Parameter	Group							
	ICSI		SCNT-NT		SCNT-PsA		SCNT-VitC	
	Blastocyst	No Blastocyst	Blastocyst	No blastocyst	Blastocyst	No blastocyst	Blastocyst	No blastocyst
Time point	Median (Q1, Q3) in min							
PNd	935 (912, 975)a	973 (928, 1032)b	902 (882, 931)	910 (826, 961)	974 (923, 1020)	973 (912, 1020)	881 (841, 920)a	902 (862, 1030)b
div1-b	90 (83, 95)	90 (83, 95)	90 (80, 95)	95 (85, 105)	99 (84, 114)	98 (85, 110)	95 (78, 100)	90 (86, 100)
div1-e	95 (90, 105)	100 (90, 105)	98 (90, 105)a	105 (92.5, 125)b	110 (92, 125)	106 (94, 125)	100 (95, 115)	105 (95, 110)
Na	140 (120, 185)	135 (115, 162.5)	145 (130, 155)	140 (117.5, 195)	147 (124, 170)	142 (132, 154)	152 (128, 165)	142 (121, 168)
div2-b	1290 (1258, 1335)a	1350 (1265, 1495)b	1473 (1395, 1565)a	1580 (1485, 1730)b	1648 (1509, 1714)	1603 (1302, 2007)	1474 (1403, 1598)	1526 (1367, 1634)
div2-e	1295 (1263, 1340)a	1355 (1275, 1500)b	1483 (1405, 1570)a	1595 (1490, 1735)b	1655 (1514, 1719)	1628 (1312, 2020)	1481 (1411, 1607)	1536 (1372, 1644)
div3-b	1345 (1295, 1415)a	1530 (1340, 1685)b	1598 (1485, 1775)a	1720 (1640, 1975)b	1780 (1644, 1965)	2074 (1447, 2389)	1593 (1505, 1702)	1654 (1557, 1779)
div3-e	1355 (1300, 1420)a	1535 (1345, 1690)b	1605 (1495, 1785)a	1750 (1665, 1985)b	1787 (1649, 1970)	2079 (1467, 2394)	1598 (1517, 1707)	1659 (1567, 1792)
div4-b	2080 (2003, 2150)a	2198 (2100, 2447)b	2390 (2240, 2535)	2500 (2360, 2560)	2561 (2429, 2650)a	3252 (2712, 3515)b	2298 (2179, 2412)	2358 (2226, 2497)
div4-e	2088 (2008, 2155)a	2195 (2090, 2514)b	2405 (2245, 2540)	2510 (2365, 2565)	2569 (2434, 2659)a	3269 (2727, 3525)b	2306 (2184, 2427)	2362 (2236, 2527)
div5-b	2108 (2023, 2212)a	2275 (2155, 2470)b	2453 (2350, 2680)	2573 (2465, 2700)	2608 (2490, 2744)a	3517 (3139, 3894)b	2337 (2209, 2514)	2372 (2282, 2407)
div5-e	2118 (2028, 2217)a	2283 (2160, 2475)b	2463 (2355, 2685)	2583 (2475, 2705)	2613 (2497, 2754)a	3529 (3154, 3904)b	2342 (2217, 2524)	2382 (2292, 2422)
div6-b	2150 (2075, 2265)a	2270 (2215, 2720)b	2530 (2365, 2700)a	2708 (2555, 2755)b	2674 (2595, 2889)	3949 (3949, 3949)	2414 (2289, 2567)	2452 (2392, 2517)
div6-e	2155 (2080, 2270)a	2275 (2220, 2725)b	2535 (2370, 2705)a	2715 (2560, 2765)b	2679 (2605, 2894)	3964 (3964, 3964)	2419 (2299, 2572)	2457 (2402, 2527)
div7-b	2235 (2115, 2405)a	2605 (2350, 2805)b	2640 (2430, 2780)	2730 (2685, 2815)	2757 (2650, 2939)	-	2409 (2304, 2582)	2527 (2457, 2607)
div7-e	2240 (2120, 2410)a	2610 (2355, 2810)b	2645 (2435, 2785)	2735 (2690, 2820)	2762 (2655, 2944)	-	2419 (2309, 2587)	2542 (2462, 2617)
comp-b	2335 (2243, 2490)a	2665 (2445, 2814)b	2373 (2230, 2590)	2355 (2190, 2610)	2532 (2227, 2755)	2389 (2072, 3029)	2316 (2174, 2492)	2248 (2028, 2401)
comp<8C-b	2459 (2369, 2545)	2740 (2430, 2814)	2348 (2128, 2480)	2340 (2190, 2585)	2484 (2215, 2674)	2389 (2072, 3029)	2217 (2112, 2332)	2175 (2016, 2380)
comp8C-b	2314 (2220, 2490)a	2608 (2445, 2990)b	2638 (2530, 2770)	2750 (2750, 2750)	2795 (2735, 3022)	-	2448 (2382, 2542)	2560 (2440, 2697)
comp-e	2595 (2470, 2745)a	2953 (2865, 3188)b	2820 (2700, 2915)	2780 (2600, 2955)	2960 (2760, 3114)	2944 (2584, 3369)	2696 (2554, 2792)a	2531 (2291, 2679)b
cav-b	4125 (3963, 4488)a	4800 (4645, 4985)b	4205 (3905, 4300)a	4835 (4370, 5050)b	4400 (4200, 4644)a	5089 (4547, 6081)b	4187 (3919, 4574)a	4882 (4804, 5012)b
cav-e	4443 (4223, 4985)	-	4965 (4550, 5370)	-	4789 (4544, 5240)	-	4905 (4456, 5563)	-
Duration	Median (Q1, Q3) in min							
1-cell stage	90 (83, 95)	90 (83, 95)	90 (80, 95)	95 (85, 105)	99 (84, 114)	98 (85, 110)	95 (78, 100)	90 (86, 100)
div1	10 (5, 10)	7.5 (5, 10)	10 (5, 10)	5 (5, 10)	10 (5, 10)	10 (5, 15)	7.5 (5, 15)	10 (5, 17.5)
cycle1	95 (90, 105)	100 (90, 105)	98 (90, 105)a	105 (92.5, 125)b	110 (92, 125)	106 (94, 125)	100 (95, 115)	105 (95, 110)
2-cell stage	1199 (1160, 1235)a	1240 (1220, 1335)b	1373 (1290, 1480)a	1460 (1355, 1625)b	1523 (1400, 1585)	1488 (1213, 1880)	1379 (1291, 1478)	1417 (1237, 1539)
div2	5 (5, 10)	5 (5, 10)	10 (5, 10)	10 (5, 10)	10 (5, 10)a	10 (10, 15)b	5 (5, 10)	5 (5, 10)
3-cell stage	40 (10, 70)a	100 (40, 240)b	95 (55, 150)a	150 (70, 250)b	85 (30, 200)	130 (95, 425)	60 (23, 125)a	115 (50, 183)b
div3	5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 10)	7.5 (5, 10)	5 (5, 10)a	5 (5, 20)b	5 (5, 10)a	10 (5, 15)b
cycle2	1260 (1200, 1318)a	1325 (1250, 1590)b	1503 (1380, 1655)a	1620 (1540, 1880)b	1645 (1540, 1785)	1974 (1375, 2260)	1495 (1391, 1587)	1565 (1439, 1695)
4-cell stage	710 (650, 770)	813 (655, 880)	795 (690, 875)	745 (605, 870)	740 (655, 860)	875 (290, 990)	703 (635, 795)	745 (645, 805)
div4	5 (5, 7.5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	10 (5, 10)	5 (5, 10)a	15 (10, 25)b	5 (5, 10)a	10 (10, 10)b
5-cell stage	23 (5, 68)a	73 (55, 115)b	50 (10, 215)	75 (35, 145)	45 (23, 108)	110 (100, 120)	35 (10, 100)	25 (10, 75)
div5	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	7.5 (5, 10)	5 (5, 10)a	12.5 (10, 15)b	5 (5, 10)a	10 (10, 10)b
6-cell stage	20 (10, 65)a	105 (30, 150)b	60 (15, 90)	50 (25, 110)	80 (15, 155)	45 (45, 45)	45 (20, 80)a	95 (55, 130)b
div6	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 10)	15 (15, 15)	5 (5, 10)	10 (10, 10)
7-cell stage	45 (15, 105)	205 (33, 308)	90 (30, 145)	105 (50, 110)	105 (65, 120)	-	65 (25, 100)	55 (45, 80)
div7	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	5 (5, 5)	-	5 (5, 10)a	10 (10, 10)b
cycle3	890 (770, 975)a	1150 (953, 1285)b	1065 (920, 1160)	1070 (1070, 1095)	988 (910, 1160)	-	890 (835, 975)	930 (910, 975)
8-cell stage	85 (50, 165)a	260 (175, 260)b	50 (10, 120)	15 (15, 15)	62.5 (20, 110)	-	55 (22.5, 95)	27.5 (20, 120)
compaction	230 (185, 293)	350 (195, 417.5)	345 (265, 560)	308 (190, 555)	360 (205, 575)	335 (200, 535)	278 (188, 513)	275 (175, 480)
morula stage	1543 (1363, 1860)a	1900 (1730, 2345)b	1378 (1180, 1610)a	1740 (1365, 2075)b	1455 (1195, 1650)	1718 (1055, 2712)	1470 (1230, 1815)a	2290 (1925, 2410)b
cavitation	292 (198, 508)	-	660 (320, 1005)	-	420 (245, 535)	-	550 (365, 875)	-
Frequency	n (%)							
directdiv	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2.4)	2 (6.1)	0 (0)	1 (2.7)
comp2C	3 (6.2)	1 (5.0)	5 (13.2)	10 (22.2)	2 (4.8)a	10 (30.3)b	3 (5.4)	5 (13.5)
frag	8 (16.7)a	19 (95.0)b	16 (42.1)a	29 (64.4)b	11 (26.2)a	17 (51.5)b	28 (50.0)a	29 (78.4)b
uneven	0 (0)a	3 (15.0)b	3 (7.9)	5 (11.1)	10 (23.8)	5 (15.2)	5 (8.9)	4 (10.8)

^{a-b} Values with different superscripts differ significantly within the same row in each group (p < 0.05). NT: non-treated, PsA: psammaplin A, VitC: vitamin C

Supplementary table S4. Morphokinetic parameters (time points, durations and frequencies) of only those ICSI embryos and SCNT embryos non-treated (NT) or treated with the epigenetic modifiers psammaplin A (PsA) or Vitamin C (VitC) that gave rise to embryonic stem cell lines.

	ICSI	SCNT-NT	SCNT-PsA	SCNT-VitC
Time point	Median (Q1, Q3) in min			
PNd	977 (947, 1002)	908 (898, 918)	960 (930, 983)	880 (827, 932)
div1-b	80 (60, 85)	95 (95, 95)	93 (83, 105)	95 (75, 105)
div1-e	95 (70, 95)	103 (100, 105)	111 (96, 118)	100 (95, 115)
Na	130 (95, 145)	135 (135, 135)	154 (136, 175)	137 (130, 168)
div2-b	1275 (1270, 1275)	1495 (1450, 1540)	1606 (1486, 1690)	1462 (1387, 1609)
div2-e	1280 (1275, 1280) ^a	1500 (1455, 1545) ^{a,b}	1614 (1494, 1700) ^{a,b}	1467 (1397, 1619) ^b
div3-b	1375 (1300, 1390)	1625 (1580, 1670)	1750 (1617, 1810)	1577 (1437, 1712)
div3-e	1380 (1310, 1400)	1633 (1590, 1675)	1757 (1622, 1818)	1582 (1442, 1717)
div4-b	2090 (2080, 2095)	2560 (2560, 2560)	2459 (2357, 2622)	2302 (2162, 2377)
div4-e	2095 (2085, 2100)	2565 (2565, 2565)	2466 (2362, 2627)	2312 (2172, 2382)
div5-b	2110 (2105, 2115)	2570 (2570, 2570)	2595 (2479, 2795)	2337 (2207, 2497)
div5-e	2120 (2115, 2120)	2575 (2575, 2575)	2605 (2484, 2805)	2342 (2217, 2507)
div6-b	2150 (2140, 2185)	2580 (2580, 2580)	2656 (2505, 2780)	2402 (2197, 2580)
div6-e	2155 (2145, 2195)	2585 (2585, 2585)	2664 (2510, 2785)	2415 (2210, 2585)
div7-b	2210 (2205, 2240)	2590 (2590, 2590)	2671 (2559, 2894)	2362 (2257, 2477)
div7-e	2215 (2210, 2245)	2595 (2595, 2595)	2679 (2564, 2904)	2375 (2267, 2487)
comp-b	2275 (2275, 2370)	2410 (2340, 2480)	2501 (2408, 2630)	2417 (2266, 2537)
comp<8C-b	-	2410 (2340, 2480)	2442 (2382, 2565)	2237 (2055, 2497)
comp8C-b	2275 (2275, 2370)	-	2695 (2695, 2695)	2485 (2382, 2537)
comp-e	2545 (2505, 2560)	2908 (2815, 3000)	2960 (2846, 3065)	2719 (2567, 2997)
cav-b	4255 (4020, 4265)	4340 (4300, 4380)	4090 (3999, 4420)	4193 (3982, 4522)
cav-e	4490 (4215, 4550)	5105 (4935, 5275)	4443 (4236, 4867)	4892 (4547, 5272)
Duration	Median (Q1, Q3) in min			
1-cell stage	80 (60, 85)	95 (95, 95)	93 (83, 105)	95 (75, 105)
div1	10 (10, 15)	7.5 (5, 10)	10 (5, 15)	10 (5, 10)
cycle1	95 (70, 95)	103 (100, 105)	111 (96, 118)	100 (95, 115)
2-cell stage	1175 (1170, 1205)	1393 (1350, 1435)	1510 (1388, 1573)	1377 (1292, 1415)
div2	5 (5, 10)	5 (5, 5)	10 (5, 10)	5 (4, 10)
3-cell stage	100 (35, 115)	125 (125, 125)	108 (15, 163)	45 (20, 151)
div3	5 (5, 10)	7.5 (5, 10)	5 (5, 7.5)	5 (5, 10)
cycle2	1295 (1285, 1305)	1530 (1490, 1570)	1643 (1520, 1710)	1477 (1342, 1587)
4-cell stage	695 (695, 700)	885 (885, 885)	743 (645, 845)	690 (625, 784)
div4	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 7.5)	10 (5, 10)
5-cell stage	15 (10, 30)	5 (5, 5)	110 (40, 228)	35 (10, 100)
div5	5 (5, 10)	5 (5, 5)	7.5 (5, 10)	10 (6, 10)
6-cell stage	30 (25, 65)	5 (5, 5)	58 (5, 145)	48 (28, 78)
div6	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	10 (5, 15)
7-cell stage	45 (20, 55)	5 (5, 5)	85 (65, 170)	58 (30, 85)
div7	5 (5, 5)	5 (5, 5)	7.5 (5, 10)	10 (5, 10)
cycle3	900 (835, 940)	920 (920, 920)	1040 (868, 1160)	880 (830, 955)
8-cell stage	65 (60, 65)	-	115 (115, 115)	54.5 (30, 115)
compaction	285 (180, 290)	498 (475, 520)	475 (353, 713)	380 (155, 521)
morula stage	1720 (1160, 1800)	1433 (1380, 1485)	1168 (1010, 1328)	1423 (1135, 1630)
cavitation	285 (195, 320)	765 (555, 975)	393 (250, 475)	600 (365, 885)
Frequency	n (%)			
directdiv	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
comp2C	0 (0)	0 (80)	0 (0)	1 (9.1)
frag	0 (0)	1 (50.0)	1 (12.5)	7 (63.6)
uneven	0 (0)	0 (0)	3 (37.5)	0 (0)

^{a-b} Values with different superscripts differ significantly within the same row (p < 0.05).

Supplementary table S5. Morphokinetic differences between seeded blastocysts that gave rise to embryonic stem cell lines (ESCs) and those that failed in each group.

Parameter	Group							
	ICSI		SCNT-NT		SCNT-PsA		SCNT-VitC	
	ESCs	No ESCs	ESCs	No ESCs	ESCs	No ESCs	ESCs	No ESCs
Time point	Median (Q1, Q3) in min							
PNd	977 (947, 1002)	937 (912, 987)	908 (898, 918)	900 (882, 927)	960 (930, 983)	1011 (961, 1045)	880 (827, 932)	881 (821, 910)
div1-b	80 (60, 85) ^a	90 (85, 95) ^b	95 (95, 95)	90 (85, 95)	93 (82.5, 105)	88 (70, 105)	95 (75, 105)	94 (80, 100)
div1-e	95 (70, 95)	100 (95, 105)	103 (100, 105)	100 (90, 105)	111 (96, 118)	100 (78, 122)	100 (95, 115)	102 (95, 115)
Na	130 (95, 145)	140 (125, 160)	135 (135, 135)	140 (130, 155)	154 (136, 175)	140 (117, 193)	137 (130, 168)	157 (140, 189)
div2-b	1275 (1270, 1275)	1310 (1240, 1335)	1495 (1450, 1540)	1470 (1415, 1565)	1606 (1486, 1690)	1660 (1517, 1776)	1462 (1387, 1609)	1458 (1417, 1529)
div2-e	1280 (1275, 1280)	1315 (1250, 1340)	1500 (1455, 1545)	1485 (1425, 1570)	1614 (1494, 1700)	1670 (1527, 1783)	1467 (1397, 1619)	1472 (1434, 1534)
div3-b	1375 (1300, 1390)	1345 (1265, 1415)	1625 (1580, 1670)	1560 (1485, 1765)	1750 (1617, 1810)	1802 (1692, 1995)	1577 (1437, 1712)	1547 (1502, 1647)
div3-e	1380 (1310, 1400)	1350 (1270, 1420)	1633 (1590, 1675)	1565 (1495, 1770)	1757 (1622, 1818)	1810 (1697, 2000)	1582 (1442, 1717)	1555 (1522, 1657)
div4-b	2090 (2080, 2095)	2045 (2000, 2250)	2560 (2560, 2560)	2390 (2240, 2500)	2459 (2357, 2622)	2570 (2430, 2642)	2302 (2162, 2377)	2247 (2147, 2387)
div4-e	2095 (2085, 2100)	2050 (2005, 2255)	2565 (2565, 2565)	2405 (2245, 2510)	2466 (2362, 2627)	2575 (2438, 2647)	2312 (2172, 2382)	2267 (2157, 2397)
div5-b	2110 (2105, 2115)	2083 (2020, 2215)	2570 (2570, 2570)	2450 (2360, 2680)	2595 (2479, 2795)	2600 (2430, 2790)	2337 (2207, 2497)	2297 (2237, 2457)
div5-e	2120 (2115, 2120)	2090 (2025, 2220)	2575 (2575, 2575)	2465 (2365, 2685)	2605 (2484, 2805)	2605 (2440, 2795)	2342 (2217, 2507)	2302 (2242, 2487)
div6-b	2150 (2140, 2185)	2160 (2040, 2283)	2580 (2580, 2580)	2520 (2420, 2700)	2656 (2505, 2780)	2685 (2609, 2889)	2402 (2197, 2580)	2353 (2302, 2492)
div6-e	2155 (2145, 2195)	2165 (2045, 2290)	2585 (2585, 2585)	2530 (2425, 2705)	2664 (2510, 2785)	2695 (2614, 2894)	2415 (2210, 2585)	2358 (2307, 2502)
div7-b	2210 (2205, 2240)	2235 (2100, 2360)	2590 (2590, 2590)	2653 (2523, 2780)	2671 (2559, 2894)	2759 (2650, 2939)	2362 (2257, 2477)	2403 (2312, 2534)
div7-e	2215 (2210, 2245)	2240 (2105, 2365)	2595 (2595, 2595)	2658 (2528, 2785)	2679 (2564, 2904)	2764 (2655, 2944)	2375 (2267, 2487)	2411 (2317, 2539)
comp-b	2275 (2275, 2370)	2385 (2140, 2500)	2410 (2340, 2480)	2480 (2280, 2645)	2501 (2408, 2630)	2708 (2270, 2793)	2417 (2266, 2537)	2382 (2204, 2492)
comp<8C-b	-	2578 (2305, 2723)	2410 (2340, 2480)	2410 (2230, 2505)	2442 (2382, 2565)	2495 (2215, 2755)	2237 (2055, 2497)	2235 (2153, 2391)
comp8C-b	2275 (2275, 2370)	2335 (2140, 2475)	-	2638 (2530, 2720)	2695 (2695, 2695)	2814 (2775, 3019)	2485 (2382, 2537)	2444 (2407, 2547)
comp-e	2545 (2505, 2560)	2610 (2450, 2765)	2908 (2815, 3000)	2805 (2720, 2915)	2960 (2846, 3065)	2988 (2867, 3157)	2719 (2567, 2997)	2622 (2539, 2784)
cav-b	4255 (4020, 4265)	4115 (3965, 4495)	4340 (4300, 4380)	4270 (3980, 4425)	4090 (3999, 4420)	4330 (4201, 4575)	4193 (3982, 4522)	4049 (3817, 4352)
cav-e	4490 (4215, 4550)	4498 (4285, 4955)	5105 (4935, 5275)	5135 (4570, 5520)	4443 (4236, 4867)	4778 (4557, 4879)	4892 (4547, 5272)	4583 (4389, 5312)
Duration	Median (Q1, Q3) in min							
1-cell stage	80 (60, 85) ^a	90 (85, 95) ^b	95 (95, 95)	90 (85, 95)	93 (82.5, 105)	88 (70, 105)	95 (75, 105)	94 (80, 100)
div1	10 (10, 15) ^a	10 (5, 10) ^b	7.5 (5, 10)	10 (5, 10)	10 (5, 15)	10 (5, 10)	10 (5, 10)	7.5 (5, 25)
cycle1	95 (70, 95)	100 (95, 105)	103 (100, 105)	100 (90, 105)	111 (96, 118)	100 (78, 122)	100 (95, 115)	102 (95, 115)
2-cell stage	1175 (1170, 1205)	1215 (1140, 1240)	1393 (1350, 1435)	1375 (1305, 1485)	1510 (1388, 1573)	1558 (1420, 1643)	1377 (1292, 1415)	1357 (1285, 1422)
div2	5 (5, 10)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	10 (5, 10)	10 (5, 10)	10 (5, 10)	5 (4, 10)	7.5 (5, 10)
3-cell stage	100 (35, 115)	40 (15, 65)	125 (125, 125)	75 (30, 165)	108 (15, 163)	128 (40, 233)	45 (20, 151)	60 (40, 85)
div3	5 (5, 10)	5 (5, 10)	7.5 (5, 10)	5 (5, 10)	5 (5, 7.5)	5 (5, 7.5)	5 (5, 10)	7.5 (5, 10)
cycle2	1295 (1285, 1305)	1245 (1180, 1315)	1530 (1490, 1570)	1460 (1385, 1655)	1643 (1520, 1710)	1718 (1590, 1908)	1477 (1342, 1587)	1443 (1374, 1554)
4-cell stage	695 (695, 700)	750 (695, 805)	885 (885, 885)	755 (690, 835)	743 (645, 845)	730 (635, 880)	690 (625, 784)	725 (665, 780)
div4	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	5 (5, 7.5)	5 (5, 10)	10 (5, 10)	5 (5, 10)
5-cell stage	15 (10, 30)	20 (5, 65)	5 (5, 5)	40 (5, 225)	110 (40, 228) ^a	35 (15, 55) ^b	35 (10, 100)	30 (15, 105)
div5	5 (5, 10)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	7.5 (5, 10)	5 (5, 10)	10 (6, 10)	5 (5, 10)
6-cell stage	30 (25, 65)	23 (10, 50)	5 (5, 5)	55 (15, 75)	58 (5, 145)	85 (45, 155)	48 (28, 78)	60 (35, 85)
div6	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	5 (5, 5)	5 (5, 10)	10 (5, 15)	5 (5, 10)
7-cell stage	45 (20, 55)	33 (8, 110)	5 (5, 5)	80 (30, 118)	85 (65, 170)	110 (50, 145)	58 (30, 85)	38 (25, 65)
div7	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 5)	5 (5, 7.5)	7.5 (5, 10)	5 (5, 5)	10 (5, 10) ^a	5 (5, 5) ^b
cycle3	900 (835, 940)	905 (772.5, 965)	920 (920, 920)	1085 (943, 1133)	1040 (868, 1160)	995 (910, 1160)	880 (830, 955)	880 (855, 950)
8-cell stage	65 (60, 65)	85 (50, 155)	-	30 (10, 50)	115 (115, 115)	75 (50, 175)	55 (30, 115)	65 (25, 80)
compaction	285 (180, 290)	225 (185, 305)	498 (475, 520)	305 (150, 495)	475 (353, 713)	490 (220, 585)	380 (155, 521)	275 (205, 445)
morula stage	1720 (1160, 1800)	1560 (1370, 1850)	1433 (1380, 1485)	1450 (1185, 1695)	1168 (1010, 1328)	1423 (1240, 1508)	1423 (1135, 1630)	1435 (1225, 1655)
cavitation	285 (195, 320)	308 (200, 500)	765 (555, 975)	715 (270, 1160)	393 (250, 475)	265 (227.5, 485)	600 (365, 885)	460 (230, 875)
Frequency	n (%)							
directdiv	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
comp2C	0 (0)	2 (8.7)	0 (0)	4 (21.0)	0 (0)	1 (6.2)	1 (9.1)	2 (9.1)
frag	0 (0)	2 (8.7)	1 (50.0)	8 (42.1)	1 (12.5)	3 (18.8)	7 (63.6)	6 (27.3)
uneven	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10.5)	3 (37.5)	4 (25.0)	0 (0)	1 (4.6)

