



Uso da clonagem por transferência nuclear na conservação e multiplicação de mamíferos silvestres

Use of cloning by nuclear transfer in the conservation and multiplication of wild mammals

Alexsandra Fernandes Pereira[‡], Alana Azevedo Borges, Maria Valéria de Oliveira Santos, Gabriela Pereira de Oliveira Lira

Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

Resumo

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) desempenha um importante papel na conservação e na multiplicação de mamíferos silvestres, especialmente quando associada à TNCS interespecífica. Contudo, a clonagem ainda possui uma baixa eficiência, sendo necessária uma extensa busca por elucidações mais precisas das metodologias empregadas em suas etapas de preparo do carioplastos (células doadoras de núcleo), obtenção dos citoplastos (oócitos receptores), e reconstrução embrionária. Assim, o objetivo desta revisão é abordar os aspectos relevantes das etapas da clonagem aplicadas a mamíferos silvestres, descrevendo seus resultados promissores e avanços alcançados.

Palavras-chave: carioplasto, citoplasto, transferência nuclear interespecie, reconstrução embrionária.

Abstract

Cloning by somatic cell nuclear transfer (SCNT) plays an important role in the conservation and multiplication of wild mammals, especially when associated with interspecific SCNT. Nevertheless, cloning still has a low efficiency, requiring an extensive search for more precise elucidations of the methodologies used in its stages of preparation of the karyoplasts (nucleus donor cells), production of cytoplasts (receptor oocytes), and embryonic reconstruction. Thus, the purpose of this review is to address the relevant aspects of the cloning steps applied to wild mammals, describing their promising results and advances.

Keywords: karyoplast, cytoplast, interspecies nuclear transfer, embryonic reconstruction.

Introdução

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) tem sido inserida como uma estratégia alternativa de conservação e multiplicação de mamíferos silvestres. Assim, por essa tecnologia, é possível o resgate de indivíduos de populações em risco de extinção (Wani et al., 2017), bem como a “ressuscitação” de animais já extintos (Folch et al., 2009). Embora a clonagem não seja a estratégia de primeira escolha para a conservação, a mesma, quando aplicada, representa uma alternativa interessante para a manutenção e multiplicação de indivíduos ameaçados ou não à extinção, além de garantir a diversidade genética pela conservação e multiplicação de material genético de diferentes populações.

A maioria dos trabalhos que realizam a TNCS em mamíferos silvestres emprega a técnica interespecífica (iTNCs), uma vez que a colheita de oócitos em fêmeas silvestres é algumas vezes dificultosa (Borges e Pereira, 2019). Em geral, nessa técnica, embriões são produzidos empregando células doadoras de núcleo (carioplastos) e oócitos receptores (citoplastos) de espécies distintas, ou seja, um indivíduo silvestre e um doméstico, respectivamente. Assim, a iTNCs já teve seu sucesso evidenciado em mamíferos silvestres de diferentes grupos, como felídeos (Gómez et al., 2004), canídeos (Kim et al., 2007), bubalinos (Srirattana et al., 2012) e camelídeos (Wani et al., 2017).

Contudo, apesar de importantes estudos serem constantemente desenvolvidos, a eficiência global da clonagem ainda é relativamente reduzida, sendo necessário o aprimoramento de suas diferentes etapas nas espécies de interesse. Assim, sabendo da influência crucial do preparo dos carioplastos, obtenção de citoplastos e fatores relacionados à reconstrução embrionária, nesta revisão, abordaremos os aspectos relevantes dessas etapas em mamíferos silvestres, apresentando alguns resultados alcançados pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA, campus Mossoró).

Da célula somática ao carioplasto apto para a clonagem

A preparação de carioplastos para a sua reprogramação envolve as etapas de isolamento, caracterização, criopreservação e sincronização do ciclo de células somáticas. Durante essas etapas, todos os procedimentos devem ser realizados com a eficiência necessária que garantam a qualidade dos carioplastos, sendo esse um aspecto

[‡]Correspondência: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br

Recebido: 19 de março de 2019

Aceito: 29 de março de 2019



relevante para o sucesso da clonagem. Além das condições de estabelecimento das células doadoras de núcleo, alguns fatores como a origem e o tipo celular podem afetar na qualidade desses carioplastos (Liu et al., 2018).

