

TOMO LVII

**ACADEMIA NACIONAL  
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

ISSN 0327-8093

BUENOS AIRES

REPUBLICA ARGENTINA

---

# **Entrega del Premio “Pérez Companc” 2003**



Sesión Publica Extraordinaria  
del  
13 de Noviembre de 2003

### **Artículo Nº 17 del Estatuto de la Academia**

«La Academia no se solidariza con las ideas vertidas por sus miembros en los actos que ésta realice salvo pronunciamiento expreso al respecto que cuente con el voto unánime de los académicos presentes en la sesión respectiva.»

# **Disertación del Dr. Daniel E. Salamone en nombre propio y de los coautores beneficiarios del premio “Pérez Companc” 2003**

**Sr. Presidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria,  
Sr. Representante de la Fundación Pérez Companc,  
Sr. Decano de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires,  
Sra. Representante de la Secretaría de Cultura,  
Sr. Representante del Conicet,  
Sres. Académicos,  
Colegas,  
Señoras y Señores:**

Deseo en primer lugar en nombre propio y de los coautores agradecer profundamente a la Fundación Pérez Companc y a la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, la concesión de este Premio que nos honra sobremanera y por supuesto nos estimula para seguir en esta línea de trabajo.

## **Clonación en bovinos**

### **Introducción**

El presente artículo describe los resultados que hemos obtenido en el área de clonación de la especie bovina. El objetivo de este trabajo que ha sido parcialmente publicado como resumen (Salamone et al 2003) fue producir un gran número de bovinos que expresen proteínas humanas de alto valor farmacológico en su leche. El artículo está orientado a discutir los resultados de laboratorio y solamente describirá someramente en términos de preñeces y nacimientos los resultados de campo, reservándose para una futura publicación la descripción detallada de esta parte. En primer término se mencionarán algunos de los aspectos generales de la clonación bovina, para una revisión minuciosa recomendamos los artículos de Renard et al., 2002 y Dinnyés et al., 2002. El

principio básico de la clonación por trasplante o transferencia nuclear consiste en remover el núcleo de un ovocito maduro no fertilizado (ovoplasto recipiente) y transferirle un núcleo o una célula entera (núcleo o célula donante).

Las células somáticas se reproducen in vitro con gran facilidad y como toda célula diploide no reproductiva de un individuo tiene la misma información genética, por trasplante nuclear y teóricamente se pueden producir tantos animales idénticos como se deseen. Este grupo de animales idénticos se denomina clón y clonación al procedimiento para generarlos.

La extracción del núcleo del ovocito se realiza generalmente por micro-manipulación y aspiración con

pipetas de vidrio, controladas por equipos de movimiento de precisión denominados micromanipuladores. El núcleo del ovocito madurado in vitro, normalmente se detiene luego de la primera división meiótica en el estadio de metafase II, hasta el momento de ser fertilizado por un espermatozoide. Luego de la fertilización será el espermatozoide mediante un proceso denominado "activación" quien inicie una serie de sucesivas duplicación del ADN y divisiones celulares. En la clonación la activación debe ser realizada artificialmente por la aplicación de diversos métodos químicos o físicos.

La tecnología básica para la clonación por trasplante nuclear en mamíferos fue desarrollada en el ratón en los años 80 usando como donante células de embriones (blastómeros), pero los resultados en esta especie fueron desalentadores. Sin embargo, Willadsen en 1986, usando como donante blastómeros de embriones tempranos produjo los primeros corderos clonados. Un año después Robl et al., 1987 con el mismo tipo de células donantes produjeron los primeros terneros clonados.

La técnica de clonado con células embrionarias no logró gran aceptación entre investigadores y profesionales debido a numerosos factores. Entre ellos el hecho que se debía trabajar con células embrionarias cuyo mérito genético era desconocido, además los embriones tempranos tienen un reducido número de células. Sumado a esto las bajas tasas de preñez y dificultades en el parto producidas por el excesivo peso de las crías desalentaron la aplicación comercial de la técnica. El entusiasmo inicial fue disminuyendo y prácticamente ninguna compañía estaba usándola comercialmente

hasta 1997. En ese año Wilmut et al. (1997) publicaron el nacimiento de la oveja Dolly la cual fue producida por clonación de células provenientes de un animal adulto. Como inicialmente los resultados de clonación con células donantes adultas fueron poco eficientes, se considero entonces la posibilidad de usar células fetales con estas, como células donantes, los grupos del Instituto de Roslin (Schnieke et al., 1997) y de la Universidad de Massachusetts (Cibelli et al., 1998) produjeron los primeros ovinos y bovinos respectivamente clonados y transgénicos demostrándose que la técnica del trasplante nuclear es extremadamente eficiente para producir animales transgénicos. Las células fetales pueden multiplicar in vitro por periodos más prolongados que las adultas lo que permite realizar modificaciones genéticas con mayor facilidad y además un mayor número de clones llega a término y sobrevive luego del nacimiento (Heyman et al. 2002).