^{a-b} Values with different superscripts differ significantly within the same row in each group ($p < 0.05$). NT: non-treated, PsA: psammaplin A, VitC: vitamin C

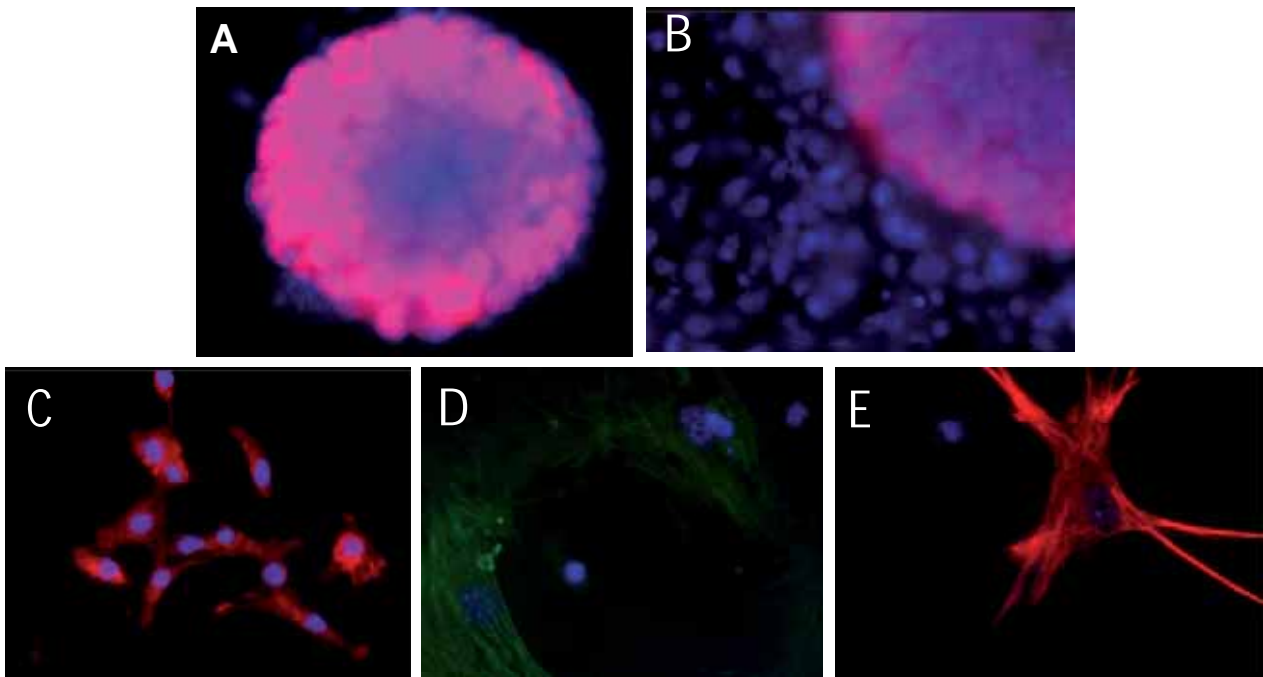


Figure S1. Characterization of ESC lines by immunofluorescence before (**A-B**) and after (**C-E**) *in vitro* differentiation. **A)** ntESC colony derived from a SCNT embryo treated with vitamin C, positive for OCT4 (red). **B)** ntESC colony derived from a SCNT embryo treated with psammaplin A, positive for SOX2 (red). **C,D)** *In vitro* differentiated ESCs lines derived from ICSI embryos showing the expression of AFP (C, red) and α -SMA (D, green). **E)** *In vitro* differentiated ntESC line derived from a SCNT embryo treated with vitamin C, positive for NESTIN (red). In all images, nuclei are counterstained with hoechst (blue).

Capítol

4

DISCUSSIÓ GENERAL

L'èxit de la SCNT depèn de tota una sèrie de factors, relacionats tant amb la complexa reprogramació del nucli somàtic que hi ha de tenir lloc com amb aspectes inherents a la pròpia tècnica, que fan que tingui una eficiència baixa (Ogura *et al.* 2013; Yang *et al.* 2007b). Entre totes les possibles modificacions del protocol de la SCNT per millorar les taxes d'èxit obtingudes, prèviament descrites al capítol 1, la present tesi doctoral se centra en el tractament dels embrions amb modificadors epigenètics per afavorir la reprogramació nuclear, l'optimització d'aspectes tècnics com l'inhibidor de la polimerització dels filaments d'actina emprat durant la micromanipulació i activació dels oòcits, i l'ús de sistemes de *time-lapse* per identificar paràmetres morfocinètics que en un futur permetin seleccionar els embrions clonats amb més potencial de desenvolupament.

Cada vegada hi ha més informació sobre els esdeveniments epigenètics que tenen lloc durant la reprogramació nuclear i també es coneixen amb més detall les anomalies epigenètiques que presenten els embrions clonats (Dean *et al.* 2003; Mason *et al.* 2012). Conseqüentment, s'han desenvolupat estratègies per tal de corregir-les, com el tractament dels embrions clonats amb modificadors epigenètics, els quals afavoreixen la reprogramació nuclear i promouen uns perfils epigenètics en els embrions clonats més similars als dels embrions fecundats (Wakayama i Wakayama 2010). Però mentre que els HDACis han estat globalment incorporats al protocol de SCNT perquè han demostrat millorar la seva eficiència mitjançant l'increment general dels nivells d'acetilació de les histones, el paper positiu d'altres modificadors epigenètics com els DNMTis o els HMTis no és tant evident. A més, aquests modificadors epigenètics actuen a nivell de tot el genoma i, per tant, es desconeix mitjançant quins efectes concrets milloren la reprogramació nuclear. Per aquests motius, cal continuar investigant l'efecte dels modificadors epigenètics en la SCNT amb l'objectiu d'incrementar la seva especificitat i reduir-ne els efectes adversos, optimitzant així els tractaments i augmentant encara més l'eficiència de la SCNT que, malgrat les millores aconseguides, continua sent baixa.

En un primer treball, es varen voler ampliar els estudis sobre l'efecte del VPA en la SCNT en ratolí per tal d'investigar si concentracions més elevades i/o temps d'exposició més llargs als prèviament utilitzats (2 mM durant 8-9 h) incrementen l'efecte beneficiós d'aquest HDACi (Costa-Borges *et al.* 2010). Un increment en la concentració de VPA de 2 a 4 mM no va millorar les taxes de blastocists ni la qualitat d'aquests, però la prolongació del tractament de 8-9 h a 16 h va donar millors resultats en quant a la qualitat dels blastocists. Aleshores el tractament amb VPA 2 mM durant 16 h postactivació va ser emprat per estudiar l'efecte del VPA sobre la reprogramació nuclear i el desenvolupament a terme. Es va detectar un increment dels nivells d'acetilació de les histones al final del tractament i també una disminució dels nivells de metilació de les histones i del DNA a l'estadi de mòrula, però no es varen superar les taxes de naixement dels embrions tractats amb VPA durant 8-9 h aconseguides prèviament al nostre laboratori (Costa-Borges *et al.* 2010, 2011b). De nou es va obtenir un increment moderat del desenvolupament a terme (1,8 vegades), similar al descrit en el clonatge d'altres espècies com el porc (2 vegades) tractant els embrions amb VPA 1 mM durant 14-16 h postactivació (Huang

et al. 2011a). Al contrari del descrit en aquesta tesi en ratolí, concentracions més elevades (3-5 mM) i temps d'exposició més llargs (24-48 h postactivació) també han donat bons resultats en el porc i la vaca (Kim *et al.* 2011; Miyoshi *et al.* 2010; Song *et al.* 2014a; Xu *et al.* 2012). Aquests resultats apunten a què el ratolí sigui més sensible al VPA que aquestes espècies. Els HDACs exerceixen efectes inhibitoris sobre l'EGA (Ito *et al.* 2000) i per això aquestes diferències entre espècies podrien estar relacionades amb el moment en què es produeix l'EGA: en el ratolí té lloc a l'estadi de dues cèl·lules (Zuccotti *et al.* 2000) mentre que en el porc i en la vaca té lloc a l'estadi de quatre i vuit cèl·lules, respectivament (Camous *et al.* 1984; De Sousa *et al.* 1998; Hyttel *et al.* 2000). Per tant, cal destacar la importància d'acotar els protocols de tractament dels embrions amb modificadors epigenètics en cada espècie, evitant possibles efectes tòxics.

D'altra banda, es va voler testar per primera vegada l'efecte de la PsA en la reprogramació nuclear, ja que aquesta molècula no havia estat mai utilitzada en estudis de SCNT ni de iPSCs. En estudis amb cèl·lules cancerígenes, però, s'ha vist que incrementa els nivells d'acetilació d'histones i inhibeix la proliferació de diverses línies cel·lulars a concentracions nanomolars i amb una citotoxicitat baixa (Ahn *et al.* 2008; Kim *et al.* 2007a; Piña *et al.* 2003). A més, s'ha descrit que la PsA podria ser un inhibidor tant de les HDACs com de les DNMTs (Piña *et al.* 2003). Per tant, tenint en compte aquestes característiques, la PsA permetia testar els possibles avantatges d'una inhibició dual de les HDACs i les DNMTs sobre la reprogramació nuclear en la SCNT. Després de provar diverses concentracions i temps d'exposició sobre les taxes de desenvolupament *in vitro* i la qualitat dels blastocists resultants, es va veure que el tractament dels embrions clonats amb PsA 10 μ M durant 16 h postactivació incrementa les taxes de blastocists i la seva qualitat. Aleshores, es va utilitzar aquest tractament optimitzat per testar l'efecte de la PsA sobre la reprogramació nuclear i el desenvolupament a terme, i es va veure que la PsA incrementa els nivells d'acetilació de les histones a l'estadi d'una i dues cèl·lules, redueix els nivells de metilació de les histones i del DNA a l'estadi de mòrula, i dona lloc a un increment de 3,6 vegades en les taxes de naixement d'embrions clonats. La reducció dels nivells de metilació del DNA en els embrions clonats es va detectar només en les mòrules, no en els blastocists, i en proporcions similars en embrions tractats amb PsA o amb VPA. Per tant, probablement no es deu a un efecte DNMTi per part de la PsA sinó que és conseqüència de la hiperacetilació produïda per ambdues molècules, la qual es correlaciona negativament amb els nivells de metilació (Dobosy i Selker 2001). Aquesta observació dona suport a treballs recents on es posa en dubte l'activitat DNMTi de la PsA (Baud *et al.* 2012; García *et al.* 2011).

Pel que fa a l'optimització del període d'exposició de l'embrió clonat a l'HDACi, treballs previs en ratolí han demostrat que el tractament dels embrions abans, durant i/o després de l'activació partenogenètica millora el seu desenvolupament. L'any 2006, dos tipus de protocols varen ser publicats de manera independent amb l'HDACi TSA. Kishigami *et al.* (2006b) varen exposar els embrions a la TSA durant i/o després de l'activació partenogenètica, i varen obtenir els millors resultats amb un tractament que consistia en les 6 h d'activació i les 4 h del cultiu embrionari

posterior. En canvi, Rybouchkin *et al.* (2006) varen exposar els embrions a la TSA abans i/o durant l'activació partenogenètica i varen obtenir els millors resultats quan la TSA es trobava present 2-3 h abans de l'activació i durant aquesta. Des d'aleshores, s'han testat altres períodes d'exposició a l'HDACi en embrions de ratolí obtinguts mitjançant SCNT, la majoria també amb la TSA. Per exemple, Tsuji *et al.* (2009) varen aplicar la TSA abans i durant l'activació partenogenètica (2 h i 6 h, respectivament), i varen provar de prolongar el tractament durant el cultiu embrionari posterior a l'activació, trobant els millors resultats quan el tractament amb la TSA acabava amb l'activació. En canvi, Dai *et al.* (2010) varen demostrar que els beneficis del tractament amb CBHA es donaven quan aquest HDACi era present durant 4-6 h després de l'activació partenogenètica, i que la seva presència durant l'activació no era necessària. De forma similar, Kang i Roh (2011) varen aplicar la TSA només durant l'activació o durant l'activació i varies hores després i varen concloure que el millor tractament era el de les 6 h d'activació més 5 h del cultiu posterior. Però, malgrat la gran varietat de protocols testats en aquests estudis, en cap d'ells s'ha comparat directament el tractament previ a l'activació amb el posterior a aquesta per veure quin dels dos dona millors resultats. En un estudi realitzat al nostre laboratori, sí que es varen comparar aquests dos tipus de tractament amb la TSA i el VPA. Una exposició a VPA abans de l'activació i durant aquesta va donar millors resultats que una exposició durant l'activació i 2 h del cultiu posterior, però la concentració del HDACi emprada era diferent entre els dos tipus de tractament. Per tant, les diferències observades podien ser atribuïdes tant al període d'exposició com a la concentració del modificador epigenètic (Costa-Borges *et al.* 2010). En canvi, en aquesta tesi s'ha estudiat l'exposició dels embrions clonats a l'HDACi abans o després de l'activació partenogenètica, utilitzant una única concentració de VPA i PsA. Concretament, s'ha aplicat l'HDACi abans i durant l'activació partenogenètica (tractament de 8-9 h) o durant les 6 h d'activació més 10 o 18 h després d'aquesta (tractaments de 16 h i 24 h, respectivament). Tal i com s'ha explicat anteriorment, els millors resultats s'han obtingut amb el tractament de 16 h postactivació. Per tant, l'exposició dels embrions clonats al modificador epigenètic durant algunes hores posteriors a l'activació partenogenètica (en aquest cas, almenys 10 h quan s'utilitza la PsA i menys de 18 h quan s'utilitza el VPA) sembla més beneficiosa que la seva presència prèvia a l'activació. De fet, Rybouchkin *et al.* (2006) no varen observar una millora en el desenvolupament d'embrions clonats de ratolí tractats amb TSA només abans de l'activació partenogenètica.

Pel que fa a l'efecte dels HDACis sobre el nucli transferit, amb el tractament de 16 h a partir de l'inici de l'activació partenogenètica es permet que les HDAC de l'òocit exerceixi una acció inicial sobre el nucli somàtic (p. ex. pèrdua de H3K14ac), però s'inhibeix l'acció HDAC durant i després de l'activació, quan té lloc la replicació del DNA, la formació del(s) pronucli(s) i la transició cap a l'estadi de dues cèl·lules, amb el conseqüent increment en els nivells d'acetilació de les histones i la major obertura de la cromatina en aquest període (Kishigami *et al.* 2006b). Durant la replicació del DNA, l'estructura de la cromatina s'ha d'obrir i, per tant, els factors reprogramadors presents en l'òocit tenen més accés al DNA per activar els gens de pluripotència. De fet, la primera ronda de replicació del DNA es considera clau per a la

reprogramació nuclear (Wang *et al.* 2014). Tenint en compte que els HDACis exerceixen el seu efecte de millora de la reprogramació nuclear en aquest període, és possible que aquest efecte es degui a la major accessibilitat del genoma que proporcionen precisament en la primera ronda de replicació del DNA, la qual es traduiria en una millor activació dels gens embrionaris. Per exemple, els embrions clonats tractats amb HDACis assoleixen patrons de síntesi de nou mRNA (Bui *et al.* 2010; Van Thuan *et al.* 2009) i d'expressió gènica (Tsuji *et al.* 2009) comparables als dels embrions fecundats. A més, però, tal i com s'ha explicat, els HDACis són més beneficiosos quan s'apliquen no només durant l'activació partenogenètica, quan té lloc la replicació del DNA, sinó també durant unes hores després. Per tant, el seu efecte de millora de la reprogramació nuclear no només es produeix durant la fase S del primer cicle cel·lular, també en les fases posteriors prèvies a l'EGA que té lloc a l'estadi de dues cèl·lules. Les modificacions epigenètiques promogudes pels HDACis en aquest període també facilitarien una correcta EGA necessària pel desenvolupament dels embrions. Addicionalment, un estudi molt recent proposa que l'increment dels nivells d'acetilació de les histones promogut pel tractament amb HDACis també milloraria la reparació del DNA en les regions amb trencaments de doble cadena, i això es traduiria en un millor potencial de desenvolupament dels embrions clonats (Bohrer *et al.* 2014).

En realitzar els estudis amb PsA i VPA en paral·lel, es va poder observar que l'efecte de la PsA en la SCNT és més potent que el del VPA i dona millors resultats tant a nivell del desenvolupament *in vitro* com *in vivo*, probablement a causa d'un major increment en els nivells d'acetilació de les histones, el qual es correlaciona amb la potent acció HDACi de la PsA (Baud *et al.* 2012; Kim *et al.* 2007a; Piña *et al.* 2003). Alternativament, però, les diferències observades aquí entre l'efecte d'aquestes dues molècules també podrien ser degudes a l'acció que exerceixen sobre l'expressió gènica. Halsall *et al.* (2012) varen estudiar l'acció dels HDACis VPA, TSA i SAHA sobre l'expressió gènica d'una línia cel·lular humana de leucèmia i varen veure que afecten l'expressió de diferents conjunts de gens. Per tant, si el mateix tingués lloc en els embrions clonats, cada HDACi induiria uns canvis específics en l'expressió gènica que es podrien veure reflectits en les taxes de desenvolupament. Per últim, també cal tenir en compte que, a banda de la inhibició de les HDACs, tant la PsA com el VPA han estat relacionats amb la inhibició d'altres enzims. Per exemple, s'ha vist que la PsA exerceix un efecte sobre la topoisomerasa II (Kim *et al.* 1999a), la DNA girasa (Kim *et al.* 1999b) i la DNA polimerasa α -primasa (Jiang *et al.* 2004), tots tres enzims relacionats amb la replicació del DNA, la qual podria jugar un paper important en la reprogramació nuclear segons publicacions recents (Chia i Egli 2013; Wang *et al.* 2014). Finalment, en el cas del VPA, s'ha descrit que a més d'inhibir les HDACs, actua com a inhibidor de la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK3), la qual també ha estat relacionada amb processos de reprogramació nuclear (Isaji *et al.* 2013).