Em geral, a origem do carioplasto representa o fator de maior importância biológica, uma vez que essa célula pode carregar erros genéticos e epigenéticos em seu genoma, bem como ser responsável por uma reprogramação genética ou epigenética incompleta durante o desenvolvimento embrionário (Zhai et al., 2018). Embora células de diferentes tecidos e de animais com distintas idades, vivos ou *post-mortem*, sejam relatadas como doadoras de núcleo, os fibroblastos oriundos da pele têm sido o tipo celular mais utilizado (Borges et al., 2018a). Isso se deve a uma maior facilidade de manipulação, estabilidade, homogeneidade e alta capacidade mitótica dessas células durante o cultivo, bem como boa resistência à criopreservação (Praxedes et al., 2018).

Nesse sentido, um dos primeiros passos é o estabelecimento das condições de cultivo celular para conhecer as características e exigências nutricionais das células e da criopreservação celular. Em catetos (*Pecari tajacu*), mamíferos silvestres do bioma Caatinga e animal de estudo de nosso laboratório, nós estabelecemos 10–20% de soro fetal bovino (SFB) como suplementação eficiente para a proliferação de células somáticas derivadas da pele desses animais (Santos et al., 2016). Além disso, para essa espécie, desenvolvemos protocolos eficientes de criopreservação de tecidos somáticos (Borges et al., 2018a) e células somáticas (Lira et al., 2017), em que evidenciamos o efeito positivo do crioprotetor extracelular (sacarose) na solução de criopreservação.

Finalmente, para que as células somáticas sejam empregadas como carioplastos, as mesmas devem ser sincronizadas em G0/G1 de seu ciclo celular. Uma série de tratamentos para sincronização celular, como a privação do SFB e inibição por contato, tem sido empregada em diferentes espécies silvestres (Tab. 1).

Do oócito imaturo ao citoplasto apto para a clonagem

O oócito consiste na célula de um organismo capaz de reprogramar o núcleo de uma célula somática para permitir o desenvolvimento de um indivíduo completo e viável. Portanto, a obtenção adequada do oócito para torná-lo um citoplasto representa uma etapa fundamental para a clonagem. Em geral, a obtenção de citoplastos envolve as os estágios de maturação, enucleação e ativação oocitária artificial.

Assim, um desafio rotineiro da clonagem em mamíferos silvestres consiste na disponibilidade de oócitos, especialmente quando se trata de indivíduos ameaçados de extinção. Muitas vezes o número de fêmeas disponíveis é limitado, resultando assim no uso de oócitos de espécies domésticas filogeneticamente próximas (Wani et al., 2017). Além disso, a maturação *in vitro* oocitária é predominantemente realizada, quando comparada à maturação *in vivo*, sendo assim as condições de cultivo constantemente aperfeiçoadas, visando à obtenção de estruturas mais competentes para sustentar a reprogramação nuclear e o desenvolvimento embrionário (Bordignon, 2017).

Em nossa experiência com catetos, constatamos que oócitos desta espécie necessitam de um tempo de maturação de 48 horas para que as estruturas alcancem seu desenvolvimento meiótico; promovendo maiores taxas de expansão das células *cumulus* (100% vs. 38,1%), de presença de primeiro corpúsculo polar (90,5% vs. 52,4%) e de estruturas em metáfase II (76,2% vs. 19,0%), quando comparado às estruturas maturadas por 24 h (Borges et al., 2018b). Além disso, demonstramos que a nível meiótico a presença do fator de crescimento epidermal (EGF, 10 ng/mL) durante a maturação de oócitos de catetos não melhorou as taxas de maturação *in vitro* (Borges et al., 2019).

