

Biología de la Reproducción

Preparación de citoplastos receptores para transferencia nuclear mediante enucleación química de ovocitos

Preparation of recipient cytoplasts for nuclear transfer by chemical oocyte enucleation

Costa-Borges N¹, Santaló J¹, Ibáñez E¹

¹Dept. Biología Celular, Fisiología i Immunologia, Facultat de Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona

Resumen

La enucleación de ovocitos es un paso clave en la clonación por transferencia nuclear. El método de enucleación mecánica tradicional, aunque eficiente, es complejo y traumático para el ovocito. Como alternativa, los ovocitos se pueden enuclea químicamente. Tratando ovocitos en metafase II con antimitóticos se induce la formación de una protuberancia en la membrana del ovocito que facilita la eliminación mecánica de los cromosomas (enucleación químicamente asistida). Si el tratamiento antimitótico se aplica a ovocitos pre-activados toda la cromatina del ovocito es expulsada en el segundo corpúsculo polar, resultando el ovocito directamente enucleado (enucleación químicamente inducida). En este estudio se pretende optimizar la eficiencia de la enucleación químicamente asistida e inducida en ovocitos de ratón, utilizando distintos antimitóticos. En los experimentos de enucleación químicamente asistida, ovocitos de ratón CD-1 y B6CBAF1 fueron tratados con colcemid (0,4µg/ml), nocodazol (0,3 y 1µg/ml) o vinblastina (0,1µg/ml) durante 15, 30, 60 o 120 min, para determinar el tratamiento más eficaz en la formación de protuberancias. En los experimentos de enucleación químicamente inducida se utilizaron ovocitos de ratón CD-1, que se activaron con etanol, se trataron con colcemid (0,4µg/ml), nocodazol (0,3µg/ml), vinblastina (0,1µg/ml) o taxol (1µM) durante 15, 30 o 60 min y, posteriormente, se cultivaron en medio con cloruro de estroncio hasta completar la extrusión del segundo corpúsculo polar. Nuestros resultados indican que los antimitóticos colcemid, nocodazol y vinblastina, pueden ser utilizados con éxito tanto en protocolos de enucleación químicamente asistida como inducida de ovocitos de ratón. Las elevadas tasas de formación de protuberancias (>80%) y de ovocitos enucleados (~40%) obtenidos en los experimentos de enucleación químicamente asistida

Este trabajo ha sido financiado por la Universitat Autònoma de Barcelona (Proyecto para Grupos Emergentes, EME2004-24) y por el Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya (2005SGR-00437)

Correspondencia: Dra. Elena Ibáñez
Departament de Biologia Celular, Fisiologia i Immunologia
Unitat de Biologia Celular, Facultat de Ciències
Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona)
Email: elena.ibanez@uab.es

NOTA: Este trabajo fue incluido en el número anterior Vol. 23 N° 3- mayo-junio 2006 y debido a un error de imprenta volvemos a publicarlo íntegramente.

e inducida, respectivamente, demuestran que estos protocolos representan una alternativa simple al método tradicional de enucleación mecánica.

Palabras clave: Enucleación química. Antimitóticos. Clonación. Transferencia nuclear.

Summary

Oocyte enucleation is a key step in mammalian cloning by nuclear transfer. Traditional mechanical enucleation, although efficient, is technically demanding and clearly damaging to the oocyte. Alternatively, oocytes can be chemically enucleated. Treatment of metaphase II oocytes with antimetabolic agents induces the formation of a cortical protrusion which facilitates the mechanical removal of the chromosomes (chemically assisted enucleation). When the antimetabolic treatment is applied to pre-activated oocytes, all the chromatin of the oocyte is extruded inside the second polar body, producing an enucleated oocyte (chemically induced enucleation). The aim of the present study was to optimize the efficiency of chemically assisted and induced enucleation methods in mouse oocytes, using different antimetabolic drugs. In the chemically assisted enucleation experiments, CD-1 and B6CBAF1 oocytes were treated with demecolcine (0,4µg/ml), nocodazole (0,3 y 1µg/ml) or vinblastine (0,1µg/ml) for 15, 30, 60 or 120 min, in order to determine the best treatment for the formation of cortical protrusions. In the chemically induced enucleation experiments, CD-1 oocytes were first activated with ethanol, then treated for 15, 30 or 60 min with demecolcine (0,4µg/ml), nocodazole (0,3 y 1µg/ml), vinblastine (0,1µg/ml) or taxol (1µM), and finally cultured in a medium with strontium chloride until second polar body extrusion. Our results show that the antimetabolic drugs demecolcine, vinblastine and nocodazole can be successfully employed in both chemically assisted and chemically induced enucleation of mouse oocytes. The high rates of cortical protrusion formation (>80%) and of enucleated oocytes (~40%) obtained in the chemically assisted and chemically induced enucleation experiments, respectively, demonstrate that these protocols represent a simpler alternative to the traditional method of mechanical enucleation.

Key words: Chemical enucleation. Antimetotics. Cloning. Nuclear transfer.