En altres estudis utilitzant HDACis per millorar l'eficiència de la SCNT, s'ha proposat que la inhibició de la classe IIb de HDACs (HDAC 6 i 10, però principalment 10) és molt important per incrementar les taxes de clonatge en la SCNT de ratolí (Ono *et al.* 2010; Wakayama i

Wakayama 2010). Els investigadors varen arribar a aquesta conclusió després d'examinar els efectes de 7 tipus de HDACs diferents (APHA, Oxamflatin, SAHA, Scriptaid, Sirtinol, TSA i VPA) en l'eficiència del clonatge de ratolins de la soca B6D2F1. De tots els HDACs testats, només els que afectaven a les classes I, IIa i IIb de HDAC milloraven les taxes de clonatge. Aquests autors no varen trobar un efecte de millora del desenvolupament dels embrions clonats per part del VPA, el qual és inhibidor de les classes I i IIa de HDAC (Gurvich *et al.* 2004), i per això varen destacar la importància d'inhibir les HDACs de classe IIb. Aquest resultat, però, no concorda amb els estudis en la soca de ratolí B6CBAF1 obtinguts en aquesta tesi i en un estudi anterior (Costa-Borges *et al.* 2010), ni amb els estudis realitzats en la mateixa soca de ratolí (B6D2F1) però tractant els embrions a partir de l'estadi de 4 cèl·lules (Isaji *et al.* 2013). Tampoc concorden amb els estudis amb VPA realitzats en clonatge d'embrions bovins i porcins (Kim *et al.* 2011; Huang *et al.* 2011a; Miyoshi *et al.* 2010; Song *et al.* 2014a; Xu *et al.* 2012). Així doncs, sembla que el VPA sí que exerceix un efecte positiu en la reprogramació nuclear. Les diferències observades en l'efecte del VPA en ratolí podrien ser degudes a la diferent sensibilitat als HDACs en funció de la soca (Wakayama i Wakayama 2010). Enlloc de la inhibició de la classe IIb, per a millorar la reprogramació nuclear i l'eficiència del clonatge podria ser més important la inhibició específica de la HDAC1 (classe I), ja que la majoria dels HDACs testats la inhibeixen fortament. Per exemple, tant el VPA com la PsA afecten específicament la HDAC1 (Baud *et al.* 2012; Gurvich *et al.* 2004). De fet, s'ha descrit que la HDAC1 és la principal HDAC que regula l'acetilació de les histones, l'expressió gènica i el desenvolupament en embrions preimplantacionals de ratolí (Ma i Schultz 2008).

En un segon treball, es varen testar els efectes de la VitC en la SCNT de ratolí. La VitC és coneguda des de fa molts anys per la seva acció antioxidant beneficiosa per reduir les espècies reactives d'oxigen (ROS) (Hu *et al.* 2012; Li *et al.* 2014; Wang *et al.* 2002) i l'apoptosi en els sistemes de cultiu (Hu *et al.* 2012; Jeong *et al.* 2006; Li *et al.* 2014), però estudis recents han demostrat que també actua com a modificador epigenètic. Concretament, en treballs realitzats en ESCs i en iPSCs s'ha vist que la VitC és un cofactor de les HDMs amb domini Jumoni i de les proteïnes TET, les quals tenen un paper important en la reprogramació nuclear (Blaschke *et al.* 2013; Chen *et al.* 2013b; Wang *et al.* 2011b; Yin *et al.* 2013). Conseqüentment, el tractament amb VitC redueix els nivells de metilació d'H3K9 (Chen *et al.* 2013c; Chung *et al.* 2010) i H3K36 (Wang *et al.* 2011b) i del DNA (Chung *et al.* 2010; Yin *et al.* 2013), facilitant l'expressió de gens de pluripotència en aquestes cèl·lules (Monfort i Wutz 2013). Alternativament, però, l'efecte de millora de les taxes d'obtenció de iPSCs també ha estat atribuït a un possible paper de la VitC en la via de la p53. Esteban *et al.* (2010) varen detectar una disminució dels nivells de p53 en iPSCs tractades amb VitC, no amb altres antioxidants, i varen postular que la VitC redueix la senescència cel·lular desencadenada per la p53 en la generació d'iPSCs i això facilita la seva reprogramació a cèl·lules pluripotents. Tenint en compte que la VitC podria actuar com a modificador epigenètic i com a reductor dels nivells de p53 simultàniament, és possible que la millora de la reprogramació nuclear en les iPSCs per part de la VitC es degui a ambdós mecanismes.

D'altra banda, en treballs realitzats en SCNT, s'ha vist que la VitC redueix l'apoptosi i millora les taxes de desenvolupament *in vitro* dels embrions clonats de porc (Chawalit *et al.* 2012; Jeong *et al.* 2006; Huang *et al.* 2011b; Kere *et al.* 2013). En canvi, sembla que no millora el desenvolupament dels embrions clonats d'altres espècies de mamífer com la vaca o el ratolí, sinó que l'afecta negativament (Lee *et al.* 2010; Li *et al.* 2014). En qualsevol cas, l'efecte de la VitC sobre el desenvolupament a terme dels embrions clonats és incert.

En aquesta tesi, embrions de ratolí obtinguts per SCNT es varen tractar amb VitC i es va obtenir una millora de les taxes de desenvolupament *in vitro* i de la qualitat dels blastocists a partir de les 16 h de tractament utilitzant una concentració de 100 µM. Per tant, a partir d'aquests resultats sembla que la VitC sí que millora el desenvolupament dels embrions clonats de ratolí, a diferència del que varen concloure Lee *et al.* (2010) en el seu treball. El resultat negatiu que varen obtenir aquests investigadors probablement es deu a l'elevada concentració de VitC que varen emprar (>500 µM). A més, es va voler comparar l'efecte de la VitC amb el de la PsA i es va veure que ambdues molècules incrementen el desenvolupament a terme de manera similar (3,9 i 3,1 %, respectivament). Fins ara, cap modificador epigenètic sense activitat HDACi havia donat tan bons resultats en l'eficiència del clonatge (vegeu els apartats 1.3.3 i 1.3.4). Curiosament, però, mentre que la PsA actua sobre el nucli transferit incrementant els nivells d'acetilació de les histones a l'estadi d'una i dues cèl·lules i reduint els de metilació de les histones i del DNA a l'estadi de mòrula, el tractament amb VitC no va alterar cap d'aquests paràmetres ni tampoc l'expressió dels gens *Nanog*, *Oct4* i *Cdx2*. De manera similar, Chawalit *et al.* (2012) tampoc varen detectar canvis en els nivells d'acetilació d'H3K9 i H3K14 i de metilació del DNA en embrions clonats de porc als estadis de dues i quatre cèl·lules i de blastocist. I tampoc varen veure una expressió diferent de *Nanog*, *Oct4*, *Cdx2* i *Sox2*, entre altres, en el blastocist. De fet, per això aquests autors varen atribuir la millora de les taxes de desenvolupament *in vitro* dels embrions clonats al paper antioxidant de la VitC.

Tot i que en aquesta tesi no s'ha pogut trobar un efecte de la VitC sobre cap dels marcadors de reprogramació nuclear estudiats, tenint en compte el gran increment de la taxa de desenvolupament a terme dels embrions clonats de ratolí quan són tractats amb VitC durant només 16 h postactivació, molt probablement la VitC no només estigui actuant com a antioxidant. El treball de Huang *et al.* (2011b), on es va concloure que incrementar la concentració o el temps d'exposició a la VitC no millora les taxes de desenvolupament dels embrions clonats de porc, i que cal tractar els embrions abans de les 24 h postfusió per observar un increment en les taxes de blastocist, també dóna suport a la idea que l'efecte de la VitC sobre la SCNT no només es deu a la seva acció antioxidant sinó que probablement actua sobre la reprogramació nuclear.

Per tal d'explicar les diferències observades entre l'efecte de la VitC sobre els nivells de metilació del DNA i de les histones en les iPSCs i en la SCNT, d'una banda, cal tenir en compte que és possible que la VitC sí que estigui exercint un efecte sobre els nivells de metilació de les histones i/o del DNA en els embrions clonats però les tècniques d'immunofluorescència emprades per analitzar-lo en aquesta tesi i en el treball de Chawali *et al.* (2012) no siguin prou sensibles per detectar-lo, ja que en la majoria dels estudis amb iPSCs, on si que s'ha vist aquest efecte, es varen utilitzar eines més sensibles com la immunoprecipitació o els arrays (Blaschke *et al.* 2013).

Una altra explicació és que s'ha vist que l'acció desmetiladora de la VitC es produeix en zones concretes del genoma que es metilen a partir de la implantació (Blaschke *et al.* 2013). Per tant, la reducció dels nivells de metilació del DNA només es detectaria en cèl·lules mare, no en embrions preimplantacionals. Blaschke *et al.* (2013) varen demostrar que l'efecte desmetilador de la VitC es produeix en regions que es troben hipermetilades en ESCs en comparació als blastocists, i no en regions amb uns nivells de metilació similars. A més, s'ha descrit que l'activitat de la HDM JMJD2C, potencialment incrementada per la VitC, té lloc principalment des de l'estadi de dues cèl·lules fins l'estadi de 8 cèl·lules en ratolí (Wang *et al.* 2010). Tenint en compte que en aquesta tesi es va analitzar la metilació de l'H3K9 en embrions que havien estat tractats durant només 16 h postactivació, abans de l'estadi de dues cèl·lules, també és possible que el tractament amb VitC aplicat no sigui prou llarg per veure canvis en els nivells de metilació de les histones. En aquests dos supòsits, la millora del potencial de desenvolupament dels embrions clonats per part de la VitC seria independent del seu paper com a modificador epigenètic. Per exemple, la VitC podria millorar el desenvolupament mitjançant una acció sobre la via p53, tal i com proposen Esteban *et al.* (2010) per les iPSCs. De fet, la inhibició de la p53 ha estat relacionada amb el manteniment de la pluripotència en ESCs (Lin *et al.* 2005; Xu 2005) i la millora de la reprogramació nuclear en iPSCs en múltiples estudis (Banito *et al.* 2009; Hanna *et al.* 2009; Hong *et al.* 2009; Kawamura *et al.* 2009; Lee *et al.* 2012) (revisat per Zhao i Xu 2010). A més, el treball de Miyamoto *et al.* (2011a), on l'anul·lació d'una proteïna essencial pel desenvolupament d'embrions clonats de porc (DJ-1) és rescatada per la inhibició de p53, dona suport al possible paper de la p53 en la reprogramació nuclear tant d'iPSCs com d'embrions obtinguts mitjançant SCNT. Tot i això, s'hauran de realitzar més estudis per tal de confirmar el presumpte paper de la VitC sobre les modificacions epigenètiques i la via de la p53 en els embrions clonats, i poder així explicar la millora en el potencial de desenvolupament dels embrions clonats tractats amb VitC.

Per últim, també es va voler determinar si la combinació de VitC i PsA resulta en un efecte positiu additiu, ja que, tal i com s'ha discutit, ambdues molècules possiblement milloren el desenvolupament dels embrions clonats mitjançant mecanismes diferents. D'altra banda, tenint en compte que s'ha descrit que cal que la PsA sigui reduïda per a què exerceixi el seu paper HDACi (Kim *et al.* 2007a), i que l'acció antioxidant de la VitC incrementa el poder reductor dels embrions (Wongsrikeao *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2010), el tractament combinat amb PsA i VitC

podria potenciar la reducció de la PsA per part de l'embrió, provocant conseqüentment una major activitat HDACi de la PsA. En comparació als resultats obtinguts tractant els embrions amb només PsA o VitC, no es va detectar un efecte additiu significatiu entre les dues molècules en cap dels paràmetres analitzats. Per tant, tot i que efectivament la VitC incrementa el poder reductor de l'embrió (es varen trobar nivells de GSH més elevats), sembla que ni l'acció HDACi de la PsA es veu limitada pel poder reductor de l'embrió ni la VitC potencia l'efecte HDACi de la PsA. De manera similar, Chawalit *et al.* (2012) tampoc varen detectar un efecte additiu entre TSA i la VitC en embrions clonats de porc. En canvi, Esteban *et al.* (2010) sí que varen detectar efectes additius entre el VPA i la VitC en l'obtenció d'iPSCs.

Per un altre costat, durant la realització de la SCNT l'oòcit ha de patir una sèrie de manipulacions com l'enucleació i la reconstrucció que poden afectar negativament la viabilitat del futur embrió. Malgrat la importància d'aquestes manipulacions, el protocol de SCNT ha experimentat molt pocs canvis en els últims anys (Wakayama *et al.* 1998). Recentment, però, s'ha vist que petites modificacions com l'ús de cafeïna, un inhibidor de les proteïnes fosfatases, durant l'enucleació i reconstrucció de l'oòcit per evitar la seva activació prematura en la SCNT en humans (Tachibana *et al.* 2013b), o la substitució de la CB per la LatA com a inhibidor de la polimerització dels filaments d'actina en la SCNT en porc (Himaki *et al.* 2010) i en ratolí (Terashita *et al.* 2012, 2013), han donat lloc a increments significatius en les taxes d'èxit.

Arran del coneixement dels avantatges de l'ús de LatA enlloc de CB en el desenvolupament a terme dels embrions clonats de ratolí de la soca B6D2F1 tractats amb TSA (Terashita *et al.* 2012, 2013), en aquesta tesi es va voler determinar si l'efecte beneficiós de la LatA també és evident en la soca B6CBAF1. Sorprenentment, es va obtenir un increment de gairebé 3 vegades en la taxa de naixement dels embrions tractats amb PsA en el primer treball d'aquesta tesi simplement canviant la CB per la LatA durant la micromanipulació i activació dels oòcits. Per això, en el segon treball, es va decidir investigar si els efectes beneficiosos de la LatA en el desenvolupament a terme d'aquests embrions es podien detectar també en el desenvolupament *in vitro* i en els embrions no tractats o tractats amb altres tipus de modificadors epigenètics com la VitC.

D'una banda, es va veure que l'ús de LatA enlloc de CB també incrementa les taxes de desenvolupament *in vitro*, però mentre que aquest increment és significatiu en els embrions no tractats amb modificadors epigenètics, en el cas dels embrions tractats l'efecte de millora és moderat (VitC) o nul (PsA). D'altra banda, es va veure que quan la LatA no es combina amb un modificador epigenètic el desenvolupament a terme és similar a aquell que s'obté quan s'utilitza CB (0-0,5 %). Els nivells d'acetilació de les histones, de metilació del DNA i de les histones i d'expressió dels gens de pluripotència *Oct4* i *Nanog* dels embrions no tractats amb modificadors epigenètics generats amb LatA tampoc són més similars als dels embrions fecundats que quan s'utilitza CB. Per tant, sembla que la LatA per si sola no té un efecte sobre la reprogramació nuclear ni el desenvolupament a terme dels embrions clonats. En canvi, quan

s'apliquen tractaments amb HDACis sí que s'observen canvis entre els embrions clonats generats amb LatA o amb CB. Tal i com hem vist, el desenvolupament a terme dels embrions tractats amb TSA (Terashita *et al.* 2012) i amb PsA (primer treball d'aquesta tesi) és molt superior quan s'utilitza LatA. A més, la PsA incrementa l'expressió de *Nanog* i *Oct4* en els blastocists tractats en comparació als no tractats quan s'utilitza LatA, però no quan s'utilitza CB, i això explica les diferències observades entre el primer i el segon estudi d'aquesta tesi en quant a l'efecte de la PsA sobre l'expressió d'aquests gens de pluripotència. En canvi, no s'han detectat canvis en l'efecte de la PsA sobre les modificacions epigenètiques estudiades en funció de si s'utilitza LatA o CB. De manera similar, Terashita *et al.* (2013) tampoc varen detectar canvis en l'acetilació o la metilació de les histones entre els embrions clonats tractats amb TSA generats amb CB o LatA, i en aquest estudi la LatA tampoc va corregir les placentes anormals dels clons generats amb CB. Globalment, sembla que la LatA no afecta les marques epigenètiques, però sí l'expressió dels gens de pluripotència i el desenvolupament a terme dels embrions clonats tractats amb HDACis. Aquests resultats fan pensar que podria haver-hi un efecte sinèrgic entre el tractament amb HDACi i l'ús de LatA en la SCNT. Pel que fa a la combinació de l'ús de LatA i el tractament dels embrions clonats amb altres modificadors epigenètics com la VitC, amb els treballs realitzats en aquesta tesi només es pot comparar el desenvolupament *in vitro* dels embrions tractats amb VitC generats amb CB o LatA. Les modificacions epigenètiques, l'expressió de gens de pluripotència i el desenvolupament a terme dels embrions tractats amb VitC només s'han estudiat en els generats amb LatA, no amb CB. Tot i això, el fet que la LatA incrementi l'expressió de gens de pluripotència en els embrions tractats amb PsA, però no amb VitC, dona suport a la idea que aquestes dues molècules milloren el desenvolupament dels embrions clonats mitjançant mecanismes diferents.

En aquesta tesi no s'ha aprofundit en els mecanismes que podrien explicar la millora del potencial de desenvolupament dels embrions clonats per part de la LatA i el seu efecte sinèrgic amb els HDACis. Altres autors han demostrat que la LatA corregeix la distribució anormal de la F-actina en embrions clonats de ratolí tractats amb TSA, la qual cosa resulta en una menor incidència de segregacions cromosòmiques anormals i un major desenvolupament a terme dels embrions (Terashita *et al.* 2013). Però val a dir que a la bibliografia s'ha descrit recentment la presència d'una actina nuclear molt dinàmica, la concentració i polimerització de la qual estan estretament controlades durant la progressió del cicle cel·lular (Baarlink and Grosse, 2014). Aquesta actina nuclear també s'ha trobat en la vesícula germinal i en el nucli transferit d'oòcits de *Xenopus*, i s'ha vist que la seva polimerització és imprescindible per la reprogramació transcripcional d'*Oct4* per part de l'oòcit, ja que el tractament d'aquest amb els inhibidors de la polimerització d'actina CB o LatA impedeix la reactivació d'*Oct4*. Per tant, és probable que l'actina nuclear jugui un paper molt important en l'activació transcripcional dels gens de pluripotència durant la SCNT (Miyamoto *et al.* 2011b). Tenint en compte que s'ha descrit una major reversibilitat en la inhibició de la polimerització dels filaments d'actina exercida per la LatA en comparació amb la CB (Terashita *et al.* 2012), la LatA podria afavorir el paper dels HDACis sobre la reprogramació nuclear mitjançant una inhibició de l'actina nuclear durant

menys temps en comparació a la CB. Tot i això, caldrà realitzar més estudis per investigar si l'actina nuclear està involucrada en l'acció dels HDACis sobre el nucli transferit i si la LatA, a més de disminuir les segregacions cromosòmiques anormals (Terashita *et al.* 2013), interfereix en aquest procés.

En conjunt, amb la utilització de modificadors epigenètics i de la LatA, hem aconseguit incrementar l'eficiència de la SCNT en la soca de ratolí B6CBAF1 del 0-0,5 % en embrions no tractats al 3-5 % en embrions tractats, superant les taxes de naixement obtingudes en aquesta soca amb altres modificadors epigenètics com la TSA (Costa-Borges *et al.* 2010; Maalouf *et al.* 2009). Malgrat les millores aconseguides, però, les taxes de naixement continuen sent baixes. A més, cap dels quatre tractaments amb modificadors epigenètics testats ni l'ús de LatA enlloc de CB en aquesta tesi no corregeixen el major pes que presenten tant les cries com les placentes respecte els controls fecundats. De fet, es tracta d'una característica dels animals clonats (Chavatte-Palmer *et al.* 2012; Eggan *et al.* 2001; Palmieri *et al.* 2008) que de moment no s'ha pogut corregir amb cap modificació del protocol. És molt probable que les anomalies que presenten els clons en els teixits placentaris siguin les responsables de l'elevada mortalitat observada a partir de la implantació (Yang *et al.* 2007b). Per tant, la normalització de les placentes suposa un gran repte pel futur que podria resoldre finalment els problemes associats al desenvolupament a terme dels embrions clonats.

Recentment, la disponibilitat de sistemes de *time-lapse* per fer un seguiment del desenvolupament embrionari a l'interior de l'incubador, sense afectar negativament la viabilitat dels embrions, ha permès l'establiment de nous mètodes de caracterització de la qualitat embrionària basats en paràmetres morfocinètics. Es tracta d'una metodologia molt més precisa i sensible que les avaluacions periòdiques de la morfologia embrionària realitzades puntualment al microscopi invertit fora de l'incubador, i permet la detecció d'esdeveniments dinàmics com la reabsorció de fragments, les divisions citoplasmàtiques, etc. sense alternar les condicions de cultiu. Aquesta metodologia ha permès introduir nous marcadors de qualitat embrionària basats en paràmetres cinètics, com la durada de les divisions cel·lulars o d'un estadi embrionari concret, que suposen noves eines per a la predicció de la viabilitat de l'embrió molt poc invasives (Kirkegaard *et al.* 2012). Per exemple, en embrions humans fecundats s'ha vist que les primeres divisions embrionàries tenen un alt valor predictiu per seleccionar precoçment els embrions amb més potencial de desenvolupament sense haver d'allargar-ne el cultiu *in vitro*; i també s'han pogut correlacionar certes anomalies en la cinètica de divisió amb la presència d'aneuploidies (Aparicio *et al.* 2013). De moment, els sistemes de *time-lapse* han estat incorporats a la majoria de clíniques de reproducció assistida i han significat una millor selecció dels embrions humans fecundats (Findikli i Oral 2014). En canvi, molts pocs estudis han caracteritzat els paràmetres morfocinètics dels embrions clonats, i es desconeix l'efecte del tractament amb modificadors epigenètics sobre la seva cinètica de desenvolupament. L'aplicació de la metodologia de *time-lapse* per a la selecció dels embrions clonats amb més potencial de desenvolupament podria millorar les taxes de naixement per

embrió transferit o de derivació de línies de ntESCs per embrió sembrat (Balbach *et al.* 2012; Mizutani *et al.* 2012).

