

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**COORDENAÇÃO DO CICLO CELULAR E INIBIÇÃO  
DA DESACETILAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE  
EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR  
TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Vitor Braga Rissi**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**COORDENAÇÃO DO CICLO CELULAR E INIBIÇÃO DA  
DESACETILAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE  
EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR TRANSFERÊNCIA  
NUCLEAR**

**Vitor Braga Rissi**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves**  
**Coorientador: Prof. Vilceu Bordignon**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rissi, Vitor Braga

Coordenação do ciclo celular e inibição da desacetilação no desenvolvimento de embriões suínos produzidos por transferência nuclear / Vitor Braga Rissi.-2015.

62 f.; 30cm

Orientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Coorientador: Vilceu Bordignon

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. SCNT 2. Ciclo celular 3. Suínos 4. Scriptaid I.  
Gonçalves, Paulo Bayard Dias II. Bordignon, Vilceu III.  
Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**A comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado**

**COORDENAÇÃO DO CICLO CELULAR E INIBIÇÃO DA  
DESACETILAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SUÍNOS  
PRODUZIDOS POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

elaborada por  
**Vitor Braga Rissi**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**


**COMISSÃO EXAMINADORA**



**Paulo Bayard Dias Gonçalves Dr.  
(Presidente/Orientador)**



**Marcos Henrique Barreta, Dr. (UFSC)**



**Fernando Mesquita, Dr. (UNIPAMPA)**

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, João Luiz Rissi e Liane Terezinha Braga Rissi, por sempre me apoiarem e incentivarem nos estudos e nas escolhas profissionais, sempre acreditaram em mim, torceram, vibraram e me deram tudo na vida, amor, carinho e dedicação.

Aos meus orientadores, Paulo Bayard Dias Gonçalves Vilceu Bordignon e demais professores do BioRep, João Francisco Coelho de Oliveira (*in memoriam*), Alfredo Antoniazzi e Fábio Vasconcellos Comim, pelos ensinamentos e apoio no direcionamento dos experimentos.

Ao laboratório BioRep, que me acolheu desde o princípio, que ajudou a crescer, e permitiu que eu ampliasse meus conhecimentos, uma equipe sensacional, divertida e dedicada.

Ao CNPq, CAPES e UFSM pelo apoio financeiro e possibilidade de um estudo de qualidade. E ao PPGMV e a secretária do PPGMV Maria Moro da Rosa pelo apoio administrativo.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **COORDENAÇÃO DO CICLO CELULAR E INIBIÇÃO DA DESACETILAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR TRANSFERÊNCIA NUCLEAR**

AUTOR: VITOR BRAGA RISSI  
ORIENTADOR: PAULO BARYAD DIAS GONÇALVES  
Santa Maria, 20 de Fevereiro de 2015.

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) têm sido utilizada nos últimos anos para diversos fins, tanto para a produção de cópias de animais geneticamente superiores quanto para a produção de animais geneticamente modificados. Principalmente como ferramenta de pesquisa básica, buscando compreender aspectos relacionados a reprogramação celular. Apesar de passados vários anos desde o nascimento do primeiro animal clonado a partir de uma célula somática, a eficiência da técnica ainda permanece baixa. As causas são multifatoriais, podem envolver características da espécie com que se está trabalhando bem como o tipo de célula utilizada como doadora de núcleo e citoplasto utilizado com receptor. Atualmente sabe-se que um dos principais problemas encontrados em embriões provenientes de clonagem estão relacionados a uma incompleta reprogramação da célula utilizada como doadora de núcleo, o que acaba por comprometer a expressão de genes necessários ao desenvolvimento embrionário normal. No presente trabalho foram estudadas diferentes associações de ciclo celular entre citoplastos (oócitos) receptores e células doadoras de núcleo e sua relação com inibidores de deacetilase sobre a reprogramação de embriões suínos produzidos por SCNT. Oócitos foram enucleados no estágio de MII ou TII (pré-ativados) e associados a células previamente sincronizadas nas fases  $G_1/G_0$  ou  $G_2/M$  do ciclo celular, para cada grupo ainda foi utilizado ou não o tratamento com o inibidor de deacetilase Scriptaid nas primeiras horas de cultivo embrionário. O resultados obtidos permitem afirmar que existem incompatibilidades de ciclo celular entre citoplastos em TII e células em  $G_1/G_0$  assim como entre citoplastos em MII e células em  $G_2/M$  quanto à reprogramação celular. O tratamento com Scriptaid mostrou ter um efeito ciclo celular dependente, uma vez que só foi observada melhora no desenvolvimento embrionário quando utilizado com citoplastos em MII, independente da célula utilizada como doadora de núcleo. Apesar de amplamente utilizados com a finalidade de melhorar a reprogramação celular em embriões clonados, foi demonstrado pela primeira vez a relação da inibição da desacetilação com diferentes interações de ciclo celular entre citoplastos e células doadoras de núcleo sobre o desenvolvimento de embriões produzidos por SCNT.

**Palavras-Chave:** SCNT. Ciclo celular. Suínos. Scriptaid.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Federal University of Santa Maria

### **CELL CYCLE EFFECT AND INHIBITION OF DEACETYLATION ON DEVELOPMENT OF PIG EMBRYOS PRODUCED BY NUCLEAR TRANSFER**

AUTHOR: VITOR BRAGA RISSI  
ADVISOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES  
Santa Maria, February 20, 2015.

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been used in recent years for various purposes; to produce copies of genetically superior animals or genetically modified animals. Mainly as a research tool, trying to understand aspects related to cell reprogramming. Despite past several years since birth first animal cloned from a somatic cell, the efficiency remains low. The causes are multifactorial and may involve species particularities, the cell used as nuclear donor or enucleated cytoplasts. Currently it is known that the main problem found in cloned embryos is related to an incomplete cellular reprogramming, which in turn compromises the expression of genes required for normal embryonic development. In the present work we studied different cell cycle associations between cytoplasts (oocytes) and donor cells and its relation with a histone deacetylase inhibitor on the reprogramming of pig embryos produced by SCNT. Oocytes were enucleated at MII or TII (pre-activated) and the associated with previously synchronized cells in  $G_1/G_0$  and  $G_2/M$  phase of the cell cycle using or not a histone deacetylase inhibitor Scriptaid in the first hours of embryo culture. The results showed cell cycle incompatibilities between TII cytoplasts and  $G_1/G_0$  cells even as MII cytoplasts  $G_2/M$  cells regarding cell reprogramming. Scriptaid treatment showed a cell cycle dependent effect, since the improvement in embryo development was observed when using MII cytoplasts, regardless of the cell used as the donor nucleus. Although widely used in order to improve cell reprogramming in cloned embryos, it was demonstrated the relationship between inhibition of deacetylation with cell cycle interactions between and cytoplasts donor cells on the development of pig embryos produced by SCNT.

**Key words:** SCNT. Cell cycle. Pigs. Scriptaid.

## LISTA DE TABELAS

- Table 1** - Number of SCNT embryos presenting a positive fluorescent signal for DNA synthesis at 8 and 12 hpf.....44
- Table 2** - Average number of nuclei in SCNT embryos reconstructed with G1-0 or G2-M donor cells and fixed at day 7 after nuclear transfer. Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).....44



## LISTA DE FIGURAS

- Figure 1** - Cell cycle synchronization for nuclear transfer. A – Representative histogram showing the cell cycle distribution of cells that were maintained in culture for 48h after reaching confluence. B – Confluent cells after trypsinization. Only the smaller cells (white arrow) were used for SCNT. C – Proportion of cells at the different stages of the cell cycle from samples collected at different times post-passage from confluent cultures. D – Cells trypsinized at 24 h after plating from a confluent culture. Only the larger cells (black arrow) were used for SCNT. ....45
- Figure 2** - DNA and RNA synthesis detection in nuclear donor cells in confluent cells (> 48h) and non-confluent cells (24 h post-passage from confluent culture). Red fluorescent signal indicates DNA synthesis and green fluorescent signal represents RNA synthesis. ....46
- Figure 3** - Development of embryos produced by SCNT. Cleavage and blastocyst rates of SCNT embryos reconstructed with G<sub>0-1</sub> cells (A and B) and G<sub>2/M</sub> cells (C and D). Different letters indicate significant differences between groups (p<0.05). \* indicates p=0.09. ....47
- Figure 4** - Nuclear diameter in SCNT embryos at 8 and 12 hpf. A - Embryos produced from G<sub>1-0</sub> synchronized cells. B - Embryos produced from G<sub>2/M</sub> synchronized cells. MII = metaphase stage cytoplasm, MII+S = metaphase stage cytoplasm treated with scriptaid, TII = telophase stage cytoplasm, TII+S = telophase stage cytoplasm treated with scriptaid. ....48
- Figure 5** - Representative pictures showing nuclear diameter and DNA synthesis in SCNT produced from G<sub>1-0</sub> and G<sub>2/M</sub> cells and fixed at 12 hpf. ....49
- Figure 6** - Presence of H2AX139ph foci in SCNT embryos produced from G<sub>0-1</sub> cells (A) and G<sub>2/M</sub> cells (B) and fixed at 48h post-activation. C – Representative

pictures showing H2AX139ph foci in SCNT embryos. Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).....	50
<b>Figura 7</b> - Ciclo celular em diferentes horários pós-passagem a partir de um cultivo mantido em confluência por 48 horas.....	52
<b>Figura 8</b> - Células tratadas com 5 $\mu$ M ou 9 $\mu$ M de RO3306 por diferentes tempos iniciando 16 horas pós-passagem a partir de um cultivo mantido em confluência por 48 horas.....	52
<b>Figura 9</b> - Células tratadas com 5 $\mu$ M ou 9 $\mu$ M de RO3306 por diferentes tempos iniciando 20 horas pós-passagem a partir de um cultivo mantido em confluência por 48 horas.....	53
<b>Figura 10</b> -Taxa de clivagem avaliada as 48h pós-ativação em embriões reconstruídos com células sincronizadas em G <sub>2</sub> /M com RO3306. ....	54
<b>Figura 11</b> -Taxas de blastocistos avaliada no Dia 7 pós-ativação em embriões reconstruídos com células sincronizadas em G <sub>2</sub> /M com RO3306.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA: *Bovine Serum Albumin*  
COCs: *Cumulus-oocytes complexes*  
dbcAMP: N(6),2'-O-dibutyryl adenosine 3':5' cyclic monophosphate  
DEMEM-F12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*  
DNA: *Ácido desoxiribonucleico*  
EGF: *Epidermal Growth Factor*  
FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*  
FBS: *Fetal Bovine Serum*  
FIV: *Fecundação In Vitro*  
FSH: *Hormônio folículo estimulante*  
HDACi: *Histone Deacetylase Inhibitor*  
HDACs: *Histone deacetylases*  
HTAs: *Histone Acetyltransferases*  
ICM: *Inner cell mass*  
IVM: *In vitro Maturation*  
LH: *Hormônio luteinizante*  
MII: *Metáfase II*  
MPF: *Maturation-promoting Factor*  
NaBu: *Sódio Butirato*  
NEBD: *Nuclear Envelope Breakdown*  
NT: *Nuclear transfer*  
PBS: *Phosphate buffered saline*  
PCC: *Premature chromosome condensation*  
PIV: *Produção in vitro de embriões*  
PZM-3: *Porcine Zygote Medium*  
RNA: *Ácido ribonucleico*  
SCNT: *Somatic cell nuclear transfer*  
TCM: *Tissue Culture Medium*  
TE: *Transferência de Embriões*  
TII: *Telófase II*  
TSA: *Tricostatina*  
VG: *Vesícula Germinativa*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Citoplastos e células doadoras de núcleo .....	15
2.2 Reprogramação celular em embriões clonados .....	18
2.3 Inibidores de Deacetilase .....	20
<b>3 CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>23</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>24</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>25</b>
<b>Material and Methods .....</b>	<b>27</b>
<b>Results.....</b>	<b>32</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>35</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>39</b>
<b>References.....</b>	<b>39</b>
<b>Author Disclosures .....</b>	<b>42</b>
<b>Figure legends .....</b>	<b>42</b>
<b>4 RESULTADOS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>51</b>
4.1 Sincronização do ciclo celular com RO3306 .....	51
4.2 Desenvolvimento embrionário utilizando células sincronizadas com RO3306.....	53
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A técnica de Clonagem por Transferência Nuclear de Células Somáticas (*Somatic Cell Nuclear Transfer* – SCNT) consiste basicamente na remoção da cromatina de um oócito (citoplasto receptor) e sua substituição por uma célula retirada do animal que se pretende clonar, seguido da ativação dos oócitos reconstruídos, cultivo *in vitro* e transferência do embrião produzido a uma receptora. A SCNT tem sido utilizada nos últimos anos para diversos fins, tanto para a multiplicação de animais geneticamente superiores quanto para a produção de animais geneticamente modificados, principalmente em pesquisa básica buscando compreender eventos relacionados à reprogramação celular. O uso desta técnica comercialmente ainda é muito limitado se for considerado a sua eficiência e os problemas encontrados em animais clonados desde a fase embrionária até o desenvolvimento a termo.

A Produção *In vitro* de Embriões (PIV) acabou por viabilizar a utilização da SCNT para a produção de animais clonados. Em animais, a PIV é principalmente utilizada em bovinos sendo que sua expansão e utilização comercial ocorreu nas últimas duas décadas, entretanto ela também é utilizada em outras espécies de produção assim como em animais de laboratório. Após os primeiros experimentos que demonstraram a viabilidade da técnica de clonagem, foi relatado o nascimento do primeiro animal a partir de células retiradas da glândula mamária de uma ovelha adulta (Wilmut *et al.*, 1997). Pela primeira vez uma célula adulta foi utilizada como doadora de núcleo provando que os oócitos usados como citoplastos receptores são capazes de reprogramar o estado de desenvolvimento de células diferenciadas.

Desde então, diversas espécies foram clonadas, utilizando os mais diversos tipos celulares como doadores de núcleo. Bovinos (Cibelli *et al.*, 1998), camundongos (Wakayama *et al.*, 1998), cabras (Keefer *et al.*, 2001) e suínos (Polejaeva *et al.*, 2000; Hyun *et al.*, 2003), além de outras espécies selvagens, de laboratório ou domésticas tem sido clonadas com sucesso (Meissner e Jaenisch, 2006).

A eficiência da técnica ainda é muito baixa quando comparada a outras biotécnicas da reprodução, existem diferenças entre espécies sendo que em bovinos existe um maior sucesso quando considerado o desenvolvimento a termo. Este fato pode estar relacionado, em parte, à disponibilidade de biotécnicas tais como a PIV e a Transferência de Embriões (TE) que são melhor estabelecidas em bovinos quando comparado a outras espécies de interesse comercial ou científico (Dinnyes *et al.*, 2002).

Atualmente, sabe-se que um dos principais problemas encontrados em embriões provenientes de clonagem estão relacionados a uma incompleta reprogramação epigenética da célula utilizada com doadora de núcleo, o que acaba por comprometer a expressão de genes necessários ao desenvolvimento embrionário normal. Existem diversas possíveis explicações para a incapacidade do núcleo transplantado não suportar o desenvolvimento embrionário. Problemas como o método de enucleação, origem dos oócitos utilizados, condições de cultivo e o tipo de célula utilizado provavelmente interferem no desenvolvimento embrionário (Meissner e Jaenisch, 2006). Além disso, diferenças espécie específicas na fisiologia da maturação dos oócitos, ativação partenogenética e desenvolvimento embrionário inicial tornam difícil a comparação conclusiva entre espécies.

Os índices de blastocistos produzidos por SCNT são similares aos obtidos por Fecundação *in vitro* (FIV). No entanto, a taxa de nascimentos após a transferência de embriões produzidos por SCNT é extremamente inferior às obtidas por embriões FIV. Em geral, menos de 5% dos embriões transferidos resultam no nascimento de um clone saudável (Smith *et al.*, 2000). Porém, a maioria dos animais que nascem fenotipicamente saudáveis são capazes de se desenvolver de forma semelhante a outros animais, destacando um aspecto positivo da SCNT.

