

Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos

Induction of parthenogenesis in mammalian oocytes

Vallejo J, Gómez-Piquer V, Tarín JJ

Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, Burjassot, 46100 Valencia

Resumen

Objetivos: *Analizar los diferentes métodos de activación partenogenética y el efecto del envejecimiento de los ovocitos in vitro e in vivo sobre el porcentaje de activación partenogenética de ovocitos de mamíferos, resaltando la especie humana.*

Métodos: *Revisión de la literatura.*

Resultados y conclusiones: *Se conocen muchos estímulos físicos y químicos capaces de activar la partenogénesis en ovocitos de mamíferos tanto in vivo como in vitro. El porcentaje de activación partenogenética alcanzado depende de la especie y cepa del animal, la presencia o ausencia de células del cúmulus, el tipo de estímulo y grado y modo de envejecimiento post-ovulatorio de los ovocitos. Los estímulos usados para inducir la partenogénesis producen una o varias elevaciones de Ca²⁺, inhiben la fosforilación y síntesis de proteínas, lo cual provoca una desactivación del factor citostático (CSF) y del factor promotor de la mitosis (MPF). Los ovocitos humanos, comparados con los de otros mamíferos, tales como el ratón, son mucho más difíciles de activar partenogenéticamente y sólo responden a los tratamientos con ionóforo de calcio A23187, manitol y puromicina. Los ovocitos envejecidos in vivo son más fáciles de activar que los frescos y los envejecidos in vitro.*

Palabras clave: Activación partenogenética. Envejecimiento post-ovulatorio. Metafase II. MPF. Ovocitos.

Correspondencia: Dr. Juan J. Tarín
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina, Universidad de Valencia
Avda. Blasco Ibañez, 17
46010 Valencia
e-mail: tarinjj@uv.es

Summary

Objectives: *To analyze the different methods of parthenogenetic activation and the effect of oocyte aging in vitro and in vivo on percentage of parthenogenetic activation of mammalian oocytes, stressing the human species.*

Methods: *A literature review.*

Result and conclusions: *Many physical and chemical stimuli capable of inducing parthenogenetic activation of mammalian oocytes both in vivo and in vitro are known. The percentage of parthenogenetic activation depends on the animal species and strain analyzed, the presence or the absence of cumulus cells, type of stimulus, and degree and kind of post-ovulatory aging of oocytes. The stimuli used for inducing parthenogenesis produce one or several intracellular Ca^{2+} rises, inhibit protein phosphorylation or synthesis, which causes the deactivation of cytostatic factor (CSF) and mitosis promoting factor (MPF). Human oocytes when compared to other mammalian oocytes, such as the mouse, are much more difficult to be parthenogenetically activated and only respond to treatment with calcium ionophore A23187, manitol and puromycin. Oocytes aged in vivo are more easily activated than fresh or in-vitro aged oocytes.*

Key words: Metaphase II. MPF. Oocytes. Parthenogenetic activation. Post-ovulatory aging.

INTRODUCCIÓN

Definición de partenogénesis

Típicamente, se define partenogénesis como la producción de un embrión, se desarrolle o no hasta la fase adulta, a partir de un gameto femenino sin contribución por parte del gameto masculino. Esta definición deja fuera del término a la ginogénesis, activación del ovocito por un espermatozoide que no contribuye con material genético al embrión.

En el caso de la mayoría de los mamíferos, lo que se tiene en cuenta para determinar si ha habido partenogénesis es la reanudación de la meiosis, ya que el ovocito sin activar está detenido en estadio de metafase de la segunda división meiótica (MII). Según el objetivo de cada estudio, se valora como reanudación de la meiosis, la extrusión de los gránulos corticales, la formación del o los pronúcleos (PNs) o el acontecimiento de la primera división mitótica.

Características de la partenogénesis de mamíferos

En la mayoría de mamíferos, el ovocito recién liberado del folículo está detenido en MII y completa el proceso de división al ser activado por un espermatozoide. El ovocito activado emite el segundo corpúsculo polar (2CP) y se produce la liberación de los gránulos corticales, el contenido de los cuales contribuye a la modificación de la zona pelúcida impidiendo la entrada de más espermatozoides o polispermia. Sigue con la formación del PN femenino y masculi-

no, síntesis de ADN y condensación y unión de ambos juegos cromosómicos en el huso mitótico. Finalmente, tras completarse la primera división mitótica, se producen los dos primeros blastómeros con su complemento cromosómico diploide correspondiente.

Uno de los efectos de la fecundación sobre el ovocito es una serie de oscilaciones de Ca^{2+} , que también son producidos por algunos de los estímulos artificiales que inducen la partenogénesis.

El ovocito puede ser artificialmente activado por una amplia variedad de estímulos que, como característica general, suponen un severo estrés para la célula. Está comprobado que sustancias oxidantes (1-3) y antioxidantes (4) son capaces de activar cascadas de MAP quinasas, como las que se activan en respuesta a las oscilaciones de Ca^{2+} . Los procesos que se desarrollan en el interior de los ovocitos artificialmente activados parecen ser los mismos que ocurren tras la activación inducida por espermatozoides, pero normalmente no ocurren todos o se desarrollan de forma parcial. Por ejemplo, en lugar de producirse una serie de oscilaciones de Ca^{2+} , la mayoría de estímulos partenogénéticos inducen la formación de una única elevación de Ca^{2+} . Según el estímulo, es típico que los gránulos corticales se extruyan en menor proporción, que no se produzca la emisión del segundo cuerpo polar o que se formen subnúcleos, porciones de membrana nuclear reconstruida alrededor de unos pocos cromosomas.

El efecto común que parecen producir todos los métodos de estimulación, incluido el espermático, es

la desactivación del bloqueo de la división a que está sometido el ovocito. Esto ocurre a través de una cadena de proteínas quinasas que actúan como canal de transducción del aumento de Ca^{2+} intracelular, provocado por el estímulo, o a través de la inhibición directa de las proteínas responsables del bloqueo, dependiendo del estímulo implicado.