Wakayama et al., 1998 repitió los resultados de clonación con animales adultos y produjo numerosos ratones clonados utilizando como donantes células del cúmulus. Los investigadores japoneses tuvieron aún resultados más alentadores dado que produjeron varias terneras clonadas a partir de adultos usando también células del cúmulus (Kato et al., 1999). Dado que las células donantes utilizadas inicialmente por muchos investigadores provenían de hembras nadie había producido machos por clonación a partir de animales adultos hasta que se logró en el ratón (Wakayama and Yanagimachi, 1999).

Los telómeros, que son la parte extrema de los cromosomas, de la primer oveja clonada Dolly, eran más

cortos y no correspondían con la edad real de Dolly sino a la edad de la célula donante (Ashworth et al., 1998). En otras palabras sus telómeros eran los de una oveja varios años más vieja que la que correspondía a la edad de Dolly. Los telómeros se van acortando cada vez que las células se dividen llegando hasta un determinado tamaño, a partir del cual las células no se dividen más. Normalmente este mecanismo protege al organismo de que se multipliquen en exceso células potencialmente peligrosas. Sin embargo investigadores de la compañía ACT, con base en Massachusetts, han demostrado exactamente lo contrario (Lanza et al., 2000), y por clonación podrían elongarse los telómeros y en términos celulares rejuvenecer las células.

Algunos de los grandes problemas del clonado, inicialmente descritos en los trabajos de neozelandeses y japoneses (Wells et al., 1999; Kato et al., 1999), siguen siendo las numerosas pérdidas durante la preñez así como la alta mortandad perinatal, que fuerza a cuidados intensivos de los recién nacidos. La causa aparente de este problema al menos en parte se debe a anomalías placentarias. Una de las hipótesis es que la expresión de los genes de los animales clonados sea incorrecta y que la célula donante fue reprogramada ineficientemente por el ovocito enucleado.

En un primer experimento destinado a incrementar la tasa de sobrevivencia de los embriones clonados a partir de animales adultos compararon diferentes sistemas de cultivo embrionario y diferentes tipos de células somática donantes. Este experimento tuvo en primer lugar la finalidad de establecer las condiciones más adecuadas para producir

embriones clonados; en ensayos paralelos se realizaban ensayos de transfección con células fetales. En un segundo experimento se comparó el desarrollo de embriones producidos de líneas fetales no transfectadas y transfectadas y en este último grupo se utilizaron ovoplastos tratados con roscovitina o no. Esta droga permite inhibir la maduración por un periodo de 24 hs lo que favorece la posibilidad de ir un día al frigorífico y trabajar 2 días diferentes; nuestra hipótesis era también que la roscovitina eventualmente podría mejorar la viabilidad del embrión producido.

## **Materiales y métodos**

La técnica utilizada con algunas modificaciones fue descrita previamente (Salamone et al., 2001).

**Obtención de ovocitos**: Los ovarios bovinos fueron obtenidos en el matadero local, llevados al laboratorio en solución fisiológica a 30°C. Los complejos ovocito-cúmulus fueron obtenidos por aspiración folicular con una aguja de 18 G conectada por una tubuladura de plástico a un tubo de ensayo de 50 ml.

**Remoción de las células del cúmulus**: Luego de un período de maduración de 18-24 horas los ovocitos se desnudaron por 3 min. de "vortexado" en el medio TALP con 1 mg/ml de hialuronidasa. Posteriormente se seleccionaron los ovocitos que habían liberado su segundo corpúsculo polar y se encontraban en el estadio de metafase II.

**Enucleación**: La enucleación fue realizada por microcirugía con un micromanipulador Narishige (Medical Systems Corp, Great Neck, NY, USA) montado en un microscopio Nikon

Diaphot (Nikon Inc., Garden City, NJ). Para observar el núcleo se coloreó el ovocito por 15 minutos con el colorante vital Hoechst 33342 y se observó con luz ultravioleta.

