

una rápida pero transiente inactivación del MPF, reiniciando en consecuencia la meiosis y produciendo la extrusión del 2º CP. Sin embargo, una subsiguiente síntesis y fosforilación de proteínas restaura la actividad del MPF, y en lugar de decondensarse los cromosomas y formar un pronúcleo como sucede en la fecundación, se produce su recondensación y un arresto en un estadio denominado metafase III (MIII), (Shoukhrat M y col, 2001). Por este motivo, en este trabajo, los ovocitos debieron incubarse con una segunda droga activadora del ciclo celular que permita mantener la inactivación del MPF, durante un período prolongado, necesario para la formación de pronúcleos y la posterior reanudación del ciclo celular. Sin embargo, se debe dejar un período de tiempo entre la incubación con ionomicina y la segunda droga activadora del ciclo celular para permitir la extrusión del segundo corpúsculo polar y de esta forma obtener la mayor cantidad posible de embriones con carga genética haploide.

En este estudio nosotros comparamos la capacidad de desarrollo de embriones partenogénicos bovinos haploides, los cuales no presentaron diferencias significativas en el desarrollo hasta estadio de mórula-blastocisto. Sin embargo, los porcentajes de desarrollo fueron bajos. Este resultado era esperable debido a la deficiente capacidad de las células a mantener un desarrollo normal con la mitad de su carga genética.

La determinación del número de cromosomas permitió confirmar que los embriones producidos por partenogénesis contenían en cada blastómera una carga genética haploide de cromosomas (N). 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. Estos bajos porcentajes de determinación del número de cromosomas, son frecuentes al utilizar este tipo de técnicas

tanto en bovinos como en caprinos (Lattanzi y col, 2003; Villamediana y col, 2001).

Los embriones producidos por transferencia nuclear desarrollaron hasta estadio de mórula y ninguno logró desarrollar hasta estadio de blastocisto. A pesar de haberse realizado 3 repeticiones del experimento, el total de embriones reconstruidos fue bajo (29), debido a las dificultades de la técnica, en especial al utilizar en las transferencias nucleares blastómeras de gran tamaño. Este procedimiento generó hemiclones, es decir, embriones con idéntica información genética proveniente de la gameta femenina pero diferente información proveniente de la gameta masculina.

La clonación de ovocitos puede ser útil en dos aspectos diferentes: aumentar el número de embriones disponibles para ofrecer descendencia genética a pacientes con problemas de esterilidad, y eventualmente analizar genéticamente las blastómeras partenogénicas, para solamente utilizar las normales en la reconstrucción embriones.

Hoy en día el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) se utiliza para la determinación de deleciones numéricas (aneuploidía), anomalías estructurales cromosómicas (translocaciones e inversiones) y desordenes genéticos (fibrosis quística, talasemia, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne y otros).

El DGP ofrece a las parejas con serios desórdenes genéticos la oportunidad de tener un hijo sano, sin necesidad de confrontar problemas asociados a la terminación de un embarazo afectado, después de conocer el diagnóstico por los métodos tradicionales, como lo son la biopsia de vellosidades coriales y la amniocentesis. Pero no evita la confrontación con cuestiones éticas relacionadas al descarte embrionario. Esta nueva técnica brindaría la posibilidad de analizar genéticamente las blastómeras partenogénicas en forma previa a la reconstrucción del em-

brión, utilizando únicamente blastómeras provenientes de partenogenotas normales y brindando de esta forma una alternativa ética al descarte embrionario, debido a que los partenogenotas no seleccionados para la donación de núcleos carecen de capacidad de desarrollo hasta estado adulto.

Otra de las ventajas de la aplicación de este método es que se evitaría el sometimiento de mujeres a tratamientos de superovulación que sí son necesarios en las prácticas de reproducción asistida convencionales y en los cuales las contraindicaciones son varias, como el síndrome de hiperestimulación que puede provocar daños hepáticos, disfunción renal o formación de trombos causantes de infartos.

Por otra parte, esta técnica podría transformarse en una fuente alternativa para multiplicar ovocitos bovinos de alta calidad genética, utilizando como ovoplasma recipiente ovocitos de bajo costo provenientes de mataderos y espermatozoides de alto valor genético; estableciendo de esta forma un procedimiento eficiente de producción *in-vitro* de embriones bovinos, provenientes de animales del más alto interés productivo, aptos para ser transferidos a receptoras apropiadas. También podría ser utilizada para contribuir en la preservación de especies en extinción y facilitar la producción y difusión de animales transgénicos.

## Bibliografía

- Alberio, Zakhartchenko, Motlik and Wolf. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int J Dev Biol* (2001).
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994). Cap.17: El ciclo de la división celular. *Biología molecular de la Célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. Barcelona.
- Booth PJ, Holm P, Vatja G. Comparison between 6-dimethylaminopurine and cycloheximide activation treatments for bovine nuclear transfer. *Theriogenology* (1999).
- De la Fuente y King. Developmental consequences of kariokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine partenotes. *Biol Reprod* (1998).
- Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* (1990).
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, and Galli C. Developmental Potential of Bovine Androgenetic and Parthenogenetic Embryos: A Comparative Study. *Biol Reprod* (2004).
- Lattanzi M, Santos C, Mudry M, Barañao L. Exposure of Bovine Oocytes to the Endogenous Metabolite 2-Methoxyestradiol During *in vitro* Maturation Inhibits Early Embryonic Development. *Biol Reprod* (2003).
- Liu L, Ju JC, X Yang. Parthenogenetic development and protein patterns of newly matured bovine oocytes after chemical activation. *Mol Reprod Dev* (1998).
- Liu L, Yang X. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod* (1999).
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* (1997).
- Moses y Masui. Metaphase arrest in newly matured or microtubule-depleted mouse eggs after calcium stimulation. *Zigote* (1995).
- Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* (2004).
- Presicce y Yang. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 hr and activated by ethanol and Cycloheximide. *Mol Reprod Dev* (1994).
- Shoukhrat M, Nusser K, and Don P. Wolf. Parthenogenetic Activation of Rhesus Monkey Oocytes and Reconstructed Embryos. *Biol Reprod* (2001).
- Szöllösi M, Cúbica J, Debey P, Pennard H, Szöllösi D, Maro B. Inhibition of protein Kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *J Cell Sci* (1993).
- Villamediana P, Vidal F, Paramio M. Cytogenetic análisis of caprine 2- to 4-cell embryos produced *in vitro*. *Zygote* (2001).