Las proteínas implicadas en el bloqueo meiótico son entre otras las que forman el factor citostático (CSF), como la proteína reguladora Mos en el ratón (5-7), y el factor promotor de la mitosis (MPF), el cual está compuesto por las subunidades ciclina B y p34^{cdc2}. Se asume que el CSF estabiliza la forma activa del MPF, el cual, a su vez, mantiene al ovocito en MII.

Hasta ahora, no se ha dado ningún caso probado de partenogénesis a término en mamíferos. Quizá, porque existen desequilibrios de dosis de los productos génicos debido al genoma haploide, o al imprinting anormal en el caso de partenogénesis diploides, que harían que el embrión muriera de forma prematura.

Rutas de desarrollo más comunes tras activación partenogenética

Hay cuatro grandes tipos de partenogénesis: haploides uniformes, haploides en mosaico por "división inmediata", heterocigotos diploides y mosaicos haploides por "división inmediata retardada". Cada tipo se desarrolla según se extruya o no el 2CP, y según el modo y momento de la segunda división meiótica:

- 1) Embrión haploide uniforme: Extrusión del 2CP y formación de un sólo PN.
- 2) Embrión haploide en mosaico:
 - a) División del ovocito ("división inmediata") y formación de un PN en cada blastómero. Cada PN contiene material diferente debido a los productos del entrecruzamiento anterior a la primera meiosis.
 - b) Se forman 2PN sin extrusión del 2CP y se produce la división celular ("división inmediata retardada").
- 3) Embrión diploide: Sin extrusión del 2CP, se forma un único PN diploide; o se crean 2PN cuyo material genético se reunirá más tarde en el huso de la primera mitosis.

El uso de diferentes cepas, métodos de activación, medios de cultivo y la edad postovulatoria influyen en la obtención de diferentes partenogénesis. También, es posible usar sustancias que interfieren en la dinámica del citoesqueleto, como las citocalasinas

B y D, para controlar la frecuencia de cada tipo de partenogénesis.

Factores que afectan al porcentaje de activación

La frecuencia de activación depende de la especie del animal y la cepa dentro de ésta, el medio de cultivo, la conservación o denudación de las células del cúmulus (8, 9) y el tipo de estímulo.

El envejecimiento del ovocito es un factor muy influyente. En general, los ovocitos recién ovulados son difíciles de activar, y es más fácil cuanto más tiempo ha pasado tras la ovulación, aunque también aumenta el porcentaje de fragmentación y disminuye el potencial de desarrollo de los ovocitos. Las condiciones en que se produce el envejecimiento parecen ser muy importantes, pues los ovocitos de ratón envejecidos *in vitro* presentan frecuencias de activación mucho menores que los envejecidos *in vivo* (10). Otro posible factor es que la ovulación sea natural (espontánea) o provocada (superovulación).

Muchos de estos puntos han sido tratados extensivamente en revisiones clásicas como las de Graham (11), Kaufman (12) y Whittingham (13) y no serán desarrollados en el cuerpo de éste artículo, el cual se centra en los métodos de activación partenogenética no revisados anteriormente, la aplicación de las técnicas y métodos partenogenéticos en humanos y las diferencias en el porcentaje de activación tras envejecimiento de los ovocitos *in vivo* e *in vitro*.

Técnicas de estimulación partenogenética

A grandes rasgos, se dividen en físicas y químicas, pudiéndose usar cada una en solitario o combinando varias técnicas para conseguir mejor resultado en las frecuencias de activación o de desarrollo, o controlar la frecuencia de aparición de un tipo determinado de partenogénesis.

Entre las técnicas físicas, se incluyen la simple manipulación del ovocito, la punción con una aguja en presencia de Ca^{2+} en el medio, calor (*in vivo* e *in vitro*), frío (*in vivo*), choque eléctrico (*in vivo* e *in vitro*), osmolaridad del medio de cultivo (hipertónico o hipotónico) y presión negativa (14).

Entre las técnicas químicas, se han explorado las enzimáticas (hialuronidasa, pronasa y tripsina), variaciones en la composición iónica del medio (Ca^{2+} , Br^{2+} , Mg^{2+} y La^{3+}), inyección de iones (Ca^{2+} , Ba^{2+} y Sr^{2+}), ionóforo de Ca^{2+} A23187, etanol, alcohol bencílico (15), 1,2-propanediol (16), solución de ácido de Tyrode (17), anestésicos y tranquilizantes *in vivo* (éter, cloroformo, cloruro etílico, alcohol etílico, pa-

raldehído, óxido nitroso, nembutal y avertin [11-12]), inhibidores de la síntesis proteica (cicloheximida y puromicina; [18]), medio deficiente en piruvato (19), inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa (20), inhibidores de la fosfodiesterasa (21), estimulación de proteínas G (22-24), activación de proteína quinasa C (25).

La mayor o menor eficacia de estas técnicas varía con la especie, y un ejemplo es la propia especie humana, cuyos ovocitos son sorprendentemente resistentes a la activación artificial por la mayoría de técnicas, al parecer, independientemente de la edad postovulatoria (26).

Las técnicas que presentamos a continuación son aquellas no reseñadas en las revisiones clásicas o, sí lo han sido, se dispone de datos o enfoques nuevos.

Físicas

Manipulación

La simple manipulación necesaria para obtener los ovocitos y depositarlos en el medio de cultivo puede ser suficiente para activarlos. Kaufman (12) recoge unos porcentajes de activación para ratones de diferentes cepas del 45-65%; y del 70-75% si los ovocitos, además, estuvieron expuestos a hialuronidasa.