En el darrer estudi d'aquesta tesi es varen voler investigar les característiques morfocinètiques dels embrions generats per SCNT en comparació als embrions control fecundats. En primer lloc cal destacar que, si bé els sistemes de monitorització emprats en altres estudis han resultat en una disminució del potencial de desenvolupament dels embrions analitzats (Balbach *et al.* 2012; Mizutani *et al.* 2012) degut a l'elevada sensibilitat dels embrions clonats a les condicions de cultiu *in vitro* (Gao *et al.* 2003), el sistema utilitzat en el present estudi (PrimoVision™) no va afectar negativament la viabilitat dels dos tipus d'embrions estudiats (ICSI i SCNT). En segon lloc, es varen detectar múltiples diferències en la cinètica de desenvolupament dels embrions estudiats. Principalment, els embrions clonats es desenvolupen més a poc a poc que els fecundats a partir de la segona divisió (de dues a tres cèl·lules), i aquest retard es manté fins la compactació, moment en què presenten un menor nombre de cèl·lules. Aquest retard en el desenvolupament podria estar associat a la major incidència d'anomalies en el nucli dels embrions clonats, que dificultaria el progrés de les divisions cel·lulars, doncs s'ha descrit una presència elevada d'aberracions cromosòmiques numèriques i estructurals (Osada *et al.* 2009) i una distribució anormal dels cromosomes en la placa metafàsica (Kawasumi *et al.* 2007; Yu *et al.* 2007b) en embrions clonats. Però malgrat aquesta hipòtesi no es pot descartar, Mizutani *et al.* (2012) varen demostrar que els embrions clonats amb segregacions cromosòmiques anormals no mostren alteracions en la morfologia ni en la cinètica de desenvolupament.

Els embrions clonats han d'experimentar una extensa reprogramació nuclear durant les primeres hores del desenvolupament embrionari per a què els patrons de modificacions epigenètiques, de replicació del DNA i d'expressió gènica del nucli somàtic transferit siguin substituïts per uns de tipus embrionari i l'EGA es doni correctament (Fulka *et al.* 2004b; Gurdon i Wilmut 2011). Per això, el desenvolupament més lent que presenten els embrions clonats també podria estar relacionat amb aquests processos. D'una banda, donat que existeixen grans diferències entre la naturalesa epigenètica del nucli somàtic i del nucli del zigot, comparat amb els embrions fecundats, en els embrions clonats s'han de donar molts més canvis durant la reprogramació nuclear que podrien requerir més temps i, per exemple, donar lloc a un retard en l'inici de la replicació del DNA de la primera fase S. Però a diferència dels nivells d'acetilació i metilació de les histones i de metilació del DNA que no es reprogramen correctament (vegeu l'apartat 1.2.3.), sembla que els mecanismes moleculars que controlen la replicació del DNA són reprogramats fàcilment durant la SCNT i no es detecten diferències en el patró temporal de replicació del DNA entre els embrions fecundats i els embrions clonats (Shufaro *et al.* 2010). En concordança, en el nostre treball no es varen detectar diferències en el moment de la primera divisió embrionària entre els embrions fecundats i els clonats. D'altra banda, encara que la replicació del DNA no es doni de forma retardada, és possible que l'EGA sí que tingui lloc més tard i aquest sigui el motiu pel qual els embrions clonats s'endarrereixen a partir de l'estadi de dues cèl·lules. Per últim, una EGA a temps però defectuosa (Vassena *et al.* 2007b), també

podria explicar el retard observat. Per exemple, sembla que els embrions clonats de ratolí podrien presentar una expressió deficient de factors mitogènics (Dadi *et al.* 2006), la qual dificultaria la progressió del cicle cel·lular i es detectarien alteracions en la seva cinètica de desenvolupament. En embrions humans fecundats, s'ha demostrat que una menor expressió de gens associats a la citocinesi afecta la cinètica de desenvolupament (Wong *et al.* 2010).

Pel que fa al moment del desenvolupament en què es produeix la compactació de l'embrió, es va detectar que la majoria dels embrions clonats compacten molt abans d'assolir l'estadi de vuit cèl·lules, concretament, presenten una mediana de 4 cèl·lules en el moment d'inici de la compactació. En canvi, els embrions fecundats compacten majoritàriament a l'estadi de 8 cèl·lules, malgrat que una minoria ho fa a l'estadi de 6-7 cèl·lules (mediana 8 cèl·lules). Davant d'aquest resultat, es podria pensar que l'inici de la compactació té lloc en el moment cronològic adequat en els embrions clonats, però que degut al seu desenvolupament retardat, a l'hora de compactar han realitzat menys divisions cel·lulars i per això presenten un menor nombre de cèl·lules. No obstant, es va observar que els embrions que compacten abans de l'estadi de vuit cèl·lules compacten cronològicament abans que els embrions que ho fan a l'estadi de vuit cèl·lules. Tenint en compte que sembla que el moment en què es produeix la compactació podria estar marcat per les rondes de replicació del DNA o de divisió del nucli que ha experimentat l'embrió (Kojima *et al.* 2014), i aquesta correlació no es va detectar en la majoria dels embrions clonats, molt probablement els mecanismes moleculars que controlen l'inici de la compactació no es reprogramin correctament en aquests embrions. En canvi, en comparar el moment d'inici de la compactació entre els embrions clonats i els fecundats de només aquells embrions que varen compactar a l'estadi de 8 cèl·lules, es va detectar un retard en els embrions clonats, d'acord amb el seu desenvolupament retardat. A més, aquests embrions varen presentar més viabilitat, en concordança amb una hipotètica millor reprogramació nuclear. Alternativament, es podrien haver donat rondes de replicació o de cariocinesi sense citocinesi en la majoria dels embrions clonats que expliquessin la compactació prèvia a l'estadi de vuit cèl·lules, tal i com s'ha proposat en embrions humans fecundats (Iwata *et al.* 2014). Però el fet que s'hauria de tractar d'un fenomen molt freqüent i en canvi no es va observar multinucleació en els blastòmers dels embrions analitzats, resta credibilitat a aquesta hipòtesi. Tot i això, caldrà a aprofundir en els mecanismes que controlen l'inici de la compactació embrionària i estudiar el funcionament d'aquests mecanismes en els embrions clonats per poder explicar aquesta compactació prèvia a l'estadi de vuit cèl·lules.

En aquest tercer treball, a més, es varen escollir els tractaments amb PsA 10 μ M i VitC 100 μ M durant 16 h utilitzant LatA com a inhibidor de la polimerització d'actina, els quals havien donat els millors resultats en els treballs anteriors, per veure si també incrementaven l'eficiència de derivació de ntESCs i si tenien algun efecte en els paràmetres morfocinètics dels embrions clonats. Tenint en compte que els modificadors epigenètics, sobretot els HDACis, han estat globalment incorporats a la SCNT (Ogura *et al.* 2013; Wakayama i Wakayama 2010), és important conèixer el seu efecte sobre la cinètica de desenvolupament si aquesta es vol emprar

com a eina de caracterització i de predicció de la qualitat embrionària, i fins ara cap estudi ha tractat aquest tema. Per un costat, es varen obtenir unes taxes de desenvolupament *in vitro* dels embrions tractats amb PsA i VitC lleugerament superiors als embrions no tractats, però estadísticament iguals, reproduint els resultats obtinguts en el segon treball d'aquesta tesi i confirmant que l'efecte de millora del desenvolupament *in vitro* dels embrions clonats per part de la LatA és més fort en els embrions no tractats amb modificadors epigenètics, i dilueix les diferències observades quan s'utilitza CB. Pel que fa a la derivació de ntESCs, es va observar que ambdós tractaments incrementen l'obtenció de línies de ntESCs, tot i que les diferències només són estadísticament significatives en el cas de la VitC. Les eficiències de derivació de línies de ntESCs obtingudes amb els tractaments amb PsA (31,0 %) i VitC (40,0 %) són molt superiors a les de naixement de cries clonades (3,1 % i 3,9 %, respectivament). Per tant, amb aquests resultats es confirma l'observació general que el clonatge terapèutic és aproximadament 10 vegades més eficient que el clonatge reproductiu (Wakayama i Wakayama 2010). De forma similar, altres modificadors epigenètics també incrementen les taxes de derivació de ntESCs en altres soques de ratolí (TSA i CBHA) (Dai *et al.* 2010), o han facilitat l'obtenció de ntESCs humanes (scriptaid i nch-51) (Tachibana *et al.* 2013; Yamada *et al.* 2014). Tot i que en el segon i en el tercer treball d'aquesta tesi, on s'han comparat directament els resultats obtinguts amb PsA i VitC, no s'han trobat diferències estadísticament significatives entre ambdues molècules en la millora de les taxes de desenvolupament a terme i de derivació de línies de ntESCs, val a dir que en ambdós casos els resultats obtinguts amb la VitC han estat més elevats. Per tant, en un futur els HDACis podrien ser substituïts per altres tipus de modificadors epigenètics, com la VitC, amb gran potencial en la millora de l'eficiència de la SCNT.

Si bé tant la PsA com la VitC milloren el desenvolupament dels embrions clonats i la derivació de línies de ntESCs, els seu efecte sobre la cinètica de desenvolupament dels embrions tractats és oposat. D'una banda, el tractament amb PsA accentua el retard en el desenvolupament dels embrions clonats. En aquests embrions la desaparició dels pronuclis es dona més tard i, tot i que el moment en el qual té lloc la primera divisió no es veu alterat, la durada de l'estadi de dues cèl·lules és més llarg i a partir d'aleshores el retard es manté fins l'estadi de set cèl·lules. El motiu d'aquestes alteracions en la cinètica de desenvolupament no ha estat investigat en aquesta tesi però a continuació es plantegen algunes hipòtesis. Per exemple, el fet que la PsA provoqui un retard en la desaparició dels pronuclis podria estar relacionat amb un efecte sobre la replicació del DNA. En principi, un increment dels nivells d'acetilació de les histones a prop dels orígens de replicació promou l'inici d'aquesta (Vogelauer *et al.* 2002) i, en concordança, els embrions clonats de ratolí tractats amb TSA inicien la replicació abans (Bui *et al.* 2010). Però atès que s'ha descrit que la PsA inhibeix la replicació del DNA, a concentracions més elevades que en aquesta tesi (Jiang *et al.* 2004), el retard observat en la desaparició dels pronuclis podria ser degut a un retard en la fase S del primer cicle cel·lular, quan els embrions estan exposats a la PsA. Per tant, es tractaria d'un efecte específic d'aquest HDACi. Pel que fa al retard observat a partir de l'estadi de dues

cèl·lules, altres treballs han descrit de forma més general que els embrions tractats amb HDACis presenten un retard en el desenvolupament (Li *et al.* 2008a; Vermilyea *et al.* 2009) o que els HDACis promouen una progressió del cicle cel·lular més lenta en diverses línies cel·lulars (Halsall *et al.* 2012; Phiel *et al.* 2001). Per tant, es podria tractar d'un efecte comú als HDACis i que estaria relacionat amb la seva acció sobre la reprogramació nuclear, la qual, tal i com s'ha explicat, podria estar provocant el retard que presenten els embrions clonats en comparació als fecundats. No obstant, s'haurà d'analitzar amb més detall l'acció d'altres HDACis per veure si provoquen unes alteracions similars en la cinètica de desenvolupament dels embrions obtinguts mitjançant SCNT. Si fos així, això suposaria un gran avantatge perquè es podria establir un model general de desenvolupament *in vitro* per a tots els embrions clonats tractats amb HDACis. Si, per contra, el retard a partir de l'estadi de dues cèl·lules també fos específicament provocat per la PsA, caldria investigar-ne els motius i aprofundir en l'acció d'aquesta molècula sobre el desenvolupament embrionari.

Al contrari que amb la PsA, en els embrions tractats amb VitC la desaparició dels pronuclis té lloc abans i aquests es desenvolupen més ràpid que els no tractats, sobretot a partir de l'estadi de quatre cèl·lules. Globalment, la seva cinètica de desenvolupament és més similar a la dels embrions fecundats. Tenint en compte que s'ha descrit que els embrions fecundats de ratolí es desenvolupen més ràpidament en concentracions baixes d'oxigen (Wale i Gardner 2010), aquest efecte accelerador podria ser degut a l'acció antioxidant de la VitC. Alternativament, el seu potencial paper com a modificador epigenètic en els embrions clonats també podria estar afectant la cinètica de desenvolupament. Per exemple, s'ha descrit que la HDM Jhdm1b, l'activitat de la qual és potenciada per la VitC en iPSCs, accelera la progressió del cicle cel·lular en aquestes cèl·lules (Wang *et al.* 2011b). A més, una millor reprogramació nuclear podria resultar en una EGA a temps o menys defectuosa, amb un patró d'expressió de gens involucrats en la progressió del cicle cel·lular més similar al dels embrions fecundats, i això podria explicar el menor retard observat en els embrions clonats tractats amb VitC i la major similitud que presenten amb els embrions fecundats. Per últim, s'ha descrit que la inhibició de la via p53 augmenta la taxa de divisió de la cèl·lula somàtica i n'accelera la cinètica de conversió a iPSCs (Hanna *et al.* 2009). Si la VitC també tingués un efecte sobre la via de p53 en els embrions clonats, això també podria explicar l'acceleració observada. De nou, caldrà realitzar estudis de *time-lapse*, per exemple amb altres antioxidants, i aprofundir en el paper de la VitC en els embrions generats mitjançant SCNT per elucidar aquesta qüestió.

Finalment, en aquest tercer treball es va fer també un estudi estadístic per detectar quins paràmetres morfocinètics permeten predir el desenvolupament dels embrions clonats fins l'estadi de blastocist o l'establiment de línies ntESCs. Altres investigadors han utilitzat amb èxit la cinètica de desenvolupament per predir la viabilitat dels embrions de ratolí generats mitjançant SCNT però, com s'ha comentat anteriorment, en aquests estudis el sistema de *time-lapse* emprat afectava negativament el potencial de desenvolupament dels embrions (Balbach *et al.* 2012; Mizutani *et al.* 2012). Per tant, en realitat les taxes de desenvolupament *in vitro* i *in*

vivo que varen aconseguir eren inferiors a les obtingudes en absència de monitorització. En el nostre treball es va determinar que els embrions que es desenvolupen més ràpid tenen més probabilitat d'arribar fins l'estadi de blastocist, ja siguin embrions fecundats o clonats tractats o no amb modificadors epigenètics. Concretament, el moment en què s'acaba la tercera divisió, cap a l'estadi de quatre cèl·lules, és un bon predictor del potencial de desenvolupament, tot i que el valor classificador d'aquesta variable i la potència de la predicció varien en funció de la naturalesa dels embrions. A més, afegint altres variables, com la durada de la compactació i/o la presència de fragmentació, al model predictiu basat en el final de la tercera divisió, es poden aconseguir models predictius encara millors en tots els grups estudiats. En canvi, no es varen poder detectar diferències significatives en els paràmetres morfocinètics dels blastocists en funció de si donen lloc o no a línies de ntESCs. La causa d'aquesta manca de significació és probablement una mida mostral insuficient, ja que sí que es varen observar algunes tendències que possiblement serien significatives en mostres més grans. Per exemple, en els embrions clonats tractats amb PsA o VitC, on la mostra és més gran perquè es varen obtenir més línies de ntESCs, sembla que un retard en l'estadi de cinc cèl·lules o en la sisena divisió (cap a l'estadi de set cèl·lules), respectivament, podria afavorir la derivació de línies de ntESCs. Els resultats obtinguts en aquesta tesi són similars als obtinguts en l'únic estudi on s'ha investigat la cinètica de desenvolupament d'embrions clonats en funció de si donen lloc a blastocists o a línies ntESCs (Balbach *et al.* 2012), tot i que el moment fixat com a temps zero és diferent (final de l'activació vs. desaparició dels pronuclis en aquesta tesi) i el moment utilitzat per a la predicció del potencial de desenvolupament (segona divisió vs. tercera divisió en aquesta tesi) no coincideixen. En l'estudi de Balbach *et al.*, es va veure que els embrions clonats de la soca de ratolí B6C3F1 mostren un retard del desenvolupament en comparació als embrions fecundats a partir de la segona divisió, i que els embrions que en el moment de dividir-se a tres cèl·lules es classifiquen com a ràpids donen una major taxa de naixement, mentre que els més lents donen lloc a línies de ntESCs més eficientment. Tot i que la reprogramació nuclear és necessària tant pel clonatge reproductiu com pel clonatge terapèutic, és possible que els requisits epigenètics d'adquisició de la totipotència i la pluripotència siguin diferents (Ogura *et al.* 2013), i això es vegi reflectit en la cinètica de desenvolupament, però caldrà aprofundir molt més en els canvis epigenètics que tenen lloc durant la reprogramació nuclear per poder dilucidar aquesta qüestió.

En conclusió, és evident que els embrions generats mitjançant SCNT presenten unes característiques cinètiques pròpies i diferents de les dels embrions fecundats, i que la fidelitat amb la qual es produeix la reprogramació nuclear en aquests embrions es veu reflectida en la cinètica de desenvolupament. Per tant, molt probablement el seguiment per *time-lapse* permetria seleccionar els embrions clonats amb més potencial de desenvolupament en funció de les seves característiques morfocinètiques, incrementant així les taxes d'èxit obtingudes en la transferència d'embrions i la derivació de ntESCs. Tot i això, serà necessària la validació dels models de predicció del desenvolupament dels embrions clonats tractats o no amb modificadors epigenètics desenvolupats en aquesta tesi per determinar si s'adapten a altres

mostres d'embrions o a altres modificadors epigenètics. A més, caldrà veure si la predicció del desenvolupament fins l'estadi de blastocist mitjançant els criteris de selecció descrits en aquesta tesi també es pot traslladar al desenvolupament a terme, i confirmar si realment es donen les tendències observades en els embrions que donen lloc a línies de ntESCs.

Capítol

5

CONCLUSIONS

1. El tractament dels embrions clonats amb VPA 2 mM durant 16 h postactivació millora les taxes de desenvolupament *in vitro*, incrementa els nivells d'acetilació de les histones a l'estadi d'una cèl·lula i redueix els nivells de metilació de les histones i del DNA a l'estadi de mòrula.
2. El tractament dels embrions clonats amb PsA 10 µM durant 16 h postactivació millora les taxes de desenvolupament *in vitro* (només quan s'utilitza CB), incrementa els nivells d'acetilació de les histones als estadis d'una i de dues cèl·lules i redueix els nivells de metilació de les histones i del DNA a l'estadi de mòrula.
3. El tractament dels embrions clonats amb VitC 100 µM durant 16 h postactivació millora les taxes de desenvolupament *in vitro* (només quan s'utilitza CB), tot i que no s'ha observat cap efecte de millora en els marcadors de reprogramació analitzats.
4. Els tres tractaments amb VPA, PsA i VitC anteriors milloren el desenvolupament a terme dels embrions clonats (de 1,8 a 3,9 vegades). Incrementar el temps d'exposició dels embrions clonats al VPA a 16 h postactivació no millora les taxes de desenvolupament a terme obtingudes prèviament amb un tractament de 8-9 h postactivació. A més, la PsA i la VitC també milloren les taxes de derivació de línies de ntESCs (de 2 a 2,6 vegades).
5. La PsA i la VitC no tenen un efecte additiu en la reprogramació nuclear ni en el potencial de desenvolupament dels embrions clonats, ja que el tractament combinat amb ambdues molècules no millora els resultats obtinguts amb només PsA o VitC.
6. L'ús de LatA en el protocol de SCNT comporta un increment en les taxes de desenvolupament *in vitro* dels embrions clonats no tractats amb modificadors epigenètics respecte a l'ús de CB. En canvi, només millora el desenvolupament a terme si es combina amb l'ús de modificadors epigenètics.
7. Els embrions clonats presenten un retard en el desenvolupament preimplantacional a partir de l'estadi de dues cèl·lules que es manté fins la compactació, moment en el qual presenten menys cèl·lules que els embrions fecundats.
8. El tractament amb PsA accentua encara més el retard en la cinètica de desenvolupament dels embrions clonats. En canvi, el tractament amb VitC accelera el seu desenvolupament.
9. S'ha establert un model de predicció del desenvolupament fins l'estadi de blastocist dels embrions fecundats i clonats tractats o no amb modificadors epigenètics, el qual es basa en el moment de finalització de la tercera divisió cap a l'estadi de quatre cèl·lules, sol o combinat amb la durada de la compactació i/o la presència de fragmentació.

Capítol

6

BIBLIOGRAFIA

A

- Ahn, M.Y., Jung, J.H., Na, Y.J., and Kim, H.S. (2008). A natural histone deacetylase inhibitor, Psammaplin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 108, 27–33.
- Akagi, S., Matsukawa, K., Mizutani, E., Fukunari, K., Kaneda, M., Watanabe, S., and Takahashi, S. (2011). Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* 57, 120–126.
- Akagi, S., Geshi, M., and Nagai, T. (2013). Recent progress in bovine somatic cell nuclear transfer. *Anim. Sci. J.* 84, 191–199.
- Alberio, R., Brero, A., Motlík, J., Cremer, T., Wolf, E., and Zakhartchenko, V. (2001). Remodeling of donor nuclei, DNA-synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 371–379.
- Alberio, R., Johnson, A.D., Stick, R., and Campbell, K.H.S. (2005). Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by *Xenopus laevis* oocyte and egg cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 307, 131–141.
- Allen, W.R., and Pashen, R.L. (1984). Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J. Reprod. Fertil.* 71, 607–613.
- Aparicio, B., Cruz, M., and Meseguer, M. (2013). Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod. Biomed. Online* 27, 654–663.
- Arav, A., Aroyo, A., Yavin, S., and Roth, Z. (2008). Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and “shortest-half” analysis. *Reprod. Biomed. Online* 17, 669–675.
- Arias, M.E., Ross, P.J., and Felmer, R.N. (2013). Culture medium composition affects the gene expression pattern and in vitro development potential of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. *Biol. Res.* 46, 452–462.
- Augui, S., Nora, E.P., and Heard, E. (2011). Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat. Rev. Genet.* 12, 429–442.
- Awe, J.P., and Byrne, J.A. (2013). Identifying candidate oocyte reprogramming factors using cross-species global transcriptional analysis. *Cell. Reprogram.* 15, 126–133.

