

Evaluación de la enucleación asistida por demecolcina como método para evitar la exposición a luz UV en la producción de embriones bovinos por técnica de clonación

MORO, L.N.¹; VICHERA, G.¹; OLIVERA, R.¹; SALAMONE, D.¹

Resumen

La clonación es una técnica con gran potencial científico y económico, aunque aún ineficiente. La luz ultravioleta (UV) utilizada durante la enucleación del ovocito genera cambios estructurales y funcionales, afectando la viabilidad de los embriones reconstituidos. El inhibidor de microtúbulos demecolcina (DMC) permite generar una protrusión visible conteniendo al núcleo del ovocito, evitando la utilización de luz UV para su ubicación y extracción. Inicialmente los ovocitos fueron tratados con 0,4µg/ml DMC durante toda la maduración *in vitro* (24h) o desde las 21h, obteniendo un 61,4% y 87% de núcleos ubicados en protrusión, respectivamente. En un segundo experimento los ovocitos fueron tratados con 0,4 µg/ml DMC luego de exposición a ionomicina, logrando un 52,7% de eficiencia. Finalmente, se extrajeron los núcleos de ovocitos con protrusión generados con el mejor tratamiento (DMC21h), sin exponerlos a radiación UV. Cada ovocito enucleado sin zona pelúcida fue electro-fusionado con una blastómera de un embrión FIV de 8 células. El grupo control no se expuso a DMC y se utilizó luz UV en la enucleación. No hubo diferencias estadísticas en las tasas de clivaje (67% vs 76%) ni de blastocistos (7,4% vs 3,8%) entre ambos grupos, aunque con el nuevo tratamiento la enucleación resultó técnicamente más sencillo.

Palabras clave: (clonación), (demecolcina), (radiación ultravioleta), (protrusión).

¹Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires.
E-mail: salamone@agro.uba.ar

Recibido: 01-11-2010 - Aceptado: 05-01-2011

Evaluation of demecolcine assisted enucleation as a method to avoid the UV exposure in the bovine embryos production by cloning

Summary

Cloning is a powerful scientific and economical tool, though inefficient. The ultraviolet irradiation (UV) used for oocytes enucleation generates structural and functional changes, affecting the viability of reconstructed embryos. The microtubule inhibitor demecolcine (DMC) permits the production of a cytoplasmic protrusion containing the oocyte nucleus, avoiding the UV irradiation for its identification and removal. Initially, oocytes were exposed to 0,4µg/ml DMC during whole *in vitro* maturation (24h) or after 21h, obtaining 61,4% and 87% of the nuclei inside a visible protrusion, respectively. In a second experiment oocytes were incubated in 0,4µg/ml DMC after ionomycin exposure, with 52,7% efficiency. Finally, protrusion nuclei formed after the best treatment (DMC21h) were removed, without UV radiation. Each enucleated and zona pelucida free oocyte was electro-fused with a blastomere from a 8 cell IVF embryo. Control group was not exposed to DMC and UV was used for the enucleation procedure. No statistical differences were observed in cleavage (67% vs 76%) nor in blastocyst rates (7,4% vs 3,8%) between both groups, although enucleation was technically easier using the new treatment

Key words: (cloning), (demecolcine), (ultraviolet radiation), (protrusion).

Introducción

La clonación es una técnica de reproducción asistida que permite la generación de animales idénticos a partir de un único ejemplar, pudiendo ser este de alto valor genético. Es una herramienta muy poderosa en investigación básica debido a que facilita el estudio de diferentes procesos del desarrollo embrionario y de la reprogramación nuclear¹⁶. Por otra parte, se ha demostrado que la clonación puede contribuir en la preservación de animales en peligro de extinción⁵ y también en la generación de animales genéticamente modificados con aplicaciones en diversas áreas como, biomedicina^{20,2}, agricultura²⁷ y producción farmacéutica^{29,17}.