La manipulación, por sí sola, sin embargo, no parece capaz de activar a los ovocitos humanos. Abramczuk y Lopata (26) sometieron a ovocitos humanos, recogidos por laparoscopia y mantenidos en cultivo hasta 39-54h tras el tratamiento con hCG, a los mismos pasos que sufren los ovocitos en un protocolo de fecundación in vitro, con la excepción de que no los pusieron en contacto con espermatozoides. Ninguno de los ovocitos mostró signos de activación, mientras que los ovocitos controles pertenecientes a los mismos pacientes y expuestos al mismo proceso pero en presencia de espermatozoides, sí fueron fecundados, excluyendo la posibilidad de que los ovocitos de estas pacientes no pudieran llevar a cabo los procesos de la activación.

Estímulo eléctrico

Un pulso eléctrico causa una única oscilación de Ca^{2+} en el ovocito, ya sea por la liberación de reservas interiores o por la apertura de poros en la membrana plasmática, que suele ser suficiente para provocar la activación.

La revisión de Graham (11) recoge un porcentaje de activación de hasta el 75% en ratones, mientras que la de Kaufman (12) ofrece unos porcentajes algo

más modestos de activación in vivo en varias cepas: 40% para ovocitos procedentes de ovulación inducida y 50% para los ovulados espontáneamente.

Onodera y Tsunoda (27) utilizaron ovocitos frescos de ratón desnudos para ensayos de electroestimulación. La máxima frecuencia de activación (78%) y desarrollo hasta blastocisto (32%) la consiguieron con una serie de 2 pulsos de corriente continua (CC; 1.5 kV/cm; 100 (s) separados por un segundo, en solución conductora (manitol 0.3M + $MgSO_4$ + $CaCl_2$ 0.05mM) y cultivo posterior en M16 con citocalasina B (5 μ g/mL; 5 h).

Marcus, trabajando con ovocitos de ratón desnudos aplicó electroestímulos de 1-3 pulsos (125 V; 40 (s) consiguiendo una frecuencia de activación del 30% (8).

En el estudio de Sasagawa y Yanamigachi (28), la comparación de diferentes protocolos de activación por electroestimulación in vitro muestra que, sobre ovocitos de una determinada cepa de ratón incubados hasta 18,5 h post-hCG, los protocolos más efectivos (76-81% de activación) son aquellos con menor número de pulsos y mayor separación temporal entre los mismos. Con una excepción, el protocolo de 4 pulsos (0,5 kV/cm; 128(s) a intervalos de 5 minutos. El protocolo que consiguió un porcentaje más alto de activación (77-81%) y de desarrollo hasta blastocisto (29%) fue el más suave, consistente en un único pulso de 1.0kV/cm durante 128(s).

Ovocitos frescos desnudos de conejo, sometidos a una serie de 2 pulsos (CC; 1,5 kV/cm; 200 (s) separados por un segundo, y cultivados posteriormente en citocalasina B mostraron unos porcentajes de activación del 77% y de desarrollo hasta blastocisto del 25% (27).

Ovocitos frescos de oveja, desnudos y expuestos a un pulso de 1,25 kV/cm durante 80(s) desarrollaron un 80% de activación (29).

Ovocitos de tití recogidos por aspiración folicular y desnudos, expuestos a las 44-48 h post-hCG a dos series de seis pulsos eléctricos (CC; 2kV/cm; 70(s) separadas por media hora, alcanzaron un porcentaje de activación del 98%. El desarrollo máximo de los partenogones fue hasta ocho células (15%), alcanzando la mayoría los estadios de 2-4 células (69%). Se desconoce el intervalo de tiempo entre los pulsos de cada serie (30).

Choque osmótico

Se entiende como choque osmótico la exposición a un medio de osmolaridad anormalmente alta o baja en relación a la óptima para la incubación del ovoci-

to. Según la revisión de Graham (11), tales condiciones activan hasta un 58% de ovocitos de rata y 38% de conejo. En cuanto a los ovocitos de ratón, la osmolaridad del medio influye en la frecuencia de cada tipo de partenogénón y, en algunas cepas, en los porcentajes de activación (12).

Marcus expuso ovocitos de ratón desnudos a incubación, durante 30 min, en medio M2 diluido 1:1 con agua destilada sin conseguir la activación de los mismos (8).

Ovocitos de ratón recolectados 14-16 h post-hCG y desnudos, expuestos a un medio sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} con dimetil sulfóxido al 10% durante 2 minutos, presentan frecuencias de exocitosis de los gránulos corticales y de formación pronuclear del 44% y 36%, respectivamente (31). En el mismo trabajo, se observó que la presencia de 5-(N,N,-dimetil)-amilorida, inhibidor del intercambio Na^+/H^+ origina frecuencias significativamente menores de exocitosis de los gránulos corticales, formación pronuclear y fosforilación de proteínas. Eso no ocurre en presencia de W7, inhibidor de la calmodulina. Esto sugiere que la activación por cambios de presión se produce a través de una ruta diferente de la ruta Ca^{2+} /calmodulina y dependiente del intercambio Na^+/H^+ .

Ovocitos humanos 34-41 h post-hCG, desnudos y expuestos a 50-250 UI/mL de hialuronidasa bovina durante 30-60 min y, posteriormente, a medio hipotónico (1:4 ó 1:2, agua:medio) durante otros 30-60 min, no mostraron signos de activación partenogénica (26).

Presión negativa

En ovocitos humanos recogidos por aspiración folicular a presiones de vacío de 100, 75 y 50 mmHg, se observó que el porcentaje de activación partenogénica (ovocitos con un único PN y uno o dos cuerpos polares) de los ovocitos aspirados a 100 mmHg (6%) fue significativamente superior al de los aspirados a 50 mmHg (14).

Choque de calor

Graham (11) recoge la activación in vitro de ovocitos de conejo (hasta un 44%) tras ser sometidos a 42-46°C.