Na espécie suína, o principal interesse e aplicação da SCNT está na produção de animais transgênicos como modelos para doenças em humanos e fontes de órgãos para xenotransplantes (Vajta *et al.*, 2007), entretanto a eficiência da técnica em suínos considerando o desenvolvimento a termo é de 1 a 2% (Lai e Prather, 2003). A descoberta de que animais podem ser gerados a partir de uma célula somática cultivada em laboratório possibilitou a sua aplicação na produção de animais transgênicos. Células cultivadas *in vitro* podem ser geneticamente modificadas e selecionadas antes do seu uso para clonagem tornando possível a produção de animais de interesse científico (Machaty *et al.*, 2002).

Os primeiros trabalhos que utilizaram a transferência nuclear demonstraram a viabilidade de dois tipos de citoplastos receptores: oócitos em Metáfase II (MII) e zigotos no estágio pró-nuclear. Não há dúvida de que o oócito é determinante no potencial do desenvolvimento até o estágio de blastocisto, é ele que contém os fatores necessários à reprogramação do núcleo transplantado regulando as primeiras divisões mitóticas até a ativação do genoma embrionário (Shi *et al.*, 2003).

Algumas metodologias têm sido utilizadas a fim de melhorar a reprogramação celular e desta maneira aumentar a eficiência da SCNT. O objetivo dessas metodologias seriam de “ajudar” o citoplasto na reprogramação da célula utilizada como doadora de núcleo.

Inibidores de Histona Deacetilases (HDACi) têm sido utilizados com o objetivo de aumentar a eficiência da SCNT. O mecanismo pelo qual os HDACi melhoram o desenvolvimento de embriões clonados, provavelmente, esteja atribuído ao aumento da atividade transcricional promovido pelo aumento na acetilação das histonas (Monneret, 2005).

Neste trabalho, foram estudadas algumas interações de ciclo celular entre oócitos e células doadoras de núcleo e sua relação com um HDACi no desenvolvimento de embriões suínos produzidos por SCNT. Em um primeiro experimento, foram utilizadas células doadoras de núcleo na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular, obtidas através da confluência do cultivo e oócitos receptores no estágio de Metáfase II (MII) ou Telófase II (TII). Em um segundo experimento, foram utilizados citoplastos em MII ou TII e células sincronizadas na fase G<sub>2</sub>/M do ciclo celular. Nossa hipótese é de que a interação do ciclo celular entre citoplastos e células doadoras de núcleo interfere na reprogramação celular de embriões clonados, e a ação dos HDCAi é dependente desta interação entre citoplastos e células doadoras de núcleo

A baixa eficiência e as anormalidades encontradas nos animais nascidos são ainda as duas maiores desvantagens da SCNT. Portanto, é fundamental o conhecimento dos processos de reprogramação celular envolvidos na SCNT a fim de estabelecer novas tecnologias e aumentar sua eficácia.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Citoplastos e células doadoras de núcleo

Em muitas espécies de mamíferos, o início da meiose ocorre na vida fetal, na qual o oócito permanece no estágio de vesícula germinativa (VG) até a fase reprodutiva. A meiose tem por objetivo formar uma célula haploide capaz de ser fecundada e suportar o desenvolvimento embrionário até a ativação de seu genoma. *In vitro*, o reinício da meiose é desencadeado pela simples remoção do oócito do ambiente folicular, progredindo do estágio de VG até MII (Pincus e Enzmann, 1935).

Nos oócitos que se encontram em metáfase da segunda divisão meiótica (MII), o material genético encontra-se na placa metafásica, a qual está localizada próximo ao 2º corpúsculo polar, tornando relativamente fácil a remoção do núcleo por aspiração em um sistema de micromanipulação. Em zigotos, o material genético é encontrado em ambos pró-núcleos, os quais são facilmente visualizados em camundongos, mas não em bovinos e suínos. Acredita-se que ao utilizar citoplastos de zigotos, fatores necessários à reprogramação são removidos juntamente com os pró-núcleos, portanto citoplastos de oócitos em MII são mais utilizados (Campbell, 1999b).

Atualmente, é aceito que citoplastos de oócitos em MII ou de Telófase II podem ser utilizados para a SCNT, a diferença entre eles está primariamente nos níveis do Fator Promotor da Fase M (*Maturation-Promoting Factor* - MPF), uma proteína kinase envolvida na divisão mitótica e meiótica (Campbell *et al.*, 1996). O MPF tem sido identificado como um complexo de duas proteínas, Ciclina e p34cdc2, uma proteína kinase que é regulada por fosforilação e pela associação com a Ciclina. Durante a divisão celular, a concentração de p34cdc2 se mantém constante, enquanto a concentração de Ciclina é variável. A ativação da p34cdc2 faz com que a célula entrem em mitose ou meiose promovendo a quebra do envelope nuclear, condensação dos cromossomos, reorganização do citoesqueleto e modificações estruturais nas células (Nurse, 1990; Maller, 1991).

Durante a maturação nuclear, os níveis de MPF estão elevados no estágio de Metáfase I. Após essa fase, há uma diminuição significativa e um novo aumento do MPF no estágio de MII, o qual é mantido por várias horas no oócito, diminuindo gradativamente ou



imediatamente após a fecundação ou ativação partenogenética (Wu *et al.*, 1997; Liu e Yang, 1999). Quando oócitos em MII são utilizados como citoplastos, a atividade de MPF encontra-se alta, ao contrário de zigotos pró-nucleares. Alternativamente, a enucleação pode ser realizada em oócitos pré-ativados no estágio de Telófase II, o que também proporciona um citoplasto receptor com baixos níveis de MPF (Bordignon e Smith, 1998).

A coordenação do ciclo celular entre citoplasto e a célula doadora de núcleo tem sido identificada como determinante em diversos aspectos. Entre outros aspectos, essa sincronização afeta a manutenção da ploidia dos oócitos reconstruídos e a atividade de fatores envolvidos na reprogramação da cromatina da célula doadora, capazes de modular a expressão gênica, assegurando o desenvolvimento a termo do animal clonado (Campbell *et al.*, 1996).

Uma célula mantida em cultivo possui quatro fases distintas do ciclo celular: fase G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e fase M. Células em G<sub>1</sub> compreendem o primeiro evento dentro do ciclo celular, onde a célula pode permanecer quiescente (G<sub>0</sub>) ou iniciar um novo ciclo de replicação. Nessa fase, a célula é diploide. Subsequentemente, na fase S, ocorre a síntese de DNA e na fase G<sub>2</sub> os cromossomos estão duplicados até que ocorra a divisão celular denominada fase M, dando origem a duas células filhas em G<sub>1</sub> iniciando assim um novo ciclo. Durante o ciclo celular, todo o DNA deve ser replicado antes que a célula entre na fase M. Se isso não ocorrer ou ocorrer mais de uma vez, a ploidia das células ficará incorreta (Campbell e Alberio, 2003).

Quando o núcleo de uma célula é transferido para um oócito com altos níveis de MPF, usualmente ocorre o rompimento do envelope nuclear (*Nuclear Envelope Breakdown* - NEBD) e a condensação prematura dos cromossomos (*Premature Chromosome Condensation* - PCC). A fase do ciclo que a célula doadora de núcleo encontra-se e o tempo de exposição ao MPF pode afetar o grau de PCC após a SCNT. Quando se utilizou células da fase S como doadoras de núcleo e oócitos com alta atividade de MPF, a PCC induzida resulta em uma alta incidência de anormalidades no núcleo (Collas *et al.*, 1992). Entretanto, quando núcleos em G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub> são utilizados, a PCC resulta na formação de cromossomos alongados com duas ou quatro cromátides, respectivamente (Collas *et al.*, 1992).

Tem sido demonstrado que em embriões reconstruídos com oócitos em MII como citoplasto, o núcleo submete-se ao NEBD, independentemente do estágio do ciclo celular, ocorrendo uma nova síntese de DNA após a reformulação do envelope nuclear. Entretanto, se o núcleo é transferido após a queda dos níveis de MPF, a replicação do DNA depende do ciclo celular que a célula doadora de núcleo se encontra. Dessa maneira, núcleos na fase S ou

$G_1$  irão continuar ou iniciar a replicação, enquanto os núcleos em  $G_2$  não são induzidos a uma nova replicação do DNA previamente replicado (Campbell e Alberio, 2003).

É aceito que quando se utiliza citoplastos no estágio de MII, a correta ploidia do embrião reconstruído pode ser obtida com sucesso quando se utiliza células em  $G_1/G_0$ . Ao contrário, quando o citoplasto receptor tem baixos níveis de MPF, os danos induzidos pela PCC são atrasados e, independente da fase do ciclo celular, ocorrerá a replicação coordenada do DNA (Campbell *et al.*, 1996). A seleção das células a serem utilizadas como doadoras de núcleo, bem como a fase do ciclo em que elas se encontram é um desafio para a SCNT. A fase do ciclo celular não pode ser determinada durante a NT por coloração, pois isso as tornariam inviáveis para o procedimento de clonagem (Korfiatis *et al.*, 2001).

Diversas alternativas podem ser utilizadas para a sincronização do ciclo celular previamente a SCNT. Uma delas é manter células em  $G_0$  a partir da privação de Soro Fetal Bovino (SFB) temporariamente no meio de cultivo (Oback e Wells, 2002). A confluência de um cultivo celular é também uma outra maneira efetiva de se obter células sincronizadas na fase  $G_1/G_0$  (Boquest *et al.*, 1999). Além disso, as taxas de desenvolvimento embrionário não diferem quando se utiliza privação de soro ou confluência do cultivo na seleção de células doadoras de núcleo (Kubota *et al.*, 2000).

Embora células em  $G_0$  ou  $G_1$  possam suportar a reprogramação e desenvolvimento a termo após a SCNT, ainda pouco se sabe efetivamente sobre a reprogramação do núcleo nos embriões produzidos a partir desses tipos celulares (Miyamoto *et al.*, 2007). Células em  $G_2$  podem ser obtidas através do tratamento do cultivo com drogas capazes de bloquear a progressão do ciclo celular em uma fase específica. Já foi demonstrado que o tratamento com Roscovitina por um período específico é capaz de proporcionar a sincronização do cultivo na fase  $G_2$  do ciclo celular (Bordignon e Smith, 2006). No entanto, essa metodologia deve ser adaptada ao tipo de célula que se está trabalhando e possíveis efeitos da droga utilizada sobre o desenvolvimento embrionário e reprogramação epigenética devem ser levados em consideração.

O estágio de diferenciação celular é um importante componente para o sucesso da SCNT. Apesar de existirem trabalhos demonstrando o desenvolvimento de clones produzidos a partir de células altamente diferenciadas, existe um consenso de que quanto mais diferenciada estiver a célula doadora de núcleo, menor será o seu sucesso na SCNT (Niemann *et al.*, 2008). É bem estabelecido que incompatibilidades entre o ciclo celular da célula doadora e oócito receptor pode afetar a viabilidade dos embriões produzidos por SCNT, comprometendo a ploidia, bem como a integridade do DNA e a segregação cromossômica (Campbell, 1999a).

Embora oócitos pré-ativados favoreçam a compatibilidade com relação integridade do núcleo transplantado, existem indícios de que oócitos em MII favoreçam a reprogramação celular (Campbell *et al.*, 1996; Campbell, 1999a; Campbell e Alberio, 2003). No entanto, alguns aspectos, principalmente relacionados à reprogramação celular, merecem ser melhor estudados nessa interação entre o oócito e as células doadora de núcleo.

## 2.2 Reprogramação celular em embriões clonados

Durante o desenvolvimento pré-implantacional em mamíferos, os genomas haploide paterno e materno são remodelados de maneira a retornar a um estado totipotente. O embrião diploide desenvolve-se e inicia a transcrição a partir de seu próprio genoma seguido pelo desenvolvimento de duas linhagens celulares: a massa celular interna (*Inner cell mass* - ICM) e o trofotoderma (TE) durante a formação do embrião (Zhao *et al.*, 2010b). Alterações epigenéticas como a metilação do DNA e as modificações de histonas são necessárias para coordenação desses eventos.

Acredita-se que durante a SCNT, o padrão de modificações epigenéticas na célula doadora de núcleo deve ser remodelado até um ponto semelhante a um embrião fertilizado. Embora algumas dessas modificações sejam estudadas tanto em embriões fertilizados quanto clonados, sabe-se que a reprogramação de uma célula somática a um estado totipotente é um processo ainda ineficiente e muitos mecanismos responsáveis por essas modificações não são totalmente compreendidos (Yang *et al.*, 2007).

O desenvolvimento embrionário inicial depende de uma sequência de modificações na configuração da cromatina, as quais são primariamente relacionadas a acetilação e metilação de histonas e a metilação do DNA genômico (Niemann *et al.*, 2008). A metilação do DNA ocorre na Citosina (C) de dinucleotídeos CG, conhecido por CpG, e acredita-se que esta modificação possui um papel importante na regulação da transcrição, estando associada, frequentemente, com a repressão da atividade transcricional em mamíferos (Zhao *et al.*, 2010b).

As histonas são proteínas associadas ao DNA que promovem a sua compactação. As regiões N-terminais das histonas são passíveis de modificações por acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (Li, 2002). A acetilação e a metilação são as modificações de histonas mais frequentemente estudadas. Em termos simplificados, a acetilação diminui a

interação entre o DNA e a histona estando associada à ativação da transcrição, enquanto que a metilação das histonas pode estar associada tanto com a ativação quanto com a repressão da transcrição dependendo de qual resíduo de aminoácido da região N-terminal está modificado (Cloos *et al.*, 2008). Por exemplo, a trimetilação da Histona H3 na Lisina do 4º aminoácido (H3K4me3), H3K36me ou H3K79me estão associadas geralmente a ativação da atividade transcricional (Sims *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2004; Kouzarides, 2007), assim como H3K9me2/3, H3K20me3 e H4K20me3 estão associadas a repressão da transcrição (Sims *et al.*, 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário a reprogramação do DNA é observada rapidamente antes e após a formação do zigoto. O DNA paterno é ativamente e rapidamente demetilado após a fecundação. Porém, o DNA materno é passivamente demetilado, sendo que esse mesmo padrão pode ser observado em diversas espécies (Mayer *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002). O DNA embrionário então é progressivamente remetilado do estágio de duas células até blastocisto (Dean *et al.*, 2001).

Os eventos básicos da demetilação/remetilação do DNA durante o desenvolvimento embrionário parece ser conservado em camundongos, bovinos, suínos e ratos (Reik *et al.*, 2001; Li, 2002; Shi *et al.*, 2003; Shi e Wu, 2009). A demetilação do genoma paterno ocorre rapidamente em cada uma dessas espécies, ao contrário do genoma materno onde a demetilação é passiva. Entretanto, parece que o tempo de remetilação do genoma difere entre essas espécies. Em bovinos, a remetilação do genoma é observada nos estádios de 8 a 16 células, enquanto que em camundongos a metilação global do DNA só é observada na ICM (Dean *et al.*, 2001) demonstrando diferenças específicas de cada espécie.

A produção de animais por SCNT exige que um núcleo altamente metilado de uma célula somática seja reprogramado de maneira a assegurar o desenvolvimento embrionário. Na espécie bovina, foi demonstrado um padrão anormal de metilação em embriões clonados (Kang *et al.*, 2001). Em clones, o evento inicial de demetilação ocorre no estágio de uma célula logo após a fusão com o ócito enucleado. Porém, a demetilação passiva é ausente, sendo observada uma remetilação precoce nos estádios de 4 a 8 células em bovinos quando deveria ocorrer entre 8 e 16 células (Dean *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003). As modificações de histonas e a metilação do DNA coordenam fases críticas do desenvolvimento embrionário, tais como, o momento da primeira divisão celular, compactação, formação do blastocisto e eclosão, sendo esses eventos regulados pela expressão coordenada de genes específicos em momentos específicos do desenvolvimento (Niemann *et al.*, 2008).

A clonagem de mamíferos por SCNT provou que uma célula somática é capaz de ser reprogramada a um estágio totipotente e dar origem a um novo indivíduo (Wilmut *et al.*, 1997). Embora embriões produzidos por SCNT sejam capazes de alcançar o desenvolvimento a termo, sabe-se que as taxas de nascimentos são extremamente baixas quando comparadas a embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* (Yang *et al.*, 2007). Muitas evidências sugerem que um dos principais problemas da SCNT deve-se a uma incorreta reprogramação epigenética nos embriões reconstruídos, o padrão de metilação e modificações de histonas diferem entre animais clonados e produzidos *in vitro* ou *in vivo*, levando a uma expressão incorreta de genes que acabam por comprometer o desenvolvimento a termo (Kang *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003).