B

- Baarlink, C., and Grosse, R. (2014). Formin' actin in the nucleus. *Nucleus* 5, 1–6.
- Bagci, H., and Fisher, A.G. (2013). DNA demethylation in pluripotency and reprogramming: the role of tet proteins and cell division. *Cell Stem Cell* 13, 265–269.
- Baguisi, A., and Overstrom, E.W. (2000). Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 54, 209.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempes, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., et al. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17, 456–461.
- Balbach, S.T., Esteves, T.C., Brink, T., Gentile, L., McLaughlin, K.J., Adjaye, J. a, and Boiani, M. (2010). Governing cell lineage formation in cloned mouse embryos. *Dev. Biol.* 343, 71–83.
- Balbach, S.T., Esteves, T.C., Houghton, F.D., Siatkowski, M., Pfeiffer, M.J., Tsurumi, C., Kanzler, B., Fuellen, G., and Boiani, M. (2012). Nuclear reprogramming: kinetics of cell cycle and metabolic progression as determinants of success. *PLoS One* 7, e35322.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 23, 2134–2139.
- Bartolomei, M.S., and Ferguson-Smith, A.C. (2011). Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–17.

- Baud, M.G.J., Leiser, T., Haus, P., Samlal, S., Wong, A.C., Wood, R.J., Petrucci, V., Gunaratnam, M., Hughes, S.M., Buluwela, L., et al. (2012). Defining the mechanism of action and enzymatic selectivity of psammaplin A against its epigenetic targets. *J. Med. Chem.* 55, 1731–1750.
- Beaujean, N. (2014). Histone post-translational modifications in preimplantation mouse embryos and their role in nuclear architecture. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 100–112.
- Beebe, L.F.S., McIlpatrick, S.J., and Nottle, M.B. (2009). Cytochalasin B and trichostatin a treatment postactivation improves in vitro development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cloning Stem Cells* 11, 477–482.
- 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. *Biol. Reprod.* 77, 384–394.
- Beyhan, Z., Lager, A.E., and Cibelli, J.B. (2007). Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell* 1, 502–512.
- Biggers, J.D., McGinnis, L.K., and Raffin, M. (2000). Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol. Reprod.* 63, 281–293.
- Black, J.C., Van Rechem, C., and Whetstone, J.R. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell* 48, 491–507.
- Blackwell, L., Norris, J., Suto, C.M., and Janzen, W.P. (2008). The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases. *Life Sci.* 82, 1050–1058.
- Blaschke, K., Ebata, K.T., Karimi, M.M., Zepeda-Martínez, J. a, Goyal, P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D.J., Hirst, M., Rao, A., et al. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 500, 222–226.
- Blelloch, R., Wang, Z., Meissner, A., Pollard, S., Smith, A., and Jaenisch, R. (2006). Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* 24, 2007–2013.
- Bohrer, R.C., Duggavathi, R., and Bordignon, V. (2014). Inhibition of histone deacetylases enhances DNA damage repair in SCNT embryos. *Cell Cycle* 13, 2138–2148.
- Boiani, M., Eckardt, S., Schöler, H.R., and Mclaughlin, K.J. (2002). Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 16, 1209–1219.
- Boiani, M., Gentile, L., Gambles, V. V, Cavaleri, F., Redi, C.A., and Schöler, H.R. (2005). Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments. *Stem Cells* 23, 1089–1104.
- Bortvin, A., Egan, K., Skaletsky, H., Akutsu, H., Berry, D.L., Yanagimachi, R., Page, D.C., and Jaenisch, R. (2003). Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130, 1673–1680.
- Bourc'his, D., Le Bourhis, D., Patin, D., Niveleau, A., Comizzoli, P., Renard, J.P., and Viegas-Péquignot, E. (2001). Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr. Biol.* 11, 1542–1546.
- Brambrink, T., Hochedlinger, K., Bell, G., and Jaenisch, R. (2006). ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 933–938.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2, 151–159.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38, 455–463.
- Briggs, R., and King, T.J. (1957). Changes in the nuclei of differentiating endoderm cells as revealed by nuclear transplantation. *J. Morphol.* 100, 269–311.
- Brook, F.A., and Gardner, R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5709–5712.

- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D., L'Huillier, P., and Laible, G. (2003). Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat. Biotechnol.* 21, 157–162.
- Bru, T., Clarke, C., McGrew, M.J., Sang, H.M., Wilmut, I., and Blow, J.J. (2008). Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp. Cell Res.* 314, 2634–2642.
- Bui, H.-T., Wakayama, S., Kishigami, S., Kim, J.-H., Van Thuan, N., and Wakayama, T. (2008). The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development* 135, 3935–3945.
- Bui, H.-T., Wakayama, S., Kishigami, S., Park, K.-K., Kim, J.-H., Thuan, N. Van, and Wakayama, T. (2010). Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 83, 454–463.
- Bui, H.-T., Kwon, D.-N., Kang, M.-H., Oh, M.-H., Park, M.-R., Park, W.-J., Paik, S.-S., Van Thuan, N., and Kim, J.-H. (2012). Epigenetic reprogramming in somatic cells induced by extract from germinal vesicle stage pig oocytes. *Development* 139, 4330–4340.
- Burgin, E. (2009). Deciding on human embryonic stem cell research. *Politics Life Sci.* 28, 3–16.
- Burton, A., and Torres-Padilla, M.-E. (2010). Epigenetic reprogramming and development: a unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo. *Brief. Funct. Genomics* 9, 444–454.
- Byrne, J. (2011). Global transcriptional analysis of oocyte-based and factor-based nuclear reprogramming in the nonhuman primate. *Cell. Reprogram.* 13, 473–481.
- Byrne, J.A., Simonsson, S., Western, P.S., and Gurdon, J.B. (2003). Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr. Biol.* 13, 1206–1213.
- Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497–502.

C

- Calloni, R., Cordero, E.A.A., Henriques, J.A.P., and Bonatto, D. (2013). Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev.* 22, 1455–1476.
- Camous, S., Heyman, Y., Méziou, W., and Ménézou, Y. (1984). Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.* 72, 479–485.
- Campbell, K.H.S., and Alberio, R. (2003). Reprogramming the genome: role of the cell cycle. *Reprod. Suppl.* 61, 477–494.
- Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64–66.
- Campbell, K.H.S., Alberio, R., Choi, I., Fisher, P., Kelly, R.D.W., Lee, J.-H., and Maalouf, W. (2005). Cloning: eight years after Dolly. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 256–268.
- Campbell, K.H.S., Fisher, P., Chen, W.C., Choi, I., Kelly, R.D.W., Lee, J.-H., and Xhu, J. (2007). Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S214–31.
- Cantone, I., and Fisher, A.G. (2013). Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 282–289.
- Cao, Z., Zhou, N., Zhang, Y., Zhang, Y., Wu, R., Li, Y., Zhang, Y., and Li, N. (2014). Dynamic reprogramming of 5-hydroxymethylcytosine during early porcine embryogenesis. *Theriogenology* 81, 496–508.
- Capecchi, M.R. (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* 6, 507–512.
- Caulfield, T., Scott, C., Hyun, I., Lovell-Badge, R., Kato, K., and Zareczny, A. (2010). Stem cell research policy and iPS cells. *Nat. Methods* 7, 28–33.

- Cavaleri, F.M., Balbach, S.T., Gentile, L., Jauch, A., Böhm-Steuer, B., Han, Y.-M., Schöler, H.R., and Boiani, M. (2008). Subsets of cloned mouse embryos and their non-random relationship to development and nuclear reprogramming. *Mech. Dev.* 125, 153–166.
- Chang, C.-C., Ma, Y., Jacobs, S., Tian, X.C., Yang, X., and Rasmussen, T.P. (2005). A maternal store of macroH2A is removed from pronuclei prior to onset of somatic macroH2A expression in preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 278, 367–380.
- Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L., and Torres, I. (1989). An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 86, 679–688.
- Chavatte-Palmer, P., Camous, S., Jammes, H., Le Cleac'h, N., Guillomot, M., and Lee, R.S.F. (2012). Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta* 33 Suppl, S99–S104.
- Chawalit, S., Nguyen, N.T., Tseng, J.-K., Lo, N.-W., Tu, C.-F., and Ju, J.-C. (2012). Trichostatin A and ascorbic acid assist in the development of porcine handmade cloned embryos via different physiologic pathways. *Reprod. Sci.* 19, 976–986.
- Chen, C.H., Du, F., Xu, J., Chang, W.F., Liu, C.C., Su, H.Y., Lin, T.A., Ju, J.C., Cheng, W.T.K., Wu, S.C., et al. (2013a). Synergistic effect of trichostatin A and scriptaid on the development of cloned rabbit embryos. *Theriogenology* 79, 1284–1293.
- Chen, J., Guo, L., Zhang, L., Wu, H., Yang, J., Liu, H., Wang, X., Hu, X., Gu, T., Zhou, Z., et al. (2013b). Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat. Genet.* 45, 1504–1509.
- Chen, J., Liu, H., Liu, J., Qi, J., Wei, B., Yang, J., Liang, H., Chen, Y., Chen, J., Wu, Y., et al. (2013c). H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat. Genet.* 45, 34–42.
- Chesné, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., and Renard, J.-P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 366–369.
- Chia, G., and Egli, D. (2013). Connecting the cell cycle with cellular identity. *Cell. Reprogram.* 15, 356–366.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111–123.
- Chung, T.-L., Brena, R.M., Kolle, G., Grimmond, S.M., Berman, B.P., Laird, P.W., Pera, M.F., and Wolvetang, E.J. (2010). Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28, 1848–1855.
- Chung, Y., Bishop, C.E., Treff, N.R., Walker, S.J., Sandler, V.M., Becker, S., Klimanskaya, I., Wun, W.-S., Dunn, R., Hall, R.M., et al. (2009). Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes. *Cloning Stem Cells* 11, 213–223.
- Chung, Y.G., Mann, M.R.W., Bartolomei, M.S., and Latham, K.E. (2002). Nuclear-cytoplasmic “tug of war” during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 66, 1178–1184.
- Chung, Y.G., Eum, J.H., Lee, J.E., Shim, S.H., Sepilian, V., Hong, S.W., Lee, Y., Treff, N.R., Choi, Y.H., Kimbrel, E.A., et al. (2014). Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. *Cell Stem Cell* 14, 1–4.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F.A., and Robl, J.M. (1998a). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256–1258.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F.A., and Robl, J.M. (1998b). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat. Biotechnol.* 16, 642–646.
- Cibelli, J.B., Campbell, K.H., Seidel, G.E., West, M.D., and Lanza, R.P. (2002). The health profile of cloned animals. *Nat. Biotechnol.* 20, 13–14.
- Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 273–304.

- Clarke, H.J., McLay, D.W., and Mohamed, O.A. (1998). Linker histone transitions during mammalian oogenesis and embryogenesis. *Dev. Genet.* 22, 17–30.
- Collas, P., and Taranger, C.K. (2006). Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts. *Stem Cell Rev.* 2, 309–317.
- Colman, A. (2013). Profile of John Gurdon and Shinya Yamanaka, 2012 Nobel laureates in medicine or physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5740–5741.
- Cong, P., Zhu, K., Ji, Q., Zhao, H., and Chen, Y. (2013). Effects of trichostatin A on histone acetylation and methylation characteristics in early porcine embryos after somatic cell nuclear transfer. *Anim. Sci. J.* 84, 639–649.
- Costa-Borges, N., Paramio, M.T., Calderón, G., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2009). Antimitotic treatments for chemically assisted oocyte enucleation in nuclear transfer procedures. *Cloning Stem Cells* 11, 153–166.
- Costa-Borges, N., Santalo, J., and Ibañez, E. (2010). Comparison between the Effects of Valproic Acid and Trichostatin A on the In Vitro Development, Blastocyst Quality , and Full-Term Development of Mouse Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell. Reprogram.* 12, 1–10.
- Costa-Borges, N., Paramio, M.T., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2011a). Demecolcine- and nocodazole-induced enucleation in mouse and goat oocytes for the preparation of recipient cytoplasts in somatic cell nuclear transfer procedures. *Theriogenology* 75, 527–541.
- Costa-Borges, N., Gonzalez, S., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2011b). Effect of the enucleation procedure on the reprogramming potential and developmental capacity of mouse cloned embryos treated with valproic acid. *Reproduction* 141, 789–800.
- Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., and Meseguer, M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod. Biomed. Online* 25, 371–381.
- Cui, X.-S., Xu, Y.-N., Shen, X.-H., Zhang, L.-Q., Zhang, J.-B., and Kim, N.-H. (2011). Trichostatin A modulates apoptotic-related gene expression and improves embryo viability in cloned bovine embryos. *Cell. Reprogram.* 13, 179–189.
- ## D
- Dadi, T.D., Li, M.-W., and Lloyd, K.C.K. (2006). Development of mouse embryos after immunoneutralization of mitogenic growth factors mimics that of cloned embryos. *Comp. Med.* 56, 188–195.
- Dai, X., Hao, J., and Zhou, Q. (2009). A modified culture method significantly improves the development of mouse somatic cell nuclear transfer embryos. *Reproduction* 138, 301–308.
- Dai, X., Hao, J., Hou, X.-J., Hai, T., Fan, Y., Yu, Y., Jouneau, A., Wang, L., and Zhou, Q. (2010). Somatic nucleus reprogramming is significantly improved by m-carboxycinnamic acid bishydroxamide, a histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 285, 31002–31010.
- Das, Z.C., Gupta, M.K., Uhm, S.J., and Lee, H.T. (2010). Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their in vitro development in pigs. *Cell. Reprogram.* 12, 95–104.
- Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., and Reik, W. (2001). Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13734–13738.
- Dean, W., Santos, F., and Reik, W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 93–100.
- Dean, W., Lucifero, D., and Santos, F. (2005). DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 75, 98–111.
- Ding, J., Guo, Y., Liu, S., Yan, Y., Chang, G., Kou, Z., Zhang, Y., Jiang, Y., He, F., Gao, S., et al. (2009). Embryonic stem cells derived from somatic cloned and fertilized blastocysts are post-transcriptionally indistinguishable: a MicroRNA and protein profile comparison. *Proteomics* 9, 2711–2721.
- Ding, X., Wang, Y., Zhang, D., Guo, Z., and Zhang, Y. (2008). Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 70, 622–630.

Dobosy, J.R., and Selker, E.U. (2001). Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 721–727.

Doi, A., Park, I.-H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., et al. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 41, 1350–1353.

Dominko, T., Chan, A., Simerly, C., Luetjens, C.M., Hewitson, L., Martinovich, C., and Schatten, G. (2000). Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol. Reprod.* 62, 150–154.

Ducibella, T., and Fissore, R. (2008). The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev. Biol.* 315, 257–279.

E

Eckardt, S., Leu, N.A., Kurosaka, S., and McLaughlin, K.J. (2005). Differential reprogramming of somatic cell nuclei after transfer into mouse cleavage stage blastomeres. *Reproduction* 129, 547–556.

Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W., Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. (2000). X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science* 290, 1578–1581.

Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W.M., Yanagimachi, R., and Jaenisch, R. (2001). Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6209–6214.

Egli, D., Rosains, J., Birkhoff, G., and Eggan, K. (2007). Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 447, 679–685.

Egli, D., Birkhoff, G., and Eggan, K. (2008). Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 505–516.

Egli, D., Sandler, V.M., Shinohara, M.L., Cantor, H., and Eggan, K. (2009). Reprogramming after chromosome transfer into mouse blastomeres. *Curr. Biol.* 19, 1403–1409.

Egli, D., Chen, A.E., Saphier, G., Ichida, J., Fitzgerald, C., Go, K.J., Acevedo, N., Patel, J., Baetscher, M., Kearns, W.G., et al. (2011). Reprogramming within hours following nuclear transfer into mouse but not human zygotes. *Nat. Commun.* 2, 1–21.

Elsheikh, A.S.I. (2007). Handmade cloning of mammals. *African J. Biotechnol.* 6, 1862–1868.

Enright, B.P., Kubota, C., Yang, X., and Tian, X.C. (2003). Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol. Reprod.* 69, 896–901.

Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., et al. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 71–79.

Esteves, T.C., Psathaki, O.E., Pfeiffer, M.J., Balbach, S.T., Zeuschner, D., Shitara, H., Yonekawa, H., Siatkowski, M., Fuellen, G., and Boiani, M. (2012). Mitochondrial physiology and gene expression analyses reveal metabolic and translational dysregulation in oocyte-induced somatic nuclear reprogramming. *PLoS One* 7, e36850.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Evans, M.J., Notarianni, E., Laurie, S., and Moor, R.M. (1990). Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. *Theriogenology* 33, 125–128.

F

Fan, Y., Jiang, Y., Chen, X., Ou, Z., Yin, Y., Huang, S., Kou, Z., Li, Q., Long, X., Liu, J., et al. (2011). Derivation of cloned human blastocysts by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer with β -thalassemia fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 20, 1951–1959.

- Farthing, C.R., Ficiz, G., Ng, R.K., Chan, C.-F., Andrews, S., Dean, W., Hemberger, M., and Reik, W. (2008). Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet.* 4, e1000116.
- Feinberg, A.P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* 4, 143–153.
- Feng, B., Ng, J.-H., Heng, J.-C.D., and Ng, H.-H. (2009). Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 301–312.
- Feng, Q., Lu, S.-J., Klimanskaya, I., Gomes, I., Kim, D., Chung, Y., Honig, G.R., Kim, K.-S., and Lanza, R. (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 28, 704–712.
- Findikli, N., and Oral, E. (2014). Time-lapse embryo imaging technology: does it improve the clinical results? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 26, 138–144.
- Fisher-Russell, D., Ibáñez, E., Albertini, D.F., and Overström, E.W. (2005). Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 161–170.
- Folch, J., Cocero, M.J., Chesné, P., Alabart, J.L., Domínguez, V., Cognié, Y., Roche, A., Fernández-Arias, A., Martí, J.I., Sánchez, P., et al. (2009). First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology* 71, 1026–1034.
- Fouladi-Nashta, A.A., Alberio, R., Kafi, M., Nicholas, B., Campbell, K.H., and Webb, R. (2005). Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online* 10, 497–502.
- Fox, J.L. (2008). Cloned animals deemed safe to eat, but labeling issues loom. *Nat. Biotechnol.* 26, 249–250.
- French, A.J., Adams, C.A., Anderson, L.S., Kitchen, J.R., Hughes, M.R., and Wood, S.H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 26, 485–493.
- Fu, L., Zhang, J., Yan, F.-X., Guan, H., An, X.-R., and Hou, J. (2012). Abnormal histone H3K9 dimethylation but normal dimethyltransferase EHMT2 expression in cloned sheep embryos. *Theriogenology* 78, 1929–1938.
- Fulka, J., Loi, P., Fulka, H., Ptak, G., and Nagai, T. (2004a). Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends Biotechnol.* 22, 279–283.
- Fulka, J., Miyashita, N., Nagai, T., and Ogura, A. (2004b). Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nat. Biotechnol.* 22, 25–26.
- Fulka, J., Langerova, A., Loi, P., Ptak, G., Albertini, D., and Fulka, H. (2013). The ups and downs of somatic cell nucleus transfer (SCNT) in humans. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 1055–1058.
- Furuya, M., Tanaka, M., Teranishi, T., Matsumoto, K., Hosoi, Y., Saeki, K., Ishimoto, H., Minegishi, K., Iritani, A., and Yoshimura, Y. (2007). H1foo is indispensable for meiotic maturation of the mouse oocyte. *J. Reprod. Dev.* 53, 895–902.

G

- Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405.
- Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N., Duchi, R., and Lazzari, G. (2003). Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424, 635.
- Galli, C., Lagutina, I., Duchi, R., Colleoni, S., and Lazzari, G. (2008). Somatic cell nuclear transfer in horses. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2, 331–337.
- Gan, Q., Yoshida, T., McDonald, O.G., and Owens, G.K. (2007). Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 2–9.
- Gandhi, A.P., Lane, M., Gardner, D.K., and Krisher, R.L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum. Reprod.* 15, 395–401.

- Gao, S., McGarry, M., Priddle, H., Ferrier, T., Gasparrini, B., Fletcher, J., Harkness, L., De Sousa, P., McWhir, J., and Wilmut, I. (2003). Effects of donor oocytes and culture conditions on development of cloned mice embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 126–133.
- Gao, S., Czirr, E., Chung, Y.G., Han, Z., and Latham, K.E. (2004a). Genetic variation in oocyte phenotype revealed through parthenogenesis and cloning: correlation with differences in pronuclear epigenetic modification. *Biol. Reprod.* 70, 1162–1170.
- Gao, S., Chung, Y.G., Parseghian, M.H., King, G.J., Adashi, E.Y., and Latham, K.E. (2004b). Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev. Biol.* 266, 62–75.
- Gao, T., Zheng, J., Xing, F., Fang, H., Sun, F., Yan, A., Gong, X., Ding, H., Tang, F., and Sheng, H.Z. (2007). Nuclear reprogramming: the strategy used in normal development is also used in somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Cell Res.* 17, 135–150.
- García, J., Franci, G., Pereira, R., Benedetti, R., Nebbioso, A., Rodríguez-Barrios, F., Gronemeyer, H., Altucci, L., and de Lera, A.R. (2011). Epigenetic profiling of the antitumor natural product psammaplin A and its analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 3637–3649.
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 36–47.
- Giles, J.R., Yang, X., Mark, W., and Foote, R.H. (1993). Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocysts or morulae. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 130–138.
- Gómez, M.C., Pope, C.E., Giraldo, A., Lyons, L.A., Harris, R.F., King, A.L., Cole, A., Godke, R.A., and Dresser, B.L. (2004). Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 6, 247–258.
- Gómez, M.C., Pope, C.E., Kutner, R.H., Ricks, D.M., Lyons, L.A., Ruhe, M., Dumas, C., Lyons, J., López, M., Dresser, B.L., et al. (2008). Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Cloning Stem Cells* 10, 469–483.
- Green, M., Bass, S., and Spear, B. (2009). A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications. *Biotechniques* 47, 919–924.
- Greising, T., and Jonas, L. (1999). The influence of enucleation on the ultrastructure of in vitro matured and enucleated cattle oocytes. *Theriogenology* 52, 303–312.
- Gu, T.-P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.-P., Xu, G.-F., Liu, W., Xie, Z.-G., Shi, L., He, X., Jin, S., et al. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477, 606–610.
- Guibert, S., Forné, T., and Weber, M. (2012). Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res.* 22, 633–641.
- Gurdon, J.B. (1962a). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* 4, 256–273.
- Gurdon, J.B. (1962b). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10, 622–640.
- Gurdon, J.B. (2006). From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 1–22.
- Gurdon, J.B. (2013). The cloning of a frog. *Development* 140, 2446–2448.
- Gurdon, J.B., and Melton, D.A. (2008). Nuclear reprogramming in cells. *Science* 322, 1811–1815.
- Gurdon, J.B., and Wilmut, I. (2011). Nuclear transfer to eggs and oocytes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–14.
- Gurdon, J.B., Laskey, R.A., and Reeves, O.R. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 34, 93–112.
- Gurvich, N., Tsygankova, O.M., Meinkoth, J.L., and Klein, P.S. (2004). Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res.* 64, 1079–1086.