Por otra parte, Kaufman (12) revisa datos de varias cepas de ratón. Tras aplicación de un baño a 44-45°C in vivo, un 50% de ovocitos ovulados espontáneamente presentan signos de activación partenogénica; mientras que la exposición in vitro a 44-44.5°C induce un porcentaje máximo de activación del 57%. Con las

mismas cepas de ratón y ovocitos cultivados en presencia de citocalasina B el rango de activación aumenta hasta un 70-90%.

Choque de frío

En Graham (11), se encuentran datos de activación in vivo por frío de ovocitos de rata (hasta 100%), hámster (hasta 80%), conejo (hasta 90%), hurón (hasta 60%) y oveja (la mayoría de ovocitos). En cambio, ovocitos desnudos de ratón expuestos in vitro a 2°C durante 30 min no muestran signos de activación (8).

Ovocitos humanos 34-60 h post-hCG fueron expuestos a 4°C (dentro de un refrigerador) durante 30-40 min y posteriormente devueltos al incubador. Durante el periodo de observación no se encontraron signos de activación en ninguno de los ovocitos (26). No obstante, en el estudio de Gook et al. (32), no se descarta la temperatura como un factor capaz de provocar la activación de ovocitos humanos durante los tratamientos de criopreservación.

Químicas

Anestesia

Está demostrado que la aplicación de anestesia puede provocar activación partenogénica in vivo en ovocitos de rata: éter (64% [11]), cloroformo, cloruro de etilo, alcohol etílico, paraldehído, óxido nitroso e inyección intraperitoneal de nembutal (revisado por Kaufman [12]); y ratón: éter (18% [11]) e inyección intraperitoneal de avertin (46% [12]).

Hialuronidasa

Este enzima es muy efectivo para provocar la partenogénesis en ovocitos de ratón. En el trabajo de Kim y Schuetz (19), el cultivo de ovocitos envejecidos in vivo expuestos a hialuronidasa produjo un 60% de activación.

Ovocitos de vaca madurados in vitro durante 33 h y cultivados en medio M2 con 0,1% hialuronidasa durante 10 min alcanzaron un porcentaje de activación del 18%, mientras que ovocitos madurados in vitro durante 24 y 27 h consiguieron un porcentaje máximo del 3% (33).

La exposición de ovocitos humanos a 0.05 mM hialuronidasa durante 2-5 min no los activa si los ovocitos son frescos, aunque los ovocitos envejecidos in vitro durante 24 h presentan un porcentaje de activación del 6% (17).

Pronasa

Tras la recolección de ovocitos de ratón 12,5 h post-hCG, exposición a 1 mM hialuronidasa durante 2-5min para separarlos de las células del cúmulus y pronasa para eliminar la zona pelúcida se obtuvo un porcentaje de activación del 44%. En cambio, no se encontró ningún ovocito fresco humano activado tras tratamiento con 0,05 mM hialuronidasa y 0,5% pronasa (17).

Solución de ácido de Tyrode

Usada para adelgazar o eliminar la ZP, la solución de ácido de Tyrode es capaz de activar tanto ovocitos humanos como de ratón. En el estudio de Johnson et al. (17) los ovocitos de ratón, frescos, fueron separados de las células de cúmulus por exposición a 1 mM hialuronidasa y se les aplicó solución de ácido de Tyrode (pH 2,5) para eliminar la ZP. El porcentaje de activación partenogenética fue del 43%. Con ovocitos humanos se siguió el mismo protocolo obteniendo un porcentaje de activación partenogenética del 33% en ovocitos frescos y de un 20% en ovocitos, no tratados con hialuronidasa, envejecidos in vitro durante 24 h. Para disminuir la posible influencia de la hialuronidasa en ovocitos frescos, se realizó un experimento con una concentración de 0.05 mM hialuronidasa. El porcentaje de activación partenogenética fue del 22%.

Etanol

Ovocitos de vaca desnudados y madurados in vitro muestran una respuesta a la activación por etanol dependiente del tiempo de cultivo durante la maduración. Se expusieron grupos de ovocitos con diferentes tiempos de cultivo al 7% etanol en medio M16 durante 7 min, observándose dos grupos diferenciados: el grupo de ovocitos cultivados durante 24-26 h, con un 25-38% de activación; y el grupo de ovocitos cultivados durante 27-32 h, con un 60-68% de activación. Además con un grupo que todavía conservaba el cúmulus consiguió un porcentaje de activación del 78% (33).

La incubación de ovocitos de ratón en medio M16 con 7% etanol durante 7 min produjo un porcentaje de activación del 81% y un porcentaje de desarrollo hasta la fase de blastocisto del 14% (27). El efecto del etanol sobre ovocitos de ratón parece ser mayor cuando están rodeados por las células del cúmulus (8, 33). De hecho, la exposición durante 5 min a 7% etanol provocó frecuencias de activación del 57% en ovocitos rodeados con cúmulus y del 16% en ovocitos desnudados (8). También, en Kim y Schutz (19), se

observa un bajo porcentaje de activación en ovocitos desnudados (<10%).

Ovocitos de oveja incubados en medio TCM 199-HEPES con 7% etanol durante 5 min presentaron un porcentaje de activación del 94% (29).

Por otra parte, Onodera y Tsunoda (27) incubaron ovocitos frescos de conejo, desnudados, en solución similar a la usada con ratones, con rangos de 7-20% de etanol, durante 7 min. En ninguna de las concentraciones se obtuvo activación partenogenética.

Tampoco la incubación de ovocitos humanos, envejecidos y desnudados, en medio con 7% etanol durante 7,5 min produjo ninguna activación (26). Concentraciones de hasta un 10% etanol y tiempos de incubación de hasta 10 min no aumentaron significativamente el porcentaje de activación partenogenética con respecto al grupo control (34-36).