Os problemas mais comuns em animais clonados são anormalidades na formação da placenta, crescimento fetal exagerado e morte perinatal. Esses problemas têm sido relacionados em parte a uma expressão errônea de genes “*imprinting*”. Em mamíferos, tanto o genoma paterno quanto o genoma materno são necessários ao desenvolvimento embrionário. A regulação do “*imprinting genômico*” ocorre através de mecanismos epigenéticos onde a expressão de certos genes deve ser específica de acordo com a sua origem parental, conferindo diferenças funcionais entre os genomas paterno e materno durante o desenvolvimento embrionário (Surani *et al.*, 1984; Reik *et al.*, 2001).

O genoma paterno é relativamente mais importante para o desenvolvimento de tecidos extra embrionários enquanto que o genoma materno tem uma maior influência no desenvolvimento do embrião (Shi *et al.*, 2003). Evidências sugerem que o cultivo e manipulação *in vitro* tanto de oócitos quanto de células utilizadas como doadoras de núcleo podem afetar o “*imprinting*” genômico (Khosla *et al.*, 2001). No entanto, são necessárias informações adicionais a cerca dos padrões normais de metilação e modificações de histonas, para então, encontrar meios de auxiliar na reprogramação epigenética em embriões clonados.

### **2.3 Inibidores de Deacetilase**

As enzimas responsáveis pelas modificações de acetilação/deacetilação das regiões N-terminais das histonas são as Histonas Acetil Transferases (*Histones Acetyl Transferases* - HTAs) que produzem a acetilação e as Histona Deacetilases (*Histone Deacetylases* – HDACs) que revertem a ação das HTAs. Considera-se que as regiões N-terminais das

histonas desempenham um importante papel na regulação da transcrição. A acetilação sempre relaciona-se com a ativação da transcrição, enquanto que a deacetilação dessas regiões induzem a repressão da transcrição através da condensação da cromatina (Monneret, 2005).

A dinâmica dessas modificações de histonas ocorre rapidamente nas células e o nível de acetilação é controlado pelo equilíbrio de ambas atividades, acetilação e deacetilação. Existem 18 genes que codificam para enzimas histonas deacetilases em mamíferos, sendo estes agrupados em 4 famílias: Grupo I (HDAC 1, 2, 3 e 8), IIa (HDAC 4, 5, 7 e 9), IIb (HDAC 6 e 10) III (SIRT 1-7), e IV (HDAC 11) (Yang e Seto, 2008). Os Inibidores de deacetilases (HDCAi) são pequenas moléculas naturais ou sintéticas capazes de inibir a ação das HDACs. Sabe-se que os eventos que regulam a diferenciação de células tronco e a reprogramação celular em embriões clonados são fundamentalmente epigenéticos (Hochedlinger e Plath, 2009), portanto os HDCAi são moléculas capazes de promover modificações epigenéticas e, conseqüentemente, regular a expressão gênica em determinado período.

Existem diversos trabalhos demonstrando a ação efetiva dos HDCAi em aumentar a eficiência da clonagem por transferência nuclear. Os primeiros trabalhos utilizaram Tricostatina (TSA) nas células utilizadas como doadoras de núcleo ou em embriões reconstruídos por transferência nuclear (Enright *et al.*, 2003; Rybouchkin *et al.*, 2006; Kishigami *et al.*, 2007), demonstrando que o tratamento melhora o desenvolvimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Já foi demonstrado que o TSA foi efetivo em bovinos (Akagi *et al.*, 2011), camundongos e suínos (Zhao *et al.*, 2009).

O tratamento com HDCAi promove a acetilação de histonas, a descondensação da cromatina e o aumento da síntese de RNA (Van Thuan *et al.*, 2009). Em camundongos foi demonstrado que o tratamento com Scriptaid resultou em maiores níveis de mRNA nos estádio de duas células, durante a ativação do genoma embrionário. Foi observada uma correlação positiva entre aumento da transcrição e o desenvolvimento a termo em camundongos clonados (Bui *et al.*, 2010). Diversos tipos de HDCAi têm sido utilizados para melhorar a reprogramação celular durante a SCNT, além do TSA, o Sódio Butirato NaBu (Das *et al.*, 2010), Scriptaid (Zhou *et al.*, 2013) e Ácido Valpróico (Miyoshi *et al.*, 2010) entre outras novas moléculas que têm sido utilizadas com sucesso.

O TSA é o HDCAi mais comumente utilizado e sua eficácia já foi demonstrada em diversos trabalhos. Entretanto, seu efeito pode ser inconsistente em algumas espécies. Em bovinos, já foi demonstrado que o tratamento melhora o desenvolvimento de embriões clonados (Rybouchkin *et al.*, 2006), enquanto outros demonstraram um efeito negativo

quando utilizado em embriões fecundados (Oliveira *et al.*, 2010) ou clonados (Wu *et al.*, 2008).

O Scriptaid é uma nova molécula considerada ser menos tóxica em relação ao TSA, o qual tem sido utilizado nos últimos anos (Su *et al.*, 2000). Desde então, tem sido demonstrado que o Scriptaid aumenta significativamente o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de camundongos (Van Thuan *et al.*, 2009). Resultados similares já foram obtidos em suínos normais e suínos em miniatura, que têm alta aplicabilidade em modelos para pesquisas (Zhao *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010a).

Como a reprogramação do núcleo após a transferência nuclear ocorre somente em um curto período até a ativação do genoma embrionário, o “relaxamento da cromatina” através da acetilação das histonas tende a facilitar a reprogramação celular. Durante a SCNT, o núcleo transferido para o citoplasto receptor não é estruturalmente organizado como um pró-núcleo paterno ou materno. O oócito contém fatores capazes de promover a reprogramação desse núcleo até certo ponto, e a utilização de HDACi pode auxiliar nesse período.

### **3 CAPÍTULO 1**

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**CELL CYCLE EFFECT AND INHIBITION OF DEACETYLATION ON  
DEVELOPMENT OF PIG EMBRYOS PRODUCED BY NUCLEAR  
TRANSFER**

Vitor Braga Rissi, Werner Giehl Glanzner, Lady Katerine Serrano, Alfredo Quites  
Antoniazzi, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Vilceu Bordignon



1 Cell cycle effect and inhibition of deacetylation on development of pig embryos  
2 produced by nuclear transfer

3  
4 Rissi, V.B<sup>a</sup>; Glanzner, W.G<sup>a</sup>; Serrano<sup>a</sup>, L.K; Antoniazzi, A.Q<sup>a</sup>; Gonçalves, P.B.D<sup>a</sup>;  
5 Bordignon, V.<sup>b\*</sup>

6  
7 *<sup>a</sup>Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of  
8 Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.*

9  
10 *<sup>b</sup>Department of Animal Science, McGill University, 21111 Lakeshore. Ste Anne de Bellevue,  
11 Quebec, Canadá, H9X 3V9. \* Corresponding author. Email: vilceu.bordignon@mcgill.ca*

12  
13 **Abstract**

14 The aim of this study was to evaluate if the positive effects of inhibiting histone  
15 deacetylase enzymes (HDACi) on cell reprogramming and development of somatic cell  
16 nuclear transfer (SCNT) embryos is affected by the cell cycle stage of nuclear donor cells and  
17 host oocytes at the time of embryo reconstruction. SCNT embryos were produced with MII or  
18 TII cytoplasts and nuclear donor cells that were either at G<sub>0-1</sub> or G<sub>2</sub>/M stage. Embryos  
19 reconstructed with the different cell cycle combinations were treated or not with the HDACi  
20 Scriptaid for 15 h, and then cultured *in vitro* for 7 days. Embryos reconstructed with MII-G<sub>0-1</sub>  
21 and TII-G<sub>2</sub>/M developed to the blastocyst stage in higher frequency compared to the other  
22 groups, which confirms the importance of cell cycle interactions on cell reprogramming and  
23 SCNT embryo development. Treatment of reconstructed embryos with HDACi improved  
24 development of embryos produced with MII but not TII cytoplasts independently of the cell  
25 cycle stage of nuclear donor cells. Our results provided evidence that cell cycle interactions

1 between the host cytoplasm and the nuclear donor cells affect nuclear reprogramming but the  
2 response of SCNT embryos to HDACi treatment depends on factors present in MII stage  
3 cytoplasm.

4

## 5 **Introduction**

6 Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been applied to study cellular  
7 reprogramming and also to produce cloned animals, since the first adult cloned animal was  
8 generated from a mammary gland cell (Wilmut *et al.*, 1997). Many species have now been  
9 cloned by SCNT including mice (Wakayama *et al.*, 1998), bovines (Cibelli *et al.*, 1998), pigs  
10 (Polejaeva *et al.*, 2000) and other domestic and wild species (Meissner e Jaenisch, 2006). In  
11 swine, SCNT has been widely used to produce transgenic animals (Machaty *et al.*, 2002) to be  
12 used as models in the study of human diseases because of physiological similarities with  
13 humans (Wolf *et al.*, 2014). However, the biggest challenge of SCNT remains its overall low  
14 efficiency due to incomplete cellular reprogramming (Niemann *et al.*, 2008).

15 Cell reprogramming in SCNT embryos is mainly regulated by epigenetic events.  
16 Histone modifications and DNA methylation are the main factors involved in the  
17 reprogramming of a somatic cell into a pluripotent state (Morgan *et al.*, 2005). Cloned  
18 embryos were shown to present aberrant DNA and histone methylation (Kang *et al.*, 2001;  
19 Santos e Dean, 2004), and histone acetylation (Zhao *et al.*, 2010b) patterns compared to  
20 fertilized embryos. Epigenetic abnormalities can result in abnormal gene expression during  
21 early embryo development, which may compromise the health and viability of cloned animals  
22 (Rideout *et al.*, 2001).

23 Histone deacetylase inhibitors (HDACi) have been used to improve epigenetic  
24 reprogramming after SCNT in mice (Van Thuan *et al.*, 2009), bovine (Wang *et al.*, 2011),  
25 swine (Zhao *et al.*, 2010a) and ovine (Wen *et al.*, 2014) embryos. HDACi treatment promotes

1 histone hyperacetylation, and consequently increases gene expression (Kretsovali *et al.*,  
2 2012). The acetylation status in cloned embryos treated with the HDACi Scriptaid was shown  
3 to be similar to fertilized embryos (Wen *et al.*, 2014). Scriptaid treatment was also shown to  
4 affect DNA methylation (Xu *et al.*, 2013) and DNA repair mechanisms (Bohrer *et al.*, 2014).

5 Besides epigenetic reprogramming, the cell cycle stage of nuclear donor cells and host  
6 oocytes is known to affect the development of SCNT embryos. Metaphase II (MII) stage  
7 oocytes are usually used as cytoplasts for SCNT; however, telophase (TII) oocytes have also  
8 been used (Bordignon e Smith, 2006). The coordination between the cell cycle stage of  
9 cytoplasts and nuclear donor cells is thought to be particularly important for maintaining  
10 normal ploidy in SCNT embryos (Campbell *et al.*, 1996). It has been proposed that when MII  
11 oocytes are used as cytoplasts the high activity of the maturation-promoting factor (MPF)  
12 induces the breakdown of the nuclear envelope (NEBD) and the premature condensation of  
13 the chromosomes (PCC), which may result in a new cycle of DNA re-replication after the  
14 reformulation of the nuclear envelope (Campbell *et al.*, 1993). In this context, G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> cells  
15 should be used as nuclear donor cells otherwise the ploidy of the reconstructed embryo would  
16 be compromised.

17 On the other hand, when pre-activated oocytes are used as cytoplasts MPF levels are  
18 insufficient to promote NEBD and PCC. Hence, G<sub>2</sub>/M cells could be used without  
19 compromising the ploidy of the reconstructed embryos (Campbell e Alberio, 2003).  
20 Nevertheless, it has been proposed that the exposure of the donor chromatin to cytoplasmic  
21 factors after NEBD and PCC would be essential for nuclear remodeling (Fulka *et al.*, 1996).  
22 Based on this premise MII cytoplasts have superior ability for nuclear reprogramming than  
23 pre-activated cytoplasts. However, a recent study showed that the cytoplasm of interphase  
24 two-cell stage mouse embryos is able to reprogram somatic cells but the cell cycle  
25 coordination between the host cytoplasm and donor cell is crucial for embryo development

1 (Kang *et al.*, 2014). In light of these previous findings, our main objectives in this study were  
2 to test the effects of the interactions between cell cycle stages of donor cells and host  
3 cytoplasts and HDACi treatment on development of SCNT embryos in swine.

4

## 5 **Material and Methods**

### 6 *Chemicals*

7 Unless otherwise indicated, chemicals and reagents were purchased from Sigma  
8 Chemical Company (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

9

### 10 *Oocyte collection and in vitro maturation*

11 Ovaries of prepubertal gilts were collected in a local slaughterhouse and transported to  
12 the laboratory in saline solution (0.9% NaCl) at 30°C to 35°C containing penicillin and  
13 streptomycin (100UI/ml and 50µg/ml, respectively). Cumulus-oocyte complexes (COCs)  
14 were aspirated from follicles ranging 3 to 6mm in diameter using a vacuum pump (vacuum  
15 rate of 15ml water/min). COCs surrounded by a minimum of three cumulus cells layers and  
16 having an entirely homogeneous granulated cytoplasm were selected for *in vitro* maturation  
17 (IVM). Groups of 35-40 CCOs were cultured in 400µl of maturation medium, in 4-well  
18 culture plates; in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 38.5°C.

19 Maturation medium consisted of TCM 199 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA),  
20 supplemented with 20% of porcine follicular fluid, 1mM of dibutyryl cyclic adenosine  
21 monophosphate (dbcAMP), 0.1µg/ml cysteine, 10ng/ml epidermal growth factor (EGF; Life  
22 Technologies), 0.91mM sodium pyruvate, 3.05mM D-glucose, 0.5µg/ml LH (Lutropin-V,  
23 Bioniche, Ontario, CA, USA), 0.5µg/ml FSH (Folltropin-V, Bioniche, Ontario CA, USA) and  
24 20µg/ml gentamicin. After 22 to 24h of maturation, oocytes were transferred to the same IVM  
25 medium, but without LH, FSH and dbcAMP for an additional 20 to 22h under the same

1 conditions. After IVM, cumulus cells were removed by vortexing in TCM 199 HEPES-  
2 buffered medium (Life Technologies) supplemented with 0.1% hyaluronidase and then  
3 oocytes were used for SCNT.

4

#### 5 *Nuclear donor cell culture and cell cycle synchronization*

6 Porcine fibroblast cells were cultured *in vitro* using Dulbecco's Modified Eagle's  
7 Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12), supplemented with 10% fetal bovine  
8 serum (FBS; Life Technologies) and 1% antibiotics (Penicillin 10.000U/ml and Streptomycin  
9 10.000µg/ml) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

10 To obtain cells at G<sub>0-1</sub> stage, fibroblasts were maintained in culture for at least 48h  
11 after reaching confluence and then used as nuclear donors for SCNT. To obtain cells at G<sub>2</sub>/M  
12 stage, fibroblasts were maintained in culture until reaching confluence and then used to  
13 prepare non-confluent cultures by plating 50,000 cells per well of a 6-well plate using 2 ml of  
14 culture media. The cells were then trypsinized and fixed for cell cycle analysis at 0, 16, 20,  
15 24, 28, 32 and 36 h after plating.

16

#### 17 *Cell cycle analysis by flow cytometry*

18 The cell culture media was removed and cells were rinsed with PBS. Cells were then  
19 trypsinized (0.25% trypsin-EDTA) and re-suspended in ice-cold fixation solution (70%  
20 ethanol and 30% PBS) for 15 minutes. Fixed cells were then pelleted by centrifugation and re-  
21 suspended in PBS until flow cytometry analysis. Before analysis, cells were re-suspended in  
22 1ml of PBS containing 50µg of propidium iodide and 100µg of RNase at 37°C for 40  
23 minutes. The DNA content of 10,000 cells was determined by fluorescence-activated cell  
24 sorting (FACS) using a FACSVerser system (BD Biosciences, San Jose, CA). The percentage  
25 of cells at G<sub>0-1</sub>, S or G<sub>2</sub>/M was calculated using the FACSSuite Software (BD Biosciences).