INTRODUCCIÓN

La técnica de transferencia nuclear (NT) consiste en introducir el núcleo de una célula somática o embrionaria en el citoplasma de un ovocito enucleado, el cual es posteriormente activado partenogénicamente para iniciar el desarrollo embrionario (1). Los embriones generados pueden ser transferidos a una hembra receptora para la obtención de animales clónicos (clonación reproductiva) o bien utilizados para la derivación de células madre embrionarias (clonación terapéutica). La viabilidad de estas estrategias ha sido demostrada en los últimos años, mediante el nacimiento de animales clonados por NT de células somáticas de diferentes especies de mamífero (2) y mediante la derivación de distintas líneas de células madre embrionarias de ratón a partir de embriones generados por NT (3-5), que en un caso fueron utilizadas con éxito para la corrección de un defecto genético (6).

A pesar de los recientes avances, la eficiencia de la técnica de NT sigue siendo muy baja. Un bajo número

de los embriones reconstruidos por NT se desarrollan hasta blastocisto y, después de su transferencia, un porcentaje aún más bajo de estos blastocistos producen gestaciones que llegan a término. De hecho, la eficiencia global de la técnica, en términos de animales nacidos respecto a embriones reconstruidos, suele estar por debajo del 5% (2). Si bien todos los pasos de la técnica de NT pueden afectar el potencial de desarrollo de los embriones generados y, por tanto, deben ser optimizados, la enucleación de los ovocitos receptores es considerado como uno de los más complejos y cruciales (7). Después de la enucleación, el citoplasma resultante debe ser capaz de reprogramar el núcleo transferido y de permitir la activación y el posterior desarrollo del embrión (7, 8). En la mayoría de trabajos realizados hasta el momento, los citoplastos receptores se preparan a partir de ovocitos en metafase II (MII), que son enucleados por microaspiración de la placa metafásica. Este método mecánico de enucleación, aunque muy eficiente, es técnicamente complejo y traumático para el ovocito (8). Además, no solo se eliminan los cromosomas del ovocito sino también el huso meiótico y una

porción importante de citoplasma, lo que puede resultar en la eliminación de moléculas y factores esenciales para la reprogramación nuclear, la activación del ovocito y las primeras etapas del desarrollo embrionario (2). Por otro lado, en los ovocitos de la mayoría de especies domésticas, la imposibilidad de visualizar el huso meiótico al microscopio, debido a la presencia de grandes cantidades de lípidos citoplasmáticos, hace necesario teñir previamente los ovocitos con Hoechst 33342 para marcar la cromatina e irradiarlos con luz ultravioleta antes de realizar la microaspiración de los cromosomas. Esta irradiación, aunque breve, disminuye significativamente la capacidad de desarrollo embrionario debido a alteraciones en la membrana y en componentes intracelulares de los ovocitos, y también a lesiones en el DNA mitocondrial del citoplasto (9, 10) que pueden afectar el metabolismo del embrión reconstruido (11).

Con el objetivo de optimizar y simplificar la enucleación de los ovocitos, se han desarrollado varias alternativas a la enucleación mecánica tradicional (7, 8). Una de las más atractivas por su simplicidad técnica es la enucleación de los ovocitos mediante un tratamiento con agentes antimitóticos para inducir la despolimerización de los microtúbulos. El tratamiento de ovocitos en MII con antimitóticos induce la formación de una protuberancia en la superficie del ovocito que contiene los cromosomas compactados (12). Al ser visible al microscopio, esta protuberancia permite la fácil localización de los cromosomas y puede ser directamente eliminada por microaspiración para enuclear los ovocitos. El volumen citoplasmático que se pierde mediante este proceso, denominado enucleación químicamente asistida, es menor que con el método mecánico tradicional (13), no se elimina el huso meiótico ni los factores asociados a él y no es necesario teñir e irradiar los ovocitos, por lo que presumiblemente la competencia del citoplasto resultante no se verá tan afectada. Esta técnica ha sido aplicada en ovocitos de cerdo y de vaca, utilizando como antimitóticos el colcemid o el nocodazol, y ha permitido obtener vacas y cerdos clonados (12-14). Otra vertiente de la técnica de enucleación química, denominada enucleación químicamente inducida, consiste en aplicar el tratamiento con antimitóticos en ovocitos previamente activados, lo que afecta a la progresión meiótica normal del ovocito y provoca que toda la cromatina del ovocito resulte expulsada en el segundo corpúsculo polar (CP). El ovocito queda así directamente enucleado, con una pérdida mínima de volumen de citoplasma y sin la necesidad de aplicar técnicas de micromanipulación (15). Ovocitos de ratón, de cabra y de vaca han sido enucleados mediante

esta técnica con el uso del antimitótico colcemid (15-17), y su efectividad para la NT se demostró con la obtención de ratones clonados a partir de células del cúmulus y de células madre embrionarias (18, 19).

