

Recientes avances en micromanipulación y transgénesis en mamíferos domésticos.

Daniel Salamone, Romina Bevacqua, Federico Pereyra Bonnet, Andrés Gambini, Natalia Canel, M. Inés Hiriart, Gabriel Vichera, Lucía Moro, Javier Jarazo, Alejandro Gibons.

Resumen

Esta revisión describe los trabajos que hemos realizado en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires y trabajos hechos en colaboración con una empresa de biotecnología argentina. Los experimentos realizados fueron principalmente en el área de micromanipulación embrionaria y transgénesis animal. Se describen experiencias de transgénesis por trasplante nuclear utilizando células genéticamente modificadas incluyendo la reclonación de animales transgénicos. Luego se presentan resultados en que mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) permitieron producir embriones transgénicos en cinco especies domésticas diferentes. Otros trabajos descriptos exploran numerosas alternativas para generar transgénesis por ICSI en bovinos y ovinos. Seguidamente se analizaron varias estrategias para producir animales transgénicos entre ellas la inyección en oocitos o cigotos de células del cúmulo, vesícula ooplásmica ambas previamente incubadas durante 5 minutos con la transgen o la inyección del plásmido solo. Todos estos tratamientos fueron eficientes induciendo la expresión de ADN exógeno en embriones preimplantados. Sin embargo hubo un gran mosaiquismo en la expresión del transgen. Varias estrategias fueron analizadas para revertir el mosaiquismo incluyendo una novedosa técnica de clonación de gametos. Concluimos que múltiples métodos nuevos de micromanipulación y transgénesis están disponibles ahora para ser empleados en las especies domésticas.

Introducción

El objetivo fundamental de este trabajo no es realizar una revisión exhaustiva de las investigaciones en el área sino presentar métodos prometedores recientemente desarrollados o evaluados en nuestro laboratorio.

Clonación por transferencia nuclear

Clonación de células somáticas por transferencia nuclear ha permitido la propagación animales domésticos de élite y la generación de animales transgénicos para fines agrícolas o biomédicos. Brevemente, la transferencia nuclear (TN) implica la enucleación de un ovocito receptor, seguido por la fusión o inyección con una célula donante. El desarrollo es inducido artificialmente por la activación química o física. La producción de animales clonados por transferencia nuclear de células somáticas se ha logrado con éxito en ovejas (Campbell et al., 1996; Wells et al., 1997; Wilmut et al., 1997); (Baguisi et al.,

1999) cabras y vacas (Cibelli et al., 1998; Kato et al., 1998; Wells et al., 1998) entre otras especies.

Hay varios factores que influyen en los resultados de TN, incluyendo los métodos de enucleación (Moro et al, 2011), fusión, activación (Vichera et al., 2009, Canel et al., 2010), la célula donante (Salamone et al., 2008) así como el grado de sincronía del ciclo celular donante/recipiente. La fusión de la célula donante y el ovocito receptor enucleado depende de numerosos factores (Collas et al., 1993). El núcleo también puede ser inyectado (Canel et al, 2010). La activación y desarrollo a blastocistos de embriones de clonación hoy ya son equivalentes a la de los ovocitos fecundados in vitro (Liu et al., 1998).

Un problema con los sistemas existentes de clonación por transferencia nuclear es la baja supervivencia de los embriones y fetos clonados. Una posible explicación es que el núcleo de donantes no es correctamente reprogramado (Heyman et al, 2006, Renard et al., 2002).

Evaluamos la combinación de ionomicina con un compuesto aislado recientemente en la Argentina, la Dehidroleucodina (DhL) para la activación química, tanto en la ICSI como el TN (Vichera et al., 2009). En un trabajo realizado por Canel et al. (2010) demostramos que al contrario del 6-dimethylaminopurine (DMAP), ionomicina-DhL induce una dinámica de formación pronuclear similar a la fertilización in vitro (FIV) y que la ionomicina-DhL en combinación con Citochalasina B induce un mayor desarrollo a blastocisto de los embriones de clonación. Además, todos los tratamientos con DhL produjeron menos embriones con blastómeros poliploides que los tratamientos con Ionomycin-DMAP, pero tasas similares de blastocistos (Canel et al, 2010).