1 *Assessment of DNA and mRNA synthesis in donors cells and reconstructed embryos*

2       Detection of DNA and RNA synthesis was performed using the Click-iT<sup>®</sup> EdU and  
3 Click-iT<sup>®</sup> EU RNA Imaging kits (Invitrogen, Life Technologies<sup>®</sup>). Cells from either  
4 confluent cultures (> 48 h) or between 24 to 28 h post-passage from confluent cultures were  
5 incubated with 10µM EdU (DNA synthesis) or 1mM EU (RNA synthesis) for 2 or 4 h. Cells  
6 were then fixed in 4% paraformaldehyde and stained according to the manufacturer's  
7 instructions. Samples were mounted on microscope slides and DNA and RNA synthesis was  
8 evaluated using an epifluorescence microscope (Leica, DMI 4000B). To detect DNA and  
9 RNA synthesis in SCNT embryos, samples were incubated with EdU or EU for 4h starting  
10 either at 4 or 8 h post-fusion (hpf). DNA synthesis was quantified by assessing the grayscale  
11 signal using the LAS AF software (Leica Microsystems<sup>®</sup>). Nuclear diameter after staining  
12 with Hoechst was also measured using the LAS AF software.

13

14 *Production of host cytoplasts and nuclear transfer*

15       Two different procedures were used to enucleate oocytes at metaphase II (MII  
16 cytoplasts) and telophase II (TII cytoplasts). For MII cytoplasts, cumulus-free oocytes with a  
17 polar body were cultured in TCM 199 supplemented with 0.4µg/ml demecolcine and 0.05M  
18 sucrose for 60 minutes. This treatment resulted in a small protrusion in the ooplasmic  
19 membrane that contained the metaphase chromosomes. To prepare TII cytoplasts, cumulus-  
20 free oocytes were parthenogenetically activated in TCM 199 supplemented with 15µM  
21 ionomycin for 5 minutes, and then cultured in Ca<sup>2+</sup>-free porcine zygote medium (PZM-3)  
22 supplemented with 10µl/ml cycloheximide and 10mM strontium chloride for 2 h. This  
23 treatment promotes the extrusion of the second polar body allowing enucleation at telophase  
24 II stage. After cytoplast preparation (MII or TII), oocytes were transferred to TCM199  
25 HEPES-buffered medium supplemented with 2mg/ml BSA (fatty acid free), 20µg/ml

1 gentamicin and 7.5µg/ml cytochalasin B for 5 to 10 minutes and then enucleated by removing  
2 the protruded oocyte chromatin together with the first polar body (MII Cytoplasm) or the two  
3 polar bodies and a small fraction of the surrounding cytoplasm (TII cytoplasts).

4 A nuclear donor cell was transferred into the perivitelline space of each enucleated  
5 oocyte and electrically fused using a single DC pulse of 35V for 50µs. Electrofusion was  
6 performed into a 0.28M mannitol solution supplemented with 50µM CaCl<sub>2</sub>, 100µM MgSO<sub>4</sub>  
7 and 0.1% BSA. After fusion oocytes were cultured in TCM 199 medium supplemented with  
8 3mg/ml BSA for 1h. Reconstructed oocytes with MII cytoplasts were exposed to ionomycin  
9 (15µM) for 5 minutes, and then transferred to Ca<sup>2+</sup>-free PZM-3 supplemented with 10mM  
10 strontium chloride, cytochalasin B (7.5µg/ml) and cycloheximide (10µg/ml) for 4h.  
11 Reconstructed oocytes with TII cytoplasts were placed directly in PZM-3 after fusion. The  
12 oocytes were cultured either in presence of 500nM of the HDACi Scriptaid or not (Control  
13 group) for 15h starting after ionomycin treatment for MII cytoplasts or after fusion for TII  
14 cytoplasts.

#### 16 *Embryo Culture*

17 After SCNT oocytes were washed in PZM-3 medium supplemented with 3mg/ml BSA  
18 (fatty acid free) and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 38.5°C.  
19 Cleavage rates were determined 48h after activation. Culture medium was supplemented with  
20 10% FBS on day 5 and blastocyst rates were evaluated on day 7.

#### 22 *Estimation of the total cell number after embryo culture*

23 Embryos that developed to the blastocyst stage after 7 days in culture were rinsed in  
24 PBS containing 0.1% polyvinyl alcohol (PBS-PVA) and fixed during 15-20 minutes in 4%  
25 paraformaldehyde. Fixed embryos were rinsed in PBS-PVA and then stored at 4°C in PBS

1 containing 0.3% BSA and 0.1% Triton X-100. DNA was stained by exposing the embryos to  
2 10 $\mu$ M Hoechst 33342 for 10 minutes. Embryos were then mounted into slides using Mowiol  
3 and the number of cell nuclei per embryo was counted in an epifluorescence microscope  
4 (Leica, DMI 4000B).

5

#### 6 *Immunofluorescence Staining*

7 SCNT embryos from the different groups were cultured for 48h after activation and  
8 then fixed for 15-20 minutes in 4% paraformaldehyde and stored in PBS with 3% BSA at 4°C  
9 until staining. For immunostaining, embryos were permeabilized in 1% Triton X-100 in PBS  
10 during 60 minutes at 37°C. Samples were incubated for 1h at room temperature in blocking  
11 solution (3% BSA and 0.2% Tween-20 in PBS) and then incubated overnight with an anti-  
12 phospho-H2A.x (ser139) primary antibody (H2AX139ph; Millipore, Billerica, MA, United  
13 States) diluted (1:1000) in blocking solution. Embryos were then incubated for 2h at room  
14 temperature in the presence of an anti-mouse IgG AlexaFluor 555<sup>®</sup> (Life Technologies)  
15 secondary antibody diluted (1:500) in blocking solution. DNA was stained by exposing the  
16 samples to 300nM 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies) in blocking  
17 solution for 20 minutes. Samples were then mounted into slides with Mowiol and the number  
18 and size of H2AX139ph foci were evaluated in each nuclei using an epifluorescence  
19 microscope (Leica, DMI 4000B). Only the fluorescent foci larger than 0.3 $\mu$ m<sup>2</sup> were counted  
20 as sites of double strand DNA breaks (DSBs).

21

#### 22 *Experimental design*

23 The experiments were designed to assess the effects of cell cycle interactions between  
24 cytoplasts and nuclear donor cells and HDACi on SCNT embryos. In the first experiment,  
25 embryos were reconstructed using G<sub>0-1</sub>-synchronized cells and MII or TII cytoplasts. In the



1 second experiment, embryos were reconstructed using G<sub>2</sub>/M synchronized cells and MII or  
2 TII cytoplasts. After nuclear transfer, reconstructed embryos from all the groups were  
3 separated in 2 groups and were treated with Scriptaid (HDACi group) or not (Control group)  
4 for 15h starting after ionomycin treatment (MII cytoplasts) or after fusion (TII cytoplasts).

5

### 6 *Statistical Analysis*

7 Data of cell cycle synchronization, number of cells, nuclei diameter and  
8 immunofluorescence were submitted to ANOVA using JUMP software (SAS institute Inc.,  
9 Cary, NC) and means were compared between treatments using LSMeans Student *t test*. Data  
10 were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk test and normalized when necessary.  
11 Results are presented as means  $\pm$  SEM. Embryo cleavage and development were analyzed by  
12 a randomized complete block design (RCBD) to evaluate the effect with or without Scriptaid  
13 on embryo development. A single replication was considered a block with 4 treatment groups  
14 performed simultaneously. In order to analyze the data by parametric test, percentages were  
15 transformed by arcsin and subjected to analysis of variance. The treatment groups were  
16 compared by contrast using the SAS program (SAS institute Inc., Cary, NC). For all analyzes,  
17  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

18

## 19 **Results**

### 20 *Cell cycle synchronization and detection of DNA and RNA synthesis*

21 For G<sub>0-1</sub> cell cycle synchronization, cells were maintained in culture for at least 48 h  
22 after reaching confluence. The proportion of cells in G<sub>0-1</sub> ( $88.2 \pm 4.3\%$ ), S ( $2.7 \pm 1.9\%$ ) and  
23 G<sub>2</sub>/M ( $9.1 \pm 2.8\%$ ) confirmed that most of the cells were at the expected phase of the cell  
24 cycle (Fig. 1.A and 1C). Only small cells (mean diameter =  $13.9\mu\text{m}$ ), which represented the

1 majority of cells in this experiment (Fig. 1B - white arrow), were used as nuclear donors for  
2 SCNT.

3 To obtain G<sub>2</sub>/M cells for the second experiment, confluent cells were trypsinized and  
4 plated in a non-confluent density, which allows for a synchronized wave of cells resuming  
5 their cell cycle and progressing to S and then G<sub>2</sub>-phases. As shown in Fig. 1C, more than 30%  
6 of cells have reached the G<sub>2</sub>/M phase at 24 to 28 h post-passage from confluent cultures.  
7 Therefore, the second SCNT experiment was conducted using only large cells (mean diameter  
8 = 25.9µm) collected at 24-28h after plating from confluent cultures (Fig. 1.D - black arrow).

9 DNA and mRNA synthesis was evaluated in cells synchronized at G<sub>1-0</sub> (confluent) and  
10 G<sub>2</sub>/M (between 24 -28 h post-passage from confluent cultures). As expected, we observed  
11 fluorescent signal for DNA synthesis in most of G<sub>2</sub>/M-synchronized cells compared to only  
12 few positive cells in the G<sub>1-0</sub> group (Fig. 2). On the other hand, positive fluorescent signal for  
13 RNA synthesis was detected in most of cells from both groups, which active transcriptional  
14 activity in these cell populations (Fig. 2).

15

16 *Effect of cell cycle interactions between donor cells and host cytoplasts and treatment with*  
17 *HDACi on development of SCNT embryos.*

18 In the first experiment, a total of 568 embryos were reconstructed using G<sub>0-1</sub> cells and  
19 MII or TII cytoplasts, which were treated or not the HDACi Scriptaid for 15h. Cleavage rates  
20 were significantly higher in embryos reconstructed with MII (72.1%) than TII (45.7%)  
21 cytoplasts (Fig. 3.A). Scriptaid treatment did not affect cleavage rates either in MII (MII  
22 72.1% vs. MII+S 66.7%) or TII (TII 45.7% vs. TII+S 47.8%) cytoplasts. Development to the  
23 blastocyst stage was significantly superior in MII (19.8%) than TII (4.6%) cytoplasts (Fig.  
24 3.B). Interestingly, Scriptaid treatment enhanced embryo development in MII cytoplasts (MII  
25 19.8% vs. MII+S 32.6%; p=0.09), but did not improve development in embryos reconstructed

1 with TII cytoplasts (TII 4.6% vs TII+S 6.2%;  $p= 0.73$ ). In the second experiment, a total of  
2 448 embryos were reconstructed using G<sub>2</sub>/M donor cells. Cleavage rates were not  
3 significantly different between MII (61%) and TII (51.9%) cytoplasts, as well as between  
4 control and Scriptaid treated (MII 61% vs. MII+S 59.4%; TII 51.9% vs. TII+S 49.5%)  
5 cytoplasts (Fig. 3.C). Development to the blastocyst stage was significantly lower in MII  
6 (8.7%) compared to TII (22.2%) cytoplasts (Fig. 3.D). Similarly to the first experiment,  
7 Scriptaid treatment enhanced development in embryos reconstructed with MII (MII 8.7% vs.  
8 MII+S 16.6%) but not TII (TII 22.2% vs. TII+S 22.4%) cytoplasts (Fig. 3.D).

9

#### 10 *Effect of cell cycle interactions on DNA and RNA synthesis and nuclear decondensation*

11 *DNA and RNA synthesis was evaluated in reconstructed embryos between 4 to 8 and*  
12 *8 to 12 h post-fusion. The mean nuclear diameter was similar at 8 and 12 hpf in both MII/G<sub>0</sub>*  
13 *and TII/G<sub>1-0</sub> embryos, and it was not affected by HDACi treatment (Fig. 4.A). However, the*  
14 *average nuclear size was superior in MII/G<sub>0-1</sub> compared to TII/G<sub>1-0</sub> embryos either at 8 or 12*  
15 *hpf (Fig. 4.A). Similar results were obtained in MII/G<sub>2-M</sub> and TII/G<sub>2-M</sub> embryos (Fig. 4.B).*  
16 *This confirms that nuclear swelling in SCNT was mainly affected by the cytoplasm cell cycle*  
17 *stage.*

18 DNA synthesis signal was also more frequently detected in embryos produced from  
19 MII cytoplasts compared to TII cytoplasts, independently of the nuclear donor stage G<sub>1-0</sub> vs.  
20 G<sub>2</sub>/M or HDACi treatment (Table 1). Yet, most of the embryos reconstructed using MII  
21 cytoplasts have initiated DNA synthesis by 12 hpf while a positive signal for DNA synthesis  
22 was only detect in a small number of embryos derived from TII cytoplasts (Fig. 5). The  
23 fluorescent signal for DNA synthesis was similar between HDACi treated and control  
24 embryos either at 8 or 12 hpf. RNA synthesis was not detected in any embryo evaluated at 8  
25 and 12 hpf independently of HDACi treatment and cell cycle stages.

1 *Effect of cell cycle interactions and HDACi on the presence of DSBs in SCNT embryos*

2         The presence of DSBs was determined in cleaved embryos fixed at 48h after SCNT by  
3 counting the number of fluorescent foci for H2AX139ph (Fig 6.C). There were no significant  
4 effects of host cytoplasm type on the average number of H2AX139ph foci in cleaved embryos  
5 either when reconstructed from G<sub>0-1</sub> or G<sub>2/M</sub> donor cells. In embryos produced from G<sub>0-1</sub> cells  
6 and MII cytoplasm Scriptaid treatment reduced the number of H2AX139ph foci (Fig. 6.A).  
7 However, Scriptaid treatment did not affect the number of H2AX139ph foci in embryos  
8 reconstructed with G<sub>0-1</sub> cells and TII cytoplasm or when G<sub>2/M</sub> cells were transfer to either MII  
9 or TII cytoplasm (Fig. 6.B).

10

11 *Effect of cell cycle interactions and HDACi on embryo cell number*

12         The total number of cells was counted in SCNT embryos that developed to the  
13 blastocyst stage (Table 2). Embryos reconstructed with G<sub>0-1</sub> cells and MII cytoplasm had  
14 higher number of nuclei ( $31.5 \pm 3.2$ ) than TII cytoplasm ( $15.3 \pm 1.7$ ). Scriptaid treatment did  
15 not affect embryo cell number either when using MII (MII  $31.5 \pm 3.2$  vs. MII+S  $36.7 \pm 5.1$ ) or  
16 TII (TII  $15.33 \pm 1.7$  vs. TII+S  $19 \pm 2.3$ ) cytoplasm (Table 2). In embryos reconstructed with  
17 G<sub>2/M</sub> cells there was no effect of cytoplasm or Scriptaid treatment on the average number of  
18 cells per blastocyst (Fig. 4C).

19

20 **Discussion**

21         Somatic cell reprogramming has many applications in cell biology comprising the  
22 production of pluripotent cells for therapeutical uses and the creation of cloned animals. It has  
23 been shown that cell reprogramming after nuclear transfer is affect by a number of conditions  
24 such as epigenetic changes and cell cycle interactions between the nuclear donor cell and the  
25 host cytoplasm. Even though many studies have investigated the impact of these conditions

1 on cell reprogramming and development of SCNT embryos {Campbell, 1999 #426;Dean, 2003  
2 #449;Niemann, 2008 #380;Wells, 2013 #626;Zhao, 2010 #381}, the interplay between cell  
3 cycle stage at the time of embryo reconstruction and the epigenetic reprogramming has not  
4 been thoroughly investigated. In this study, our main goal was to evaluate if the positive  
5 effects of HDCAi treatment on cell reprogramming and development of SCNT embryos is  
6 affected by the cell cycle stage of nuclear donor cells and host oocytes at the time of embryo  
7 reconstruction. Our findings provided evidence that the response of SCNT embryos to  
8 HDACi treatment depends upon the stage of the cell cycle at the time of nuclear transfer.