El objetivo del presente trabajo era investigar la efectividad de la técnica de enucleación químicamente asistida en ovocitos de ratón, donde esta técnica aún no ha sido probada, así como optimizar las técnicas de enucleación químicamente asistida y químicamente inducida en ovocitos de ratón mediante la evaluación de distintos agentes antimitóticos y distintos tiempos de tratamiento de los ovocitos. Los antimitóticos utilizados fueron el colcemid, nocodazol y vinblastina, que provocan la despolimerización de los microtúbulos. Además, en los experimentos de enucleación químicamente inducida se utilizó también el taxol, que al contrario de los anteriores actúa estabilizando los microtúbulos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de los ovocitos de ratón

Los ovocitos se obtuvieron de hembras de 6 a 12 semanas de edad de la cepa no consanguínea CD-1 y de la cepa híbrida B6CBAF1 (C57BL/6JxCBA7J), previamente sometidas a un protocolo de superovulación (5 IU de PMSG y 5 IU de hCG 48 h más tarde). Los ovocitos se recuperaron de los oviductos a las 14-15 h (en los experimentos de enucleación químicamente asistida) o a las 16-17 h (en los experimentos de enucleación químicamente inducida) después de la administración de hCG. Tras un breve tratamiento con hialuronidasa (156 U/ml) para dispersar las células del cúmulus, los ovocitos fueron lavados dos veces en medio de manipulación mKSOM-H (20) y se sometieron directamente a los tratamientos de enucleación químicamente asistida o inducida.

Enucleación químicamente asistida de ovocitos

Los ovocitos de ratón de la cepa CD-1 se trataron con los antimitóticos colcemid (0,4 µg/ml), nocodazol (0,3 y 1 µg/ml) o vinblastina (0,1 µg/ml), diluidos en medio de cultivo KSOMaag (20) durante 15, 30, 60 o 120 min a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los ovocitos de la cepa B6CBAF1 se sometieron únicamente a aquellos tratamientos que mejores resultados dieron en la cepa CD-1: colcemid 0,4 µg/ml o nocodazol 0,3 µg/ml durante 30 min y vinblastina 0,1 µg/ml o nocodazol 1 µg/ml durante 60 min.

Enucleación químicamente inducida de ovocitos

Estos experimentos se llevaron a cabo únicamente en ovocitos de la cepa CD-1. Los ovocitos se activaron por exposición a una solución de etanol 7% durante 5 min a 37°C. El momento de exposición de los ovocitos al etanol fue considerado el tiempo cero post-activación (p.a.). A los 5 min p.a. los ovocitos se lavaron en medio KSOMaag sin calcio (KSOMaag-Ca²⁺free), y se incubaron en presencia de los antimitóticos colcemid (0,4 µg/ml), nocodazol (0,3 µg/ml), vinblastina (0,1 µg/ml) o taxol (1 µM) durante 15, 30 o 60 min. Todos los antimitóticos fueron diluidos en medio KSOMaagCa²⁺free conteniendo 10 mM cloruro de estroncio (SrCl₂-KSOMaag-Ca²⁺free) para proseguir la activación de los ovocitos durante su tratamiento (21). Finalizado el tratamiento, los ovocitos fueron lavados en SrCl₂-KSOMaag-Ca²⁺free y cultivados en este medio sin antimitótico hasta completar las 2 horas p.a., tiempo necesario para que los ovocitos de ratón completen la extrusión del segundo CP (22).

Fijación de los ovocitos y análisis por inmunofluorescencia

Al finalizar el tratamiento de enucleación químicamente asistida o inducida, los ovocitos se fijaron durante 30 min a 37°C en fijador MTSB-XF (23) y posteriormente se guardaron a 4°C en solución block compuesta por 0,2% azida sódica, 1% BSA, 0,2% leche descremada en polvo, 2% suero de cabra inactivado, 0,1 M glicina y 0,01% Triton X-100 en PBS.

Los ovocitos fijados fueron posteriormente sometidos a un protocolo de triple tinción para la detección simultánea de los microtúbulos, los microfilamentos y la cromatina por microscopia de fluorescencia. En primer lugar se incubaron los ovocitos (1 h a 37°C) en una solución conjunta de anticuerpos de ratón anti- β -tubulina (dilución 1:1000). Tras dos lavados en solución block durante 10 min a 37°C, se incubaron (30 min a 37°C) en solución conjunta de anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (6 µg/ml) y de faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 (1,5 U/ml), para el marcaje de los microtúbulos y de los microfilamentos, respectivamente. Por último, los ovocitos fueron lavados dos veces en solución block e incubados (15 min a temperatura ambiente) en Hoechst 33258 (10 µg/ml) para teñir la cromatina. Seguidamente se montaron en un portaobjetos en una solución de 50% glicerol/PBS con 25 mg/ml de azida sódica.

Los ovocitos fueron analizados en un microscopio de epifluorescencia Olympus Bx60 equipado con fil-

tros específicos y un sistema de captura y análisis de imágenes (Software Genus, versión 3.0).

Análisis estadístico

Los distintos tratamientos de enucleación químicamente asistida o inducida fueron repetidos un mínimo de tres veces y se analizaron aproximadamente 50 ovocitos por grupo. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante Chi-cuadrado, y los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Enucleación químicamente asistida

Los ovocitos tratados se analizaron individualmente con respecto al grado de despolimerización de los microtúbulos del huso meiótico, a la distribución y grado de compactación de los cromosomas y la presencia o no de una protuberancia en la superficie del ovocito. En función de su tamaño, las protuberancias se clasificaron en tipo A o B (Figura 1). Las protuberancias de tipo A comprenden una área relativamente extensa de la membrana del ovocito que se proyecta ligeramente hacia el espacio perivitelino. Las protuberancias de tipo B son más pronunciadas, con un área de proyección más delimitada y con un menor volumen que las de tipo A. En los dos tipos de protuberancias, los cromosomas se localizan en su interior, generalmente en forma de una masa compacta.