Preparación de la célula donante: Las células adultas de la granulosa fueron obtenidas de una vaca Jersey por aspiración de folículos guiada por ecografía y por vía transvaginal como fue descrito previamente (Salamone et al., 1997). Los fibroblastos adultos fueron obtenidos de un toro Angus a partir de un explante de oreja. Para las células fetales todas las células donantes fueron subcultivos obtenidos de la zona del ijar de un feto hembra de la raza Jersey de 75 días. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio a-MEM con 5% SFB y antibióticos. Para la transfección se utilizó una construcción con el gen neomicina, un promotor para expresión en leche y el gen de la hormona del crecimiento humana (GH); la construcción se introdujo a las células donantes por liposomas. Luego se realizó la selección con geneticina por 10-15 días para eliminar las células no transgénicas.

Transplante Nuclear propiamente dicho y fusión: Se introdujo el núcleo, con una micropipeta y se incorporó la célula completa, debajo de la zona pellúcida y en contacto con la ovolema. Luego se realizó la fusión por un pulso eléctrico. El procedimiento de fusión consistió en la alineación manual de ovoplasto en la cámara de fusión (BTX Inc., San Diego, CA, USA) de manera tal que ambas superficies a fusionar estuvieran paralelas a los electrodos. La fusión fue iniciada por la administración de un pulso eléctrico de 3 Kv/ cm por 20 ms (BTX Electro Cell Manipulator 200) y el parámetro

de pulso fue monitoreado con un optimizador gráfico BTX. El pulso eléctrico causa una rotura transitoria de las membranas a fusionar. Esta rotura es de muy corta duración y es reparada rápidamente, pero si ambas membranas están en perfecta oposición se forman pequeños canales entre ambas células. Debido a la inestabilidad termodinámica estas pequeñas aberturas se hacen mayores y las dos células se transforman en una luego de un cierto periodo de tiempo.

Activación: Se indujo por tratamiento con ionomicina (5 mM, Calbiochem, San Diego, CA, USA) por 4 minutos seguido por 3 hs de incubación en 2 mM 6-dimethyl aminopurine (DMAP, Susko-Parrish et al., 1994).

Cultivo embrionario in vitro, transferencia de los embriones: Se utilizaron diversos sistemas de cultivo que luego se describirán, todos ellos fueron llevados a cabo en 500 microlitros de medio cubierto por 200 microlitros de aceite mineral en placas marca Nunc de 4 celdas. Se cultivaron por 7 días de manera tal que los embriones pudieron ser implantados en forma no quirúrgica en una vaca recipiente previamente sincronizada a la edad del embrión.

Desarrollo fetal, parto: El desarrollo fetal fue evaluado al mes y luego en forma mensual hasta los 7 meses (datos no presentados); los partos se realizaron por cesárea en decúbito lateral. Luego de ligado el cordón umbilical y cortado, el tren posterior fue elevado, el animal intubado y aspirado, para luego ser secado. Finalmente las terneras se trasladaron a un lugar con temperatura promedio 20°C. Antes de las 2 hs se les suministraron 2 litros de calostro.

## Experimento 1: Clonación de células adultas y sistema de cultivo

Células de la granulosa y fibroblastos provenientes de animales adultos fueron utilizadas como células donantes comparándose diferentes sistemas de cultivo embrionario. Luego del trasplante nuclear, fusión y activación tres sistemas de cultivo se utilizaron, cuando las células donantes fueron fibroblastos adultos: TCM-199+5% FCS o Menezo+5% FCS (ambos con células Vero como co-cultivo y atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> en aire) y SOF sin co-cultivo pero con una baja concentración de 5 % O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, y 90 % de N<sub>2</sub>. Para las células de la granulosa los embriones producidos sólo se

cultivaron con Menezo+5% FCS y células Vero como co-cultivo y 5 % de CO<sub>2</sub> en aire.

Experimento 2: Clonación de células fetales transgénicas y ovoplasto tratados con roscovitina

Los embriones producidos en los todos los tratamientos fueron cultivados en SOF sin co-cultivo pero con una atmósfera de 5% de O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de N<sub>2</sub>. Se utilizaron como célula donantes fibroblastos fetales, transfectados o no. Para la línea transfectada también se determinó si la roscovitina podía incrementar la disponibilidad de ovocitos recipientes a lo largo de la semana y/o incrementar su viabilidad.

## Resultados

### Experimento 1

Los resultados de este experimento se describen en la Tabla 1. El grupo tratamiento SOF tuvo clivaje y desarrollo hasta blastocisto en mayor proporción que los otros tratamientos; además se simplificó el trabajo de laboratorio dado que entre otras ventajas no se necesitaba preparar la línea celular para el co-cultivo por lo que se decidió su utilización en el siguiente experimento. Sin embargo el único animal que llegó a término fue producido a partir de TC199 + VERO pero murió durante el parto.