9 Cell cycle coordination between nuclear donor cells and host cytoplasts is thought to  
10 be important for preserving embryo ploidy and promote nuclear reprogramming in SCNT  
11 embryos {Chia, 2013 #623}. In this context, it has been proposed that when G<sub>2</sub>/M cells are  
12 used in combination with MII cytoplasts ploidy errors can be induced, whereas the use of pre-  
13 activated cytoplasts would eliminate this problem {Campbell, 1996 #427}. Indeed, the high  
14 MPF activity present in MII cytoplasts may induce the degradation of the nuclear envelope  
15 (NEBD) and the premature chromatin condensation (PCC) of the transferred nucleus, which  
16 can result in DNA re-replication after nuclear envelope reformulation. Thus, unless nuclear  
17 donor cells are used at G<sub>1</sub> or G<sub>0</sub> stages, the ploidy of reconstructed embryos can be  
18 compromised {Campbell, 2003 #479}. On the other hand, G<sub>2</sub>/M cells can be fully  
19 reprogrammed and generate healthy animals when transferred to pre-activated cytoplasts  
20 {Bordignon, 2006 #360}. Those previous studies have indicated that both G<sub>0-1</sub> and G<sub>2</sub>/M  
21 stage nuclei are amenable to reprogramming if transferred to a suitable cytoplasmic  
22 environment.

23 Similarly to previous studies in other species, we have provided additional evidence  
24 using the porcine model that SCNT embryos reconstructed with G<sub>0-1</sub> donor cells and MII  
25 stage cytoplast have similar developmental rate to the blastocyst stage than those

1 reconstructed with G<sub>2</sub>/M donor cells and pre-activated T-II stage cytoplasts. Interestingly,  
2 when G<sub>0-1</sub> donor cells were combined with activated cytoplasm and G<sub>2</sub>/M donor cells with MII  
3 stage cytoplasm both treatments resulted in poor development to the blastocyst stage. One  
4 possibility to explain the low development of embryos reconstructed with G<sub>2</sub>/M donor cells  
5 and MII stage cytoplasm relies on the fact that MII cytoplasts induce NEBD and PCC, which  
6 are likely to affect the ploidy of the developing embryo. However, pre-activated cytoplasts do  
7 not induce NEBD and PCC, which suggests that the low development of embryos  
8 reconstructed with G<sub>0-1</sub> donor cells and pre-activated cytoplasts was due to deficient nuclear  
9 reprogramming rather than abnormal ploidy. Our findings support the hypothesis that cell  
10 cycle coordination in SCNT is important not only to preserve the normal ploidy of  
11 reconstructed embryo but also to promote nuclear reprogramming.

12 Deficient cell reprogramming to a pluripotent stage has been considered the main  
13 constraint affecting development of SCNT embryos in many animal species including swine  
14 {Gruppen, 2014 #670;Liu, 2014 #677}. This is supported by the results of comparisons  
15 performed between IVF and SCNT embryos, which revealed significant differences in gene  
16 expression {Wang, 2011 #508}, acetylation status {Wen, 2014 #656} and genome integrity  
17 {Pereira, 2014 #704}. Further supporting the impact of cell reprogramming on SCNT are the  
18 results of other studies showing that the treatment of reconstructed embryos with inhibitors of  
19 histone deacetylases enzymes enhances cellular reprogramming and embryo development  
20 {Bui, 2010 #758;Chen, 2013 #552;Zhou, 2013 #550;Zhang, 2014 #798}. In addition to  
21 enhance cell reprogramming, it has also been shown that HDACi treatment facilitates DNA  
22 damage repair in SCNT embryos {Bohrer, 2014 #732}. To further investigate the potential  
23 interplay between cell cycle interactions and cell reprogramming we have assessed the effect  
24 HDACi treatment on embryos reconstructed with G<sub>0-1</sub> or G<sub>2</sub>/M nuclear donor cells and MII or  
25 TII host cytoplasm. Interestingly, we observed that the positive effect of HDACi treatment

1 depends on the stage of the host cytoplasm but not the nuclear donor cell. Independently of the  
2 donor cell stage, HDACi treatment improved development of embryos reconstructed with MII  
3 but not with TII cytoplasts. Even though one cannot rule out the possibility that the observed  
4 benefit of HDACi treatment was due to an enhancement in nuclear reprogramming, our  
5 findings suggest that HDACi treatment may facilitate the interaction between the transplanted  
6 interphase nucleus and the host MII cytoplasm. Indeed, it seems logical to speculate that both  
7 cytoplasts would have been equally affected by HDACi treatment if the effect was only due to  
8 the enhancement of nuclear reprogramming. Nonetheless, it is possible that the positive effect  
9 of HDACi treatment to promote cell reprogramming depends upon cytoplasmic factors  
10 present into MII stage but not in pre-activated cytoplasts. It is also possible that HDACi effect  
11 depends on NEBD, which is known to occur when nuclei are transferred to MII but not pre-  
12 activated cytoplasts.

13 In order to explore the potential mechanism associated with the observed MII stage-  
14 dependent effect of HDACi treatment, we evaluated the presence of H2AX139ph in cleaved  
15 embryos fixed at 48h after nuclear transfer. The presence of H2AX139ph foci indicates the  
16 sites of DNA double strand breaks {Rogakou, 1999 #782}. It has been shown that DSBs can  
17 affect embryo development in different species including bovine {Henrique Barreta, 2012  
18 #709} and swine {Bohrer, 2013 #622}. In agreement with previous studies {Bohrer, 2014  
19 #712}, we observed that HDACi treatment reduced the number of fluorescent foci for  
20 H2AX139ph in embryos reconstructed with G<sub>0-1</sub> donor cells and MII cytoplasts. However,  
21 this effect was not seen in embryos reconstructed with G<sub>2</sub>/M donor cells and MII cytoplasts,  
22 despite of the positive effect of HDACi on embryo development. Although these findings  
23 suggest that the benefit of HDACi treatment on development was not by promoting DNA  
24 damage repair, additional studies should be conducted to investigate the presence of  
25 H2AX139ph at different developmental stages. It is worth highlighting that in this study

1 embryos reconstructed with G<sub>0-1</sub> donor cells and MII cytoplasts and then treated with HDCAi  
 2 had lower number of H2AX139ph foci and resulted in embryos with superior developmental  
 3 capacity and higher number of cells.

4 In conclusion, findings reported in this manuscript provide evidence that: i) G<sub>0-1</sub> stage  
 5 donor cells are better reprogrammed by MII cytoplast while G<sub>2/M</sub> cells can better support  
 6 embryo development if transferred to a pre-activated TII stage cytoplast; ii) the positive effect  
 7 of HDACi treatment on development of SCNT embryos depends on the cell cycle stage of the  
 8 host cytoplast but not of the donor cell; and iii) the cell cycle coordination is important for  
 9 nuclear reprogramming in SCNT embryos.

10

## 11 **Acknowledgments**

12 This study was supported by the Brazilian council of Scientific and Technological  
 13 Development (CNPq) and the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC)  
 14 of Canada.

15

## 16 **References**

- 17 Bohrer, R.C., Che, L., Goncalves, P.B., Duggavathi, R., and Bordignon, V. (2013).  
 18 Phosphorylated histone H2A.x in porcine embryos produced by IVF and somatic cell  
 19 nuclear transfer. *Reproduction* 146, 325-333.
- 20 Bohrer, R.C., Duggavathi, R., and Bordignon, V. (2014). Inhibition of histone deacetylases  
 21 enhances DNA damage repair in SCNT embryos. *Cell Cycle* 13, 2138-2148.
- 22 Bordignon, V., and Smith, L.C. (2006). Telophase-stage host ooplasts support complete  
 23 reprogramming of roscovitine-treated somatic cell nuclei in cattle. *Cloning and stem*  
 24 *cells* 8, 305-317.
- 25 Bui, H.T., Wakayama, S., Kishigami, S., Park, K.K., Kim, J.H., Thuan, N.V., and Wakayama,  
 26 T. (2010). Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications,  
 27 DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biology of*  
 28 *reproduction* 83, 454-463.
- 29 Campbell, K.H. (1999). Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1,  
 30 3-15.



- 1 Campbell, K.H., and Alberio, R. (2003). Reprogramming the genome: role of the cell cycle.  
2 *Reprod Suppl* 61, 477-494.
- 3 Campbell, K.H., Loi, P., Otaegui, P.J., and Wilmut, I. (1996). Cell cycle co-ordination in  
4 embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of reproduction* 1, 40-46.
- 5 Campbell, K.H., Ritchie, W.A., and Wilmut, I. (1993). Nuclear-cytoplasmic interactions  
6 during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos:  
7 implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biology of*  
8 *reproduction* 49, 933-942.
- 9 Chen, C.H., Du, F., Xu, J., Chang, W.F., Liu, C.C., Su, H.Y., Lin, T.A., Ju, J.C., Cheng,  
10 W.T., Wu, S.C. and others. (2013). Synergistic effect of trichostatin A and scriptaid on  
11 the development of cloned rabbit embryos. *Theriogenology* 79, 1284-1293.
- 12 Chia, G., and Egli, D. (2013). Connecting the cell cycle with cellular identity. *Cellular*  
13 *reprogramming* 15, 356-366.
- 14 Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon,  
15 F.A., and Robl, J.M. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent  
16 fetal fibroblasts. *Science* 280, 1256-1258.
- 17 Dean, W., Santos, F., and Reik, W. (2003). Epigenetic reprogramming in early mammalian  
18 development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in cell &*  
19 *developmental biology* 14, 93-100.
- 20 Fulka, J., Jr., First, N.L., and Moor, R.M. (1996). Nuclear transplantation in mammals:  
21 remodelling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor.  
22 *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 18,  
23 835-840.
- 24 Grupen, C.G. (2014). The evolution of porcine embryo in vitro production. *Theriogenology*  
25 81, 24-37.
- 26 Henrique Barreta, M., Garziera Gasperin, B., Braga Rissi, V., de Cesaro, M.P., Ferreira, R.,  
27 de Oliveira, J.F., Goncalves, P.B., and Bordignon, V. (2012). Homologous  
28 recombination and non-homologous end-joining repair pathways in bovine embryos  
29 with different developmental competence. *Experimental cell research* 318, 2049-2058.
- 30 Kang, E., Wu, G., Ma, H., Li, Y., Tippner-Hedges, R., Tachibana, M., Sparman, M., Wolf,  
31 D.P., Scholer, H.R., and Mitalipov, S. (2014). Nuclear reprogramming by interphase  
32 cytoplasm of two-cell mouse embryos. *Nature* 509, 101-104.
- 33 Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K., and Han, Y.M.  
34 (2001). Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nature*  
35 *genetics* 28, 173-177.
- 36 Kretsovali, A., Hadjimichael, C., and Charmpilas, N. (2012). Histone deacetylase inhibitors in  
37 cell pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Stem cells international* 2012,  
38 184154.

- 1 Liu, Y., Li, J., Lvendahl, P., Schmidt, M., Larsen, K., and Callesen, H. (2014). In vitro  
2 manipulation techniques of porcine embryos: a meta-analysis related to transfers,  
3 pregnancies and piglets. *Reproduction, Fertility and Development*.
- 4 Machaty, Z., Bondioli, K.R., Ramsoondar, J.J., and Fodor, W.L. (2002). The use of nuclear  
5 transfer to produce transgenic pigs. *Cloning and stem cells* 4, 21-27.
- 6 Meissner, A., and Jaenisch, R. (2006). Mammalian nuclear transfer. *Developmental dynamics*  
7 : an official publication of the American Association of Anatomists 235, 2460-2469.
- 8 Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic  
9 reprogramming in mammals. *Human molecular genetics* 14 Spec No 1, R47-58.
- 10 Niemann, H., Tian, X.C., King, W.A., and Lee, R.S. (2008). Epigenetic reprogramming in  
11 embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning.  
12 *Reproduction* 135, 151-163.
- 13 Pereira, A.F., Melo, L.M., Freitas, V.J., and Salamone, D.F. (2014). Phosphorylated H2AX in  
14 parthenogenetically activated, in vitro fertilized and cloned bovine embryos. *Zygote*,  
15 1-9.
- 16 Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J.,  
17 Walker, S., Ayares, D.L. and others. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer  
18 from adult somatic cells. *Nature* 407, 86-90.
- 19 Rideout, W.M., 3rd, Eggan, K., and Jaenisch, R. (2001). Nuclear cloning and epigenetic  
20 reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093-1098.
- 21 Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin  
22 domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*  
23 146, 905-916.
- 24 Santos, F., and Dean, W. (2004). Epigenetic reprogramming during early development in  
25 mammals. *Reproduction* 127, 643-651.
- 26 Van Thuan, N., Bui, H.T., Kim, J.H., Hikichi, T., Wakayama, S., Kishigami, S., Mizutani, E.,  
27 and Wakayama, T. (2009). The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances  
28 nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice.  
29 *Reproduction* 138, 309-317.
- 30 Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-  
31 term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei.  
32 *Nature* 394, 369-374.
- 33 Wang, L.J., Zhang, H., Wang, Y.S., Xu, W.B., Xiong, X.R., Li, Y.Y., Su, J.M., Hua, S., and  
34 Zhang, Y. (2011). Scriptaid improves in vitro development and nuclear  
35 reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *Cellular*  
36 *reprogramming* 13, 431-439.
- 37 Wells, D.N. (2013). Keith's MAGIC: Cloning and the Cell Cycle. *Cellular reprogramming* 15,  
38 348-355.

- 1 Wen, B.Q., Li, J., Li, J.J., Tian, S.J., Sun, S.C., Qi, X., Cai, W.T., and Chang, Q.L. (2014).  
 2 The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves in vitro developmental  
 3 competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. *Theriogenology* 81,  
 4 332-339.
- 5 Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable  
 6 offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- 7 Wolf, E., Braun-Reichhart, C., Streckel, E., and Renner, S. (2014). Genetically engineered pig  
 8 models for diabetes research. *Transgenic research* 23, 27-38.
- 9 Xu, W., Li, Z., Yu, B., He, X., Shi, J., Zhou, R., Liu, D., and Wu, Z. (2013). Effects of  
 10 DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during  
 11 porcine somatic cell nuclear transfer. *PloS one* 8, e64705.
- 12 Zhang, H., Wang, Y., Sang, Y., Zhang, Y., and Hua, S. (2014). Combination of S-  
 13 adenosylhomocysteine and scriptaid, a non-toxic epigenetic modifying reagent,  
 14 modulates the reprogramming of bovine somatic-cell nuclear transfer embryos.  
 15 *Molecular reproduction and development* 81, 87-97.
- 16 Zhao, J., Hao, Y., Ross, J.W., Spate, L.D., Walters, E.M., Samuel, M.S., Rieke, A., Murphy,  
 17 C.N., and Prather, R.S. (2010a). Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in  
 18 vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos.  
 19 *Cellular reprogramming* 12, 75-83.
- 20 Zhao, J., Whyte, J., and Prather, R.S. (2010b). Effect of epigenetic regulation during swine  
 21 embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. *Cell and tissue research* 341, 13-21.
- 22 Zhou, Y., Huang, Y., Xie, W., Song, Q., Ji, Y., Zhang, Y., Ouyang, H., Lai, L., Pang, D., and  
 23 Tang, X. (2013). Scriptaid affects histone acetylation and the expression of  
 24 development-related genes at different stages of porcine somatic cell nuclear transfer  
 25 embryo during early development. *Chinese Science Bulletin* 58, 2044-2052.  
 26

## 27 **Author Disclosures**

28 The authors declare that there are no conflicts of interest.

29

## 30 **Figure legends**

31

32 **Figure 1.** Cell cycle synchronization for nuclear transfer. A – Representative histogram  
 33 showing the cell cycle distribution of cells that were maintained in culture for 48h after  
 34 reaching confluence. B – Confluent cells after trypsinization. Only the smaller cells (white  
 35 arrow) were used for SCNT. C – Proportion of cells at the different stages of the cell cycle  
 36 from samples collected at different times post-passage from confluent cultures. D – Cells

1 trypsinized at 24 h after plating from a confluent culture. Only the larger cells (black arrow)  
2 were used for SCNT.

3

4 **Figure 2.** DNA and RNA synthesis detection in nuclear donor cells in confluent cells (> 48h)  
5 and non-confluent cells (24 h post-passage from confluent culture). Red fluorescent signal  
6 indicates DNA synthesis and green fluorescent signal represents RNA synthesis.

7

8 **Figure 3.** Development of embryos produced by SCNT. Cleavage and blastocyst rates of  
9 SCNT embryos reconstructed with G<sub>0-1</sub> cells (A and B) and G<sub>2/M</sub> cells (C and D). Different  
10 letters indicate significant differences between groups (p<0.05). \* indicates p=0.09.