Independientemente del antimitótico utilizado, a los 15 min de tratamiento los ovocitos CD-1 presentaban un huso meiótico poco despolimerizado, con una densidad de tubulina más reducida en la parte central del huso, y los cromosomas poco compactados. Un 27,5%-50% (dependiendo del antimitótico aplicado) de estos ovocitos presentaban protuberancias, que mayoritariamente eran de tipo A (80%-92,9%; Figura 2). Al aumentar la duración del tratamiento con antimitótico hasta 30 o 60 min, los ovocitos presentaban ya el huso meiótico prácticamente despolimerizado y los cromosomas en forma de una masa compacta. Estos tratamientos resultaron ser los más eficaces en la formación de protuberancias (Figura 2). Concretamente, los porcentajes de ovocitos con protuberancia en los tratamientos de 30 min con colcemid (84%) y con nocodazol 0,3 µg/ml (81%) fueron significativamente superiores a los obtenidos con los tratamientos de 15, 60 y 120 min con estas mismas drogas (26,3%-61,2%). En el caso de la

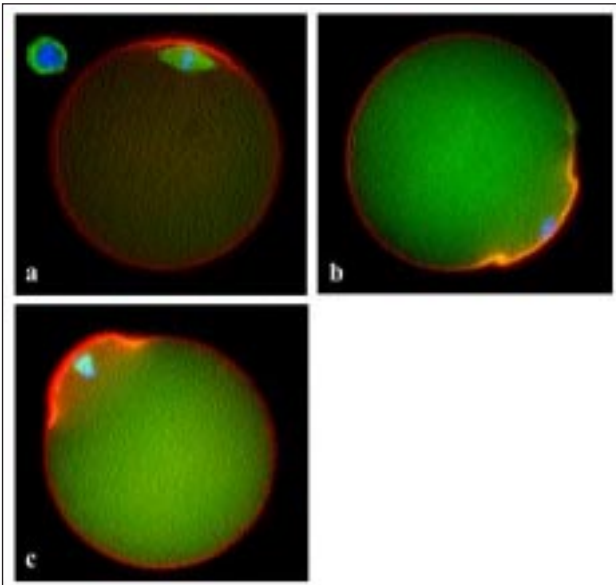


Figura 1

Ovocitos de ratón de la cepa B6CBAF1 fijados en un experimento de enucleación químicamente asistida. (a) Ovocito control en MII, no tratado con antimetabólico, con el huso meiótico intacto y los cromosomas en la placa ecuatorial. (b) Ovocito tratado con antimetabólico, con el huso meiótico despolimerizado y los cromosomas compactados dentro de una protuberancia de tipo A. (c) Ovocito tratado con antimetabólico con el huso despolimerizado y los cromosomas compactados dentro de una protuberancia de tipo B. Los microtúbulos se muestran en verde, los microfilamentos en rojo y la cromatina en azul.

vinblastina y el nocodazol 1 $\mu\text{g/ml}$, los tratamientos más eficientes en cuanto a inducción de protuberancias fueron los de 60 min (84% y 80%, respectivamente), aunque las diferencias respecto a los tratamientos de 30 min (66% y 68%, respectivamente) no fueron estadísticamente significativas (Figura 2). Independientemente del antimetabólico usado, aproximadamente el 50% (42,5%-57,6%) de las protuberancias formadas a los 30 y 60 min de tratamiento eran de tipo B. Aunque los tratamientos de 60 min con vinblastina y con nocodazol 1 $\mu\text{g/ml}$ fueron significativamente superiores a los tratamientos de igual duración con colcemid y nocodazol 0,3 $\mu\text{g/ml}$ en la formación de protuberancias, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos antimetabólicos en los tratamientos de 30 min.

Al incrementar el tiempo de tratamiento hasta 120 min, se observó una disminución significativa del número de ovocitos con protuberancia para todos los

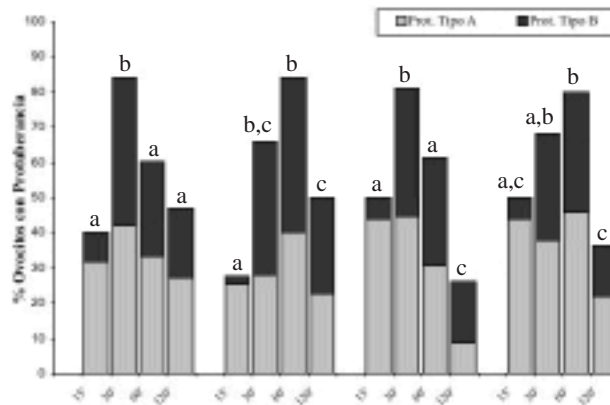


Figura 2

Porcentaje de ovocitos con protuberancia y tipo de protuberancia en ovocitos MII de ratón de la cepa CD-1 sometidos a diferentes tratamientos con antimetabólicos. Las diferentes letras en la parte superior de las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) respecto al porcentaje total de ovocitos con protuberancia entre los diferentes tiempos de tratamiento aplicados para cada antimetabólico.

antimetabólicos utilizados con respecto a los tratamientos de 30 y de 60 min (Figura 2), aunque los porcentajes relativos de protuberancias de tipo A o tipo B seguían manteniéndose alrededor del 50%. Aproximadamente el 50% de los ovocitos tratados con antimetabólico durante 120 min presentaban los cromosomas dispersos por todo el citoplasma, hecho no observado en los tratamientos más cortos.