A pesar del gran potencial de la técnica de transferencia nuclear y las múltiples variantes que han sido desarrolladas, ésta continúa siendo muy ineficiente. Las tasas de nacimiento de animales clonados son extremadamente bajas (típicamente no superan el 2%¹⁰) y la mayoría de los embriones/fetos que componen el 98% restante, mueren en diferentes estadios de desarrollo²⁸.

El proceso de clonación cuenta con un paso crítico que es la remoción del material genético del ovocito recipiente (denominado enucleación). Para visualizar el material genético éste debe ser expuesto a intercalantes de ADN fluorescentes, y posteriormente a luz ultravioleta (UV) para poder realizar la enucleación mediante micromanipulación⁴. Está reportado que la exposición a este tipo de radiación genera cambios estructurales y funcionales en la célula y sus organelas, debido a sus efectos ionizantes sobre macromoléculas esenciales como el ADN¹², la membrana lipídica y las proteínas^{11,19}. A pesar de extraerse el ADN nuclear en la clonación, el ADN mitocondrial (ADNmt) se mantiene durante el desarrollo del embrión por lo que debería evitarse su alteración por radiación. Por este motivo, la viabilidad de los embriones reconstituidos por transferencia nuclear se ve comprometida cuando el ovocito ha sido expuesto por tiempos prolongados a luz UV^{24,30,7}.

Debido a los efectos perjudiciales de la radiación UV utilizada durante el procedimiento de enucleación, se han desarrollado alternativas

menos invasivas para el ovoplasto recipiente, como la centrifugación²¹, la enucleación química⁶ y la enucleación químicamente asistida²³.

Diferentes grupos evaluaron la capacidad del inhibidor de microtubulos demecolcina (DMC) para asistir la enucleación del ovocito. Está demostrado para el bovino²⁶, porcino^{13,15} y ovino⁹ que el tratamiento de ovocitos con demecolcina durante la maduración *in vitro* induce la formación de una protrusión conteniendo el núcleo, la cual puede ser fácilmente removida por aspiración sin necesidad de exponerlo a luz UV.

El objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de DMC para realizar enucleación químicamente asistida durante el proceso de transferencia nuclear, sin exponer a los ovocitos a luz UV, y evaluar el desarrollo embrionario respecto a la técnica de clonación tradicional.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Con el objetivo de situar al núcleo del ovocito en una protrusión citoplasmática, se diseñaron dos estrategias (Experimento 1 y 2): **Experimento 1: Inhibición de microtúbulos durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.** Los ovocitos fueron expuestos al inhibidor de microtúbulos demecolcina desde el inicio de la maduración *in-vitro* (Grupo DMC+0) o a partir de las 21 h (Grupo DMC+21). Cumplidas las 24 h de maduración, se los tiñó con Hoechst 33342 y se evaluó la ubicación del núcleo y la formación de la protrusión bajo microscopio de fluorescencia.

Experimento 2: Inhibición de microtúbulos durante la activación partenogenética de ovocitos bovinos. Los ovocitos maduros, fueron incubados con DMC y cicloheximida (CHX) luego de su exposición a ionomicina, la cual promueve la liberación del segundo corpúsculo polar. Transcurridas 4 h de incubación se los tiñó con Hoechst 33342 y se evaluó la ubicación del núcleo y la formación de la protrusión bajo microscopio de fluorescencia.

Experimento 3: Clonación por transferencia nuclear de blastómeras y sin utilización de luz ultravioleta. El tratamiento más efectivo (Grupo DMC+21) se aplicó para realizar enucleación sin luz UV. Los ovocitos tratados con DMC desde las 21 h hasta las 24 h de maduración fueron enucleados extrayendo la protrusión formada que contiene al núcleo. Los citoplastos liberados de su zona pelúcida fueron fusionados con blastómeras donantes de núcleo procedentes de embriones de 8 células generados por fertilización *in vitro* (FIV).

Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de la Compañía Sigma (St. Louis MO, EEUU), excepto donde se especifique lo contrario.