11

12 **Figure 4.** Nuclear diameter in SCNT embryos at 8 and 12 hpf. A - Embryos produced from  
13 G<sub>1-0</sub> synchronized cells. B - Embryos produced from G<sub>2/M</sub> synchronized cells. MII =  
14 metaphase stage cytoplasm, MII+S = metaphase stage cytoplasm treated with scriptaid, TII =  
15 telophase stage cytoplasm, TII+S = telophase stage cytoplasm treated with scriptaid.

16

17 **Figure 5.** Representative pictures showing nuclear diameter and DNA synthesis in SCNT  
18 produced from G<sub>1-0</sub> and G<sub>2/M</sub> cells and fixed at 12 hpf.

19

20 **Figure 6.** Presence of H2AX139ph foci in SCNT embryos produced from G<sub>0-1</sub> cells (A) and  
21 G<sub>2/M</sub> cells (B) and fixed at 48h post-activation. C – Representative pictures showing  
22 H2AX139ph foci in SCNT embryos. Different letters indicate significant differences between  
23 groups (p<0.05).

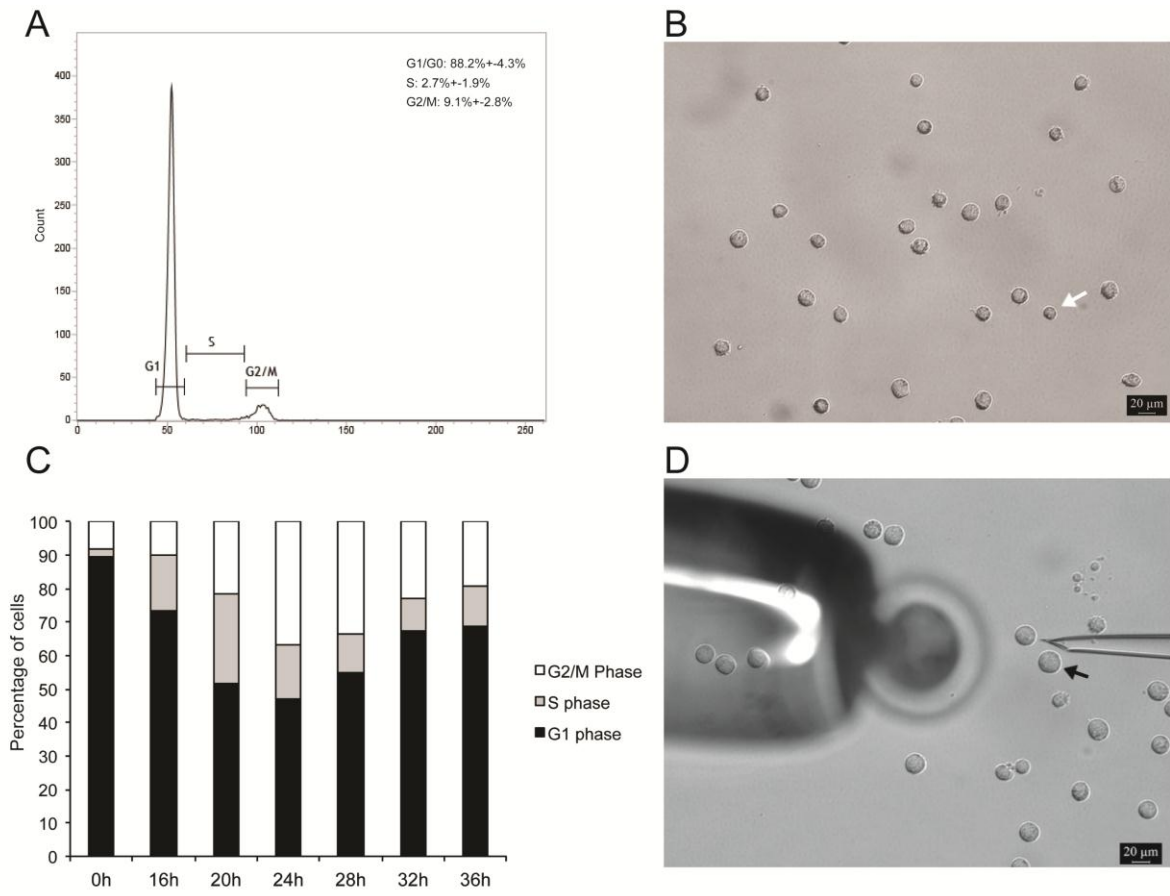
**Table 1.** Number of SCNT embryos presenting a positive fluorescent signal for DNA synthesis at 8 and 12 hpf.

Groups	G <sub>0-1</sub> cells		G <sub>2/M</sub> cells	
	8 hpf	12 hpf	8 hpf	12 hpf
MII	3/10 (30%)	10/12 (83.3%)	4/6 (66.7%)	14/14 (100%)
MII+S	4/8 (50%)	9/11 (81.8%)	2/10 (20%)	6/6 (100%)
TII	2/14 (14.3%)	2/14 (14.3%)	0/11 (0%)	0/13 (0%)
TII+S	2/15 (13.3%)	1/14 (7.1%)	1/11 (9.1%)	0/12 (0%)

**Table 2.** Average number of nuclei in SCNT embryos reconstructed with G1-0 or G2-M donor cells and fixed at day 7 after nuclear transfer. Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

Groups	G <sub>0-1</sub> cells	G <sub>2/M</sub> cells
MII	31.7 ± 3.2 <sup>A</sup>	17 ± 4.7
MII+S	36.7 ± 5.1 <sup>A</sup>	16 ± 0.5
TII	15.3 ± 1.7 <sup>B</sup>	23.3 ± 1.7
TII+S	19 ± 2.3 <sup>B</sup>	20.6 ± 1.4

Figure 1



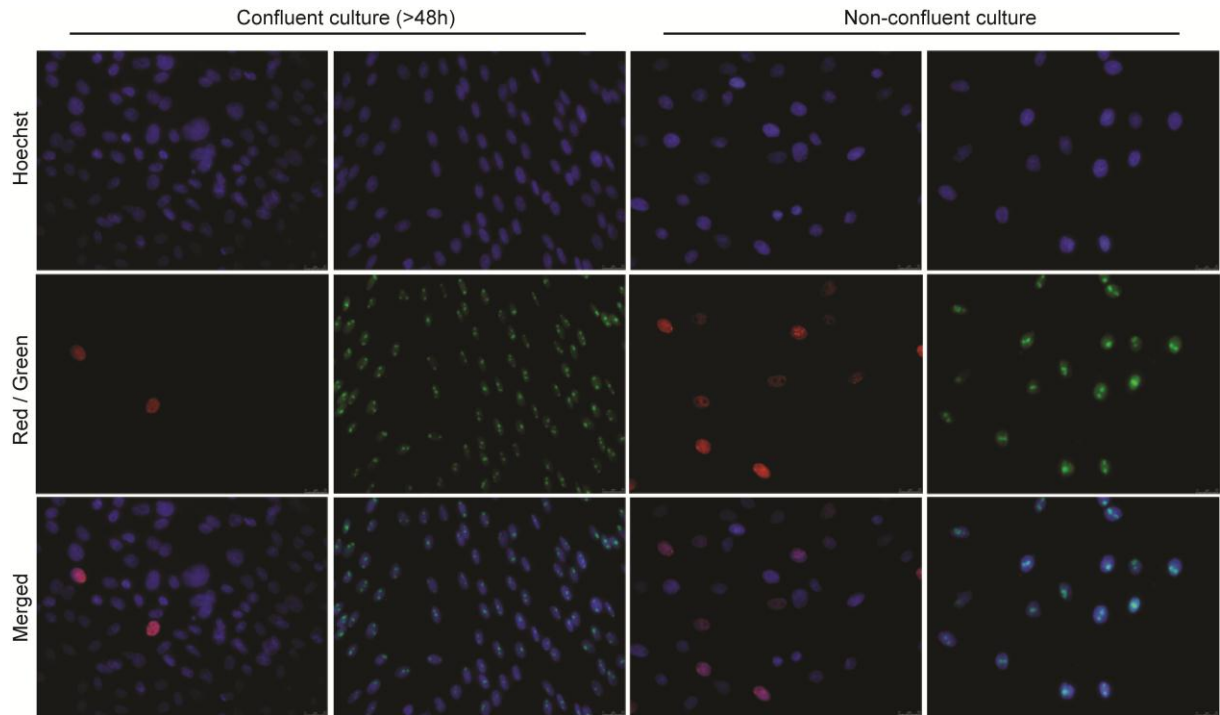
**Figure 2**

Figure 3

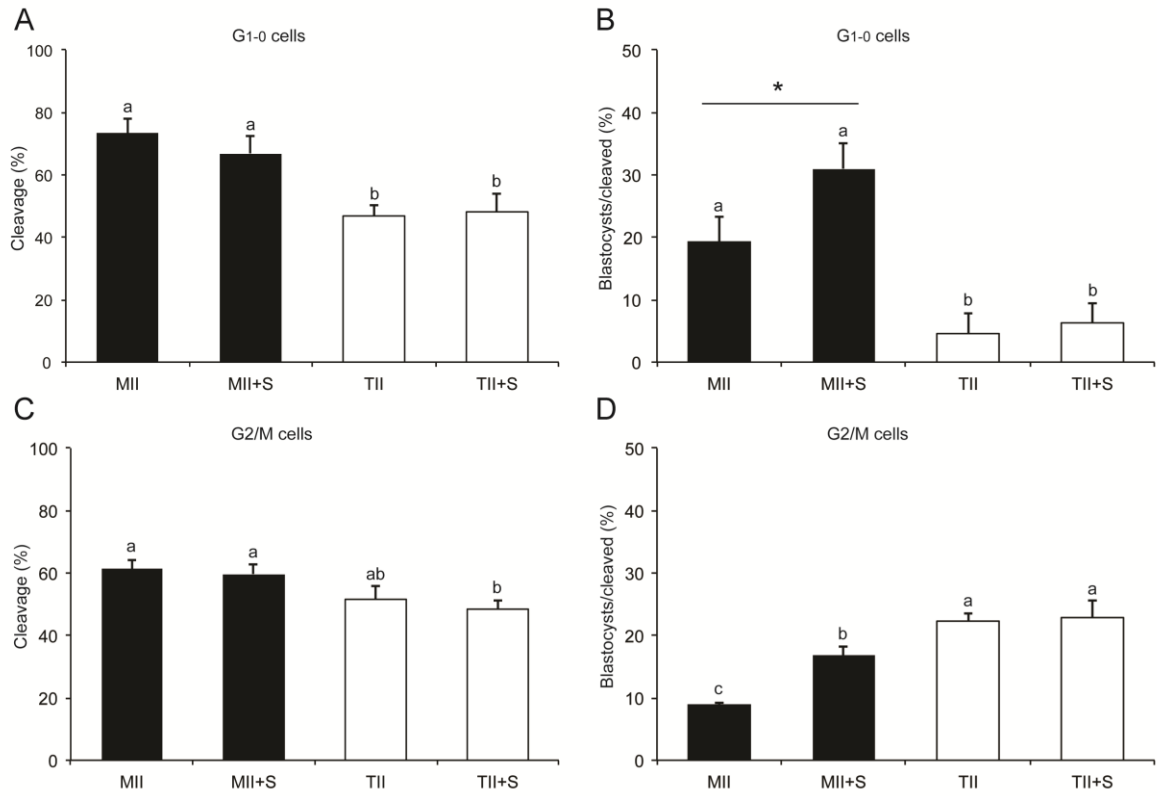
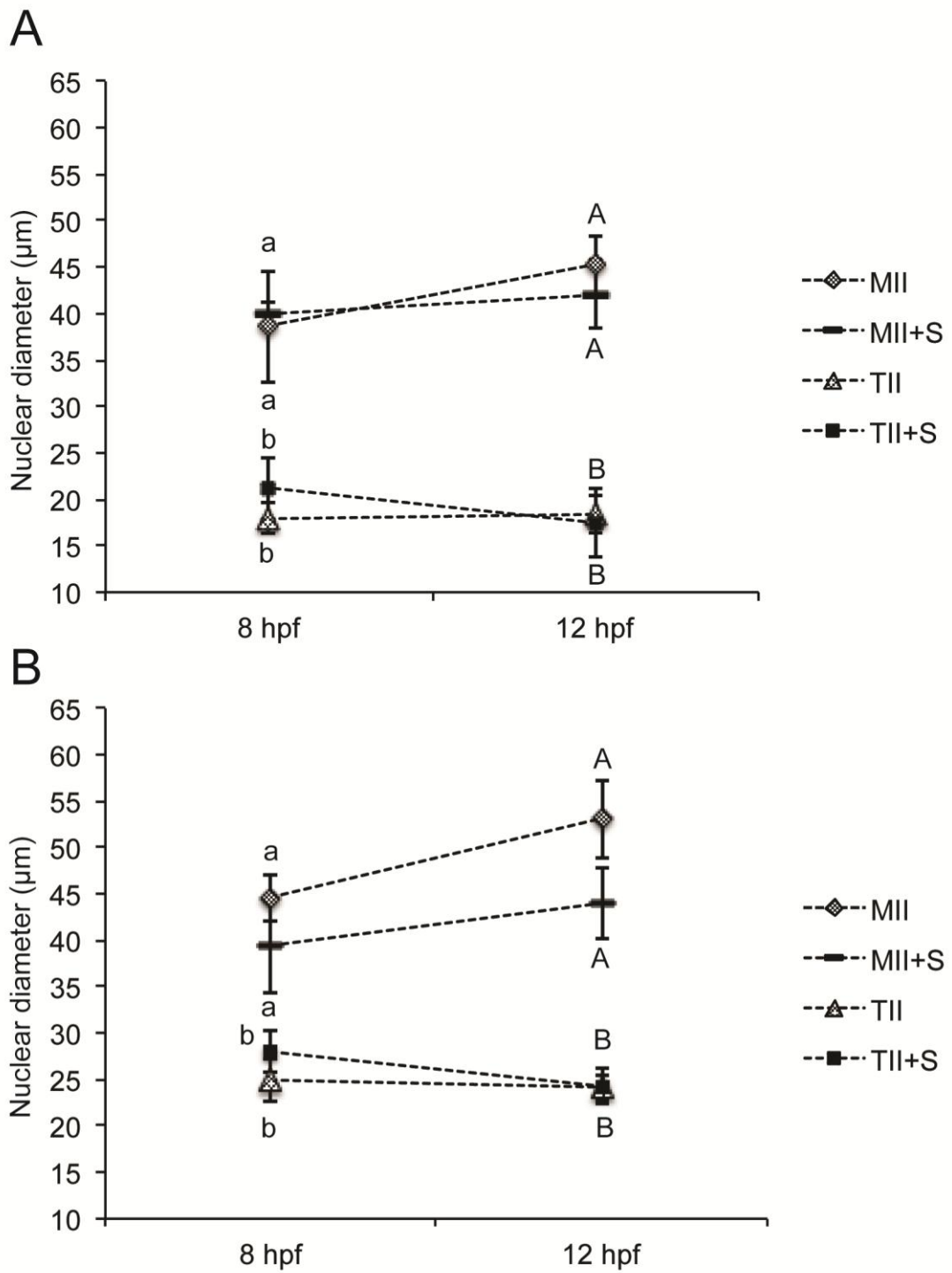
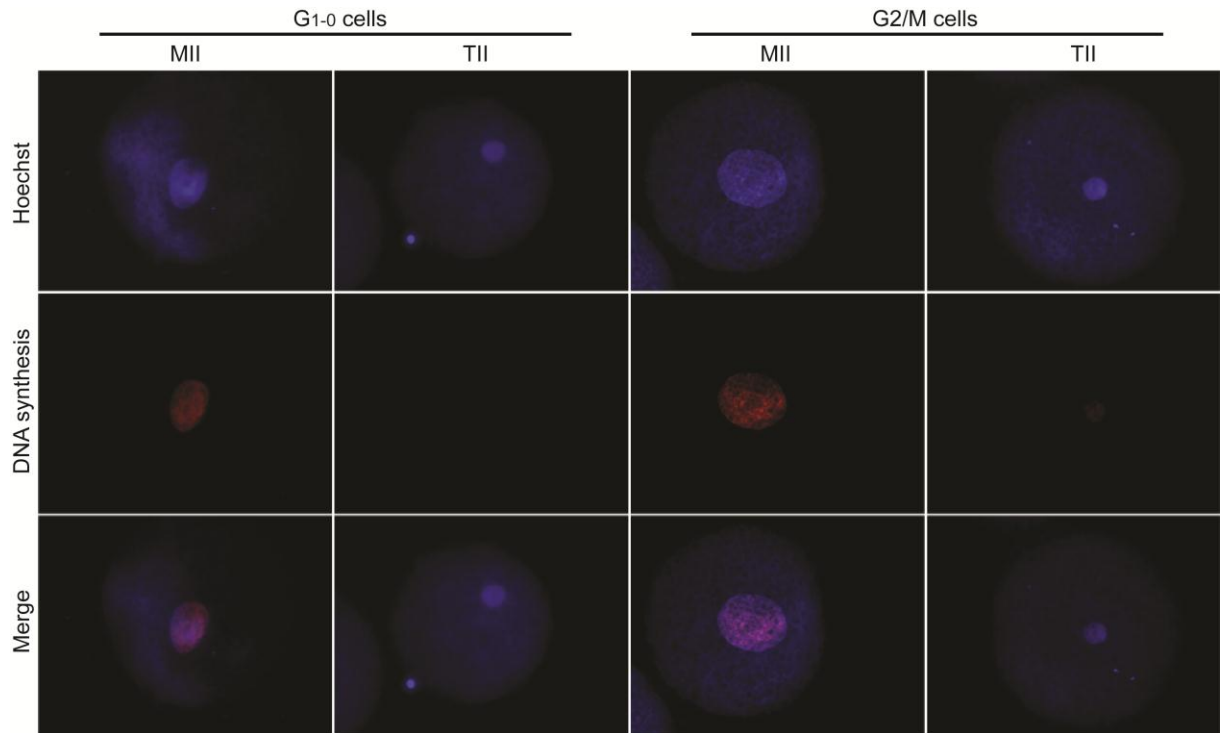
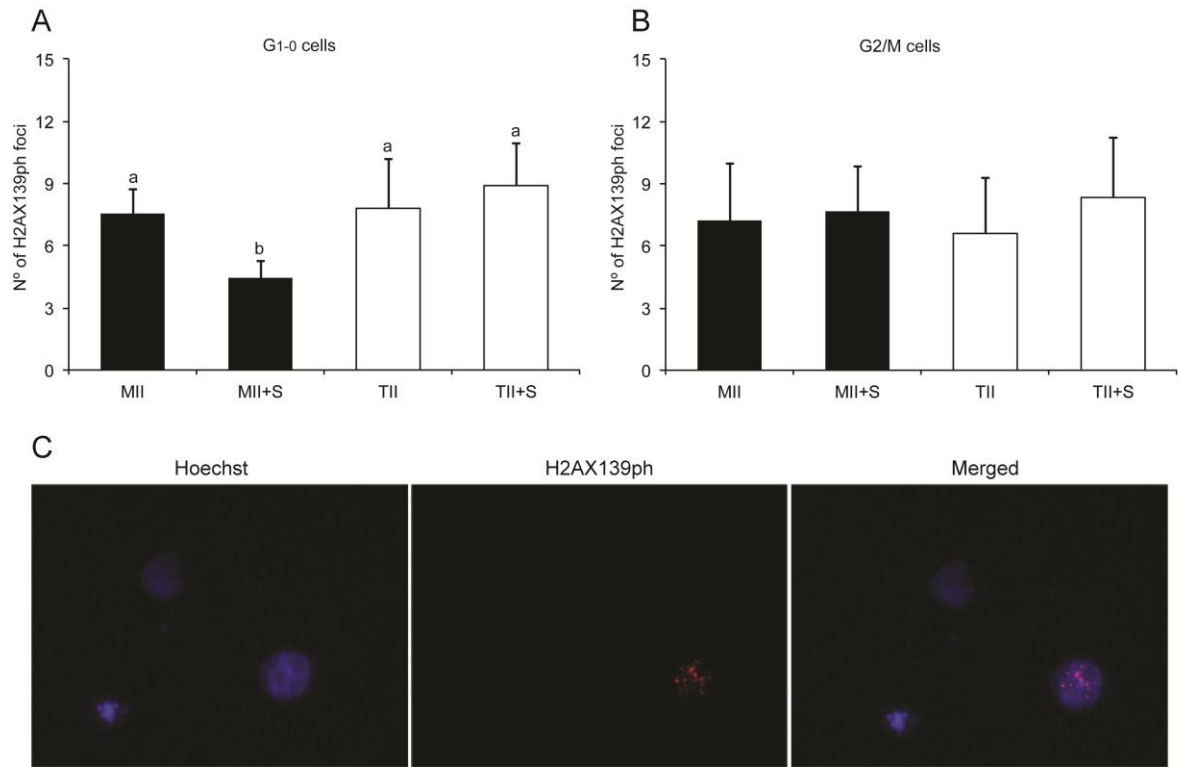