En otro primate, el tití, el etanol presenta un efecto activador muy bajo, consiguiéndose sólo un 20% en ovocitos envejecidos in vitro (4 días post-hCG) e incubados durante 5 min en una solución de 7% etanol en PBS (30).

1,2-propanediol

El 1,2-propanediol (PROH) es un crioprotector comúnmente usado en criopreservación de embriones y ovocitos. Al igual que ocurre con otras sustancias que presentan grupos hidroxilo (-OH), tales como etanol y éster de forbol, el PROH puede activar ovocitos de ratón, aunque es incapaz de activar ovocitos humanos. En un estudio ovocitos humanos frescos fueron expuestos a soluciones de congelación y descongelación basadas en PROH. No observaron signos de activación partenogenética, tales como la formación pronuclear, en ningún ovocito. En contraste, cuando tanto ovocitos frescos como envejecidos se sometieron a un tratamiento completo de criopreservación, se obtuvieron porcentajes significativos de partenogénesis del 27% y 29%, respectivamente (32).

Secuestro de iones Zn^{2+}

Con la exposición de ovocitos de cerdo en fase de vesícula germinal a diferentes dosis de una sal disódica de EDTA (quelador específico de iones divalentes; Na-EDTA) los máximos porcentajes de activación, 63% y 65%, se obtuvieron en ovocitos rodeados o no de células del cúmulus, respectivamente, usando una concentración 1 mM Na-EDTA. Para conocer el mecanismo por el cual el Na-EDTA induce una activación partenogenética, se efectuaron una serie de ensayos con EDTA saturado con varios iones metálicos,

tales como Ca^{2+} (Ca-EDTA), Cu^{+2} (Cu-EDTA), Fe^{+3} (Fe-EDTA) ó Zn^{+2} (Zn-EDTA), así como con el quelador específico de iones Ca^{2+} , EGTA. Sólo cuando los ovocitos se trataron con Zn-EDTA y EGTA, no se obtuvo respuesta partenogenética. Estos resultados apuntan a que la disponibilidad de Zn^{2+} libre en el ovocito es necesaria para mantenerlo estable en MII y que el secuestro de Zn^{2+} es el responsable de la activación partenogenética (37).

Ciclohexamida

Ovocitos frescos de ratón, incubados durante 6 h en presencia de 10 (g/mL de ciclohexamida, presentaron un porcentaje de activación del 22% (28). En el trabajo de Kim y Schuetz (19), la concentración de 10 (g/mL también provocó un 22% de activación, pero se llegó hasta el 89% con 100 (g/mL. Aunque por sí sólo, este inhibidor de la síntesis proteica tenga muy poco efecto como activador partenogenético, es capaz de potenciar el efecto de otros tratamientos activadores.

Exposición a Sr^{2+}

El tratamiento con Sr^{2+} provoca oscilaciones repetitivas de Ca^{2+} en el interior del ovocito capaces de estimular la activación partenogenética. La exposición de ovocitos de ratón denudados a 12-60 min de incubación en medio M16, en el que la sal de calcio se reemplazó por cloruro de estroncio equimolar observando frecuencias de activación de 12-86% según cepa y tiempo de exposición (8). También se encontró un 44% de activación partenogenética en ovocitos frescos y denudados de ratón, incubados durante 2 h en medio M16 libre de Ca^{2+} con 10 mM SrCl_2 (38).

Ionóforos de calcio

Ovocitos de ratón denudados expuestos durante 5 min a medio M16 suplementado con 0,05 $\mu\text{g/mL}$ ionóforo de calcio A23187 alcanzan porcentajes de activación de 45-81% según la cepa usada (8). También, es uno de los pocos tratamientos capaz de inducir partenogénesis en ovocitos humanos. Incubando ovocitos frescos en presencia de 5 μM del ionóforo de calcio A23187 durante 5 min, se consiguió un porcentaje máximo del 54% (35). Similar tratamiento arroja un porcentaje del 60% en otro estudio (34). Parece que esos porcentajes de activación no son posibles con ovocitos envejecidos, ya que en algunos casos no se consiguen porcentajes de activación significativamente diferentes a los de los grupos control (35, 36, 39). En otro estudio utilizando el

mismo tratamiento, la tendencia se invierte y el porcentaje de activación en ovocitos frescos resulta significativamente menor (42%) que el alcanzado con ovocitos envejecidos in vitro (65%). También la edad de la mujer donante influye, ya que los ovocitos de mujeres mayores de 35 años presentan menor porcentaje de activación (53%) que los del grupo de menores de 35 (69-76%) (40).

El tratamiento durante 5 min con 5 μM ionomicina, otro ionóforo de calcio, en medio TCM 199-HEPES consigue muy buen porcentaje de activación (98%) en ovocitos ovinos frescos y denudados, desarrollándose el 58% de estos ovocitos hasta la fase blastocisto (29).

Medio libre de iones de Ca^{+2} y Mg^{+2}

En la revisión de Kaufman (12), encontramos que la mayor frecuencia de activación de ovocitos sin denudar se consigue con medio estándar carente de iones Mg^{2+} (80%), mientras que en medio sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} se obtienen frecuencias de activación de 40-60%. Sin embargo, hay que señalar que, para facilitar la observación, después de la exposición al medio, los ovocitos se denudaron mediante tratamiento con hialuronidasa, lo cual podría haber hecho que el porcentaje observado de activación fuera mayor que el estrictamente debido a la carencia de iones calcio o magnesio en el medio.

En el estudio de Marcus (8), la incubación de ovocitos denudados de ratón durante 30 min en medio M16 en el que las sales de Ca^{2+} y Mg^{2+} habían sido reemplazadas por cloruro sódico no se consiguió activar ningún ovocito. Posibles explicaciones a la diferencia respecto de los resultados anteriores podrían ser la ausencia de células del cúmulus o el uso de diferentes protocolos o cepas de ratón.