H

- Hai, T., Hao, J., Wang, L., Jouneau, A., and Zhou, Q. (2011). Pluripotency maintenance in mouse somatic cell nuclear transfer embryos and its improvement by treatment with the histone deacetylase inhibitor TSA. *Cell. Reprogram.* 13, 47–56.
- Hajkova, P. (2011). Epigenetic reprogramming in the germline: towards the ground state of the epigenome. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 366, 2266–2273.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15–23.
- Håkkelien, A.-M., Landsverk, H.B., Robl, J.M., Skålhegg, B.S., and Collas, P. (2002). Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat. Biotechnol.* 20, 460–466.
- Hales, B.F., Grenier, L., Lalancette, C., and Robaire, B. (2011). Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 91, 652–665.
- Hall, V.J., Compton, D., Stojkovic, P., Nesbitt, M., Herbert, M., Murdoch, A., and Stojkovic, M. (2007). Developmental competence of human in vitro aged oocytes as host cells for nuclear transfer. *Hum. Reprod.* 22, 52–62.
- Halley-Stott, R.P., and Gurdon, J.B. (2013). Epigenetic memory in the context of nuclear reprogramming and cancer. *Brief. Funct. Genomics* 12, 164–173.
- Halley-Stott, R.P., Pasque, V., and Gurdon, J.B. (2013). Nuclear reprogramming. *Development* 140, 2468–2471.
- Halsall, J., Gupta, V., O'Neill, L.P., Turner, B.M., and Nightingale, K.P. (2012). Genes are often sheltered from the global histone hyperacetylation induced by HDAC inhibitors. *PLoS One* 7, e33453.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315, 680–683.
- Handyside, A., Hooper, M.L., Kaufman, M.H., and Wilmut, I. (1987). Towards the isolation of embryonal stem cell lines from the sheep. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196, 185–190.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.-C., Townes, T.M., et al. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920–1923.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462, 595–601.
- Hawkins, P.G., and Morris, K. V (2008). RNA and transcriptional modulation of gene expression. *Cell Cycle* 7, 602–607.
- Hayes, E., Galea, S., Verkuylen, A., Pera, M., Morrison, J., Lacham-Kaplan, O., and Trounson, A. (2001). Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. *Physiol. Genomics* 5, 193–204.
- Van der Heijden, G.W., Derijck, A.A.H.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev. Biol.* 298, 458–469.
- Heindryckx, B., Rybouchkin, A., Van Der Elst, J., and Dhont, M. (2001). Effect of culture media on in vitro development of cloned mouse embryos. *Cloning* 3, 41–50.
- Heindryckx, B., Van der Elst, J., and Dhont, M. (2006). Culture medium preferences of pre-implantation cloned mouse embryos. *Methods Mol. Biol.* 348, 59–78.
- Heindryckx, B., De Sutter, P., Gerris, J., Dhont, M., and Van der Elst, J. (2007). Embryo development after successful somatic cell nuclear transfer to in vitro matured human germinal vesicle oocytes. *Hum. Reprod.* 22, 1982–1990.
- Hemberger, M. (2002). The role of the X chromosome in mammalian extra embryonic development. *Cytogenet. Genome Res.* 99, 210–217.

- Hemberger, M., Dean, W., and Reik, W. (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 526–537.
- Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A., and Bird, A. (2001). Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev.* 15, 710–723.
- Heyman, Y., Vignon, X., Chesné, P., Le Bourhis, D., Marchal, J., and Renard, J.P. (1998). Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 595–603.
- Himaki, T., Mori, H., Mizobe, Y., Miyoshi, K., Sato, M., Takao, S., and Yoshida, M. (2010). Latrunculin A dramatically improves the developmental capacity of nuclear transfer embryos derived from gene-modified clawn miniature pig cells. *Cell. Reprogram.* 12, 127–131.
- Hirata, S., Fukasawa, H., Tagaya, H., Shoda, T., Wakayama, T., and Hoshi, K. (2008). Effects of sirtinol on early development of the cloned murine embryos.
- Hochedlinger, K., and Jaenisch, R. (2002). Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 415, 1035–1038.
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136, 509–523.
- Holden, C. (2002). Cloning. Carbon-copy clone is the real thing. *Science* 295, 1443–1444.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135.
- Hoshino, Y., Hayashi, N., Taniguchi, S., Kobayashi, N., Sakai, K., Otani, T., Iritani, A., and Saeki, K. (2009). Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80 degrees c freezer for a decade. *PLoS One* 4, e4142.
- Houdebine, L.-M. (2002). The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J. Biotechnol.* 98, 145–160.
- Howlett, S.K., Barton, S.C., and Surani, M.A. (1987). Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos. *Development* 101, 915–923.
- Hu, B.-Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J.A., and Zhang, S.-C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4335–4340.
- Hu, J., Cheng, D., Gao, X., Bao, J., Ma, X., and Wang, H. (2012). Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 873–879.
- Huan, Y.J., Zhu, J., Xie, B.T., Wang, J.Y., Liu, S.C., Zhou, Y., Kong, Q.R., He, H. Bin, and Liu, Z.H. (2013). Treating cloned embryos, but not donor cells, with 5-aza-2'-deoxycytidine enhances the developmental competence of porcine cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 59, 442–449.
- Huang, Y., Tang, X., Xie, W., Zhou, Y., Li, D., Yao, C., Zhou, Y., Zhu, J., Lai, L., Ouyang, H., et al. (2011a). Histone deacetylase inhibitor significantly improved the cloning efficiency of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 13, 513–520.
- Huang, Y., Tang, X., Xie, W., Zhou, Y., Li, D., Zhou, Y., Zhu, J., Yuan, T., Lai, L., Pang, D., et al. (2011b). Vitamin C enhances in vitro and in vivo development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 397–401.
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Friedman, A., Hochedlinger, K., Yanagimachi, R., Lander, E.S., Golub, T.R., and Jaenisch, R. (2002). Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12889–12894.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Närvä, E., Ng, S., Sourour, M., Hämäläinen, R., Olsson, C., et al. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58–62.
- Hyttel, P., Laurincik, J., Rosenkranz, C., Rath, D., Niemann, H., Ochs, R.L., and Schellander, K. (2000). Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed in vivo. *Biol. Reprod.* 63, 1848–1856.

I

- Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D., and Brenin, D.R. (1994). Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.* 163, 288–292.
- Ibanez, E., Sanfins, A., Combelles, C., Albertini, D.F., and Overstrom, E.W. (2002). Induced enucleation of mouse and goat oocytes Kinetic and phenotypic characterizations.
- Ibáñez, E., Albertini, D.F., and Overström, E.W. (2003). Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biol. Reprod.* 68, 1249–1258.
- Illmensee, K., and Hoppe, P.C. (1981). Nuclear transplantation in *Mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23, 9–18.
- Ilyin, V., and Parker, I. (1992). Effects of alcohols on responses evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 448, 339–354.
- Inoue, K., Kohda, T., Lee, J., Ogonuki, N., Mochida, K., Noguchi, Y., Tanemura, K., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., and Ogura, A. (2002). Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science* 295, 297.
- Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Sado, T., Ogonuki, N., Matoba, S., Shiura, H., Ikeda, R., Mochida, K., Fujii, T., et al. (2010). Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 330, 496–499.
- Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2011). Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3642–3647.
- Isaji, Y., Murata, M., Takaguchi, N., Mukai, T., Tajima, Y., Imai, H., and Yamada, M. (2013). Valproic acid treatment from the 4-cell stage improves Oct4 expression and nuclear distribution of histone H3K27me3 in mouse cloned blastocysts. *J. Reprod. Dev.* 59, 196–204.
- Ito, M., Sakai, S., Nagata, M., and Aoki, F. (2000). Effect of Histone Deacetylase Inhibitors on Early Preimplantation Development in Mouse Embryo. *J. Mamm. Ova Res.* 17, 90–95.
- Iwata, K., Yumoto, K., Sugishima, M., Mizoguchi, C., Kai, Y., Iba, Y., and Mio, Y. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 421–426.
- Iwatani, M., Ikegami, K., Kremenska, Y., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., and Shiota, K. (2006). Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 24, 2549–2556.

J

- Jafari, S., Hosseini, M.S., Hajian, M., Forouzanfar, M., Jafarpour, F., Abedi, P., Ostadosseini, S., Abbasi, H., Gourabi, H., Shahverdi, A.H., et al. (2011). Improved in vitro development of cloned bovine embryos using S-adenosylhomocysteine, a non-toxic epigenetic modifying reagent. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 576–584.
- Jafarpour, F., Hosseini, S.M., Hajian, M., Forouzanfar, M., Ostadosseini, S., Abedi, P., Gholami, S., Ghaedi, K., Gourabi, H., Shahverdi, A.H., et al. (2011). Somatic cell-induced hyperacetylation, but not hypomethylation, positively and reversibly affects the efficiency of in vitro cloned blastocyst production in cattle. *Cell. Reprogram.* 13, 483–493.
- Janssen, D.L., Edwards, M.L., Koster, J.A., Lanza, R.P., and Ryder, O.A. (2004). 206 POSTNATAL MANAGEMENT OF CHRYPTORCHID BANTENG CALVES CLONED BY NUCLEAR TRANSFER UTILIZING FROZEN FIBROBLAST CULTURES AND ENUCLEATED COW OVA. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 224.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jeon, B.-G., Coppola, G., Perrault, S.D., Rho, G.-J., Betts, D.H., and King, W.A. (2008). S-adenosylhomocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves in vitro embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction* 135, 815–828.
- Jeong, Y.W., Park, S.W., Hossein, M.S., Kim, S., Kim, J.H., Lee, S.H., Kang, S.K., Lee, B.C., and Hwang, W.S. (2006). Antiapoptotic and embryotropic effects of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 66, 2104–2112.

- Ji, Q., Zhu, K., Liu, Z., Song, Z., Huang, Y., Zhao, H., Chen, Y., He, Z., Mo, D., and Cong, P. (2013). Improvement of porcine cloning efficiency by trichostatin A through early-stage induction of embryo apoptosis. *Theriogenology* 79, 815–823.
- Jiang, Y., Ahn, E.-Y., Ryu, S.H., Kim, D.-K., Park, J.-S., Yoon, H.J., You, S., Lee, B.-J., Lee, D.S., and Jung, J.H. (2004). Cytotoxicity of psammoplin A from a two-sponge association may correlate with the inhibition of DNA replication. *BMC Cancer* 4, 70.
- Jin, J.-X., Li, S., Hong, Y., Jin, L., Zhu, H.-Y., Guo, Q., Gao, Q.-S., Yan, C.-G., Kang, J.-D., and Yin, X.-J. (2013). CUDC-101, a histone deacetylase inhibitor, improves the in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer pig embryos. *Theriogenology*.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.
- Jouneau, A., Zhou, Q., Camus, A., Brochard, V., Maulny, L., Collignon, J., and Renard, J.-P. (2006). Developmental abnormalities of NT mouse embryos appear early after implantation. *Development* 133, 1597–1607.
- Ju, S., Rui, R., Lu, Q., Lin, P., and Guo, H. (2010). Analysis of apoptosis and methyltransferase mRNA expression in porcine cloned embryos cultured in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 49–59.
- Jullien, J., Astrand, C., Halley-Stott, R.P., Garrett, N., and Gurdon, J.B. (2010). Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5483–5488.
- Jullien, J., Pasque, V., Halley-Stott, R.P., Miyamoto, K., and Gurdon, J.B. (2011). Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 453–459.

K

- Kang, H., and Roh, S. (2011). Extended exposure to trichostatin A after activation alters the expression of genes important for early development in nuclear transfer murine embryos. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 623–631.
- Kang, E., Wu, G., Ma, H., Li, Y., Tippner-Hedges, R., Tachibana, M., Sparman, M., Wolf, D.P., Schöler, H.R., and Mitalipov, S. (2014). Nuclear reprogramming by interphase cytoplasm of two-cell mouse embryos. *Nature* 509, 101–104.
- Kang, J.-D., Li, S., Lu, Y., Wang, W., Liang, S., Liu, X., Jin, J.-X., Hong, Y., Yan, C.-G., and Yin, X.-J. (2013). Valproic acid improved in vitro development of pig cloning embryos but did not improve survival of cloned pigs to adulthood. *Theriogenology* 79, 306–11.e1.
- Kang, Y.-K., Park, J.S., Koo, D.-B., Choi, Y.-H., Kim, S.-U., Lee, K.-K., and Han, Y.-M. (2002). Limited demethylation leaves mosaic-type methylation states in cloned bovine pre-implantation embryos. *EMBO J.* 21, 1092–1100.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., and Tsunoda, Y. (1998). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282, 2095–2098.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144.
- Kawano, K., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2004). Comparison of in vitro development of porcine nuclear-transferred oocytes receiving fetal somatic cells by injection and fusion methods. *Cloning Stem Cells* 6, 67–72.
- Kawase, E., Yamazaki, Y., Yagi, T., Yanagimachi, R., and Pedersen, R.A. (2000). Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts. *Genesis* 28, 156–163.
- Kawasumi, M., Anzai, M., Takehara, T., Mitani, T., Kato, H., Saeki, K., Iritani, A., Matsumoto, K., and Hosoi, Y. (2007). Abnormal distribution of chromosomes in the first division of nuclear transferred mouse embryos. *J. Reprod. Dev.* 53, 615–622.
- Keefe, D., Liu, L., Wang, W., and Silva, C. (2003). Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF. *Reprod. Biomed. Online* 7, 24–29.
- Kelly, K.F., Ng, D.Y., Jayakumar, G., Wood, G.A., Koide, H., and Doble, B.W. (2011). β -catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism. *Cell Stem Cell* 8, 214–227.

- Kim, D., Lee, I.S., Jung, J.H., Lee, C.O., and Choi, S.U. (1999a). Psammaplin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. *Anticancer Res.* 19, 4085–4090.
- Kim, D., Lee, I.S., Jung, J.H., and Yang, S.I. (1999b). Psammaplin A, a natural bromotyrosine derivative from a sponge, possesses the antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the DNA gyrase-inhibitory activity. *Arch. Pharm. Res.* 22, 25–29.
- Kim, D.H., Shin, J., and Kwon, H.J. (2007a). Psammaplin A is a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylase. *Exp. Mol. Med.* 39, 47–55.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290.
- 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., et al. (2007b). Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9, 130–137.
- Kim, Y.J., Ahn, K.S., Kim, M., and Shim, H. (2011). 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.* 47, 283–289.
- King, T.J., Dobrinsky, J.R., Zhu, J., Finlayson, H.A., Bosma, W., Harkness, L., Ritchie, W.A., Travers, A., McCorquodale, C., Day, B.N., et al. (2002). Embryo development and establishment of pregnancy after embryo transfer in pigs: coping with limitations in the availability of viable embryos. *Reproduction* 123, 507–515.
- Kirkegaard, K., Agerholm, I.E., and Ingerslev, H.J. (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum. Reprod.* 27, 1277–1285.
- Kishigami, S., Wakayama, S., Thuan, N. Van, Ohta, H., Mizutani, E., Hikichi, T., Bui, H.-T., Balbach, S., Ogura, A., Boiani, M., et al. (2006a). Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Protoc.* 1, 125–138.
- Kishigami, S., Mizutani, E., Ohta, H., Hikichi, T., Thuan, N. Van, Wakayama, S., Bui, H.-T., and Wakayama, T. (2006b). Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 183–189.
- Kishigami, S., Lee, A.R., and Wakayama, T. (2013). Using somatic-cell nuclear transfer to study aging. *Methods Mol. Biol.* 1048, 109–126.
- Kishikawa, H., Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1999). Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. *Cloning* 1, 153–159.
- Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* 7, 715–727.
- Kobolak, J., Horsch, M., Geissler, S., Mamo, S., Beckers, J., and Dinnyes, A. (2012). Comparative analysis of nuclear transfer embryo-derived mouse embryonic stem cells. Part II: gene regulation. *Cell. Reprogram.* 14, 68–78.
- Kohda, T., Kishigami, S., Kaneko-Ishino, T., Wakayama, T., and Ishino, F. (2012). Gene expression profile normalization in cloned mice by trichostatin A treatment. *Cell. Reprogram.* 14, 45–55.
- Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–479.
- Kojima, Y., Tam, O.H., and Tam, P.P.L. (2014). Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Semin. Cell Dev. Biol.* 34C, 65–75.
- Kono, T., Kwon, O.Y., and Nakahara, T. (1991). Development of enucleated mouse oocytes reconstituted with embryonic nuclei. *J. Reprod. Fertil.* 93, 165–172.
- Koo, D.-B., Kang, Y.-K., Choi, Y.-H., Park, J.S., Kim, H.-N., Oh, K.B., Son, D.-S., Park, H., Lee, K.-K., and Han, Y.-M. (2002). Aberrant allocations of inner cell mass and trophoblast cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol. Reprod.* 67, 487–492.
- Krishnakumar, R., and Blillock, R.H. (2013). Epigenetics of cellular reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 548–555.

Kwong, P.J., Abdullah, R.B., and Wan Khadijah, W.E. (2012). Increasing glucose in KSOMaa basal medium on culture Day 2 improves in vitro development of cloned caprine blastocysts produced via intraspecies and interspecies somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 78, 921–929.

L

Lai, L., and Prather, R.S. (2003). Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 82.

Lanza, R.P., Cibelli, J.B., Diaz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin, C.E., Hammer, C.J., West, M.D., and Damiani, P. (2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2, 79–90.

Latham, K.E. (2005). Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning. *Biol. Cell* 97, 119–132.

Latham, K.E., Gao, S., and Han, Z. (2007). Somatic cell nuclei in cloning: strangers traveling in a foreign land. *Adv. Exp. Med. Biol.* 591, 14–29.

Lawitts, J.A., and Biggers, J.D. (1991a). Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J. Reprod. Fertil.* 91, 543–556.

Lawitts, J.A., and Biggers, J.D. (1991b). Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse embryo culture medium. *Biol. Reprod.* 45, 245–251.

Lee, A.R., Matsubara, K., Okuyama, N., Saeki, K., Matsumoto, K., Iritani, A., Wakayama, T., Kishigami, S., and Hosoi, Y. (2010). P35. Vitamin C does not enhance reprogramming after SCNT. *Differentiation* 80, S28.

Lee, B., Palermo, G., and Machaca, K. (2013). Downregulation of store-operated Ca²⁺ entry during mammalian meiosis is required for the egg-to-embryo transition. *J. Cell Sci.* 126, 1672–1681.

Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hossein, M.S., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., et al. (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436, 641.

Lee, D.-F., Su, J., Ang, Y.-S., Carvajal-Vergara, X., Mulero-Navarro, S., Pereira, C.F., Gingold, J., Wang, H.-L., Zhao, R., Sevilla, A., et al. (2012). Regulation of embryonic and induced pluripotency by aurora kinase-p53 signaling. *Cell Stem Cell* 11, 179–194.

Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A., and Ishino, F. (2002). Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129, 1807–1817.

Leppens, G., Gardner, D.K., and Sakkas, D. (1996). Co-culture of 1-cell outbred mouse embryos on bovine kidney epithelial cells: effect on development, glycolytic activity, inner cell mass:trophoblast ratios and viability. *Hum. Reprod.* 11, 598–603.

Li, C., Terashita, Y., Tokoro, M., Wakayama, S., and Wakayama, T. (2012). 36 EFFECT OF DNA METHYLTRANSFERASE INHIBITOR, RG108, ON IN VITRO DEVELOPMENT AND ntES ESTABLISHMENT RATE IN CLONED MOUSE EMBRYOS. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 130.

Li, G.-P., White, K.L., and Bunch, T.D. (2004). Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art. *Cloning Stem Cells* 6, 5–13.

Li, J., Svarcova, O., Villemoes, K., Kragh, P.M., Schmidt, M., Bøgh, I.B., Zhang, Y., Du, Y., Lin, L., Purup, S., et al. (2008a). High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology* 70, 800–808.

Li, J., Liu, X., Wang, H., Zhang, S., Liu, F., Wang, X., and Wang, Y. (2009). Human embryos derived by somatic cell nuclear transfer using an alternative enucleation approach. *Cloning Stem Cells* 11, 39–50.

Li, Q., Wang, Y.-S., Wang, L.-J., Zhang, H., Li, R.-Z., Cui, C.-C., Li, W.-Z., Zhang, Y., and Jin, Y.-P. (2014). Vitamin C Supplementation Enhances Compact Morulae Formation but Reduces the Hatching Blastocyst Rate of Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell. Reprogram.* 16.

Li, X., Kato, Y., Tsuji, Y., and Tsunoda, Y. (2008b). The effects of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development-related genes in cloned mouse blastocysts. *Cloning Stem Cells* 10, 133–142.

- Li, Z., Sun, X., Chen, J., Liu, X., Wisely, S.M., Zhou, Q., Renard, J.-P., Leno, G.H., and Engelhardt, J.F. (2006). Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol.* 293, 439–448.
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* 7, 165–171.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73.
- Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P., and Clinton, M. (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962–964.
- Loi, P., Modlinski, J.A., and Ptak, G. (2011). Interspecies somatic cell nuclear transfer: a salvage tool seeking first aid. *Theriogenology* 76, 217–228.
- Luo, Y., Lin, L., Bolund, L., Jensen, T.G., and Sørensen, C.B. (2012). Genetically modified pigs for biomedical research. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 695–713.