Figure 4



**Figure 5**

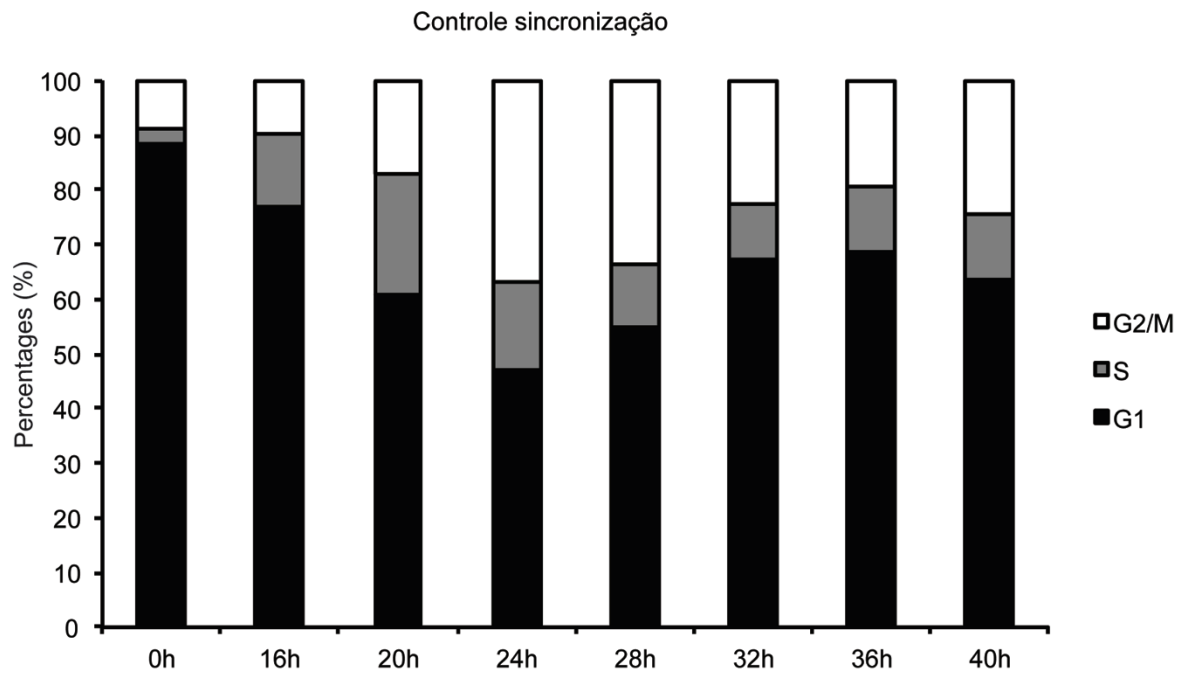
**Figure 6**

## 4 RESULTADOS COMPLEMENTARES

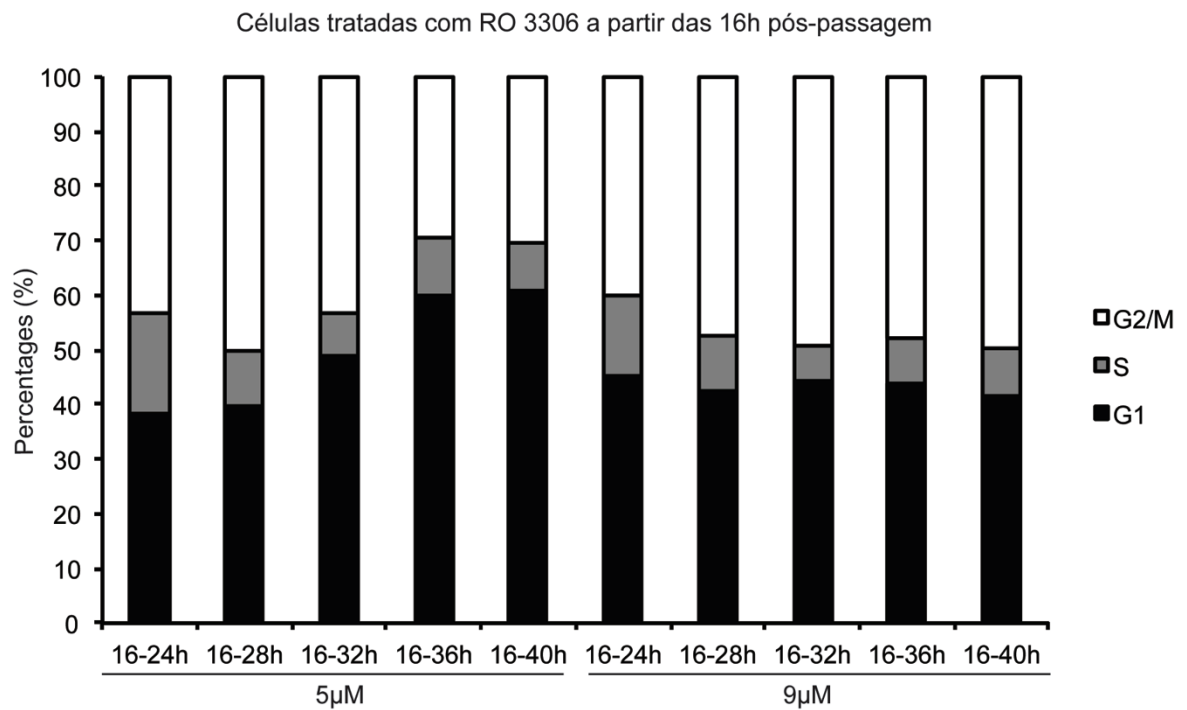
### 4.1 Sincronização do ciclo celular com RO3306

O objetivo deste experimento foi testar a eficiência de um inibidor de CDK1, RO3306, uma nova molécula utilizada para a sincronização do ciclo celular na fase  $G_2/M$  (Vassilev, 2006) para posterior utilização como doadoras de núcleo para SCNT. Para isso fibroblastos suínos foram cultivados até atingirem confluência por pelo menos 48 horas. A partir deste cultivo foram preparadas culturas não confluentes, as células foram fixadas em diferentes horários pós-passagem para análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Foi observado que entre 24h ( $G_2/M$  - 35,6%) e 28h ( $G_2/M$  - 32,4%) pós-passagem pelo menos 30% das células estavam na fase  $G_2/M$  do ciclo celular (Figura 1).

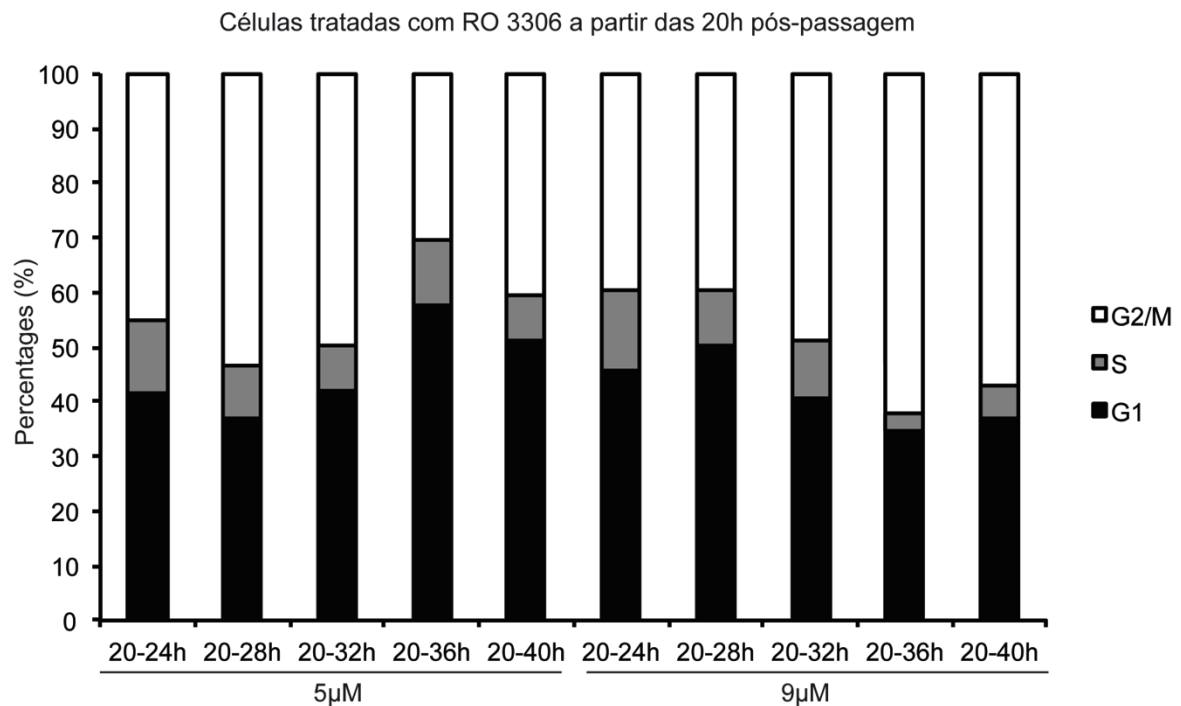
Baseados nestes resultados, foram testadas as doses de  $5\mu M$  e  $9\mu M$  de RO3306 iniciando o tratamento as 16h ou 20h pós-passagem e mantidas em cultivo até as 28, 32, 36 e 40h para análise do ciclo celular. No tratamento iniciado nas 16 horas, a dose de  $5\mu M$  utilizada das 16 as 32 horas ( $G_2/M$  - 41,9%) pós-passagem, proporcionou a maior porcentagem de células em  $G_2/M$  quando comparado ao grupo Controle ( $G_2/M$  - 22,2%) (Figura 2). Quando as células foram tratadas a partir das 20h pós-passagem (Figura 3), foi observado que a dose de  $9\mu M$  de RO3306 até 36h ( $G_2/M$  - 61,7%) ou 40h ( $G_2/M$  - 56,1%) horas proporcionou a maior porcentagem de células na fase  $G_2/M$ . Baseado nos dados de sincronização em  $G_2/M$  com RO3306, as células foram utilizadas com doadoras de núcleo entre 36 e 40h após o tratamento com  $9\mu M$  de RO3306 iniciando o tratamento a partir de 20 horas pós-passagem.



**Figura 7** - Ciclo celular em diferentes horários pós-passagem a partir de um cultivo mantido em confluência por 48 horas.