Una de las principales aplicaciones del TN es la clonación de animales de valor genético. Para mejorar los resultado se evaluó una nueva alternativa para producir clones equinos anteriormente descrita para el bovino (Ribeiro et al., 2009). La cual consiste en la agregación de embriones libre de la zona pelucida originados por TN de células somáticas de un animal. Para esto se colocan tempranamente 2 o tres embriones en estrecho contacto en micropozos al momento de la compactación los embriones se integran. La agregación del embrión mejoró el desarrollo in vitro, y el porcentaje de preñez. Lo más interesante es que la clonación equina por agregación de dos o tres embriones no implicó la utilización de oocitos adicionales. Una de las ventajas es que es una buena estrategia para mejorar las tasas de preñez de clonación equina sin transferir embriones adicionales, evitando producir mellizos, factor que no es deseado en esta especie. El primer potro clonada viable obtenido con este método nació el 4 de agosto de 2010 (Gambini et al, 2010).

Transferencia de genes por microinyección pronuclear

El primer método para producir animales transgénicos fue la microinyección

de ADN exógeno (ADNe) en el pronúcleo masculino de cigotos (Gordon et al., 1980). La transgénesis por microinyección todavía se utiliza en ratones principalmente para generar conocimientos en investigación básica. Este procedimiento ha demostrado ser útil en especies como conejos, ovejas y cerdos (Hammer *et.al*, 1985), pero es dependiente de la visualización adecuada del pronúcleo masculino y en algunas especies como la bovina tiene muy baja eficiencia (Eyestone, 1999).

Transgenesis por clonación

Con el advenimiento de la clonación por transferencia nuclear, la microinyección nuclear tendió a ser reemplazado por la TN utilizando células somáticas genéticamente modificadas (Schnieke et al., 1997; Cibelli et al, 1998). Trabajando en conjunto con la empresa Biosidus en septiembre de 2002 produjimos una vaca capaz de expresar la hormona de crecimiento humana (hGH) que fue la primera producida en América del Sur. La producción de hGH humana en leche y el potencial de utilizar vacas transgénicas como biorreactores fueron analizadas y publicados por Salamone et al. (2006). Se demostró que es posible producir en leche hGH humana y que las vacas transgénicas constituyen una forma eficiente de producir esta proteína. Estimamos que serían necesario sólo unos 15 animales para cubrir las necesidades mundiales actuales de esta proteína (Salamone et al., 2006). Sin embargo, producir animales clonados y transgénicos por TN nuclear es costoso y tiene en general baja eficiencia, explicada en parte por fracaso de reprogramación epigenética (Rideout *et. al.*, 2001).

Aunque la clonación es una técnica poderosa para generar animales transgénicos, aparecen varios problemas adicionales en la clonación convencional al momento de producir animales transgénicos. El evento de transfección puede afectar el proceso y diferentes transfecciones de la misma línea de células somáticas a pesar de producir semejante porcentajes de blastocistos pueden diferir en la supervivencia fetal. Se realizó un experimento con la empresa Biosidus, con una línea de células fetales de un feto femenino de raza Jersey de 75 días de edad, la cual se utilizó como control y además fue transfectada con ADNe en 3 oportunidades utilizando el mismo protocolo. Los eventos se llamarán transfección 1, 2 y 3 las células fueron modificadas con una construcción de ADN y liposomas. Un nacimiento fue obtenido del control. Cuatro y 7 nacimientos se obtuvieron de Transfecciones 1 y 3, respectivamente. Aunque transfección 2 tenía buen desarrollo *in vitro*, este tratamiento no produjo ningún preñez. Este hecho demuestra que el evento de transfección proporciona una fuente adicional de variabilidad en la obtención de animales vivos de transgénicos. Nuestros resultados señalaron la necesidad de controlar la supervivencia fetal por ecografía para detectar lo antes posible las deficiencias de desarrollo presentado por transfección.