**Tabla 1. Experimento 1: Clonación con células adultas**

Tratamiento	n	Clivaje(%)	Blastocisto(%)	Preñez (%)	Nacimientos
Granulosa C199+VERO	92	59 a	26 (28)b	11 (12)	0
Fibroblasto TC199+VERO	294	53.9 a	22(7.5)a	5(38.4)	1
Fibroblasto Menezo+VERO	324	72.3 bc	29(8.9)a	5(29.4)	0
Fibroblasto SOF	108	75.0 bc	24(22.2)b	5(45.4)	0

<sup>abc</sup> Porcentajes dentro columnas con diferente letras son diferentes (P<0.05)

## Experimento 2

Los resultados se describen en la Tabla 2. No se observaron diferencias entre tratamientos. La transfección no afectó la capacidad de desarrollo de los animales clonados, tampoco afectó el tratamiento de la recipiente con roscovitina; sorprendentemente con este último tratamiento se observó una tendencia positiva en el desarrollo. Se produjeron trece animales transgénicos en menos de un año de trabajo lo que demuestra el potencial de clonación en la transgénesis de animales de granja.

**Tabla 2. Experimento 2: Clonación utilizando como células donantes fibroblastos (F.) fetales transgénicos y recipientes tratados con roscovitina.**

Tratamiento	n	Clivaje (%)	Blastocisto (%)	implantes	Preñez	Nacidos
F. no transfectado	197	122(62)	33(16.7)	16	5(31)	1
F. transfectado	646	476(74)	128(19.8)	56	25(44.6)	7
F. transfectado roscovitina	228	191(84)	51(22.3)	30	16(53.3)	6

## Discusión

Utilizando células donantes adultas se observó que una sola prosperó hasta la fecha de parto a pesar de haber producido numerosas preñeces (ver Tabla 1). Esto coincide con otros autores (Wells et al., 1999; Kato et al., 1999). Estos autores describen alta mortandad perinatal de los terneros producidos por clonado; en nuestra experiencia el único animal producido murió en el parto demostrando la necesidad de incrementar los cuidados intensivos del recién nacido.

A diferencia de otros autores la transgénesis no indujo una reducción en la capacidad de desarrollo de los embriones clonados (Forsberg et al., 2002). En tanto que el tratamiento con roscovitina no sólo no redujo la viabilidad sino que permitió observar una tendencia positiva en el desarrollo embrionario. La roscovitina es un

inhibidor de MPF y MAPK dos complejos reguladores de la maduración ovocitaria. Luego de iniciada la maduración normal todos los eventos son regulados por un rápido incremento en MPF y MAPK citosólicos los cuales previenen la reconstrucción de la membrana nuclear y la entrada del núcleo en fase de síntesis de ADN hasta la fertilización o activación. La maduración nuclear se puede detener con roscovitina dado que mantiene MPF y MAPK bajos. Esto permite retrasar la maduración 24 horas. La combinación del uso o no uso de esta droga posibilita trabajar por 2 días luego de un viaje al frigorífico. Si no se tratan los ovocitos con roscovitina 24 hs después se tendrán numerosas metafases II para enucleación y el transplante nuclear. Por el contrario si son tratados con roscovitina recién podrá realizarse el transplante nuclear 48 hs después, dado que las primeras 24 hs en



roscovina inhiben la maduración manteniendo el ovocito como vesícula germinal y luego se requiere 24 horas más para llegar a metafase II.

En la Argentina se han adoptado muchas de las llamadas "Biotecnologías de la Reproducción" con relativa rapidez, tanto por la acción de profesionales de la actividad privada como la realizada por investigadores de organismos oficiales. Prueba de esto es la realización en 1978 de las primeras transferencias quirúrgicas de embriones por el doctor Rodríguez Dubra y colaboradores, los primeros nacimientos por fertilización in vitro (Salamone et al. 1995), la preñeces (Salamone et al. 2003) y nacimiento de terneras por clonación y transgénesis (presente artículo). Todos estos hechos fueron producidos pocos años después de generadas estas tecnologías en los países desarrollados y ser pionera en relación a otros países del tercer mundo lo que nos permite ser optimistas respecto a las posibilidades futuras para el desarrollo y aplicación de estas técnicas en nuestro país.

El clonado ha tenido un progreso tan vertiginoso y un interés general tan grande que ha sido fácil seguir su evolución por los medios de divulgación masiva. Sin embargo, ha prevalecido el enfoque alarmista debido a su potencial aplicación en humanos. Por el contrario es nuestra opinión que esta técnica ayudará a generar conocimientos básicos para descubrir las bases de la

totipotencialidad celular y la rediferenciación de los tejidos, permitiendo su aplicación terapéutica, para regenerar tejidos lesionados, incluyendo entre otros el tejido nervioso y el pancreático.