Puromicina

El tratamiento de ovocitos en MII con puromicina inhibe la síntesis proteica, incluyendo la ciclina B, componente del MPF. Esto hace que, al agotarse las proteínas que ya estaban en el citoplasma, el ovocito se active y tenga lugar el desarrollo partenogenético.

Es el tratamiento más efectivo conocido para la especie humana, con una frecuencia de activación partenogenética de hasta un 91% en ovocitos envejecidos, tratados con 100 mg/mL de puromicina durante 7-24 h (39). En otro estudio, se ensayó el grado de activación partenogenética utilizando diferentes concentraciones de puromicina (10, 50 y 100 (g/mL en medio F-10 ó M16 durante 5-24 h), sin que los porcentajes de activación (86-100%) presentaran dife-

rencias significativas. No obstante, parece ser que el desarrollo es mejor usando una concentración de 10 (g/mL durante 6-10h de incubación. El envejecimiento post-ovulatorio no parece afectar el porcentaje de activación, pero los grupos de ovocitos jóvenes presentan mejor desarrollo preimplantatorio (41).

Medio carente de piruvato

El cultivo de ovocitos de ratón frescos y desnudos en medio deficiente en piruvato provoca también la activación partenogenética. Tras 4 h de cultivo, la síntesis proteica queda inhibida y el ovocito entra en interfase. El desarrollo continúa al exponer de nuevo los ovocitos a medio con piruvato. En medio MEM suplementado con suero fetal bovino, sin piruvato, cultivando durante 24 h, se obtiene un porcentaje de activación del 78%. En solución equilibrada de sales de Earle y diferentes concentraciones de piruvato, comienza a haber activación con 94 (M piruvato y se alcanza un máximo (>85%) con 47 ó 23.5 (M. Aunque la activación se produce tanto en ovocitos jóvenes como envejecidos, el tiempo de cultivo necesario para activar estos últimos es menor (19).

Solución de manitol

La exposición de ovocitos humanos a una solución isotónica de manitol con baja concentración en calcio, magnesio y cloro provoca su activación partenogenética. La frecuencia de activación (64%-95%) no parece afectada por el envejecimiento in vitro (hasta 2 días). Sin embargo, la frecuencia de aparición de dos o más pronúcleos sólo se observa en ovocitos envejecidos (42), lo cual, probablemente, está relacionado con el deterioro que sufren los filamentos del huso mitótico durante el envejecimiento.

Inhibidores de la fosfodiesterasa

Pentoxifilina, cafeína y 2-deoxiadenosina, que son inhibidores de la fosfodiesterasa y antagonistas de los receptores de adenosina, se han usado comúnmente para estimular la motilidad de los espermatozoides en tratamientos de fecundación in vitro. Estas metilxantinas, a las concentraciones usadas en clínicas de fecundación in vitro, pueden provocar la activación partenogenética de ovocitos de ratón con máximos de activación del 82% para la pentoxifilina (10 mM, 10 min), 90% para la cafeína (5 mM, 60 min) y 75% para la 2-deoxiadenosina (10 mM, 30 min). En los tres casos la frecuencia de activación aumentaba con la dosis y el tiempo de incubación, como también lo hacía el número de ovocitos atétricos y lisados. Así

mismo, el desarrollo de los partogones era muy limitado; hasta la fase de dos células con pentoxifilina o cafeína, y con algunos blastocistos en el caso de la 2-deoxiadenosina (21). Sin embargo, la cafeína previene la fosforilación inhibitoria de la subunidad p34^{cdc2} y podría evitar la pérdida de actividad del MPF que se produce durante el envejecimiento del ovocito (43).

Inhibidores de proteínas quinasas

Ro-31-8220, H7 y estaurosporina, inhibidores de MAP quinasas; genisteína, inhibidor de la proteína tirosina quinasa; bohemina (44) y butirolactona I (45), inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, y 6-dimetilaminopurina (46), inhibidor de la fosforilación de proteínas, activan ovocitos de diferentes animales de experimentación aparentemente sin producir oscilaciones de Ca²⁺ (47-49).

Inhibidores del enzima inosina monofosfato deshidrogenasa

El tratamiento in vivo con bredinina y ácido mico-fenólico, inhibidores del enzima inosina monofosfato deshidrogenasa, produce activación en ovocitos de ratón, obteniendo un porcentaje máximo del 95% para la bredinina y del 75% para el ácido mico-fenólico, con desarrollo hasta la fase de blastocisto del 7% y del 6% del total, respectivamente. La frecuencia está directamente relacionada con el tiempo de permanencia del ovocito en el folículo tras la administración del tratamiento. No existe respuesta similar si el tratamiento se realiza durante la maduración in vitro, por lo que se supone que el efecto se produce por la interrupción de rutas del metabolismo de purinas importantes en el mantenimiento del bloqueo meiótico (20).

Estimulación de proteínas G

El papel de las rutas mediadas por proteína G se ha estudiado en ovocitos de ratón y cerdo que expresan un receptor muscarínico m1 exógeno, acoplado a proteína G, tratando con acetilcolina (22, 24), y en ovocitos de cerdo inyectando GTP- γ -S (23). En ambos casos, se consiguió activación (50% y 71%, respectivamente) y cierto grado de desarrollo.

Estos trabajos refuerzan la hipótesis de que la activación del ovocito durante la fecundación se dispara por la unión de proteínas espermáticas a receptores de membrana del ovocito, y exploran la posibilidad de que la ruta de activación esté mediada por una proteína G.

Estimulación del enzima proteína quinasa C

La proteína quinasa C está implicada en la cascada de quinasas que regula el sistema Ca²⁺-calmodulina. Su estimulación tras tratamiento de ovocitos humanos con forbol éster produce una frecuencia de activación partenogenética marginal (14%) (36).