En un programa de clonación a gran escala destinado a obtener animales transgénicos, es muy importante producir la integración del transgen y expresión

génica bien caracterizados. Sin embargo, después de transfección no homóloga se introducen a cada célula un número heterogéneo de copias del transgen así como ubicaciones en diferentes cromosomas, se puede realizar la propagación clonal pero esto puede comprometer la viabilidad de células donantes. La reclonación de la primera generación de terneros transgénicos ofrece la oportunidad de aumentar la homogeneidad entre los animales transgénicos. Terneros de reclonación se obtuvieron en un experimento (n=procedimiento de clonación de 1739) En este ensayo se evaluó la tasa de supervivencia después de una segunda ronda de la clonación utilizando fibroblastos transgénicos obtenidos del cordón umbilical y de la oreja de terneros clones. Siete nacimientos se obtuvieron de la línea original de células fetales, un nacimiento fue obtenido de la reclonación del cordón umbilical y dos terneros se generaron de la reclonación a partir de los fibroblastos de oreja. Desarrollo de blastocistos fue diferente entre fibroblastos fetales transfectados y ambos grupos de tratamiento de reclonación. Se observaron diferencias en las tasas de embarazo entre blastocistos generados por las diferentes fuentes de células donantes. Aunque con menor producción de blastocisto, nuestros resultados sugieren que reclonación proporciona un método adicional para obtener animales transgénicos, donde fibroblastos de cordón umbilical podrían dar mejores resultados para reclonación que los obtenidos a partir de oreja de ternero.

Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

(ICSI)La ICSI ha sido utilizado en los seres humanos y ratones (Palermo et al., 1992; Kimura y Yanagimachi, 1995). En estas especies, la inyección del espermatozoide en el oocito provoca la activación de los mismos (Nakano et al., 1997). Sin embargo, después de la ICSI la mayoría de los animales domésticos la activación no se desarrolla correctamente (McEvoy et al., 2003; Malcuit et al., 2006). Con frecuencia, los protocolos de activación química para ICSI utilizan ionomicina, un ionóforo de calcio, seguido de 3 h de incubación con DMAP (Rho et al., 1998). La mayoría de los grupos realiza ICSI utilizando un dispositivo piezoeléctrico y obtienen aceptables porcentajes de blastocistos, nosotros reemplazamos este costoso equipo utilizando protocolos de activación química y produjimos un cordero vivo Fig. 2 (Pereyra Bonnet, 2009). En equinos esta técnica tiene un gran potencial, debido a que los ovocitos pueden ser colectados por aspiración transvaginal guiados por ecografía en animales vivos. Desgraciadamente hasta el día de hoy no se los puede fertilizar eficientemente con las técnicas regulares de fertilización in vitro (FIV). La ICSI parece solucionar este problema y actualmente estamos generamos buenos porcentajes de blastocistos en equinos. Recientemente, hemos explorado el uso de esta técnica en gatos con una alta tasa de blastocistos sin la necesidad de activación química, simplificando el procedimiento y permitiendo su aplicación en felinos en extinción (Moro y Salamone, 2010).

Transferencia de genes por ICSI (TG-ICSI)

Varios autores publicaron alternativas a las técnicas de transferencia nuclear de células somáticas y la microinyección pronuclear para obtener animales. Éstas son la transfección del espermatozoide seguida de inseminación laparoscópica (IL) (Lavitrano et al., 2002), la FIV (Lavitrano et al., 1989) y la ICSI (Perry et al., 1999). IL y FIV permitirían generar animales transgénicos en forma más simple. Sin embargo, los resultados han generado un gran debate (Lavitrano et al., 1989; Brinster *et. al*, 1989). Por otro lado, ICSI demostró ser una técnica eficaz para producir descendencia en ratones (Perry et al., 1999). La transferencia de genes mediada por ICSI con frecuencia da una alta tasa de expresión mosaico del transgen. Una explicación posible es que la transgen no se integra en el genoma del embrión antes de primeras divisiones celulares (Smith y Spadafora, 2005; Perry et al 1999; Szczygiel et al., 2003; Kaneko et al 2005). Además, el transgen podría permanecer extracromosómico y perderse durante sucesivas divisiones mitóticas (Celebi et al., 2002).