En un estudio anterior se había demostrado un claro efecto del fondo genético de los ovocitos en la eficiencia de enucleación inducida por el antimetabólico colcemid, comparando los resultados obtenidos en ovocitos de dos cepas distintas de ratón (15). Así, para determinar si la eficiencia de formación de protuberancias también podía verse influida por el fondo genético de los ovocitos, los tratamientos más eficientes en los ovocitos de la cepa CD-1 se probaron en ovocitos de la cepa B6CBAF1. La comparación estadística entre los resultados obtenidos en las dos cepas de ratón para un mismo tratamiento indicó que, en el caso de la enucleación químicamente asistida, el fondo genético no parece ser tan importante, pues no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ni en cuanto al porcentaje de ovocitos con protuberancia ni en cuanto a la tendencia para formar protuberancias de tipo A o tipo B, excepto para el tratamiento con nocodazol 1 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 1). En este caso, el porcentaje de ovocitos con protuberancia en

Tabla 1

Comparación de la tasa de formación y del tipo de protuberancias inducidas en los experimentos de enucleación químicamente asistida entre ovocitos de ratón de las cepas CD-1 y B6CBAF1.

Tratamiento	Cepa	n	% Ovocitos (n)		
			Sin Protuberancia	Protuberancia Tipo A	Protuberancia Tipo B
Colcemid 0,4 µg/ml 30 min	CD-1	50	16% (8)	42% (21)	42% (21)
	B6CBAF1	52	28,8% (15)	28,8% (15)	42,4% (22)
Vinblastina 0,1 µg/ml 60min	CD-1	50	16% (8)	40% (20)	44% (22)
	B6CBAF1	55	25,5% (14)	21,8% (12)	52,7% (29)
Nocodazol 0,3 µg/ml 30 min	CD-1	58	19% (11)	44,8% (26)	36,2% (21)
	B6CBAF1	49	28,6% (14)	40,8% (20)	30,6% (15)
Nocodazol 1 µg/ml 60 min	CD-1	50	20% (10) a	46% (23) a	34% (17)
	B6CBAF1	65	53,8% (35) b	18,5% (12) b	27,7% (18)

a,b Los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las dos cepas de ratón para cada una de las categorías y tratamientos.

la cepa B6CBAF1 (46,2%) fue significativamente inferior al obtenido en los ovocitos de la cepa CD-1 (80%), aunque el porcentaje de ovocitos con protuberancia de tipo B fue equivalente en las dos cepas (27,7% y 34%, respectivamente).

Enucleación químicamente inducida

En los experimentos de enucleación químicamente inducida, los ovocitos tratados fueron analizados por lo que respecta al grado de polimerización o despolimerización de los microtúbulos, al grado de rotación del huso meiótico, a la expulsión total o parcial del segundo CP, y a la presencia o no de toda la cromatina del ovocito dentro del segundo CP. En función de estos dos últimos parámetros, los ovocitos se clasificaron como enucleados o no enucleados (Figura 3). Así, los ovocitos se consideraron como enucleados solo cuando toda la cromatina del ovocito se encontraba en el interior del segundo CP y la extrusión de este era completa. En estos ovocitos no se había producido la rotación del huso meiótico y los restos de este se encontraban en el interior del segundo CP, junto con la cromatina. El segundo CP podía ser único (Figura 3d) o doble (Figura 3e) y de distintos tamaños.

La exposición corta (15 min) de los ovocitos preactivados a la vinblastina o al nocodazol resultó ser el tratamiento más eficiente, con una media final del 40,4% y del 35% de ovocitos enucleados, respectivamente (Figura 4). El aumento del tiempo de trata-

miento de 15 a 30 o 60 min resultó en una disminución de la eficiencia, que solo resultó significativa en los tratamientos con vinblastina. Con el colcemid, los porcentajes más elevados de ovocitos enucleados se obtuvieron con los tratamientos de 15 min (15,9%) y 30 min (19,5%), mientras en los tratamientos de 60 min se observó una disminución significativa del número de ovocitos enucleados (3,6%). Finalmente, con el taxol, todos los tratamientos resultaron ser poco eficientes, con tasas de enucleación prácticamente nulas (0%-2,4%). No se observó en ningún caso una relación entre el tipo de antimetabólico usado o la duración del tratamiento y la morfología o el tamaño del segundo CP extruído.