M

- Ma, P., and Schultz, R.M. (2008). Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* 319, 110–120.
- Ma, H., Morey, R., O'Neil, R.C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M.D., Hariharan, M., Nery, J.R., Castanon, R., Sabatini, K., et al. (2014). Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 511, 177–183.
- Ma, S.-F., Liu, X.-Y., Miao, D.-Q., Han, Z.-B., Zhang, X., Miao, Y.-L., Yanagimachi, R., and Tan, J.-H. (2005). Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology* 64, 1142–1157.
- Maalouf, W.E., Liu, Z., Brochard, V., Renard, J.-P., Debey, P., Beaujean, N., and Zink, D. (2009). Trichostatin A treatment of cloned mouse embryos improves constitutive heterochromatin remodeling as well as developmental potential to term. *BMC Dev. Biol.* 9, 11.
- Macháty, Z., and Prather, R.S. (1998). Strategies for activating nuclear transfer oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 599–613.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70.
- Mallol, A., Santaló, J., and Ibáñez, E. (2013). Comparison of three differential mouse blastocyst staining methods. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 59, 117–122.
- Mann, M.R.W., Chung, Y.G., Nolen, L.D., Verona, R.I., Latham, K.E., and Bartolomei, M.S. (2003). Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol. Reprod.* 69, 902–914.
- Marikawa, Y., and Alarcón, V.B. (2009). Establishment of trophectoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 1019–1032.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634–7638.
- Martinez-Diaz, M.A., Che, L., Albornoz, M., Seneda, M.M., Collis, D., Coutinho, A.R.S., El-Beirouthi, N., Laurin, D., Zhao, X., and Bordinon, V. (2010). Pre- and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. *Cell. Reprogram.* 12, 85–94.
- Mason, K., Liu, Z., Aguirre-Lavin, T., and Beaujean, N. (2012). Chromatin and epigenetic modifications during early mammalian development. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 45–55.
- Mastromonaco, G.F., and King, W.A. (2007). Cloning in companion animal, non-domestic and endangered species: can the technology become a practical reality? *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 748–761.

- Matoba, S., Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Mizutani, E., Ogonuki, N., Nakamura, T., Abe, K., Nakano, T., Ishino, F., et al. (2011). RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20621–20626.
- Matsumoto, K., Miyake, M., Utsumi, K., and Iritani, A. (1989). Production of identical twins by separating two-cell rat embryos. *Gamete Res.* 22, 257–263.
- McGrath, J., and Solter, D. (1983a). Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.* 228, 355–362.
- McGrath, J., and Solter, D. (1983b). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220, 1300–1302.
- McGrath, J., and Solter, D. (1984). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317–1319.
- Mehlmann, L.M., Mikoshiba, K., and Kline, D. (1996). Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-trisphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 180, 489–498.
- Meissner, A. (2010). Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 1079–1088.
- Meissner, A., and Jaenisch, R. (2006). Mammalian nuclear transfer. *Dev. Dyn.* 235, 2460–2469.
- Meng, Q., Wang, M., Stanca, C.A., Bodo, S., and Dinnyes, A. (2008). Cotransfer of parthenogenetic embryos improves the pregnancy and implantation of nuclear transfer embryos in mouse. *Cloning Stem Cells* 10, 429–434.
- Meng, Q., Polgar, Z., Liu, J., and Dinnyes, A. (2009). Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and cotransfer of parthenogenetic embryos. *Cloning Stem Cells* 11, 203–208.
- Mitalipov, S., and Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 114, 185–199.
- Mitalipov, S.M., Yeoman, R.R., Kuo, H.-C., and Wolf, D.P. (2002). Monozygotic twinning in rhesus monkeys by manipulation of in vitro-derived embryos. *Biol. Reprod.* 66, 1449–1455.
- Mittwoch, U. (2002). “Clone”: the history of a euphonious scientific term. *Med. Hist.* 46, 381–402.
- Miyamoto, K., Furusawa, T., Ohnuki, M., Goel, S., Tokunaga, T., Minami, N., Yamada, M., Ohsumi, K., and Imai, H. (2007). Reprogramming events of mammalian somatic cells induced by *Xenopus laevis* egg extracts. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1268–1277.
- Miyamoto, K., Nagai, K., Kitamura, N., Nishikawa, T., Ikegami, H., Binh, N.T., Tsukamoto, S., Matsumoto, M., Tsukiyama, T., Minami, N., et al. (2011a). Identification and characterization of an oocyte factor required for development of porcine nuclear transfer embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7040–7045.
- Miyamoto, K., Pasque, V., Jullien, J., and Gurdon, J.B. (2011b). Nuclear actin polymerization is required for transcriptional reprogramming of Oct4 by oocytes. *Genes Dev.* 25, 946–958.
- Miyoshi, K., Mori, H., Mizobe, Y., Akasaka, E., Ozawa, A., Yoshida, M., and Sato, M. (2010). Valproic Acid Enhances In Vitro Development and Oct-3/4 Expression of Miniature Pig Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos. *Cell. Reprogram.* 12, 67–74.
- Mizutani, E., Yamagata, K., Ono, T., Akagi, S., Geshi, M., and Wakayama, T. (2012). Abnormal chromosome segregation at early cleavage is a major cause of the full-term developmental failure of mouse clones. *Dev. Biol.* 364, 56–65.
- Monfort, A., and Wutz, A. (2013). Breathing-in epigenetic change with vitamin C. *EMBO Rep.* 14, 337–346.
- Moore, N.W., Adams, C.E., and Rowson, L.E. (1968). Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.* 17, 527–531.
- Morgan, A.J., and Jacob, R. (1994). Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem. J.* 300, 665–672.
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 14 Spec No, R47–58.

Morris, K. V (2009a). Non-coding RNAs, epigenetic memory and the passage of information to progeny. *RNA Biol.* 6, 242–247.

Morris, K. V (2009b). Long antisense non-coding RNAs function to direct epigenetic complexes that regulate transcription in human cells. *Epigenetics* 4, 296–301.

Munoz, J., Low, T.Y., Kok, Y.J., Chin, A., Frese, C.K., Ding, V., Choo, A., and Heck, A.J.R. (2011). The quantitative proteomes of human-induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Mol. Syst. Biol.* 7, 550.

Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., and Jyothy, A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *J. Genet. Genomics* 36, 75–88.

Munsie, M.J., Michalska, A.E., O'Brien, C.M., Trounson, A.O., Pera, M.F., and Mountford, P.S. (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr. Biol.* 10, 989–992.

N

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106.

Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., et al. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 64–71.

Nakamura, T., Liu, Y.-J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M., Ogura, A., Shinkai, Y., and Nakano, T. (2012). PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486, 415–419.

Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2005). Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1957–1962.

Niemann, H., and Lucas-Hahn, a (2012). Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod. Domest. Anim.* 47 Suppl 5, 2–10.

Niemann, H., Tian, X.C., King, W.A., and Lee, R.S.F. (2008). Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* 135, 151–163.

Noggle, S., Fung, H.-L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K.C., Prosser, R., Oum, K., Paull, D., Druckenmiller, S., Freeby, M., et al. (2011). Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* 478, 70–75.

Nolen, L.D., Gao, S., Han, Z., Mann, M.R.W., Gie Chung, Y., Otte, A.P., Bartolomei, M.S., and Latham, K.E. (2005). X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev. Biol.* 279, 525–540.

Notarianni, E., Laurie, S., Moor, R.M., and Evans, M.J. (1990). Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 41, 51–56.

Nothias, J.Y., Majumder, S., Kaneko, K.J., and DePamphilis, M.L. (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* 270, 22077–22080.

O

O'Doherty, R., Greiser, U., and Wang, W. (2013). Nonviral methods for inducing pluripotency to cells. *Biomed Res. Int.* 2013, 705902.

Ogonuki, N., Inoue, K., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Tanemura, K., Suzuki, O., Nakayama, H., Doi, K., Ohtomo, Y., Satoh, M., et al. (2002). Early death of mice cloned from somatic cells. *Nat. Genet.* 30, 253–254.

Ogura, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Lee, J., Kohda, T., and Ishino, F. (2002). Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning Stem Cells* 4, 397–405.

Ogura, A., Inoue, K., and Wakayama, T. (2013). Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20110329.

Ohgane, J., Wakayama, T., Kogo, Y., Senda, S., Hattori, N., Tanaka, S., Yanagimachi, R., and Shiota, K. (2001). DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis* 30, 45–50.

Oikawa, M., Inoue, K., Shiura, H., Matoba, S., Kamimura, S., Hirose, M., Mekada, K., Yoshiki, A., Tanaka, S., Abe, K., et al. (2014). Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: a comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 9, 204–211.

Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D., and Heard, E. (2004). Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303, 644–649.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.

Ono, T., Li, C., Mizutani, E., Terashita, Y., Yamagata, K., and Wakayama, T. (2010). Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. *Biol. Reprod.* 83, 929–937.

Opiela, J. (2009). Apoptosis in preimplantation bovine embryos and methods used for its detection. *Ann. Anim. Sci.* 9, 3–16.

Osada, T., Kakazu, N., Watanabe, M., Yamane, H., and Yagi, T. (2009). The chromosomal constitution of postmitotic neurons, assessed by neuronal nuclear transfer into oocytes and in ES cell lines derived from them. *Cytogenet. Genome Res.* 125, 201–212.

Ozil, J.P. (1983). Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fertil.* 69, 463–468.

P

Pagliuca, F.W., and Melton, D.A. (2013). How to make a functional β -cell. *Development* 140, 2472–2483.

Palmieri, C., Loi, P., Ptak, G., and Della Salda, L. (2008). Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice. *Vet. Pathol.* 45, 865–880.

Panarace, M., Agüero, J.I., Garrote, M., Jauregui, G., Segovia, A., Cané, L., Gutiérrez, J., Marfil, M., Rigali, F., Pugliese, M., et al. (2007). How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 67, 142–151.

Papp, B., and Plath, K. (2013). Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 152, 1324–1343.

Park, E.S., Hwang, W.S., Jang, G., Cho, J.K., Kang, S.K., Lee, B.C., Han, J.Y., and Lim, J.M. (2004). Incidence of apoptosis in clone embryos and improved development by the treatment of donor somatic cells with putative apoptosis inhibitors. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 65–71.

Park, I.-H., Lerou, P.H., Zhao, R., Huo, H., and Daley, G.Q. (2008). Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 3, 1180–1186.

Park, S.-J., Park, H.-J., Koo, O.-J., Choi, W.-J., Moon, J.-H., Kwon, D.-K., Kang, J.-T., Kim, S., Choi, J.-Y., Jang, G., et al. (2012). Oxamflatin improves developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 14, 398–406.

Pastor, W.A., Aravind, L., and Rao, A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 341–356.

Paterson, L., DeSousa, P., Ritchie, W., King, T., and Wilmut, I. (2003). Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. *Applications of reproductive cloning. Anim. Reprod. Sci.* 79, 137–143.

Petersen, B., Lucas-Hahn, A., Oropeza, M., Hornen, N., Lemme, E., Hassel, P., Queisser, A.-L., and Niemann, H. (2008). Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning Stem Cells* 10, 355–362.

Piel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., and Klein, P.S. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 276, 36734–36741.

Piña, I.C., Gautschi, J.T., Wang, G.-Y.-S., Sanders, M.L., Schmitz, F.J., France, D., Cornell-Kennon, S., Sambucetti, L.C., Remiszewski, S.W., Perez, L.B., et al. (2003). Psammalins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase. *J. Org. Chem.* 68, 3866–3873.

Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., et al. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 86–90.

Polge, C., Rowson, L.E., and Chang, M.C. (1966). The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. *J. Reprod. Fertil.* 12, 395–397.

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 848–855.

Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M., Eyestone, W.H., and First, N.L. (1987). Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37, 859–866.

Prather, R.S., Sims, M.M., and First, N.L. (1989). Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.* 41, 414–418.

R

Rao, M., and Condic, M.L. (2008). Alternative sources of pluripotent stem cells: scientific solutions to an ethical dilemma. *Stem Cells Dev.* 17, 1–10.

Rathbone, A.J., Fisher, P.A., Lee, J.-H., Craigon, J., and Campbell, K.H.S. (2010). Reprogramming of ovine somatic cells with *Xenopus laevis* oocyte extract prior to SCNT improves live birth rate. *Cell. Reprogram.* 12, 609–616.

Rathbone, A.J., Liddell, S., and Campbell, K.H.S. (2013). Proteomic analysis of early reprogramming events in murine somatic cells incubated with *Xenopus laevis* oocyte extracts demonstrates network associations with induced pluripotency markers. *Cell. Reprogram.* 15, 269–280.

Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2013). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 155–168.

Reichert, B., and Niemann, H. (1994). Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J. Reprod. Fertil.* 100, 163–172.

Reik, W., and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* 2, 21–32.

Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., et al. (2007). Production of cattle lacking prion protein. *Nat. Biotechnol.* 25, 132–138.

Rideout, W.M., Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G.Q., and Jaenisch, R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109, 17–27.

Rideout III, W.M., Eggan, K., and Jaenisch, R. (2001). The Genome Nuclear Cloning and Epigenetic Reprogramming of the Genome. *Science* 293, 1093–1098.

Del Rizzo, P.A., and Trievel, R.C. (2014). Molecular basis for substrate recognition by lysine methyltransferases and demethylases. *Biochim. Biophys. Acta.*

Robl, J.M., Prather, R., Barnes, F., Eyestone, W., Northey, D., Gilligan, B., and First, N.L. (1987). Nuclear transplantation in bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 64, 642–647.

Rodriguez-Osorio, N., Urrego, R., Cibelli, J.B., Eilertsen, K., and Memili, E. (2012). Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology* 78, 1869–1886.

Rudenko, L., Matheson, J.C., and Sundlof, S.F. (2007). Animal cloning and the FDA—the risk assessment paradigm under public scrutiny. *Nat. Biotechnol.* 25, 39–43.

De Ruijter, A.J.M., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B.P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737–749.

Rybouchkin, A., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2006). Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 74, 1083–1089.

S

- Saito, S., and Niemann, H. (1991). Effects of extracellular matrices and growth factors on the development of isolated porcine blastomeres. *Biol. Reprod.* 44, 927–936.
- Sangalli, J.R., De Bem, T.H.C., Perecin, F., Chiaratti, M.R., Oliveira, L. de J., de Araújo, R.R., Valim Pimentel, J.R., Smith, L.C., and Meirelles, F.V. (2012). Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cell. Reprogram.* 14, 235–247.
- Sangalli, J.R., Chiaratti, M.R., De Bem, T.H.C., de Araújo, R.R., Bressan, F.F., Sampaio, R.V., Perecin, F., Smith, L.C., King, W.A., and Meirelles, F.V. (2014). Development to term of cloned cattle derived from donor cells treated with valproic acid. *PLoS One* 9, e101022.
- Santos, F., and Dean, W. (2004). Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 127, 643–651.
- Santos, F., Zakhartchenko, V., Stojkovic, M., Peters, A., Jenuwein, T., Wolf, E., Reik, W., and Dean, W. (2003). Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr. Biol.* 13, 1116–1121.
- Santos, F., Peters, A.H., Otte, A.P., Reik, W., and Dean, W. (2005). Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev. Biol.* 280, 225–236.
- Sawai, K., Fujii, T., Hirayama, H., Hashizume, T., and Minamihashi, A. (2012). Epigenetic status and full-term development of bovine cloned embryos treated with trichostatin A. *J. Reprod. Dev.* 58, 302–309.
- Sayed, N., Wong, W.T., and Cooke, J.P. (2013). Therapeutic Transdifferentiation: Can we Generate Cardiac Tissue Rather Than Scar after Myocardial Injury? *Methodist Debaque Cardiovasc. J.* 9, 210–212.
- Schultz, R.M., and Kopf, G.S. (1995). Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30, 21–62.
- Schurmann, A., Wells, D.N., and Oback, B. (2006). Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear transfer and result in cloned offspring. *Reproduction* 132, 839–848.
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., and Reik, W. (2012). The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell* 48, 849–862.
- Selokar, N.L., St John, L., Revay, T., King, W.A., Singla, S.K., and Madan, P. (2013). Effect of Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Treatment on Donor Cell Growth Characteristics, Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Handmade Cloned Bovine Embryo Production Efficiency. *Cell. Reprogram.* 15.
- Shi, L., and Wu, J. (2009). Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 59.
- Shi, D., Lu, F., Wei, Y., Cui, K., Yang, S., Wei, J., and Liu, Q. (2007). Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod.* 77, 285–291.
- Shi, L.-H., Miao, Y.-L., Ouyang, Y.-C., Huang, J.-C., Lei, Z.-L., Yang, J.-W., Han, Z.-M., Song, X.-F., Sun, Q.-Y., and Chen, D.-Y. (2008). Trichostatin A (TSA) improves the development of rabbit-rabbit intraspecies cloned embryos, but not rabbit-human interspecies cloned embryos. *Dev. Dyn.* 237, 640–648.
- Shi, W., Hoeflich, A., Flaswinkel, H., Stojkovic, M., Wolf, E., and Zakhartchenko, V. (2003). Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. *Biol. Reprod.* 69, 301–309.
- Shimozawa, N., Ono, Y., Kimoto, S., Hioki, K., Araki, Y., Shinkai, Y., Kono, T., and Ito, M. (2002). Abnormalities in cloned mice are not transmitted to the progeny. *Genesis* 34, 203–207.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., and Westhusin, M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415, 859.
- Shufaro, Y., Lacham-Kaplan, O., Tzuberi, B.-Z., McLaughlin, J., Trounson, A., Cedar, H., and Reubinoff, B.E. (2010). Reprogramming of DNA replication timing. *Stem Cells* 28, 443–449.

- Simerly, C., Dominko, T., Navara, C., Payne, C., Capuano, S., Gosman, G., Chong, K.-Y., Takahashi, D., Chace, C., Compton, D., et al. (2003). Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 300, 297.
- Simerly, C., Navara, C., Hyun, S.H., Lee, B.C., Kang, S.K., Capuano, S., Gosman, G., Dominko, T., Chong, K.-Y., Compton, D., et al. (2004). Embryogenesis and blastocyst development after somatic cell nuclear transfer in nonhuman primates: overcoming defects caused by meiotic spindle extraction. *Dev. Biol.* 276, 237–252.
- Smith, S.L., Everts, R.E., Tian, X.C., Du, F., Sung, L.-Y., Rodriguez-Zas, S.L., Jeong, B.-S., Renard, J.-P., Lewin, H.A., and Yang, X. (2005). Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17582–17587.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., and Meissner, A. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484, 339–344.
- Somers, J., Smith, C., Donnison, M., Wells, D.N., Henderson, H., McLeay, L., and Pfeffer, P.L. (2006). Gene expression profiling of individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction* 131, 1073–1084.
- Song, B.-S., Yoon, S.-B., Sim, B.-W., Kim, Y.-H., Cha, J.-J., Choi, S.-A., Jeong, K.-J., Kim, J.-S., Huh, J.-W., Lee, S.-R., et al. (2014a). Valproic acid enhances early development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos by alleviating endoplasmic reticulum stress. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 432–440.
- Song, Y., Hai, T., Wang, Y., Guo, R., Li, W., Wang, L., and Zhou, Q. (2014b). Epigenetic reprogramming, gene expression and in vitro development of porcine SCNT embryos are significantly improved by a histone deacetylase inhibitor-m-carboxycinnamic acid bishydroxamide (CBHA). *Protein Cell* 5, 382–393.
- Van Soom, A., Vanroose, G., and de Kruif, A. (2001). Blastocyst evaluation by means of differential staining: a practical approach. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 29–35.
- De Sousa, P.A., Watson, A.J., and Schultz, R.M. (1998). Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. *Biol. Reprod.* 59, 969–977.
- De Sousa, P.A., Dobrinsky, J.R., Zhu, J., Archibald, A.L., Ainslie, A., Bosma, W., Bowering, J., Bracken, J., Ferrier, P.M., Fletcher, J., et al. (2002). Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol. Reprod.* 66, 642–650.
- Sparman, M.L., Tachibana, M., and Mitalipov, S.M. (2010). Cloning of non-human primates: the road “less traveled by”. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1671–1678.
- Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and Parnpai, R. (2012). Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin A treatment. *Cell. Reprogram.* 14, 248–257.
- St John, J., and Lovell-Badge, R. (2007). Human-animal cytoplasmic hybrid embryos, mitochondria, and an energetic debate. *Nat. Cell Biol.* 9, 988–992.
- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K. (2010). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465, 175–181.
- Sterthaus, O., Skoczylas, E., De Geyter, C., Bürki, K., and Ledermann, B. (2009). Evaluation of in vitro cultured rat oocytes, from different strains, by spindle morphology and maturation-promoting-factor activity combined with nuclear-transfer experiments. *Cloning Stem Cells* 11, 463–472.
- Stice, S.L., and Robl, J.M. (1988). Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39, 657–664.
- Stojkovic, M., Stojkovic, P., Leary, C., Hall, V.J., Armstrong, L., Herbert, M., Nesbitt, M., Lako, M., and Murdoch, A. (2005). Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11, 226–231.
- Su, J., Wang, Y., Li, Y., Li, R., Li, Q., Wu, Y., Quan, F., Liu, J., Guo, Z., and Zhang, Y. (2011). Oxamflatin significantly improves nuclear reprogramming, blastocyst quality, and in vitro development of bovine SCNT embryos. *PLoS One* 6, e23805.
- Suemizu, H., Aiba, K., Yoshikawa, T., Sharov, A.A., Shimozawa, N., Tamaoki, N., and Ko, M.S.H. (2003). Expression profiling of placentomegaly associated with nuclear transplantation of mouse ES cells. *Dev. Biol.* 253, 36–53.

Sun, L., Wu, K.-L., Zhang, D., Wang, H.-Y., Wang, Y., Xu, Z.-Y., Huang, X.-Y., Chen, Z.-J., and Liu, H.-Q. (2012). Increased cleavage rate of human nuclear transfer embryos after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Reprod. Biomed. Online* 25, 425–433.

Surani, M.A., Barton, S.C., and Norris, M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548–550.

Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Northey, D.L., Schutzkus, V., and First, N.L. (1994). Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev. Biol.* 166, 729–739.

T

Tachibana, M., Sparman, M., Sritanandomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O., and Mitalipov, S. (2009). Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461, 367–372.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Woodward, J., Sanchis, D.M., Ma, H., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Kang, E., Lee, H.-S., et al. (2013a). Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 493, 627–631.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanandomchai, H., et al. (2013b). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228–1238.

Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S.C., and Surani, M.A. (1997). Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* 16, 6510–6520.