Efecto del envejecimiento in vivo e in vitro de los ovocitos

El cultivo in vitro hace a los ovocitos menos propensos a la activación que el cultivo in vivo. El estudio de Abbott et al. (10) revela estas diferencias tanto en la activación espontánea como en la activación por tratamiento con ionóforo de calcio. Los porcentajes máximos de activación espontánea que consiguieron fueron 36% para ovocitos envejecidos in vivo hasta 22 h post-hCG y 2% para ovocitos extraídos 13-16 h post-hCG y envejecidos en cultivo in vitro durante 3-6 horas. Con el tratamiento de ionóforo de calcio, los porcentajes de activación fueron 75% de activación en ovocitos envejecidos in vivo y 25% en ovocitos envejecidos in vitro.

En los ovocitos envejecidos in vitro los niveles de actividad p34cdc2 y MAP quinasa se mantienen de forma más estable que in vivo, conservando un ambiente intracelular incompatible con procesos que llevan a estas células hacia la interfase, hecho correlacionado con el aumento de susceptibilidad a estímulos partenogenéticos.

Esta diferencia podría ser debida tanto a la presencia de factores en el oviducto que ponen en marcha estos procesos como a una inhibición de los mismos inducida por el ambiente de cultivo in vitro.

RESUMEN-CONCLUSIÓN

Se han estudiado muchos estímulos capaces de desencadenar la activación partenogenética de los ovocitos tanto in vivo como in vitro. En general, ya se trate de físicos o químicos, los estímulos se caracterizan por someter a estrés al ovocito, activar las rutas enzimáticas que se activan por fecundación normal o desactivar los factores que mantienen al ovocito estabilizado en la fase MII. La efectividad de cada estímulo depende de muchos factores como son la especie y cepa con la que se trabaja, el tiempo transcurrido desde la ovulación y el medio y las condiciones de cultivo del ovocito.

En el ratón, que es el animal de laboratorio con el que se han realizado más estudios de este tipo, se

puede alcanzar un alto porcentaje de activación partenogenética con casi todos los estímulos aplicados, especialmente los estímulos eléctricos y exposición a etanol, ciclohexamida, estroncio, ionóforos de calcio y cultivo en medio pobre en piruvato.

En la especie humana, de la cual se tiene también abundante información, se sabe que los ovocitos son muy difíciles de activar partenogenéticamente. Sólo unos pocos estímulos ofrecen frecuencias de activación significativamente altas. Estos son la exposición al ionóforo de calcio A23187 (sólo en ovocitos frescos), manitol y puromicina. Siendo este último el más efectivo para provocar la activación partenogenética tanto de ovocitos frescos como envejecidos.

Un factor muy importante que influye en el porcentaje de activación partenogenética es el envejecimiento del ovocito. Durante ese envejecimiento acontecen dentro del ovocito una serie de cambios que afectan a la estructura del citoesqueleto y los orgánulos, la expresión génica y la actividad enzimática. Uno de estos cambios enzimáticos es la fosforilación de la subunidad p34cdc2 del MPF, el cual es uno de los factores responsables del mantenimiento del ovocito en la fase MII. Cuando esa unidad se fosforila el MPF se inactiva. El grado de fosforilación es proporcional al envejecimiento del ovocito y se correlaciona con la facilidad de activación.

Sin embargo, los cambios que se producen durante el envejecimiento son distintos si éste se produce in vivo o in vitro. En los ovocitos envejecidos in vitro, los niveles de actividad p34cdc2 y MAP quinasa se mantienen estables y sus frecuencias de activación son mucho menores que las de los activados in vivo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido realizado gracias a la ayuda FIS 01/0138 concedidas por el "Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo".

BIBLIOGRAFÍA

1. **Poynter ME, Yvonne MWJ-H, Sylke B-H, Taatjes DJ, Mossman BT.**: Measurement of oxidant-induced signal transduction proteins using cell imaging. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1164-1172.
2. **Kurata S.**: Selective Activation of p38 MAPK Cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* 2000; 275: 23413-23416.
3. **Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M.**: Thiol