DISCUSIÓN

Se había demostrado previamente que el tratamiento de ovocitos en MII de cerdo (12,13) o de vaca (14,24) con colcemid o nocodazol induce la formación de una protuberancia en la superficie del ovocito, lo que facilita la eliminación mecánica de los cromosomas. Los porcentajes de formación de protuberancias descritos en estos trabajos fueron superiores al 70% en ovocitos de cerdo (12, 13) y de alrededor del 90% en ovocitos de vaca (14, 24). Uno de los objetivos de nuestro trabajo era comprobar la eficacia de estos tratamientos de enucleación químicamente asistida en ovocitos de ratón, una especie donde todavía no habían sido aplicados. Al mismo tiempo, se

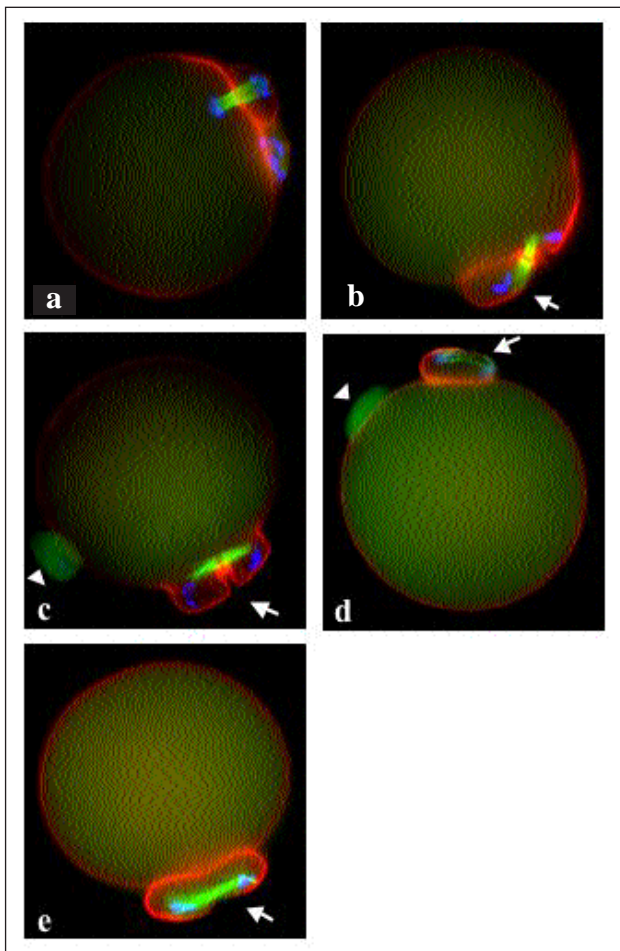


Figura 3

Ovocitos de ratón de la cepa CD-1 fijados a las 2 h post activación. (a) Ovocito control activado y no tratado con antimitótico, con el huso meiótico perpendicular a la superficie (rotado) y un segundo CP totalmente extruído que contiene la mitad de la cromatina y del huso meiótico del ovocito. (b) Ovocito tratado con antimitótico y no enucleado, con un segundo CP totalmente extruído que contiene la mitad de la cromatina y del huso meiótico del ovocito, en este caso paralelo a la superficie del ovocito (no rotado). (c) Ovocito tratado con antimitótico y no enucleado, con toda la cromatina y los restos del huso meiótico (no rotado) incluidos en un segundo CP doble parcialmente extruído. (d) Ovocito tratado con antimitótico y enucleado, con un segundo CP totalmente extruído que contiene dos grupos de cromosomas conectados por los restos del huso meiótico, no rotado. (e) Ovocito tratado con antimitótico y enucleado, con toda la cromatina y los restos del huso meiótico, no rotado, incluidos en un segundo CP doble y totalmente extruído. Los microtúbulos se muestran en verde, los microfilamentos en rojo y la cromatina en azul. Las flechas indican el segundo CP mientras que las cabezas de flecha indican el primer CP, aún visible en algunos ovocitos.

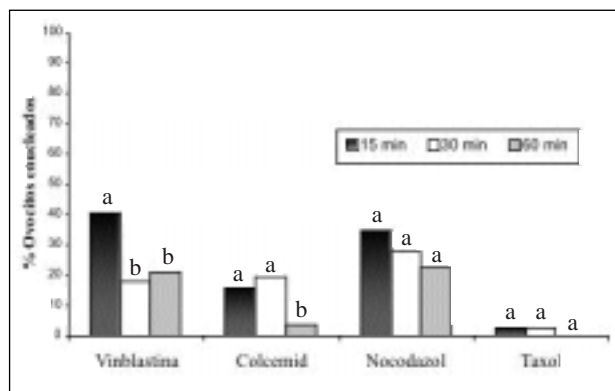


Figura 4

Porcentaje de ovocitos de ratón CD-1 enucleados después de su activación y tratamiento con antimitóticos. Las diferentes letras en la parte superior de las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre tiempos de tratamiento para cada antimitótico usado.

pretendía averiguar si existen diferencias en la eficiencia del tratamiento en función del antimitótico utilizado y del tiempo de tratamiento de los ovocitos y también entre ovocitos de la misma especie con fondos genéticos distintos, tal como se había descrito anteriormente para los tratamientos aplicados en ovocitos de ratón pre-activados (15).