Colecta de complejos ovocitos-células del *cumulus* y maduración *in vitro*

Ovarios obtenidos de mataderos bovinos locales fueron transportados hasta el laboratorio y conservados a una temperatura de entre 25°-29°C. El tiempo estimado entre la faena y la llegada de los ovarios al laboratorio varió entre 2 y 5 horas. Los complejos ovocitos-células del *cumulus* (COCs), fueron recuperados mediante punción de folículos ováricos de 2 a 8 mm de diámetro. Para este procedimiento se utilizó una aguja 18 G acoplada a una jeringa de 10 ml, cargada con aproximadamente 0,5 ml de medio de búsqueda: buffer Hepes Tyrode conteniendo albúmina bovina, lactato y piruvato (TALP-H1). Para la maduración *in-vitro*, se seleccionaron aquellos COCs que presentaban al menos 3 capas de *cumulus* compacto rodeando al ovocito y con citoplasma homogéneo. El medio de cultivo empleado para la maduración ovocitaria fue TCM-199 (31100-035; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), suplementado con 2mM de glutamina (G8540), 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 µg/ml de Hormona Folículo Estimulante (FSH, NIH-FSH-P1, Folltropin®, Bioniche, Belleville, ON, Canada), 100 mM de cisteamina (M9768) y 0.3 mM de piruvato de sodio (P2256). Para la maduración los ovocitos fueron incubados en gotas de 100 µl de medio

de cultivo, a las que se cubrió con aceite mineral (M8410). Las condiciones de maduración *in vitro* fueron 6.5% de CO₂ a 39°C en atmósfera humidificada, durante 24 hs. Para la realización del primer experimento las gotas de maduración fueron suplementadas con 0.4 µg/ml¹³ de DMC (D1925) desde la hora 0 y a partir de la hora 21 de maduración *in vitro*.

En todos los casos, luego del tiempo de maduración los COCs fueron colocados en 200 µl de hialuronidasa (H4272) (1 mg/ml TALP-H). Se los sometió a agitación mecánica durante 3 min en esta solución para lograr la separación de las células del *cumulus* y posteriormente se realizaron tres lavados en TALP-H.

Activación partenogénica

La activación química se realizó con 5 µM ionomicina (Io; I24222; Invitrogen, Eugene, Oregon, EEUU) en TALP-H incubando los ovocitos seleccionados durante 4 minutos a resguardo de la luz y a temperatura constante de 35°C. Transcurrido ese tiempo, se realizaron 3 enjuagues con TALP-H y luego se los trató por 4 hs en 0,4 µg/ml DMC y 10 µg/ml cicloheximida (CHX; C7698).

Presencia de protrusión y ubicación del núcleo

La evaluación del estadio meiótico se realizó a las 24 h de maduración o a las 4 hs post-ionomicina. En ambos casos, los ovocitos fueron incubados con Hoechst Bisbenzimidazol 33342 (B-2261) (colorante vital cromatínico) (1 µg/ml) en medio TCM-199 suplementado como descrito para maduración, durante 15 minutos a 39°C en estufa gaseada y humidificada. Para su estudio, los ovocitos fueron depositados en gotas de TALP-H cubiertas con aceite mineral y evaluados en microscopio de epifluorescencia invertido Nikon modelo Eclipse Diaphot TE-300 (Nikon, NY, EEUU) bajo luz ultravioleta (UV).

Fertilización *in-vitro*

Para cada procedimiento se utilizaron 2 pajuelas de semen criopreservado en nitrógeno

líquido, las cuales fueron descongeladas en agua a 37°C durante 30 seg. El semen fue centrifugado dos veces (490 g x 5 min) en medio Brackett-Oliphant³ suplementado con 5 mM de cafeína (C4144) y 20 UI/ml de heparina (H3149). El *pellet* obtenido se diluyó a la mitad con medio BO conteniendo 10 mg/ml de albúmina bovina libre de ácidos grasos (A6003), resultando en una concentración final de espermatozoides de 16-18 x10⁶ /ml. Con esta dilución se hicieron gotas de 100 µl y se cubrieron con aceite mineral. Luego de la maduración, los COCs se lavaron en 3 ml de TALP-H y se colocaron en grupos de 30 en la suspensión de espermatozoides. Ambas gametas fueron co-incubadas durante 5 h en iguales condiciones que para la maduración. Los presuntos cigotos fueron agitados mecánicamente en 0.2 ml de TALP-H por 30 seg. y luego lavados 3 veces en el mismo medio. El cultivo embrionario se realizó como se detalla a continuación.