- Antioxidant, N-Acetylcysteine, Activates extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 789-794.
4. **Yu R, Tan T, Kong A-NT.:** Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1997; 272: 28962-28970.
 5. **Hashimoto N, Watanabe N, Furuta Y, Tamemoto H, Sagata N, Yokoyama M, Okazaki K, Nagayoshi M, Takeda N, Ikawa Y, Arzawa S.:** Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* 1994; 370: 68-71.
 6. **Colledge WH, Carlton MBL, Udy GB, Evans MJ.:** Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1994; 370: 65-67.
 7. **Vande Woude GF.:** On the loss of Mos. *Nature* 1994; 370: 20-21.
 8. **Marcus GJ.:** Activation of cumulus-free mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 159-162.
 9. **Chian RC, Sirad MA.:** Effects of cumulus cells and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 425-431.
 10. **Abbott AL, Xu Z, Kopf GS, Ducibella T, Schultz RM.:** In vitro culture retards spontaneous activation of cell cycle progression and cortical granule exocytosis that normally occur in vivo unfertilized mouse eggs. *Biol Reprod* 1998; 59: 1515-1521.
 11. **Graham CF.:** The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biol Rev* 1974; 49: 399-422.
 12. **Kaufman, M.H.:** The experimental production of mammalian parthenogenetic embryos. In *Methods in Mammalian Reproduction* 1978; 21-47, ed. by Daniel, J.C.
 13. **Whittingham DG.:** Parthenogenesis in mammals. *Oxford Rev Reprod Biol* 1980; 2: 205-231.
 14. **Muechler EK, Graham MC, Huang K-E, Partridge AB, Jones K.:** Parthenogenesis of human oocytes as a function of vacuum pressure. *J In Vitro Fert Embryo Trans* 1989; 6: 335-337.
 15. **Cuthbertson KSR.:** Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. *J Exp Zool* 1983; 226: 311-314.
 16. **Shaw JM, Trounson AO.:** Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2-propanediol is influenced by temperature, oocyte age, and cumulus removal. *Gamete Research* 1989; 24:269-279.
 17. **Johnson MH Pickering SJ, Braude PR, Vincent C, Cant A, Currie J.:** Acid Tyrode's solution can stimulate parthenogenetic activation of human and mouse oocytes. *Fertil Steril* 1990; 53:266-270.
 18. **Clarke HJ, Rossent J, Masui Y.:** Suppression of chromosome condensation during meiotic maturation induces parthenogenetic development of mouse oocytes. *Development* 1988; 104: 97-103.
 19. **Kim H, Schuetz AW.:** Regulation of parthenogenetic activation of metaphase II mouse oocytes by pyruvate. *J Exp Zool* 1991; 257:375-385.
 20. **Downs SM.:** Stimulation of parthenogenesis in mouse ovarian follicles by inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase. *Biol Reprod* 1990; 43:427-436.
 21. **Scott L, Smith S.:** Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos. *Fertil Steril* 1995; 63:166-175.
 22. **Moore GD, Kopf GS, Schultz RM.:** Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Dev Biol* 1993; 159: 669-678.
 23. **Macháty Z, Mayes MA, Prather RS.:** Parthenogenetic activation of porcine oocytes with guanosine-5'-O-(3'-thiotriphosphate). *Biol Reprod* 1995; 52: 753-758.
 24. **Kim J-H, Macháty Z, Cabot RA, Han Y-M, Do H-J, Prather RS.:** Development of pig oocytes activated by stimulation of an exogenous G protein-coupled receptor. *Biol Reprod* 1998; 59: 655-660.
 25. **Colonna R, Tatone C, Francione A, Rosati F, Callaini G, Corda D, Di Francesco L.:** Protein kinase C is required for the disappearance of MPF upon artificial activation in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 292-299.
 26. **Abramczuk JW, Lopata A.:** Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained in vitro. *Hum Reprod* 1990; 5: 578-581.
 27. **Onodera M, Tsunoda Y.:** Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation in vitro. *Gamete Research* 1989; 22: 277-283.
 28. **Sasagawa I, Yanamigachi R.:** Comparison of methods for activating mouse oocytes for spermatid nucleus transfer. *Zygote* 1996; 4: 269-274.
 29. **Loi P, Ledda S, Fulka J, Cappai P, Moor RM.:** Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol Reprod* 1998; 58: 1177-1187.
 30. **Marshall VS, Wilton LJ, Moore HDM.:** Parthenogenetic activation of marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of marmoset parthenogenones in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1998; 59: 1491-1497.
 31. **Inagaki N et al.:** Egg activation induced by osmotic pressure change and the effects of amiloride in the cryopreservation of mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* 1996; 11, 835-843.
 32. **Gook DA, Osborn SM, Johnston WIH.:** Parthe-

- nogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995; 10: 654-658.
33. **Nagai T.:** Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Research* 1987; 16: 243-249.
 34. **Johnson MH, Winston NJ, Pickering SJ, Braude PR.:** Parthenogenetic activation and development of human oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series* 1991; 7: 19.
 35. **Winston N, Johnson M, Pickering S, Braude P.:** Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. *Fertil Steril* 1991; 56: 904-912.
 36. **Balakier H, Casper RF.:** Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum Reprod* 1993; 8: 740-743.
 37. **Azuma T, Ikeda S, Kondo T, Imai H, Yamada M.:** Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid induces parthenogenetic activation of porcine oocytes at the germinal vesicle stage, leading to formation of blastocysts. *Biol Reprod* 2001; 64: 647-653.
 38. **Bos-Mikich AB, Swann K, Whittingham DG.:** Sr²⁺-induced parthenogenetic activation of mouse oocytes is enhanced by cyclohexamide. *Journal of reproduction and fertility. Abstract series* 1993; 12: 25.
 39. **Balakier H, Casper RF.:** Spontaneous and induced parthenogenetic activation of human oocytes. Abstracts of the 7th Annual Meeting of the ESHRE and the 7th World Congress of IVF and Assisted Procreations 1991; p. 230.
 40. **Taylor AS, Braude PR.:** The early development and DNA content of activated human oocytes and parthenogenetic human embryos. *Hum Reprod* 1994; 12: 2389-2397.
 41. **De Sutter P, Dozortsev D, Cieslak J, Wolf G, Verlinsky Y, Dyban A.:** Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *J Assist Reprod Genet* 1999; 9: 328-337.
 42. **Levron J, Cohen J, Willadsen S.:** Highly effective method of human oocyte activation. *Zygote* 1995; 3: 157-161.
 43. **Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Kaneko H, Tojo H.:** Maturation / M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro. *Cloning stem cells* 2002; 4: 211-221.
 44. **Alberio R, Kubelka M, Zakhartchenko V, Hajduch M, Wolf E, Motlik J.:** Activation of bovine oocytes by specific inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 422-432.
 45. **Kubelka M, Anger M, Pavlok A, Kalous J, Schultz RM, Motlik J.:** Activation of pig and cattle oocytes by butyrolactone I: morphological and biochemical study. *Zygote* 2002; 10: 47-57.
 46. **Jiang J-Y, Mizuno S, Mizutani E, Sasada H, Sato E.:** Parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 120-125.
 47. **Wang W, Sun Q, Hosoe M, Shioya Y.:** Calcium- and meiotic-spindle-independent activation of pig oocytes by the inhibition of staurosporine-sensitive protein kinases. *Zygote* 1997; 5: 75-82.
 48. **Prather RS, Mayes MA, Murphy CN.:** Parthenogenetic activation of pig eggs by exposure to protein kinase inhibitors. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 539-544.
 49. **Sun Q-Y, Luria A, Rubinstein S, Breitbart H.:** Protein kinase inhibitors induce the interphase transition by inactivating mitogen-activated protein kinase in mouse eggs. *Zygote* 1998; 6: 277-284.