**Figura 8** - Células tratadas com 5µM ou 9µM de RO3306 por diferentes tempos iniciando 16 horas pós-passagem a partir de um cultivo mantido em confluência por 48 horas



**Figura 9** - Células tratadas com 5µM ou 9µM de RO3306 por diferentes tempos iniciando 20 horas pós-passagem a partir de um cultivo mantido em confluência por 48 horas

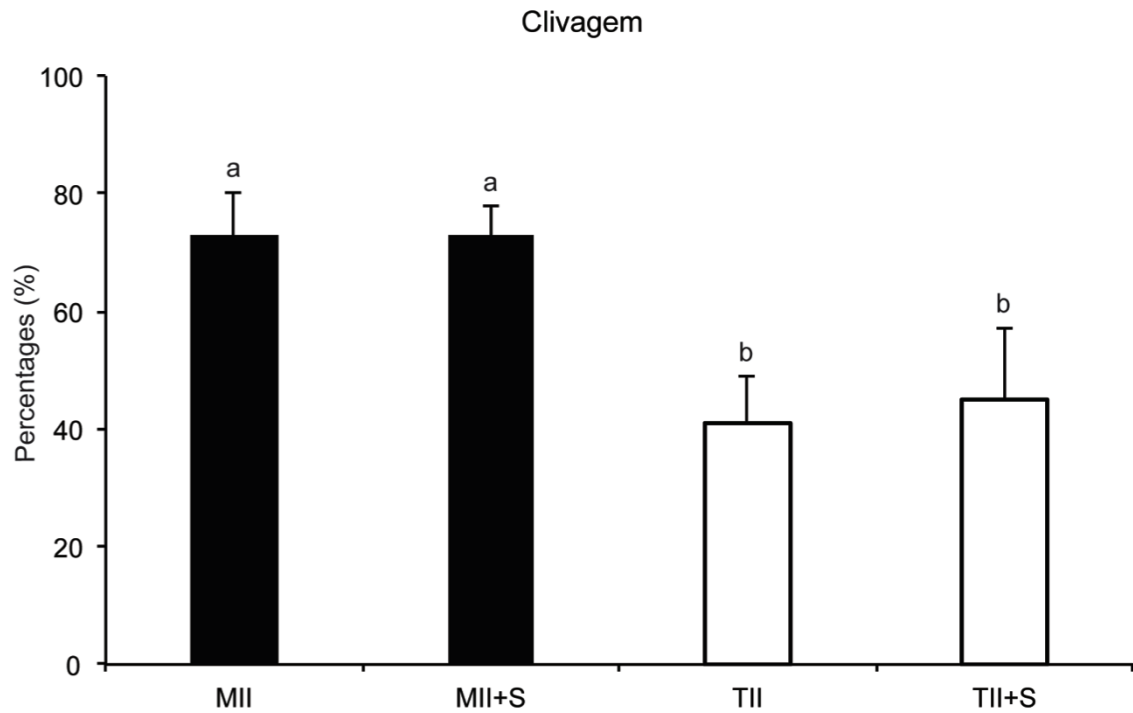
#### 4.2 Desenvolvimento embrionário utilizando células sincronizadas com RO3306

Embriões suínos foram reconstruídos como descrito anteriormente utilizando citoplastos em MII ou TII associado ou não ao uso de Scriptaid nas primeiras 15 de cultivo, utilizando células sincronizadas em G<sub>2</sub>/M.

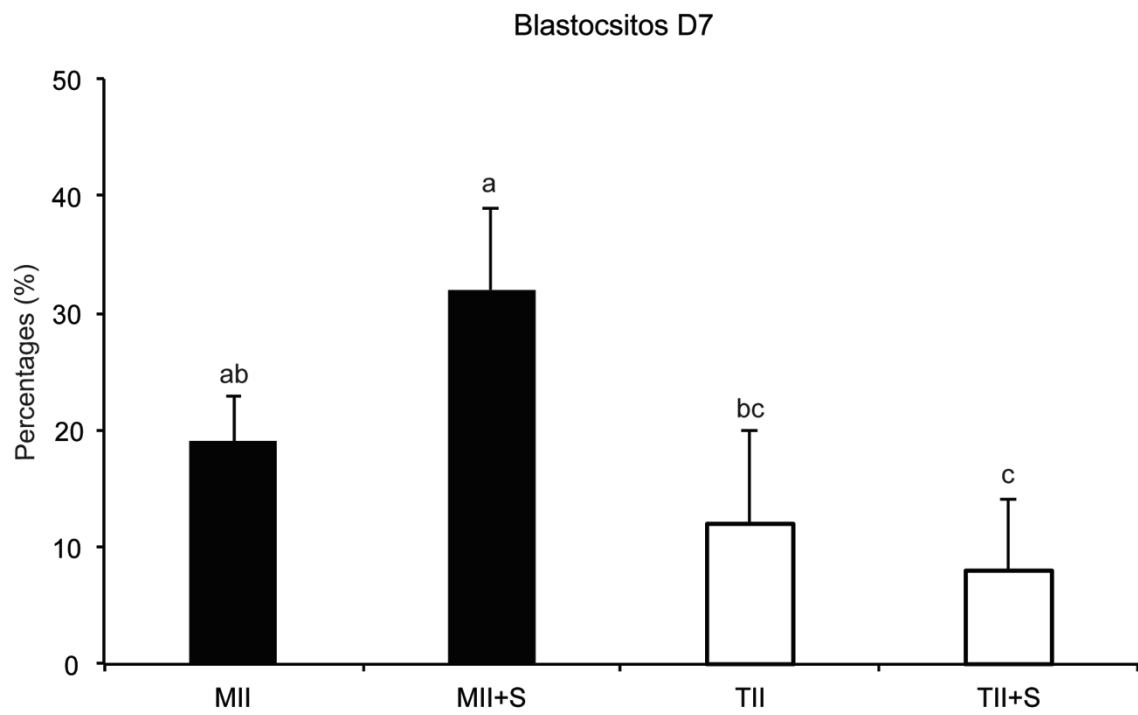
Os dados de clivagem (Figura 4) demonstram diferença significativa entre embriões reconstruídos com citoplastos em MII ou TII independentemente do tratamento com Scriptaid. As taxas de clivagem para os grupos MII, MII+S, TII e TII+S foram: 73%, 73%, 41% e 45%, respectivamente.

Nas taxas de blastocistos avaliados no D7 (Figura 5) foi observado diferença significativa entre os grupos MII+S (32,0%), TII (12,0%) e TII+S (8,0%). No entanto entre MII (19,0%) e TII (12,0%) não houve diferença significativa. Assim como entre grupos MII com ou sem tratamento com Scriptaid e entre TII e TII+S. Os resultados obtidos neste experimento sugerem uma interação diferente entre células em G<sub>2</sub>/M a citoplastos em MII, no entanto alguns aspectos relacionados ao inibidor RO3306 merecem ser melhor estudados.

A sincronização obtida com a utilização do RO3306 pela inibição de CDK1/ciclina B1 proporciona uma célula na transição G2 - Metáfase. Foi demonstrado que 30 minutos após a remoção do inibidor as células entram em mitose (Vassilev, 2006), este fato pode ter sido determinante nos resultados obtidos.



**Figura 10** - Taxa de clivagem avaliada as 48h pós-ativação em embriões reconstruídos com células sincronizadas em G<sub>2</sub>/M com RO3306.



**Figura 11** -Taxas de blastocistos avaliada no Dia 7 pós-ativação em embriões reconstruídos com células sincronizadas em G<sub>2</sub>/M com RO3306



## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que as interações de ciclo celular possuem um papel importante na reconstrução de embriões produzidos por transferência nuclear. Citoplastos em MII tendem a reprogramar melhor células na fase  $G_{0-1}$  do ciclo celular enquanto que citoplastos pré-ativados reprogramam melhor células na fase  $G_2/M$ . Embora os inibidores de deacetilase venham sendo bastante utilizados para melhorar a reprogramação epigenética em embriões clonados, foi demonstrado que seus efeitos são ciclo celular dependentes, ou seja, a interação de ciclo celular e célula doadora de núcleo deve ser considerada anteriormente a utilização de inibidores de deacetilase na técnica de clonagem.

## REFERÊNCIAS

- Akagi, S., *et al.* Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. **J Reprod Dev**, v.57, n.1, p.120-6. 2011.
- Bohrer, R. C., *et al.* Inhibition of histone deacetylases enhances DNA damage repair in SCNT embryos. **Cell Cycle**, v.13, n.13, p.2138-48. 2014.
- Boquest, A. C., *et al.* Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. **Biol Reprod**, v.60, n.4, p.1013-9. 1999.
- Bordignon, V. e L. C. Smith. Telophase enucleation: an improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v.49, n.1, p.29-36. 1998.
- Bordignon, V. e L. C. Smith. Telophase-stage host ooplasts support complete reprogramming of roscovitine-treated somatic cell nuclei in cattle. **Cloning Stem Cells**, v.8, n.4, p.305-17. 2006.
- Bui, H. T., *et al.* Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. **Biol Reprod**, v.83, n.3, p.454-63. 2010.
- Campbell, K. H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. **Cloning**, v.1, n.1, p.3-15. 1999a.
- Campbell, K. H. Nuclear transfer in farm animal species. **Semin Cell Dev Biol**, v.10, n.3, p.245-52. 1999b.
- Campbell, K. H. e R. Alberio. Reprogramming the genome: role of the cell cycle. **Reprod Suppl**, v.61, p.477-94. 2003.
- Campbell, K. H., *et al.* Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Rev Reprod**, v.1, n.1, p.40-6. 1996.
- Campbell, K. H., *et al.* Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. **Biol Reprod**, v.49, n.5, p.933-42. 1993.
- Cibelli, J. B., *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science**, v.280, n.5367, p.1256-8. 1998.
- Cloos, P. A., *et al.* Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. **Genes Dev**, v.22, n.9, p.1115-40. 2008.
- Collas, P., *et al.* Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. **Biol Reprod**, v.46, n.3, p.501-11. 1992.

Das, Z. C., *et al.* Increasing histone acetylation of cloned embryos, but not donor cells, by sodium butyrate improves their in vitro development in pigs. **Cell Reprogram**, v.12, n.1, p.95-104. 2010.

Dean, W., *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.24, p.13734-8. 2001.

Dinnyes, A., *et al.* Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. **Cloning Stem Cells**, v.4, n.1, p.81-90. 2002.

Enright, B. P., *et al.* Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biol Reprod**, v.69, n.3, p.896-901. 2003.

Fulka, J., Jr., *et al.* Nuclear transplantation in mammals: remodelling of transplanted nuclei under the influence of maturation promoting factor. **Bioessays**, v.18, n.10, p.835-40. 1996.

Hochedlinger, K. e K. Plath. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. **Development**, v.136, n.4, p.509-23. 2009.

Hyun, S., *et al.* Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. **Biol Reprod**, v.69, n.3, p.1060-8. 2003.

Kang, E., *et al.* Nuclear reprogramming by interphase cytoplasm of two-cell mouse embryos. **Nature**, v.509, n.7498, p.101-4. 2014.

Kang, Y. K., *et al.* Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nat Genet**, v.28, n.2, p.173-7. 2001.

Keefer, C. L., *et al.* Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. **Biol Reprod**, v.64, n.3, p.849-56. 2001.

Khosla, S., *et al.* Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biol Reprod**, v.64, n.3, p.918-26. 2001.

Kishigami, S., *et al.* Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. **J Reprod Dev**, v.53, n.1, p.165-70. 2007.

Korfiatis, N., *et al.* Cell synchronization for the purposes of nuclear transfer in the bovine. **Cloning Stem Cells**, v.3, n.3, p.125-38. 2001.

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v.128, n.4, p.693-705. 2007.

Kretsovali, A., *et al.* Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming. **Stem Cells Int**, v.2012, p.184154. 2012.

Kubota, C., *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.3, p.990-5. 2000.

Lai, L. e R. S. Prather. Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. **Reprod Biol Endocrinol**, v.1, p.82. 2003.

Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nat Rev Genet**, v.3, n.9, p.662-73. 2002.

Liu, L. e X. Yang. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.61, n.1, p.1-7. 1999.

Machaty, Z., *et al.* The use of nuclear transfer to produce transgenic pigs. **Cloning Stem Cells**, v.4, n.1, p.21-7. 2002.

Maller, J. L. Mitotic control. **Curr Opin Cell Biol**, v.3, n.2, p.269-75. 1991.

Mayer, W., *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v.403, n.6769, p.501-2. 2000.

Meissner, A. e R. Jaenisch. Mammalian nuclear transfer. **Dev Dyn**, v.235, n.9, p.2460-9. 2006.

Miyamoto, K., *et al.* Effects of synchronization of donor cell cycle on embryonic development and DNA synthesis in porcine nuclear transfer embryos. **J Reprod Dev**, v.53, n.2, p.237-46. 2007.

Miyoshi, K., *et al.* Valproic acid enhances in vitro development and Oct-3/4 expression of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. **Cell Reprogram**, v.12, n.1, p.67-74. 2010.

Monneret, C. Histone deacetylase inhibitors. **Eur J Med Chem**, v.40, n.1, p.1-13. 2005.

Morgan, H. D., *et al.* Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet**, v.14 Spec No 1, p.R47-58. 2005.

Niemann, H., *et al.* Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v.135, n.2, p.151-63. 2008.

Nurse, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v.344, n.6266, p.503-8. 1990.

Oback, B. e D. Wells. Practical aspects of donor cell selection for nuclear cloning. **Cloning Stem Cells**, v.4, n.2, p.169-74. 2002.

Oliveira, C. S., *et al.* Effects of histone hyperacetylation on the preimplantation development of male and female bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, v.22, n.6, p.1041-8. 2010.

- Pincus, G. e E. V. Enzmann. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. **J Exp Med**, v.62, n.5, p.665-75. 1935.
- Polejaeva, I. A., *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature**, v.407, n.6800, p.86-90. 2000.
- Reik, W., *et al.* Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v.293, n.5532, p.1089-93. 2001.
- Rideout, W. M., 3rd, *et al.* Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science**, v.293, n.5532, p.1093-8. 2001.
- Rybouchkin, A., *et al.* Role of histone acetylation in reprogramming of somatic nuclei following nuclear transfer. **Biol Reprod**, v.74, n.6, p.1083-9. 2006.
- Santos, F. e W. Dean. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v.127, n.6, p.643-51. 2004.
- Santos, F., *et al.* Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. **Dev Biol**, v.241, n.1, p.172-82. 2002.
- Santos, F., *et al.* Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Curr Biol**, v.13, n.13, p.1116-21. 2003.
- Schneider, R., *et al.* Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. **Nat Cell Biol**, v.6, n.1, p.73-7. 2004.
- Shi, L. e J. Wu. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. **Reprod Biol Endocrinol**, v.7, p.59. 2009.
- Shi, W., *et al.* Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer. **Differentiation**, v.71, n.2, p.91-113. 2003.
- Sims, R. J., 3rd, *et al.* Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. **Trends Genet**, v.19, n.11, p.629-39. 2003.
- Smith, L. C., *et al.* Benefits and problems with cloning animals. **Can Vet J**, v.41, n.12, p.919-24. 2000.
- Su, G. H., *et al.* A novel histone deacetylase inhibitor identified by high-throughput transcriptional screening of a compound library. **Cancer Res**, v.60, n.12, p.3137-42. 2000.
- Surani, M. A., *et al.* Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature**, v.308, n.5959, p.548-50. 1984.
- Vajta, G., *et al.* Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. **Reprod Fertil Dev**, v.19, n.2, p.403-23. 2007.

- Van Thuan, N., *et al.* The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. **Reproduction**, v.138, n.2, p.309-17. 2009.
- Vassilev, L. T. Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. **Cell Cycle**, v.5, n.22, p.2555-6. 2006.
- Wakayama, T., *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v.394, n.6691, p.369-74. 1998.
- Wang, L. J., *et al.* Scriptaid improves in vitro development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. **Cell Reprogram**, v.13, n.5, p.431-9. 2011.
- Wen, B. Q., *et al.* The histone deacetylase inhibitor Scriptaid improves in vitro developmental competence of ovine somatic cell nuclear transferred embryos. **Theriogenology**, v.81, n.2, p.332-9. 2014.
- Wilmut, I., *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, n.6619, p.810-3. 1997.
- Wolf, E., *et al.* Genetically engineered pig models for diabetes research. **Transgenic Res**, v.23, n.1, p.27-38. 2014.
- Wu, B., *et al.* Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.56, n.1, p.253-9. 1997.
- Wu, X., *et al.* Trichostatin A improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development. **Anim Biotechnol**, v.19, n.4, p.211-24. 2008.
- Xu, W., *et al.* Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. **PLoS One**, v.8, n.5, p.e64705. 2013.
- Yang, X., *et al.* Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nat Genet**, v.39, n.3, p.295-302. 2007.
- Yang, X. J. e E. Seto. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.3, p.206-18. 2008.
- Zhao, J., *et al.* Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. **Cell Reprogram**, v.12, n.1, p.75-83. 2010a.
- Zhao, J., *et al.* Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod**, v.81, n.3, p.525-30. 2009.
- Zhao, J., *et al.* Effect of epigenetic regulation during swine embryogenesis and on cloning by nuclear transfer. **Cell Tissue Res**, v.341, n.1, p.13-21. 2010b.

Zhou, Y., *et al.* Scriptaid affects histone acetylation and the expression of development-related genes at different stages of porcine somatic cell nuclear transfer embryo during early development. **Chinese Science Bulletin**, v.58, n.17, p.2044-2052. 2013.