En un experimento, utilizamos «TG-ICSI» asistida por activación química demostramos en cinco especies incluyendo a los ovinos, porcinos, felinos, bovinos y equinos, que es posible obtener embriones que expresan la proteína verde fluorescente (EGFP) en todas estas especies. Los espermatozoides fueron coincubados con plásmido pCX-EGFP e inyectados en el ovocito MII. El Protocolo de activación química fue ionomicina seguido luego de 3 horas por el tratamiento con DMAP de 3 horas. Hemos detectado altas proporciones de los embriones EGFP fluorescentes en las cinco especies (23 a 60%) en el cuarto día y se produjo blastocistos verde en bovinos, ovinos y gato (Pereyra Bonnet et al, 2008).

En el ganado, la TG-ICSI no fue evaluada hasta nuestro reporte (Pereyra et al, 2008). La razón principal de la falta de intentos previos son los pobres resultados obtenidos después de la ICSI convencional en esta especie. En otro estudio determinamos las mejores condiciones para la TG-ICSI en bovinos. Se evaluaron los diversos aspectos de la fecundación y desarrollo embrionario tras cinco tratamientos de activación. Los espermatozoides fueron co-incubados con el plásmido pCX-EGFP e inyectados en ovocitos en metafase II, que luego fueron tratados con ionomicin (Io), antes de la activación a los que se les sumó algunos de los siguientes compuestos: DMAP (Io-DMAP), un tratamiento adicional de Io sumado al DMAP (2Io-DMAP), sólo un segundo tratamiento de Io (2Io), etanol (EtOH Io) o cloruro de estroncio (Io-SrCl₂). Se evaluaron las tasas de fertilización a las 16 h después de ICSI, la presencia de una cabeza de espermatozoide condensada en el día 4, el porcentaje de blastocistos y la expresión de EGFP al día 7. Las tasas de fertilización no difirieron significativamente entre los tratamientos. Todos los embriones EGFP positivo (100%) eran fertilizados, mientras que al menos el 60% de los embriones EGFP negativo tenía una cabeza de espermatozoides condensada. La producción de blastocistos después 2Io-DMAP no eran significativamente diferentes de Io-DMAP o Io-EtOH, pero fueron superiores a 2Io o tratamientos

de lo-Src12- (25,9, 18,7, 14,7, 9,4 y 10,9% respectivamente). En bovinos, TM-ICSI demostró ser una técnica poderosa porque más del 80% de los blastocistos expresó proteína EGFP (Bevacqua et al 2010). En otro trabajo evaluamos IL, la FIV y la ICSI como métodos para producir embriones transgénicos ovinos utilizando el plásmido egfp. Todos los tratamientos los espermatozoides habían sido expuestos al plásmido pCX-EGFP. Se obtuvieron altas tasas de morulas/blastocistos con LI y la fecundación in vitro, pero no hubo embriones que expresaran egfp. En contraste, el 91,6% morulas y blastocistos expresando egfp cuando se usaba la TG-ICSI (Pereyra Bonnet, et al 2011).

Transferencia de genes por microinyección citoplasmática

Basado en nuestro resultado en ICSI, determinamos que no solamente el espermatozoide sino que otras células e incluso fragmentos celulares podían transferir el ADN exógeno (ADNe) al embrión. Cuando inyectamos células del cúmulo, fragmentos celulares (los cuales llamamos vesículas ooplásmicas) incubados con el ADNe, o ADNe desnudo en el citoplasma de ovocitos MII, cuando se induce el desarrollo embrionario de estos había expresión de ADNe (Pereyra Bonnet et al, 2011, Bevacqua et al., 2010b). Utilizando la microscopía confocal demostramos que interacción del ADNe marcado con FITC se adhería a las células de cúmulo y vesículas ooplásmicas. En un experimento más, evaluamos si podían producir embriones que expresasen el transgen por medio de la inyección de vesícula, seguido de la fecundación in vitro. El análisis preliminar de los embriones indica en 1/5 de los blastocistos eventos de integración detectable producidos por TN. Nuestros estudios demuestran por primera vez que un corto período de co-incubación con el transgen de células somáticas utilizadas luego para TN en mamíferos se logran embriones que expresan el transgen. También se pueden obtener embriones que expresan ADNe por inyección de vesículas ooplásmica o por la inyección del ADNe sólo en cigotos producidos por FIV, lo que simplificaría enormemente las técnicas de transgénesis.