Los resultados obtenidos indican que la exposición de los ovocitos de ratón a agentes antimitóticos induce la formación de protuberancias corticales, de manera similar a lo que ocurre con los ovocitos de cerdo y de vaca, y que la tasa de formación de protuberancias no se ve afectada por el tipo de antimitótico utilizado ni por la cepa de los ovocitos de ratón. En cambio, el tiempo de tratamiento de los ovocitos con el antimitótico influye claramente en la eficiencia de formación de protuberancias, siendo los tratamientos más efectivos los de 30 o 60 min de duración. Curiosamente, los tratamientos más prolongados (120 min) resultaron en una disminución del porcentaje de ovocitos con protuberancias, probablemente a consecuencia de la dispersión de los cromosomas. Por otro lado, en los tratamientos con nocodazol, tampoco se detectaron diferencias en las tasas máximas de formación de protuberancias en función de la concentración de antimitótico utilizada, si bien el tiempo de tratamiento necesario para conseguir estas elevadas tasas si varió en función de la concentración utilizada (30 min para nocodazol 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y 60 min para nocodazol 1 $\mu\text{g/ml}$).

Los porcentajes máximos de ovocitos de ratón con protuberancias obtenidos en este trabajo (80-84%)

fueron similares a los porcentajes máximos descritos anteriormente en ovocitos de vaca y de cerdo (12-14, 24). El tipo de protuberancias formadas (A o B) tampoco parece depender del antimitótico utilizado, de su concentración o de la cepa de los ovocitos, pero sí del tiempo de tratamiento. Así, los porcentajes más elevados de ovocitos con protuberancias de tipo B, que son las más interesantes para la técnica de NT por su facilidad de localización y su pequeño volumen, se obtuvieron con los tratamientos de 30 y 60 min, con un máximo del 52,7% del total de ovocitos tratados.

La utilidad del antimitótico colcemid para la enucleación químicamente inducida de ovocitos había sido demostrada en ovocitos de ratón, de cabra y de bovino, con tasas de enucleación del 20%, 36% y 46%, respectivamente (15-17). La obtención de ratones clonados a partir de la transferencia de núcleos de células del cúmulus (18) y de células madre embrionarias (19) a ovocitos enucleados químicamente con colcemid, demostró la eficiencia de esta técnica, no invasiva, para la clonación por NT.

En nuestro trabajo, pretendíamos verificar si además del colcemid, los antimitóticos vinblastina, nocodazol o taxol, podían también ser utilizados en la enucleación químicamente inducida de ovocitos de ratón. El colcemid y el nocodazol, con mecanismos de actuación semejantes, se unen específicamente a los dímeros libres de α/β -tubulina, impidiendo su polimerización, lo que comporta la despolimerización de los microtúbulos. La vinblastina provoca también la despolimerización de los microtúbulos, induciendo la formación de agregados paracrystalinos de tubulina. El taxol, sin embargo, actúa de modo contrario, uniéndose a la β -tubulina polimerizada y promoviendo la estabilización de los microtúbulos del huso meiótico (25). En los trabajos previos con colcemid, quedó demostrado que la eficiencia de la técnica de enucleación inducida depende tanto del tiempo de exposición de los ovocitos al colcemid, como del momento en que este tratamiento se inicia después de la activación de los ovocitos. En ratón, los mejores resultados se obtuvieron cuando los tratamientos eran empezados inmediatamente después de la activación (15). También se concluyó que la progresión meiótica de los ovocitos activados no es interrumpida por el tratamiento con colcemid, pero que las tasas de enucleación están limitadas por el efecto negativo de este en la extrusión completa del segundo CP. En nuestro trabajo, demostramos como, además del colcemid, también la vinblastina o el nocodazol son eficaces en la preparación de ovocitos enucleados de ratón. Los tratamientos más cortos (15 min) con vinblastina o nocodazol, con tasas máximas de enucleación del

40,4% y del 35%, respectivamente, resultaron incluso ser bastante superiores a las máximas obtenidas con colcemid en nuestro estudio (19,5%) y en los estudios previos (20%; 15). La inhibición de la rotación del huso meiótico durante la progresión meiótica y la despolimerización parcial de este, son mecanismos de actuación comunes a estas tres drogas. Al contrario, la gran mayoría de los ovocitos tratados con taxol presentaban el huso meiótico totalmente polimerizado y perpendicular a la superficie del ovocito, lo que parece estar relacionado con las bajas tasas de enucleación logradas con esta droga. Ya anteriormente, el taxol había sido probado en la enucleación inducida de ovocitos de ratón y los resultados finales (3,4% de enucleados) fueron igualmente muy bajos (18). Por lo que respecta al fenotipo del segundo CP en los ovocitos enucleados, este no parece depender del tipo de antimitótico usado ni de la duración del tratamiento. El momento de exposición de los ovocitos al antimitótico, relativo al estado de progresión meiótica en que se encuentre cada ovocito, puede ser el factor determinante para que se forme un segundo CP único o bien doble.