Clonación por transferencia nuclear de blastómeras utilizando luz ultravioleta

La enucleación del ovocito se realizó por microcirugía utilizando un sistema de micromanipulación de dos brazos (Nikon-Narishige) acoplado a microscopio invertido de epifluorescencia. Para observar la metafase, se tiñó con el colorante vital Hoechst 33342 en medio TCM 199 (1 µg/ml) durante 10 minutos a 39°C. La observación se realizó empleando luz ultravioleta en microscopio de epifluorescencia. Una vez enucleados los ovocitos, se los incubó con 1.5 mg/ml de pronasa (P8811) disuelta en TALP-H por 5-10 min a temperatura constante de 35°C para prepararlos para la etapa de fusión. Para la obtención individualizada de las blastómeras se trató a los embriones FIV de día 2 (8 células) con pronasa en igual concentración, luego se depositaron 30 segundos en medio hipotónico (citrate de sodio 0.8%) y se pipeteó para lograr la separación de las mismas.

Los ovocitos libres de zona fueron transferidos individualmente en 1 mg/ml de fitohemaglutinina (L8754) disuelta en TCM-199 sin suero y rápidamente se colocaron sobre una blastómera

para lograr su unión. El complejo blastómera-ovocito fue transferido al medio de fusión (0.3 M manitol, 0.1 mM MgSO₄, 0.05 mM CaCl₂, 1mg/ml PVA) por 2-3 min y luego se alinearon en la cámara de fusión (BTX microslide 0.5 mm fusion chamber, model 450, cat. no. 01-000209-01) cubierta por 2 ml de medio de fusión, de manera tal que ambas superficies a fusionar estuvieran paralelas a los electrodos. La fusión se inició administrando doble pulso eléctrico de 65 V durante 30 μ s. Finalizada, los embriones se depositaron en una placa de recuperación con medio TALP-H y luego se trasladaron individualmente a placas con microgotas de 5 μ l de medio SOF^{22,8} durante 2 h para permitir la reprogramación nuclear. Transcurridas las 2 h, los embriones se activaron con ionomicina como fue descrito anteriormente y se los incubó por tres horas en 2 mM 6-DMAP. Los embriones reconstituidos se cultivaron como se describe a continuación.

Clonación por transferencia nuclear de blastómeras y sin utilización de luz ultravioleta

Los ovocitos bovinos se maduraron por 21 h momento en el que se adicionó DMC 0.4 μ g/ml y se incubaron por 3 h más. Luego de la denudación de los mismos, se los tiñó con el colorante vital Hoechst 33342 en medio TCM 199 (1 μ g/ml) durante 10 minutos a 39°C. La enucleación se llevó a cabo extrayendo por micromanipulación la protrusión formada, sin exponer a los ovocitos a luz UV (Figura 1). Para corroborar la remoción del núcleo, se expuso a luz UV sólo el citoplasma extraído presente en la pipeta de enucleación, sin afectar el citoplasto resultante. La reconstitución del embrión fue realizado como se detalló anteriormente.

Cultivo *in-vitro* de embriones

Los presuntos cigotos generados por FIV fueron cultivados en gotas de 50 μ l de medio SOF suplementado con 2,5% v/v SFB cubiertas con aceite mineral durante 48 h. Los presuntos cigotos libres de zona obtenidos luego de la activación partenogénica o de la clonación

fueron cultivados individualmente un sistema similar al de “Well of the Well” (WOW25) en medio SOF. En este sistema los micro-wells fueron realizados utilizando un capilar de vidrio calentado con el que se presionó la base de una placa de petri y se cubrió con medio de cultivo. Las condiciones de cultivo fueron 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂ a 39°C en atmosfera humidificada. Al día 5 de cultivo embrionario, se suplementó el medio con 10% de SFB. Se evaluó tasa de clivaje 48 h después de la activación y tasa de blastocisto a día 7.