En otros experimentos se estudiaron diferentes alternativas para mejorar la eficiencia de la transgénesis y evitar patrones de expresión mosaico de transgen. Estructuras circulares y lineales plásmido e inhibidores de ciclo celular (DMAP y DhL) fueron probados con este objetivo (Bevacqua et al., 2010b). EGFP expresión fue mayor cuando se incubó el plásmido lineal en comparación con el circular pCX-EGFP y las tasas de blastocistos verde fueron más altas para los grupos inoculados con el transgen lineal con vesículas que sólo el plásmido lineal. Análisis de FISH mostraron evidencias de la integración del transgen en embriones verdes. El inhibidor del ciclo celular DMAP produjo mayor área de focos de H2AX histonas fosforilada (que es un indicador de ruptura doble de la cadena de ADN), y reducida expresión de mosaico. Intentamos obtener una mayor simplificación de la técnica utilizando ovocitos bovinos y cigotos, que fueron inyectados intracitoplasmáticamente con complejos formados por ADNe y liposomas. Aproximadamente 70% de los embriones inyectados y 50% de los blastocistos expresaron EGFP, cuando egfp-liposoma se inyectó post-fertilization h 16 (Vichera et al., 2010).

El porcentaje de integración de todos estos métodos queda por confirmar con el nacimiento de animales transgénicos.

Diferentes enfoques para la reversión de multiplicación y mosaicismo de embriones

Nuestro primer intento consistió en la producción de embriones transgénicos FIV por microinyección de vesícula para luego utilizar estos blastómeros transgénicos como célula de donantes para la clonación. Se produjo una alta eficiencia en la inversión de mosaiquismo y multiplicación de embriones transgénicos (Bevacqua 2010b).

Otra experimento que estamos realizando consiste en la separación de blastómeros transgénicos verdes (expresando eGFP), seguido de la agregación de una blastómera transgénica con dos estructuras provenientes de la fusión embriones de 2 células. A esto se lo acompaño o no de agregaciones asincrónico. Esta técnica permite multiplicado embriones transgénicos. El blastómero verde originará el embrión (en general una célula). los blastómeros fusionados y más tempranos al momento de la agregación tienden a formar trofoblasto. Teóricamente, puede reducirse la tasa de mosaiquismo de la futura descendencia (Hiriart et al, 2010). Esta metodología también podría utilizarse para multiplicar los embriones de animales de alto valor genético, al poder dividir estos embriones en sus blastómeros para darle masa mediante agregación con futuras células trofoblásticas generadas de embriones de poco valor. Así de un embrión originar varios.

Otra opción para reducir el mosaiquismo que exploramos es la clonación de gametos. Hemos demostrado que el espermatozoides y los oocitos pueden ser eficiente clonado (Vichera et al, 2007, 2011a, 2011b). Produjimos blastómeros verdes androgénicos haploides por la inyección de un solo espermatozoide por egfp TG-ICSI a oocitos a los que se les retira en núcleo femenino. Luego utilizamos a las blatómeras androgenéticas para fertilizar ovocitos, resultando en varios embriones que expresan homogéneamente el transgen. Este enfoque ofrece un enorme potencial, ya que permite determinar el sexo del núcleo de esperma antes a la fertilización. También es posible clonar oocitos a los que se les incorporó previamente ADN_e (Vichera et al., 2011b) seguido de la reconstrucción de embriones bovinos biparental para después de generar embriones que expresen en transgen en forma homogéneos. Esto abre la posibilidad de que el genoma de espermatozoides o de ovocitos pueden se clonados multiplicándolos, es probable que en un futuro pueda lograrse la generación de líneas haploide. Esto tendría el potencial para generar un número ilimitado de embriones biparentales combinando estas células haploides con hemizigotas haploide del sexo opuesto.

Las aplicaciones de estas tecnologías están sujetas a nuestra capacidad de imaginación e innovación. Los animales que se han generado con algunos métodos (Fig. 1, 2 y 3) forman una especie de postales del futuro que demuestran la posibilidad de utilizar estas tecnologías en nuestro país.



Fig. 1: BS Ñandubay Bicentenario caballo clondo producido en el año 2010



Fig. 2: Pampas: clones producidas a partir de células transfectadas con hGH, 2002.



Fig. 3: Esperanza cordero generado por ICSI producido en 2008.