Outro aspecto importante da preparação do citoplasto é a micromanipulação do oócito para a enucleação. Embora existam alguns protocolos para remover o material genético oocitário, o mais empregado em mamíferos silvestres é o método convencional pelo uso de micromanipuladores (Wani et al., 2017). Adicionalmente, para que oócito seja apto para a clonagem o mesmo deve ser estimulado/ativado para iniciar o desenvolvimento embrionário após a transferência de citoplasto e a fusão dos complexos citoplasto-carioplasto. Assim, falhas na ativação artificial oocitária podem comprometer a integridade da cromatina, interações núcleo-citoplasmáticas e parada do desenvolvimento embrionário (Bordignon, 2017).

Em geral, os protocolos empregados nesta etapa são baseados na ativação do oócito pelo espermatozoide e envolvem o uso de agentes que promovem o aumento de cálcio intracelular e inibição do fator promotor da maturação. Assim, distintas combinações de agentes físicos e químicos já foram empregadas para atender as necessidades de cada espécie em mamíferos silvestres (Tab. 1). Em catetos, testamos diferentes protocolos de ativação artificial usando a ionomicina (5,0 μ M, 4 min) como mobilizador de cálcio em associação com diferentes ativadores secundários: 6-dimetilaminopurina (6-DMAP, 1,9 mM, 3 h) e ciclohexamida (CHX, 10 μ g/mL, 3 h) (Borges et al., 2018).



Tabela 1. Protocolos de sincronização da carioplastos e ativação do complexo citoplasto-carioplasto na clonagem de mamíferos silvestres.

Origem da célula doadora	Classificação da IUCN*	Origem do oócito receptor	Protocolo de sincronização	Protocolo de ativação	Resultados	Referência
<i>Acinonyx jubatus</i> (Guepardo)	Vulnerável	<i>Felis catus</i> (Gata)	Privação de SFB (0,5%)	10 μ M cálcio ionóforo por 5 min e 1,9 mM de 6-DMAP por 4 h	5,9% de mórulas	Moulavi et al. (2017)
<i>Bos gaurus</i> (Bisão indiano)	Vulnerável	<i>Bos taurus</i> (Vaca)	NI	7% etanol por 5 min e 1,25 μ g/mL CD e 10 μ g/mL de CHX por 5 h	1 nascimento	Srirattana et al. (2012)
<i>Bos javanicus</i> (Bantengue)	Ameaçado	<i>Bos taurus</i> (Vaca)	Privação de SFB (0,5%)	5 μ M ionomicina por 4 min e 10 μ g/mL CHX e 6 μ g/mL CD por 2 h	17% de prenhez	Sansinena et al. (2005)
<i>Bubalus arnee</i> (Búfalo asiático)	Ameaçado	<i>Bubalus bubalis</i> (Búfalo doméstico)	Inibição por contato	5 μ M de cálcio ionóforo (A23187) por 5 min e 2 mM de 6-DMAP por 4 h	38,7% de blastocistos	Priya et al. (2014)
<i>Camelus bactrianus</i> (Camelo-bactriano)	Criticamente ameaçado	<i>Camelus dromedarius</i> (Dromedário)	Privação de SFB (0,5%)	5 μ M de ionomicina por 3 min e 2 mM de 6-DMAP por 4 h	1 nascimento	Wani et al. (2017)
<i>Canis lupus</i> (Lobo)	Menos preocupante	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cadela)	Inibição por contato	10 μ M cálcio ionóforo por 4 min e 1,9 mM de 6-DMAP por 4 h	2 nascimentos	Kim et al. (2007)
<i>Capra pyrenaica pyrenaica</i> (Íbex-dos-Pireneus)	Ausente	<i>Capra hircus</i> (Cabra)	Inibição por contato	5 μ M ionomicina por 5 min e 2 mM 6-DMAP e 5 μ g mL ⁻¹ de CB por 4 h	1 nascimento	Folch et al. (2009)
<i>Felis silvestris lybica</i> (Gato-da-Líbia)	Menos preocupante	<i>Felis catus</i> (Gata)	Privação de SFB (0,5%)	2 pulsos de corrente direta (60 μ sec; 120 V/mm) e 10 μ g/mL CHX e 5 μ g/mL de CB por 4 h	17 crias	Gómez et al. (2004)
<i>Macaca fascicularis</i> (Macaco-cinomolgo)	Menos preocupante	<i>Macaca fascicularis</i> (Macaco-cinomolgo)	Inibição por contato	5 μ M ionomicina por 5 min e 2 mM 6-DMAP por 5 h	4 nascimentos	Liu et al. (2018)
<i>Ovis orientalis musimon</i> (Muflão)	Vulnerável	<i>Ovis aries</i> (Ovino)	NI	5 μ M ionomicina por 5 min e 10 μ g/mL CHX e 7,5 μ g/mL CB por 5 h	1 nascimento	Loi et al. (2001)