En conclusión, los antimitóticos colcemid, nocodazol y vinblastina, utilizados en el presente trabajo, son igualmente efectivos en la inducción de la formación de protuberancias corticales en los ovocitos de ratón, con tasas superiores al 80%. En cambio, para la enucleación químicamente inducida, la vinblastina y el nocodazol son los más eficientes, con tasas de enucleación máximas del 40%, considerablemente superiores a la descrita en la bibliografía utilizando el colcemid. En ambos tipos de tratamientos la eficiencia se ve claramente afectada por el tiempo de exposición de los ovocitos a los agentes antimitóticos. Si bien el tratamiento de los ovocitos con colcemid no parece comprometer su potencial de desarrollo después de la NT, como demuestra el nacimiento de ratones, vacas y cerdos clonados a partir de ovocitos tratados con este antimitótico (12-14, 18, 19), el efecto de los tratamientos con vinblastina o nocodazol se desconoce por el momento y debe ser comprobado antes de su aplicación para la preparación de citoplastos receptores para NT. Estos estudios se están llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio. Por otro lado, la aplicación generalizada de la técnica de enucleación químicamente inducida requiere llevar a cabo más estudios con el objetivo de incrementar las tasas de enucleación. Sin embargo, hasta que esto se consiga, sería posible incrementar significativamente el número de ovocitos enucleados mediante la eliminación mecánica del segundo CP en aquellos ovocitos donde su extrusión no se ha completado.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH.**: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
2. **Campbell KH, Alberio R, Choi I, Fisher P, Kelly RD, Lee JH, Maalouf W.**: Cloning: eight years after Dolly. *Reprod Domest Anim* 2005; 40: 256-68.
3. **Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, Trounson AO, Pera MF, Mountford PS.**: Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. *Curr Biol* 2000; 10: 989-992.
4. **Wakayama T, Tabar V, Rodríguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P.**: Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 2001; 292: 740-743.
5. **Wakayama S, Ohta H, Kishigami S, Thuan NV, Hikichi T, Mizutani E, Miyake M, Wakayama T.**: Establishment of male and female nuclear transfer embryonic stem cell lines from different mouse strains and tissues. *Biol Reprod* 2005; 72: 932-936.
6. **Rideout WM, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R.**: Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002; 109: 17-27.
7. **Fulka J Jr, Loi P, Fulka H, Ptak G, Nagai T.**: Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 279-283.
8. **Li GP, White KL, Bunch TD.**: Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: State of the art. *Cloning Stem Cells* 2004; 6: 5-13.
9. **Smith LC.**: Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 39-44.
10. **Dominko T, Chan A, Simerly C, Luetjens CM, Hewitson L, Martinovich C, Schatten G.**: Dynamic imaging of the metaphase II spindle and maternal chromosomes in bovine oocytes: implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis, and successful embryogenesis. *Biol Reprod* 2000; 62: 150-154.
11. **Velilla E, López-Bejar M, Rodríguez-González E, Vidal F, Paramio MT.**: Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Zygote* 2002; 10: 201-208.
12. **Yin XJ, Tani T, Yonemura I, Kawakami M, Miyamoto K, Hasegawa R, Kato Y, Tsunoda Y.**: Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod* 2002; 67: 442-446.
13. **Kawakami M, Tani T, Yabuuchi A, Kobayashi T, Murakami H, Fujimura T, Kato Y, Tsunoda Y.**: Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the developmental potential of nuclear transferred porcine oocytes. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 379-387.
14. **Vajta G, Lewis IM, Trounson AO.**: Hand-made somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency in vitro. *Biol Reprod* 2003; 68: 571-578.
15. **Ibáñez E, Albertini DF, Overström EW.**: Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. *Biol Reprod* 2003; 68: 1249-1258.
16. **Ibáñez E, Sanfins A, Combelles C, Albertini DF, Overström EW.**: Induced enucleation of mouse and goat oocytes: kinetic and phenotypic characterizations. *Theriogenology* 2002; 57: 421.
17. **Fischer-Russell D, Ibáñez E, Albertini DF, Overström EW.**: Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 161-170.
18. **Baguisi A, Overström EW.**: Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 2000; 54: 209.
19. **Gasparrini B, Gao S, Ainslie A, Fletcher J, McGarry M, Ritchie WA, Springbett AJ, Overström EW, Wilmot I, De Sousa PA.**: Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol Reprod* 2003; 68: 1259-1266.
20. **Biggers J, McGuinnis LK, Raffin M.**: Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free KSOM. *Biol Reprod* 2000; 63: 281-293.
21. **Loren J, Lacham-Kaplan O.**: The employment of strontium to activate mouse oocytes: effects on spermatid-injection outcome. *Reproduction* 2006; 131: 259-267.
22. **Ibáñez E, Albertini DF, Overström EW.**: Effect of genetic background and activating stimulus on the timing of meiotic cell cycle progression in parthenogenetically activated mouse oocytes. *Reproduction* 2005; 129: 27-38.
23. **Messinger SM, Albertini DF.**: Centrosome and microtubule dynamics during meiotic maturation of the mouse oocyte. *J Cell Sci* 1991; 100: 289-298.
24. **Vajta G, Maddox-Hyttel P, Skou CT, Tecirlioglu RT, Peura TT, Lai L, Murphy CN, Prather RS, Kragh PM, Callesen H.**: Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2005; 17: 791-797.
25. **Chen J-G, Horwitz SB.**: Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and destabilizing drugs. *Cancer Research* 2002; 62: 1935-1938.