

Resultados

Tabla 1. Activación partenogénica haploide.

Tratamiento	Nº Ovocitos	Clivados %	Mórulas/Blastocistos %
1o+6-Dmap	110	44a	23
1o+Roscovitina	109	29b	19
1o+Deidroleucodina	98	35ab	18
1o+Cicloeximida	127	39ab	20

Determinación de la capacidad de desarrollo de los embriones producidos por los diferentes tratamientos de activación partenogénica haploide, ab porcentajes entre columnas con diferencias significativas ($p < 0,05$) Chi Cuadrado.

Evaluación de la capacidad de desarrollo de los embriones producidos por los diferentes procedimientos de activación partenogénica haploide

Todos los tratamientos activaron ovocitos en forma haploide y generaron embriones partenogénicos que mostraron bajos porcentajes de clivaje, inferiores al 50%, y pocos embriones desarrollaron hasta estadio de blastocistos. Estos bajos porcentajes de desarrollo de embriones obtenidos por activación partenogénica haploide fueron también descritos en otros trabajos de activación en bovinos (Lagutina y col, 2004).

Determinación de blastómeras haploides en los embriones producidos por diferentes procedimientos de activación partenogénica haploide

Un total de 68 embriones en estadio de 4 a 16 células fueron analizados. Solo aproximadamente el 35 % de las blastómeras de estos embriones pudieron ser clasificadas.

En el tratamiento con 6-DMAP se determinó un porcentaje de blastómeras haploides de 67% y un elevado % de aneuploidías. Este tipo de anomalías cromosómicas ya han sido observadas en embriones partenogénicos activados con 6-DMAP (De la fuente y King, 1998).

En el grupo donde se utilizó Roscovitina como agente inhibidor de MPF se observó un elevado porcentaje de blastómeras haploides, superior al 80%, y no se advirtió la presencia de blastómeras con carga genética diploide.

En el grupo donde se utilizó dihidroleucodina se observó un porcentaje de blastómeras haploides de 83 % y no se advirtió la presencia de blastómeras con carga genética diploide. En el grupo donde se utilizó como agente inhibidor de MPF a la cicloheximida, se determinó un porcentaje de blastómeras haploides de 63% y un alto porcentaje de aneuploidías.

A pesar de no haberse registrado diferencias significativas en el número de blastómeras haploides entre los diferentes procedimientos, los tratamientos en los que se utilizó Roscovitina y Dihidroleucodina fueron seleccionados como métodos de generación de embriones partenogénicos haploides utilizados en los posteriores experimentos, debido a que con estos tratamientos se obtuvieron altos porcentajes de blastómeras haploides (N), los mayores porcentajes de blastómeras analizadas y un porcentaje nulo de blastómeras diploides (2N).

Tabla 2. Determinación del número de cromosomas.

Tratamiento	Nº Embriones Analizados	% Blastómeras Analizadas	Blastómeras Haploides %
Io+6-Dmap	15	32	67
Io+Roscovitina	18	38	83
Io+Deidroleucodina	14	33	83
Io+Cicloeximida	21	39	63

Determinación del número de cromosomas de las blastómeras obtenidas por los diferentes tratamientos de activación partenogénica. ab porcentajes de blastómeras haploides con diferencias significativas ($p < 0,05$) Fisher.

Evaluación del desarrollo de los embriones producidos por transferencia nuclear

El desarrollo resultante de los hemiclones producidos por transferencia de blastómeras arrojó un clivaje de 62,5 % y 54 %, y un porcentaje de mórulas de 25 % y 15 %, para el tratamiento Io + Roscovitina y Io + De-

hidroleucodina respectivamente, sin diferencias estadísticas. A pesar de que ambos tratamientos de activación haploide fueron efectivos para generar embriones haploides y a partir de éstos reconstruir hemiclones viables, en ninguno de los casos se logró el desarrollo hasta estadio de blastocisto.

Tabla 3. Transferencia nuclear.

Tratamiento	n	Clivados %	Mórulas %	Blastocistos %
Io+Roscovitina	16	62,5	25	
Io+Dihidroleucodina	13	54	15	
Control FIV	214	85	36	9

Determinación de la capacidad de desarrollo de los hemiclones producidos por transferencia nuclear y activación partenogénica haploide. ab porcentajes entre columnas con diferencias significativas ($p < 0,05$) Fisher. FIV: Fertilización in-vitro.

Discusión

La meiosis en los ovocitos, como el ciclo celular de todas las células eucariotas, está regulada por el factor promotor de la mitosis (MPF) que es un heterodímero compuesto por la subunidad regulatoria Ciclina B y la Kinasa de serinas y treoninas dependiente de ciclinas p34 (CDC2), (Gautier y col,1990).