*IUCN, 2019. 6-DMAP: 6-dimetilaminopurina; CHX: ciclohexamida; CB: citocalasina B; CD: citochalasin D. NI: não informado.



Do complexo carioplasto-citoplasto ao embrião reconstruído

Quanto à etapa de reconstrução embrionária, a mesma tem sido realizada de forma convencional pelo uso de micromanipuladores, como observado na clonagem do camelo-bactriano (*Camelus bactrianus*, Wani et al., 2017) ou manual sem o uso de micromanipuladores, como verificado na clonagem do búfalo selvagem (*Bubalus arnee*, Priya et al., 2014). Em geral, o desenvolvimento bem-sucedido de embriões clones depende de uma complexa interação entre o carioplasto e o citoplasto que pode ser comprometida por divergência genética, sendo a reprogramação celular um ponto chave, uma vez que promove a eliminação das restrições epigenéticas da célula somática (Kumar et al., 2017). Contudo, a produção de um embrião viável ainda é um fenômeno complexo após a sua reconstrução (Gambini et al., 2016).

Nesse contexto, para promover um maior sucesso na remodelação e reprogramação até o estágio embrionário, a preparação anterior de células sincronizadas em G0/G1 e oócitos em metáfase II com altas concentrações do fator promotor da maturação são etapas cruciais (Kumar et al., 2017). Assim, durante a reprogramação ocorre a transmissão de informações genéticas das células doadoras para o oócito enucleado, sendo um ponto fundamental a habilidade do citoplasto em eliminar os marcadores epigenéticos e reestruturar o material genético ao estado de totipotência embrionária. Adicionalmente, o momento exato da ativação e/ou inativação do gene relacionado à remodelação embrionária é de extrema importância para garantir o desenvolvimento ideal, pois o atraso ou a falta da expressão de um determinado gene pode causar a morte do embrião (Kumar et al., 2017).

Entre os exemplos dessa reprogramação bem-sucedida, tem-se a reconstrução embrionária a partir de oócitos de gatas domésticas em células somáticas do guepardo asiático (*Acinonyx jubatus venaticus*), a qual resultou na produção de mórulas (Moulavi et al., 2017). Além disso, Priya et al. (2014) avaliaram a relação de alguns genes que são expressos durante o desenvolvimento embrionário de clones intraespecíficos de búfalos domésticos em relação ao que foi expresso em embriões clones interespecíficos de búfalos selvagens e observaram um padrão de expressão similar.

Do embrião reconstruído às estratégias de conservação e multiplicação

Apesar de ainda observarmos resultados limitados na produção de clones visando à conservação e multiplicação de mamíferos silvestres, estudos têm sido constantemente desenvolvidos, visando aumentar e solucionar os entraves verificados nas taxas e na qualidade embrionária, além da obtenção das crias nascidas. Assim, a clonagem vem sendo aperfeiçoada nos pontos críticos já citados anteriormente e trazendo resultados interessantes em diferentes espécies.

Nessa perspectiva, alguns exemplos podem aqui ser citados. Quanto ao entendimento na compreensão nos eventos de reprogramação, em panda (*Ailurus fulgens*), uma taxa de blastocistos de 22,6% foi derivada da reconstrução embrionária usando um carioplasto desta espécie com o citoplasto de coelhas (Tao et al., 2009). Ainda, em baleia-boreal (*Balaenoptera borealis*), oócitos bovinos suportaram o desenvolvimento de carioplastos até o estágio embrionário (Bhuiyan et al., 2010). Quanto ao nascimento de crias nascidas, exemplos interessantes foram observados em argali (*Ovis ammon*), o qual foi clonado usando oócitos de ovinos domésticos (Pan et al., 2014). Ainda, em 2017, Wani et al. obtiveram uma cria do camelo-bactriano, usando oócitos de dromedários.