Análisis Estadístico

Sobre todos los datos obtenidos, se realizó un análisis no paramétrico de Fisher, con un intervalo de confianza de 95%, en el programa Graph Pad PRISM® versión 5.01. Se consideraron significativas las muestras con un valor P < 0,05.

Resultados

Efecto de demecolcina durante la maduración *in-vitro* de ovocitos bovinos

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para ovocitos bovinos tratados con 0,4 μ g/ml de DMC durante la maduración ovocitaria *in vitro*. En el grupo tratado con DMC desde el inicio de la maduración hasta la hora 24 (DMC+0), se observó que el 61,4% presentó una protrusión evidente del citoplasma luego de 24 h de tratamiento. De este porcentaje, el 54,7% no liberó el primer CP y contenía la metafase I en su interior y el 6,25% presentó primer corpúsculo polar y contenían la metafase II en la protrusión. A diferencia del grupo DMC+0, cuando se trató a los ovocitos con DMC desde las 21 h hasta las 24 h de maduración (DMC+21), el 87% de los ovocitos con primer corpúsculo polar visible presentó una protrusión evidente conteniendo la metafase II en su interior (Figura 2). En el grupo control (DMC-), sólo el 14,7 % contenía

Tabla 1. Ovocitos bovinos tratados con demecolcina (DMC) durante la maduración *in vitro*

Grupo	r*	n	MI en Pr (%)	MII en Pr (%)	Sin Pr (%)
DMC+0	4	127	70 (54,7)a	8 (6,25)a	49 (36,8)a
DMC+21	4	92	ND**	80 (87)b	12 (13)b
Sin DMC	5	116	2 (1,7)b	15 (13)a	99 (85,3)c

r*= cantidad de repeticiones

**No determinado

(a,b) Subíndices diferentes indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma columna (Test de Fisher $p<0.05$). **DMC+0** = Tratamiento con DMC desde la hora 0 de maduración hasta la hora 24. **DMC+21** = Tratamiento con DMC desde la hora 21 de maduración hasta la hora 24. **MI en Pr** = Metafase I contenida en protrusión citoplasmática. **MII en Pr** = Metafase II contenida en protrusión citoplasmática. **Sin Pr** = Núcleo no contenido en protrusión.

Tabla 2. Ovocitos bovinos madurados *in vitro*, expuestos a ionomicina (Io) y posteriormente tratados con demecolcina (DMC) y cicloheximida (CHX) durante 4h.

Grupo	r*	n	Núcleo en Pr (%)	Enucleados (%)	MIII (%)	MII (%)
Io+CHX+DMC	3	55	29 (52,7)a	2 (3,6)	1 (1,8)a	25(45,5)a
Io+CHX	3	55	3 (5,4)b	4 (7,2)	44 (80)b	3 (5,4)b
Io	5	110	3 (2,7)b	0	74 (67,3)b	33 (30)a

r*= cantidad de repeticiones

(a,b) Subíndices diferentes indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma columna (Test de Fisher $p<0.05$)

Tabla 3. Desarrollo *in-vitro* de embriones producidos por trasferecia nuclear de blastómeras (Embriones FIV de 8 células) en ovocitos enucleados con y sin luz ultravioleta

Grupo	r**	n	Clivaje (%)	Blastocistos (%)***
Clonación sin UV*	2	40	27 (67,5)	2 (7,4)a
Clonación con UV	2	34	26 (76,5)	1 (3,8)a
Control partenogénesis	2	54	36 (66,7)	17 (47,22)b

UV * = luz ultravioleta

r ** = cantidad de repeticiones

*** El porcentaje de blastocistos fue calculado con respecto a la cantidad de embriones clivados.

(a,b) Subíndices diferentes indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma columna (Test de Fisher $p<0.05$).

el núcleo en una protrusión citoplasmática siendo significativamente menor a los 2 grupos anteriormente mencionados. A partir de estos resultados se determinó que el tratamiento con mayor eficiencia consistió en la aplicación de DMC a las 21 h de maduración y durante 3 hs.