A la pregunta ¿cuales serán sus aplicaciones agropecuarias en nuestro sistema de producción? la respuesta es que están libradas a nuestra capacidad de imaginación e innovación. La aplicación más inmediata será la multiplicación de rodeos de elite. La utilización de animales clonados facilitará la producción y difusión de animales transgénicos. Por ejemplo, existe interés en Europa en reemplazar el gen PrP que torna a los bovinos susceptibles al virus de la vaca loca por otro que les otorgue mayor resistencia. Numerosas compañías ya han producido animales transgénicos y clonados especialmente expresando nuevas proteínas en leche de valor farmacéutico (Baguisi et al., 1999, Salamone et al. 2003). La producción de órganos y tejidos animales humanizados para ser utilizados en transplante ha despertado también un interés enorme. Esto implicará la expresión de ciertas proteínas humanas y el silenciamiento de algunas proteínas de origen animal.

Todo esto indica la enorme potencialidad de esta técnica y el futuro desarrollo que puede alcanzar en la Argentina y por su puesto en otros países.

Muchas gracias por vuestra gentil atención.

## Agradecimientos

A la empresa Biosidus por la financiación total del proyecto y las facilidades para realizar los experimentos mencionados. A los integrantes de Munar y asociados por la colaboración en las transferencias embrionarias. A Jorge Artuzo por el cuidado de los terneros y al Dr. G. Berra por su ayuda durante los nacimientos.

- Ashworth, D., Bishop, M., Campbell, K., Colman, A., Kind, A., Schnieke, A., Blott, S., Griffin, H., Haley, C., McWhir, J., and Wilmut, I. 1998. DNA microsatellite analysis of Dolly [letter] [see comments]. *Nature* 394, 329.
- 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.
- 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 [see comments]. *Science* 280, 1256-8.
- Dinnyés A, De Sousa P., King T., and Wilmut I. 2002. Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Challenges *Cloning and Stem Cells* 4: 81-90.
- Forsberg EJ. Strelchenko N.S., Augenstein M.L. Betthausen J.M., Childs L.A., Eilertsen K.J., Enos J.M., Forsythe T.M., Golueke P.J., Koppang R.W., Lange G., Lesmeister T.L., Mallon K.S., Mell G.D., Misica P.M., Pace M.M., Pfister-Genskow M., Voelker G.R., Watt S.R., y Bishop. 2002. Production of Cloned Cattle from In Vitro Systems *Biol Reprod* 67, 327–333 .
- 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.
- Y. Heyman, Chavatte-Palmer P., LeBourhis D., Camous S., Vignon X., and Renard J.P. 2002. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos  
*Biol Reprod* 66: 6-13.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J., Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M., and West, M. D. 2000. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 288, 665-9.
- Renard J. P., Zhou Q, LeBohurgis D, Chavatte-Palmer, I Hue, Y Heyman and Vignon X. 2002. Nuclear Transfer Technologies: Between successes and doubts *Theriogenology* 57: 203

- 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, 642-7.
- Salamone D. F., Adams G.P. and Mapletoft R.J. 1999. Changes in Bovine Cumulus-Oocyte Complex Morphology and Oocyte Developmental Competence in Subordinate Follicles During the Different Phases of Follicle Wave. *Theriogenology*, (52)4: 549-561.
- Salamone D. F., Damiani P., Fissore R. A., Robl J. M. and Duby R. T. 2001. Ooplasmic and Nuclear Maturation of Calf Oocytes: Assessment By Biochemical And Nuclear Transfer Approach. *Biology of Reproduction*, Junio, 64:1761-1768
- Salamone D. F., Santos C. B., Baraño J. L., Busmann L., Artuso J., Valdez A., Munar C., Werning C. and Melo C. 2003. Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitin treatment of recipient oocytes in bovine cloning. *Theriogenology* 59: 285.
1995. Salamone D. F., Valdez A. y Baraño J. L. 1995. Producción de los Primeros Terneros Nacidos en la Argentina por Maduración Y Fertilización In Vitro de Ovocitos Recuperados de Animales Sacrificados para Consumo. Seminario Internacional de Embriones Biotecnología y Tecnologías Avanzadas. 4-5 Mayo Montevideo. Uruguay.
- 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. *Science* 278, 2130-3.
- Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Northe D.L., Schutzhus V., First N.L. 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.
- 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 [see comments]. *Nature* 394, 369-74.
- Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1999). Cloning of male mice from adult tail-tip cells [news]. *Nat Genet* 22, 127-8.
- 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 [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Mar 13;386(6621):200]. *Nature* 385, 810-3.