Além da obtenção de embriões e crias nascidas, a clonagem também visa a obtenção de células-tronco e a compreensão dos eventos relacionados à indução de células induzidas à pluripotência (iPS). Assim, dentro dessa finalidade, iPS já foram produzidas em tigre-de-bengala asiático (*Panthera tigris*), serval africano (*Leptailurus serval*) e onça-pintada (*Panthera onca*), sendo observado o NANOG um fator essencial no processo de reprogramação e produção de iPS nesses felídeos (Verma et al., 2013). Além disso, Wang et al. (2016) investigaram o NANOG como um marcador para identificação de células-tronco de cervo manchado (*Cervus nippon*) e em sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) foi possível observar o desenvolvimento de um protocolo não viral eficiente para a reprogramação de fibroblastos em iPS (Debowski et al., 2015). Em todos esses estudos, as iPS permitem o surgimento de oportunidades para a conservação de mamíferos por diferentes perspectivas, como produção de gametas, transferência nuclear e complementação de embriões (Verma et al., 2013).

Considerações finais

O sucesso da clonagem por TNCS foi observado em vários mamíferos silvestres, sendo a clonagem interespecífica a mais empregada. Contudo, sabe-se que todas as etapas realizadas até a produção de embriões e nascimento de crias clones apresentam fatores limitantes para o sucesso da técnica e que, portanto, devem ser avaliados e estabelecidos. Nesse contexto, a busca por protocolos eficientes, o uso de células de fácil manipulação e em grandes quantidades, associadas à oócitos de qualidade, são fatores necessários para a adequada reprogramação. Por esta razão, nossa equipe tem buscado nas espécies de estudo aperfeiçoar etapas iniciais da clonagem visando maior sucesso da sua aplicação posterior. Finalmente, pesquisas necessitam ser continuamente realizadas para que seja possível um maior leque de possibilidades na conservação de mamíferos silvestres.