Referencias

Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempe, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W., and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17: 456-61.

Bevacqua Romina, Federico Pereyra-Bonnet, Rafael Fernandez-Martin, Daniel F. Salamone. 2010. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. *Romina Theriogenology* 74(6):922-31.

Bevacqua R. J., F. Pereyra-Bonnet, R. Olivera, M. I. Hiriart, R. Fernandez-Martín, D. F. Salamone. 2010b. New IVF transgenesis strategy in bovine using cell cycle inhibitors and mosaicism reversion by cloning. *Reproduction, Fertility and Development*, Vol. 23 No. 1 Pages 107 – 107.

- Canel N, Bevacqua R, Fernández-Martín R, and Salamone D. 2010. Activation with Ionomycin followed by Dehydroleucodine and Cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cellular Reprogramming*. 2010 Aug;12(4):491-9.
- Brinster, R. L., Sandgren, E. P., Behringer, R. R., and Palmiter, R. D. 1989. No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 59: 239–241.
- Canel N, Bevacqua R, Fernández-Martín R, Salamone DF. 2010. Activation with ionomycin followed by dehydroleucodine and cytochalasin B for the production of parthenogenetic and cloned bovine embryos. *Cell Reprogram*. 12(4):491-9.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line.. *Nature* 7;380(6569):64-6.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A., and Robl, J. M. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-8.
- Celebi C, Auvray P, Benvegna T, Plusquellec D, Jegou B, Guillaudeux T. 2002. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following in vivo transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev* 62(4):477-82.
- Collas, P., Fissore, R., and Robl, J. M. 1993. Preparation of nuclear transplant embryos by electroporation. *Anal Biochem* 208:1-9
- Eyestone, W.H. 1999. Production and breeding of transgenic cattle using in vitro production technology. *Theriogenology*, 51:509-517.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec;77(12):7380-4.
- Heyman Y., P. Chavatte-Palmer, D. LeBourhis, S. Camous, X. Vignon, and J.P. Renard 2002. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos *Biol Reprod* 66: 6-13.
- Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P. 2005. Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 64(8):1704-15.
- Kato, Y., Yabuuchi, A., Motosugi, N., Kato, J., and Tsunoda, Y. 1999. Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer. *Biol Reprod* 61: 1110-4.
- Kimura, Y., and Yanagimachi, R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52, 709–720.

- A. Gambini, J. Jarazo, R. Olivera, F. Karlanian, D. F. Salamone. 2010. Aggregation of cloned equine embryos: improvement of in vitro and in vivo development. *Reprod Fert and Develop* 23: 166 – 166.
- Hammer, R. E., Pursel, V. G., Rexroad, C. E., Jr, 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: 20–26.
- Hiriart M. I., R. J. Bevacqua, R. Fernandez-Martin, D. F. Salamone. 2010. Multiplication of 8-cell embryos by aggregation of a single enhanced green fluorescent protein-labeled blastomere with putative tetraploid embryos. *Reprod, Fert and Develop* 23:168 – 169.
- Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., and Spadafora, C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 57: 717–723.
- Lavitrano, M., Bacci, M. L., Forni, M., Lazzereschi, D., Di Stefano, C., et al. 2002. Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 14 230–14 235.
- Liu L, Ju JC, Yang X. 1998. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 59:537–545.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A. C. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17–18.
- Pereyra-Bonnet F, R Bevacqua, I La Rosa, P Sipowicz, M Radrizzani., R Fernandez-Martin, D Salamone, 2011. Novel methods to induce exogenous gene expression in SCNT, parthenogenic and IVF bovine embryos *Trangenic Reseach*.(accepted).
- Pereyra-Bonnet F., R. Fernández-Martín, R. Olivera, J. Jarazo, G. Vichera, A. Gibbons, D. Salamone. 2008. A unique method to produce transgenic embryos in ovine, porcine, feline, bovine and equine species. *Reproduction, Fertility and Development*, Vol. 20 No. 7 Pages 741 – 749.
- Pereyra-Bonnet F, A Gibbons, M Cueto, P Sipowicz, R Fernández-Martina, D Salamone. 2010. Efficiency of sperm mediated gene transfer in ovine by Laparoscopic Insemination, In Vitro Fertilization or Intracytoplasmic Sperm Injection with Different sperm/DNA incubation treatments. *J Reprod and Develop*. (acceted)
- Perry, A. C., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., and