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 11, 1553–1558.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, S., and Ito, Y. (2004). Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning Stem Cells* 6, 165–171.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., Koike, N., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481–484.

Tamashiro, K.L.K., Wakayama, T., Akutsu, H., Yamazaki, Y., Lachey, J.L., Wortman, M.D., Seeley, R.J., D'Alessio, D. a, Woods, S.C., Yanagimachi, R., et al. (2002). Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat. Med.* 8, 262–267.

Tan, J., Liu, Z.-H., Ren, W., Ni, H., Sun, X., and He, G. (1997). The Role of Extracellular Ca²⁺ and Formation and Duration of Pores on the Oolemma in the Electrical Activation of Mouse Oocytes. *J. Reprod. Dev.* 43, 289–293.

Tanaka, S., Oda, M., Toyoshima, Y., Wakayama, T., Tanaka, M., Yoshida, N., Hattori, N., Ohgane, J., Yanagimachi, R., and Shiota, K. (2001). Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol. Reprod.* 65, 1813–1821.

Tang, H.-H., Tsai, Y.-C., and Kuo, C.-T. (2012). Embryo splitting can increase the quantity but not the quality of blastocysts.

Tang, S., Wang, Y., Zhang, D., Gao, Y., Ma, Y., Yin, B., Sun, J., Liu, J., and Zhang, Y. (2009). Reprogramming donor cells with oocyte extracts improves in vitro development of nuclear transfer embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 115, 1–9.

Taranger, C.K., Noer, A., Sørensen, A.L., Håkelién, A.-M., Boquest, A.C., and Collas, P. (2005). Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 5719–5735.

- TARKOWSKI, A.K. (1959). Experiments on the development of isolated blastomers of mouse eggs. *Nature* 184, 1286–1287.
- Tarkowski, A.K., Ozdzinski, W., and Czolowska, R. (2005). Identical triplets and twins developed from isolated blastomeres of 8- and 16-cell mouse embryos supported with tetraploid blastomeres. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 825–832.
- Teranishi, T., Tanaka, M., Kimoto, S., Ono, Y., Miyakoshi, K., Kono, T., and Yoshimura, Y. (2004). Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. *Dev. Biol.* 266, 76–86.
- Terashita, Y., Wakayama, S., Yamagata, K., Li, C., Sato, E., and Wakayama, T. (2012). Latrunculin A can improve the birth rate of cloned mice and simplify the nuclear transfer protocol by gently inhibiting actin polymerization. *Biol. Reprod.* 86, 180.
- Terashita, Y., Yamagata, K., Tokoro, M., Itoi, F., Wakayama, S., Li, C., Sato, E., Tanemura, K., and Wakayama, T. (2013). Latrunculin a treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos. *PLoS One* 8, e78380.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7844–7848.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Van Thuan, N., Wakayama, S., Kishigami, S., and Wakayama, T. (2006). Donor centrosome regulation of initial spindle formation in mouse somatic cell nuclear transfer: roles of gamma-tubulin and nuclear mitotic apparatus protein 1. *Biol. Reprod.* 74, 777–787.
- Van Thuan, N., Bui, H.-T., Kim, J.-H., Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., Mizutani, E., and Wakayama, T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction* 138, 309–317.
- Van Thuan, N., Kishigami, S., and Wakayama, T. (2010). How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J. Reprod. Dev.* 56, 20–30.
- Tomé, D., Dubarry, M., and Fromentin, G. (2004). Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells* 6, 172–177.
- Tóth, S., Huneau, D., Banrezes, B., and Ozil, J.-P. (2006). Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction* 131, 27–34.
- Tsuji, Y., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2009). The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote* 17, 109–115.
- Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Sugie, T., and Katsumata, M. (1985). Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenology* 24, 337–343.
- Tsunoda, Y., Yasui, T., Shioda, Y., Nakamura, K., Uchida, T., and Sugie, T. (1987). Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J. Exp. Zool.* 242, 147–151.
- V**
- Vajta, G., and Gjerris, M. (2006). Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim. Reprod. Sci.* 92, 211–230.
- Vajta, G., Lewis, I.M., Hyttel, P., Thouas, G.A., and Trounson, A.O. (2001). Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning* 3, 89–95.
- Vajta, G., Kragh, P.M., Mtango, N.R., and Callesen, H. (2005). Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 97–112.
- Vassena, R., Han, Z., Gao, S., Baldwin, D.A., Schultz, R.M., and Latham, K.E. (2007a). Tough beginnings: alterations in the transcriptome of cloned embryos during the first two cell cycles. *Dev. Biol.* 304, 75–89.
- Vassena, R., Han, Z., Gao, S., and Latham, K.E. (2007b). Deficiency in recapitulation of stage-specific embryonic gene transcription in two-cell stage cloned mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1548–1556.

Vassena, R., Boué, S., González-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 138, 3699–3709.

Velilla, E., López-Béjar, M., Rodríguez-González, E., Vidal, F., and Paramio, M.-T. (2002). Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 10, 201–208.

VerMilyea, M.D., O'Neill, L.P., and Turner, B.M. (2009). Transcription-independent heritability of induced histone modifications in the mouse preimplantation embryo. *PLoS One* 4, e6086.

Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J., and Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol. Cell* 10, 1223–1233.

W

Wakayama, S., and Wakayama, T. (2010). Improvement of mouse cloning using nuclear transfer-derived embryonic stem cells and/or histone deacetylase inhibitor. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1641–1648.

Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1999). Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat. Genet.* 22, 127–128.

Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (2001). Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122, 49–60.

Wakayama, S., Jakt, M.L., Suzuki, M., Araki, R., Hikichi, T., Kishigami, S., Ohta, H., Van Thuan, N., Mizutani, E., Sakaide, Y., et al. (2006). Equivalency of nuclear transfer-derived embryonic stem cells to those derived from fertilized mouse blastocysts. *Stem Cells* 24, 2023–2033.

Wakayama, S., Kishigami, S., Nguyen, V.T., Ohta, H., Hikichi, T., Mizutani, E., Bui Hong, T., Miyake, M., and Wakayama, T. (2008a). Effect of volume of oocyte cytoplasm on embryo development after parthenogenetic activation, intracytoplasmic sperm injection, or somatic cell nuclear transfer. *Zygote* 16, 211–222.

Wakayama, S., Ohta, H., Hikichi, T., Mizutani, E., Iwaki, T., Kanagawa, O., and Wakayama, T. (2008b). Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20 degrees C for 16 years. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17318–17322.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369–374.

Wakayama, T., Tateno, H., Mombaerts, P., and Yanagimachi, R. (2000). Nuclear transfer into mouse zygotes. *Nat. Genet.* 24, 108–109.

Wale, P.L., and Gardner, D.K. (2010). Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod. Biomed. Online* 21, 402–410.

Wang, B., Pfeiffer, M.J., Schwarzer, C., Araúzo-Bravo, M.J., and Boiani, M. (2014). DNA replication is an integral part of the mouse oocyte's reprogramming machinery. *PLoS One* 9, e97199.

Wang, F., Kou, Z., Zhang, Y., and Gao, S. (2007). Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.* 77, 1007–1016.

Wang, J., Zhang, M., Zhang, Y., Kou, Z., Han, Z., Chen, D.-Y., Sun, Q.-Y., and Gao, S. (2010). The histone demethylase JMJD2C is stage-specifically expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic development. *Biol. Reprod.* 82, 105–111.

Wang, L.-J., Zhang, H., Wang, Y.-S., Xu, W.-B., Xiong, X.-R., Li, Y.-Y., Su, J.-M., Hua, S., and Zhang, Y. (2011a). Scriptaid improves in vitro development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *Cell. Reprogram.* 13, 431–439.

Wang, T., Chen, K., Zeng, X., Yang, J., Wu, Y., Shi, X., Qin, B., Zeng, L., Esteban, M.A., Pan, G., et al. (2011b). The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 9, 575–587.

Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J.M., Agarwal, A., and Sharma, R.K. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil. Steril.* 78, 1272–1277.

- Wang, Y., Su, J., Wang, L., Xu, W., Quan, F., Liu, J., and Zhang, Y. (2011c). The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on gene expression and DNA methylation status in cloned bovine blastocysts. *Cell. Reprogram.* 13, 297–306.
- Wang, Y.S., Xiong, X.R., An, Z.X., Wang, L.J., Liu, J., Quan, F.S., Hua, S., and Zhang, Y. (2011d). Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology* 75, 819–825.
- 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. *Biol. Reprod.* 82, 373–379.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Weaver, J.R., and Bartolomei, M.S. (2013). Chromatin regulators of genomic imprinting. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 169–177.
- Webber, H.J. (1903). NEW HORTICULTURAL AND AGRICULTURAL TERMS. *Science* 18, 501–503.
- Wee, G., Shim, J.-J., Koo, D.-B., Chae, J.-I., Lee, K.-K., and Han, Y.-M. (2007). Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction* 134, 781–787.
- Wells, D.N. (2013). Keith's MAGIC: Cloning and the Cell Cycle. *Cell. Reprogram.* 15, 348–355.
- Wellner, K. (2010). Hans Spemann. Embryo Project Encyclopedia. ISSN: 1940-5030 <http://embryo.asu.edu/handle/10776/1688>.
- Wen, B.-Q., Li, J., Li, J.-J., Tian, S.-J., Sun, S.-C., Qi, X., Cai, W.-T., and Chang, Q.-L. (2014a). The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves in vitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology* 81, 332–339.
- Wen, D., Banaszynski, L.A., Liu, Y., Geng, F., Noh, K.-M., Xiang, J., Elemento, O., Rosenwaks, Z., Allis, C.D., and Rafii, S. (2014b). Histone variant H3.3 is an essential maternal factor for oocyte reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 7325–7330.
- Whitworth, K.M., and Prather, R.S. (2010). Somatic cell nuclear transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol. Reprod. Dev.* 77, 1001–1015.
- Wilkins, J.F., and Haig, D. (2003). What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat. Rev. Genet.* 4, 359–368.
- Willadsen, S.M. (1979). A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277, 298–300.
- Willadsen, S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, 63–65.
- Willadsen, S.M., and Polge, C. (1981). Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.* 108, 211–213.
- Williams, R.S.B., Cheng, L., Mudge, A.W., and Harwood, A.J. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature* 417, 292–295.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.
- Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M., and Reijo Pera, R.A. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat. Biotechnol.* 28, 1115–1121.
- Wongsrikeao, P., Nagai, T., Agung, B., Taniguchi, M., Kunishi, M., Suto, S., and Otoi, T. (2007). Improvement of Transgenic Cloning Efficiencies by Culturing Recipient Oocytes and Donor Cells With Antioxidant Vitamins in Cattle. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 694–702.

Wood, A., and Shilatifard, A. (2004). Posttranslational modifications of histones by methylation. *Adv. Protein Chem.* 67, 201–222.

Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.-P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N., and Pate, B.J. (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301, 1063.

Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C.J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., and Walter, J. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* 2, 241.

Wu, S.C., and Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 607–620.

X

Xin, J., Yang, H., Fan, N., Zhao, B., Ouyang, Z., Liu, Z., Zhao, Y., Li, X., Song, J., Yang, Y., et al. (2013). Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One* 8, e84250.

Xiong, X., Wang, L., Wang, Y., Hua, S., Zi, X., and Zhang, Y. (2014). Different preferences of IVF and SCNT bovine embryos for culture media. *Zygote* 22, 1–9.

Xu, Y. (2005). A new role for p53 in maintaining genetic stability in embryonic stem cells. *Cell Cycle* 4, 363–364.

Xu, W., Wang, Y., Li, Y., Wang, L., Xiong, X., Su, J., and Zhang, Y. (2012). Valproic acid improves the in vitro development competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell. Reprogram.* 14, 138–145.

Xu, W., Li, Z., Yu, B., He, X., Shi, J., Zhou, R., Liu, D., and Wu, Z. (2013). Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. *PLoS One* 8, e64705.

Y

Yamada, M., Johannesson, B., Sagi, I., Burnett, L.C., Kort, D.H., Prosser, R.W., Paull, D., Nestor, M.W., Freeby, M., Greenberg, E., et al. (2014). Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*.

Yamaguchi, M., Ito, Y., and Takahashi, S. (2007). Fourteen-week feeding test of meat and milk derived from cloned cattle in the rat. *Theriogenology* 67, 152–165.

Yamanaka, S., and Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712.

Yamanaka, K., Sugimura, S., Wakai, T., Kawahara, M., and Sato, E. (2009). Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.* 55, 638–644.

Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R.O., and Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev. Dyn.* 235, 2301–2314.

Yang, F., Hao, R., Kessler, B., Brem, G., Wolf, E., and Zakhartchenko, V. (2007a). Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction* 133, 219–230.

Yang, L., Chavatte-Palmer, P., Kubota, C., O'neill, M., Hoagland, T., Renard, J.-P., Taneja, M., Yang, X., and Tian, X.C. (2005). Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 431–438.

Yang, X., Presicce, G.A., Moraghan, L., Jiang, S.E., and Foote, R.H. (1994). Synergistic effect of ethanol and cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. *Theriogenology* 41, 395–403.

Yang, X., Smith, S.L., Tian, X.C., Lewin, H.A., Renard, J.-P., and Wakayama, T. (2007b). Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat. Genet.* 39, 295–302.

Yin, R., Mao, S.-Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., Zhang, D., Huang, H., Gao, J., Li, Z., et al. (2013). Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10396–10403.

- Yin, X.J., Tani, T., Yonemura, I., Kawakami, M., Miyamoto, K., Hasegawa, R., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2002a). Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol. Reprod.* 67, 442–446.
- Yin, X.J., Kato, Y., and Tsunoda, Y. (2002b). Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. *Reproduction* 124, 41–47.
- Yonai, M., Kaneyama, K., Miyashita, N., Kobayashi, S., Goto, Y., Bettpu, T., and Nagai, T. (2005). Growth, reproduction, and lactation in somatic cell cloned cows with short telomeres. *J. Dairy Sci.* 88, 4097–4110.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007a). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, Y., Ding, C., Wang, E., Chen, X., Li, X., Zhao, C., Fan, Y., Wang, L., Beaujean, N., Zhou, Q., et al. (2007b). Piezo-assisted nuclear transfer affects cloning efficiency and may cause apoptosis. *Reproduction* 133, 947–954.
- Yu, Y., Mai, Q., Chen, X., Wang, L., Gao, L., Zhou, C., and Zhou, Q. (2009). Assessment of the developmental competence of human somatic cell nuclear transfer embryos by oocyte morphology classification. *Hum. Reprod.* 24, 649–657.
- Yu, Y., Yan, J., Li, M., Yan, L., Zhao, Y., Lian, Y., Li, R., Liu, P., and Qiao, J. (2012). Effects of combined epidermal growth factor, brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 on human oocyte maturation and early fertilized and cloned embryo development. *Hum. Reprod.* 27, 2146–2159.
- Yun, Y., Zhao, G., Wu, S., Li, W., and Lei, A. (2012). Replacement of H1 linker histone during bovine somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 78, 1371–1380.
- ## Z
- Zhang, B., Wang, X., and Nazarali, a J. (2010). Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of *hoxa2* and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30, 137–148.
- Zhang, H., Wang, Y., Sang, Y., Zhang, Y., and Hua, S. (2014). Combination of S-adenosylhomocysteine and scriptaid, a non-toxic epigenetic modifying reagent, modulates the reprogramming of bovine somatic-cell nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 81, 87–97.
- Zhang, Y., Li, J., Villemoes, K., Pedersen, A.M., Purup, S., and Vajta, G. (2007). An epigenetic modifier results in improved in vitro blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 9, 357–363.
- Zhao, T., and Xu, Y. (2010). P53 and Stem Cells: New Developments and New Concerns. *Trends Cell Biol.* 20, 170–175.
- Zhao, J., Ross, J.W., Hao, Y., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N., and Prather, R.S. (2009). Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 81, 525–530.
- Zhao, J., Hao, Y., Ross, J.W., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy, C.N., and Prather, R.S. (2010). Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell. Reprogram.* 12, 75–83.
- Zhong, Z., Spate, L., Hao, Y., Li, R., Lai, L., Katayama, M., Sun, Q.-Y., Prather, R.S., and Schatten, H. (2007). Remodeling of centrosomes in intraspecies and interspecies nuclear transfer porcine embryos. *Cell Cycle* 6, 1510–1520.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zhou, Q., Renard, J.-P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., and Cozzi, J. (2003). Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302, 1179.
- Zuccotti, M., Garagna, S., and Redi, C.A. (2000). Nuclear transfer, genome reprogramming and novel opportunities in cell therapy. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 623–629.

AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull agrair a l'Elena Ibáñez i al Josep Santaló haver-me donat l'oportunitat de participar, sota la seva direcció, en un projecte de recerca tan apassionant com és el clonatge. Aquesta tesi doctoral ha estat el repte més gran amb el que m'he trobat. En el seu transcurs he experimentat moments de glòria amb l'arribada "dels meus clons". Però també he viscut moments de dificultat. I la seva orientació i suport han estat claus en tot moment. Admiro la professionalitat amb la que treballen, assolint fàcilment la perfecció sense perdre mai el sentit de l'humor. Els agraeixo la dedicació i atenció en l'elaboració de tots els treballs que hem redactat junts. I els dono especialment les gràcies per tot el que he pogut aprendre al llarg d'aquests anys.

Vull expressar el meu agraïment també per a la Laura Tusell, la Zaida Sarrate, l'Ester Anton, la Cristina Camprubí, el Joan Blanco, l'Anna Genescà, el Leo Barrios, la Carme Nogués, la M^a Dolors Coll, la Montse Ponsà i la Fanny Vidal, tots ells professors del departament que, juntament amb l'Elena i el Josep, varen despertar en mi l'interès per la Biologia Cel·lular durant els meus anys de llicenciatura a la UAB, i després varen acollir-me amb els braços oberts a la gran família que és la Unitat de Biologia Cel·lular.

A més, al llarg de la realització d'aquesta tesi doctoral he tingut la gran sort d'estar envoltada de persones disposades a ajudar-me i a oferir-me part del seu temps, un recurs molt escàs avui en dia.

He d'agrair al Nuno Costa haver-me ensenyat la tècnica de transferència nuclear, la gran protagonista d'aquesta tesi, i haver-me passat el testimoni de "Clonador de la Unitat". Aquest mateix testimoni el té ara la Laia Piqué, a qui li desitjo molta sort i li agraeixo fer-me sentir una heroïna quan la sento dir que tinc un abecedari de clons. També he tingut el plaer de compartir el laboratori d'embrions amb la Sheyla González, el Jonatan Lucas, el Sergi Novo, la Marina Tomsic, l'Anna Seriola i la Marta Vila. Tots ells no només són excel·lents companys sinó també bons amics.

També vull fer un agraïment molt sincer als membres del Servei d'Estabulari de la UAB, entre ells, l'Ignacio Segovia, el Joan González, la Rafaela Gascón, el Juan Ramón Garcia, el Carles Baldellou, el Jordi Cantó i el Pedro Otaegui, per ajudar-me sempre que ho he necessitat i per la feina tant important que realitzen amb els ratolins establats, als quals també els dec aquesta tesi.

El següent lloc on he passat més temps durant aquests anys ha estat el meu despatx. Afortunadament, sempre he estat molt ben acompanyada. Gràcies Sheyla González, Mariona Terradas i Lydia García per acollir-me tan bé i per ajudar-me sempre. Gràcies també a la Mirèia

Borràs, juntament amb la Laia Piqué i la Marta Vila, per mantenir l'ambient càlid. Totes vosaltres m'heu fet sentir com a casa des del primer dia. A més, també he pogut gaudir de molt bones companyes i amigues fora del despatx. La Marta Farré, la Marta Martin, l'Assumpta Duran, la Nerea Gaztelumendi, la Laia Hernández, l'Anna Godo i la Laia Vergés, sempre disposades a escoltar i a col·laborar. L'amistat de totes vosaltres ha estat fonamental per poder assolir aquest repte, i que bé ens ho hem passat juntes!

I no puc deixar de mencionar a la resta de companys "matxaques" que en algun moment, o en tots, han coincidit amb mi a la Unitat: la Judith Pampalona, la Irene Miguel, l'Òscar Molina, l'Eli Fernández, la Cristina Frias, la Tània Patiño, el Dani Domínguez, l'Albert Salas, la Puri Feijoo, l'Andreu Blanquer, l'Aina Bernal, l'Inma Mora, el Toni Aranda, l'Helena Montón, el Jorge Soriano, el Joan Repullés, la Teresa Anglada, la Mireia Solé, la Lidia Ávila, la Rosa Cristina, etc. Amb alguns he compartit moltes classes, jornades i festes, i amb altres només algunes estones de passadís o de micros, però a tots vosaltres us agraeixo l'energia positiva i l'ambient alegre que heu generat fins i tot en els dies més difícils!

Tampoc no vull deixar de donar les gràcies a la Sílvia Gasulla i a la M^a Jesús Álvarez per l'eficiència amb la qual treballen i els seus ànims constants, així com al Marc Puigcerver i al David Soler per la seva ajuda tècnica.

Vull expressar el meu agraïment també a les companyes de viatge de Veterinària: la Maria Teresa Paramio, la Teresa Mogas, la Dolors Izquierdo, la Maria Catalá, la Roser Morato, la Marcia Ferraz i la Núria Arcarons, gràcies per fer tan agradables i productius els nostres congressos juntes!

Fora de les fronteres del campus de la UAB, vull agrair a la Nuri, l'Ari i l'Arnau ser tan bons consellers i amics, i als meus amics d'Olesa haver-me ajudat a desconnectar de la tesi de tant en tant de forma tan amena!

Finalment, gràcies a tota la meva família, també la Rosa, el Josep Lluís i l'Elies, per preocupar-se per mi i oferir-me la seva ajuda, i en especial vull agrair a les meves tietes haver-me preparat els fantàstics dinars de *tupper* que han alegrat els meus dies al laboratori.

I per últim, però no per això els menys importants sinó tot el contrari, vull agrair als meus pares, a la Cristina (el meu propi clon) i al Bernat el seu suport incondicional, no només al llarg de la realització d'aquesta tesi sinó en tots els aspectes de la vida, sóc molt afortunada de tenir-vos!

Moltíssimes gràcies a tots!