Referências

- Bhuiyan MMU, Suzuki Y, Watanabe H, Lee E, Hirayama H, Matsuoka K, Fukui Y.** Production of sei whale (*Balaenoptera borealis*) cloned embryos by inter-and intra-species somatic cell nuclear transfer. *J Reprod Health Med*, v.56, p.131-139, 2010.
- Bordignon V.** Animal cloning- state of the art and applications. In: Reference Module in Life Sciences. Amsterdam: Elsevier, 2017, p.1-17.
- Borges AA, Lira GPO, Nascimento LE, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Influence of cryopreservation solution on the *in vitro* culture of skin tissues derived from collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Biopreserv Biobank*, v.16, p.77-81, 2018a.
- Borges AA, Santos MVO, Queiroz Neta LB, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** *In vitro* maturation of collared peccary (*Pecari tajacu*) oocytes after different incubation times. *Pesq Vet Bras*, v.38, p.1863-1868, 2018b.
- Borges AA, Pereira AF.** Potential role of intraspecific and interspecific cloning in the conservation of wild mammals. *Zygote*, no prelo, 2019.
- Borges AA, Santos MVO, Lira GPO, Nascimento LE, Praxedes EA, Silva AR, Oliveira MF, Pereira AF.** Evaluation of epidermal growth factor on *in vitro* maturation of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) oocytes. *Anim Reprod*, v.16, p.235, 2019.
- Borges AA, Santos MVO, Nascimento LE, Lira GPO, Praxedes EA, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** *In vitro* production of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus 1758) embryos using different chemical activators. In: Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal, 9, 2017, Belém. Anais do IX Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal, no prelo, 2018.
- Debowski K, Warthemann R, Lentjes J, Salinas-Riester G, Dressel R, Langenstroth D, Behr R.** Non-viral generation of marmoset monkey iPS cells by a six-factor-in-one-vector approach. *PLoS one*, v.10, p.e0118424, 2015.
- Folch J, Cocero MJ, Chesné P, Alabart JL, Domínguez V, Cognié Y, Vignon X.** First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, v.71, p. 1026-1034, 2009.
- Gambini A, De Stéfano A, Jarazo J, Buemo C, Karlanian F, Salamone DF.** Embryo aggregation does not improve the development of interspecies somatic cell nuclear transfer embryos in the horse. *Theriogenology*, v.86, p.1081-1091, 2016.
- Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL.** Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.247-258, 2004.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC.** Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.130-137, 2007.
- Kumar D, Ranjan R, Singh AP, Sarkhel BC.** Cellular reprogramming of adult goat fibroblast: toward pluripotency. *Indian J Anim Res*, v.51, p.52-57, 2017.
- Lira GPO, Borges AA, Nascimento LE, Santos MVO, Queiroz Neta LB, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Influência de diferentes crioprotetores sobre a viabilidade de células somáticas de catetos (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). In: Encontro de Biotecnologia do Nordeste, Natal. Anais do Encontro de Biotecnologia do Nordeste, 2017.
- Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, Sun Q.** Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, v.172, p.881-887, 2018.
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Cappai P, Clinton M.** Genetic rescue of an endangered mammal by crossspecies nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*, v.19, p.962-964, 2001.
- Moulavi F, Hosseini SM, Tanhaie-Vash N, Ostadhosseini S, Hosseini SH, Hajinasrollah M, Asghari MH, Gourabi H, Shahverdi A, Vosough AD, Nasr-Esfahani MH.** Interspecies somatic cell nuclear transfer in Asiatic cheetah using nuclei derived from post-mortem frozen tissue in absence of cryo-protectant and *in vitro* matured domestic cat oocytes. *Theriogenology*, v.90, p.197-203, 2017.
- Pan X, Zhang Y, Guo Z, Wang F.** Development of interspecies nuclear transfer embryos reconstructed with argali (*Ovis ammon*) somatic cells and sheep ooplasm. *Cell Biol*, v.38, p.211-218, 2014.
- Praxedes EA, Borges AA, Santos MVO, Pereira AF.** Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. *Zoo Biol*, v.37, p.258-263, 2018.
- Priya D, Selokar NL, Raja AK, Saini M, Sahare AA, Nala N, Palta P, Chauhan MS, Manik RS, Singla SK.** Production of wild buffalo (*Bubalus arnee*) embryos by interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.343-351, 2014.
- Sansinena MJ, Hylan D, Hebert K, Denniston RS, Godke RA.** Banteng (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer. *Theriogenology*, v.63, p.1081-1091, 2005.
- Santos MLT, Borges AA, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** *In vitro* culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) in medium with different requirements. *Pesq Vet Bras*, v.36, p.1194-1202, 2016
- Srirattana K, Imsoonthornruksa S, Laowtammathron C, Sangmalee A, Tunwattana W, Thongprapai T, Chaimongkol C, Ketudat-Cairns M, Parnpai R.** Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin A treatment. *Cell Reprogram*, v.14, p.248-257, 2012.
- Tao Y, Liu J, Zhang Y, Zhang M, Fang J, Han W, Zhang X.** Fibroblast cell line establishment, cryopreservation and interspecies embryos reconstruction in red panda (*Ailurus fulgens*). *Zygote*, v.17, p.117-124, 2009.



Verma R, Liu J, Holland MK, Temple-Smith P, Williamson M, Verma PJ. Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. *BioResearch*, v.2, p.72-76, 2013.

Wang D, Guo Q, Ba H, Li, C. Cloning and characterization of a Nanog pseudogene in sika deer (*Cervus nippon*). *DNA and Cell Biol*, v.35, p.576-584, 2016.

Wani NA, Vettical BS, Hong SB. First cloned Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) calf produced by interspecies somatic cell nuclear transfer: a step towards preserving the critically endangered wild Bactrian camels. *Plos one*, v.12, p.1-8, 2017.

Zhai Y, Li Z, Cao Y, Wang Z, Zhang S, Li Z. Epigenetic states of donor cells significantly affect the development of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos in pigs. *Mol Reprod Dev*, v.85, p.26-37, 2018.