Los ovocitos que entran en la división meiótica II y detienen su maduración en estadio de metafase II, poseen elevados niveles de MPF en estado activo. El MPF activo cataliza la ruptura de la envoltura nuclear

al fosforilar serinas de las laminas nucleares, lo cual induce su desorganización y desensamblaje. El MPF también fosforila directamente a las histonas H1 y a proteínas asociadas a los microtubulos. Estas fosforilaciones por MPF son esenciales para la ruptura de la vesícula germinal y el mantenimiento del arresto meiótico. Posteriormente a la fertilización o a la activación partenogénica del ovocito, los niveles de MPF activo decrecen abruptamente y el ovocito completa la división meiótica II, expulsa el segundo corpúsculo polar, se produce la formación de

pronúcleos y finalmente la progresión de la interfase (Alberts y col, 1994).

Numerosas investigaciones han sido llevadas a cabo con el objetivo de imitar los eventos fisiológicos que acontecen en la activación ovocitaria, de manera de lograr optimizar los protocolos utilizados en técnicas como la clonación y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Los procedimientos utilizados actualmente para la activación de ovocitos detenidos en MII incluyen estímulos físicos y químicos (Liu y col, 1998). En este trabajo se utilizaron diferentes estímulos químicos incluyendo cicloheximida, roscovitina, 6-dimetilaminopurina y dehidroleucodina.

La cicloheximida (CHX) es un inhibidor general de la síntesis proteica, que utilizada por un período de 2-5 hs posterior a un pulso de oscilación de Ca^{2+} , induce activación y formación de pronúcleos (Presicce y Yang, 1994). El efecto de la CHX es la inhibición de la producción de ciclina B, componente del MPF, así como de otras proteínas de vida corta. De esta manera se inhibe la actividad del MPF y los cromosomas decondensan dando lugar a la formación de un pronúcleo.

El 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), un inhibidor de la fosforilación de proteínas Kinasas (Szollosi y col, 1993), demostró ser también eficaz en la activación de ovocitos bovinos jóvenes. Esta sustancia utilizada en ovocitos bovinos por período de 3-4 hs posteriores a un pulso de Ca^{2+} , permite lograr porcentajes de activación y formación de pronúcleos superiores a los obtenidos con cicloheximida, aunque un menor desarrollo fue obtenido después de la activación de ovocitos clonados con blastómeros (Booth y col, 1999). Esta sustancia prevendría la reactivación del MPF indirectamente a partir de la inhibición de la fosforilación de c-Mos y MAPK, así como a partir de la inhibición de la fosfatasa cdc25 encargada de llevar a

cabo la activación del MPF (Alberio y col, 2001). Sin embargo, el 6-DMAP no induce activación cuando es utilizado sin previo incremento del Ca^{2+} (Moses y Masui, 1995). Otros autores adjudican al 6-DMAP, una acción directa sobre la CDK, componente del MPF, produciendo una fosforilación en uno de sus sitios inhibidores (Liu y Yang, 1999).

La exposición a CHX posterior a un pulso de Ca^{2+} muestra una dinámica de inactivación del MPF, similar a la observada después de la fecundación (Liu y Yang, 1999). El intervalo entre la inactivación del MPF y MAPK es similar en ambos grupos. Por otra parte, estos embriones extruyen un segundo corpúsculo polar.

Cuando se utiliza la combinación de un elevador del flujo de Ca^{2+} y 6-DMAP, la actividad del MPF declina abruptamente tan pronto como una media hora después de la inducción del flujo de Ca^{2+} y la de MAPK disminuye recién a las 3-4 hs después de la activación. Este intervalo entre la disminución de la actividad del MPF y MAPK es menor que lo observado durante la fecundación o la activación con cicloheximida (Liu y Yang, 1999).

La roscovitina (ROSC) es una purina que posee una actividad inhibitoria específica de las CDK, suprimiendo de esta forma la actividad del MPF, debido a que presumiblemente bloquea la unión del ATP al sitio activador de la CDK (Meijer y col, 1997; Noble y col, 2004).

La dehidroleucodina es una lactona sesquiterpénica del tipo guaianolido que es el principio activo de la planta *Artemisa douglasiana* Besser, y de la cual sus mecanismos moleculares no han sido descritos en su totalidad, pero se especula una acción directa sobre MPF, o indirecta actuando sobre las enzimas claves para la activación del MPF.

La inducción de un incremento de Ca^{2+} intracelular producido por ionomicina causa