- Yanagimachi, R. 1999. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284: 1180–1183.
- Malcuit, C., Maserati, M., Takahashi, Y., Page, R., and Fissore, R. A. 2006. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal $[Ca^{2+}]_i$ responses and oocyte activation. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 39–51.
- McEvoy, T. G., Ashworth, C. J., Rooke, J. A., and Sinclair, K. D. 2003. Consequences of manipulating gametes and embryos of ruminant species. *Reprod. Suppl.* 61: 167–182.
- Moro, L. N. 1; Vichera, G. 1; Olivera, R. 1; Salamone, D. 2011. Evaluación de la enucleación asistida por demecolcina como método para evitar la exposición a luz UV en la producción de embriones bovinos por técnica de clonación. In *vet (aceptado) Argentina*
- Moro L. N., D. F. Salamone. 2010. Development of domestic cat embryos generated by intracytoplasmic sperm injection exposed to ionomycin activation and different culture conditions. *Reprod Fert and Develop* 23: 241 – 242.
- Nakano, Y., Shirakawa, H., Mitsuhashi, N., Kuwabara, Y., and Miyazaki, S. 1997. Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 1087–1093.
- Renard JP, Zhou Q, LeBohurgis D, Chavatte-Palmer, I Hue, Y Heyman and Vignon. 2002. Nuclear Transfer Technologies: Between successes and doubts *Theriogenology* 57: 203.
- Rideout, W. M., Eggan, K., and Jaenisch, R. 2001. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093–1098.
- Ribeiro Ede S, Gerger RP, Ohlweiler LU, Ortigari I Jr, Mezzalira JC, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambrósio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M. 2009.
- Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning Stem Cells.* 11(3):377-86.
- Rho, GJ., Wu, B., Kawarsky, S., Leibo, SP., Betteridge, KJ., 1998. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev.* 50: 485-492.
- Salamone D. F., P. Damiani, R. A. Fissore, J. M. Robl and R. T. Duby. 2001. Ooplasmic and Nuclear Maturation of Calf Oocytes: Assessment By Biochemical And Nuclear Transfer Approach. *Biology of Reproduction, Junio*, 64:1761-1768

- Salamone Daniel et al. 2006. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol.* 2006 Jul 13;124(2):469-72.
- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., and Campbell, K. H. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [see comments]. *Science* 278: 2130-3.
- Smith K, Spadafora C. 2005. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays* 27(5):551-62.
- Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Northe DL, Schutzhus V, First NL. 1994. Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Dev Bio* 166:729-739.
- Szczygiel MA, Moisyadi S, Ward WS. 2003. Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection-mediated transgenesis in the mouse. *Biol Reprod* 68(5):1903-10.
- Vichera G, Alfonso J, Duque C, Silvestre M, Pereyra-Bonnet F, Fernández-Martín R, Salamone D. 2009. Chemical Activation with a Combination of Ionomycin and Dehydroleucodine for Production of Parthenogenetic, ICSI and Cloned Bovine Embryos. *Reprod Domest Anim.* 45(6):e306-12.
- Vichera Gabriel, Daniel Salamone. 2007. Clonación de ovocitos y producción de hemiclones bovinos. *Revista Reproducción:* 22(3): 1008-117.
- Vichera G, Moro L, Salamone D. 2010. Efficient method to produce IVF and parthenogenetic transgenic bovine embryos by intracytoplasmic injection of DNA-liposome complexes. *J Reprod Domest Anim* 46(2):214-20.
- Vichera, F. R. Olivera, P. Sipowicz, M. Radrizzani, and D. Salamone. 2011a. Sperm Genome Cloning Used in Biparental Bovine Embryo Reconstruction. *Reprod Fertil Dev.* (accepted).
- Vichera G, R Olivera, D Salamone. 2011b. Oocyte genome cloning used in biparental bovine embryo reconstruction. (accepted)
- Wells, D. N., Misica, P. M., and Tervit, H. R. (1999). Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60, 996-1005.
- 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: 810-3. recent advances from our group.