Efecto de demecolcina durante la activación partenogénica de ovocitos bovinos

Los resultados obtenidos en la segunda estrategia se muestran en la Tabla 2. En primer lugar, el tratamiento con DMC y CHX después de la exposición a ionomicina logró que el 52,7% de los ovocitos tratados expongan su núcleo en una protrusión citoplasmática evidente. Los grupos control tratados con ionomicina+CHX o con ionomicina sola, en cambio, no presentaron prácticamente formación de protrusión (5,4% y 2,7%, respectivamente). Por otra parte, se observó que un pequeño porcentaje de los ovocitos tratados con CHX+DMC y con CHX sola luego de su exposición a ionomicina, no contenían núcleo y la totalidad del material genético estaba contenida en dos corpúsculos polares, por lo que se los denominó enucleados. En cuanto a la tasa de activación, el porcentaje de ovocitos con dos corpúsculos polares visibles y una metafase III (MIII) en su interior, en los grupos control, difirió significativamente con respecto al grupo tratado con DMC, siendo este último mucho menor (80% y 67% vs 1,8%, respectivamente).

Clonación por transferencia nuclear de blastómeras y sin utilización de luz ultravioleta

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos luego de realizar clonación bovina sin utilizar luz UV durante la enucleación del ovocito. En primer lugar, no se observaron diferencias estadísticas en la tasa de clivaje entre el grupo de clonación sin UV, el grupo de clonación con UV y el grupo partenogénesis (67,5%, 76,5% y 66,7%, respectivamente). En

cuanto a la tasa de producción de blastocistos, esta no difirió significativamente entre los embriones producidos por clonación sin UV y los producidos por clonación con UV, aunque sí con el control partenogénico (7,4%, 3,8% y 47,22%, respectivamente).

Discusión

En el presente trabajo se aplicó una técnica alternativa de enucleación (enucleación químicamente asistida) y se determinó su capacidad de mejorar el desarrollo de los embriones reconstituidos por transferencia nuclear de células embrionarias. En función de ello y utilizando como modelo al bovino, se indujo en el ovocito la formación de una protrusión citoplasmática conteniendo su núcleo, para así sustraerlo sin necesidad de exponerlo a luz UV, como se realiza tradicionalmente²⁷.

El primer objetivo de este trabajo fue lograr situar al núcleo del ovocito en la protrusión, para lo cual se diseñaron dos estrategias. En la primera, los ovocitos fueron expuestos al inhibidor de microtúbulos demecolcina durante la maduración *in vitro* (desde su inicio o a partir de las 21 h). En la segunda, se trató a los ovocitos con DMC luego de su exposición a ionomicina, un agente activador que induce entrada de calcio al ovocito, la disminución de MPF y promueve la liberación del segundo corpúsculo polar¹⁴. El tratamiento con DMC durante toda la maduración tuvo como finalidad ubicar la MI en una protrusión evidente y determinar si era posible enuclear químicamente los ovocitos sólo con este tratamiento, tal como fue reportado en el ovino⁹; en cambio la aplicación de DMC a las 21 h de maduración permitiría formar una protrusión conteniendo la MII. Nuestros resultados mostraron que se logró eficientemente contener al núcleo en una protrusión siendo la mejor estrategia la utilización de DMC a partir de las 21 h de maduración. Esto concuerda con trabajos previos que también demostraron la efectividad de DMC para formar una protrusión conteniendo el núcleo del ovocito, y asistir a la clonación en bovinos^{23,18}. Además, a diferencia de otros trabajos⁹, no se obtuvieron ovocitos

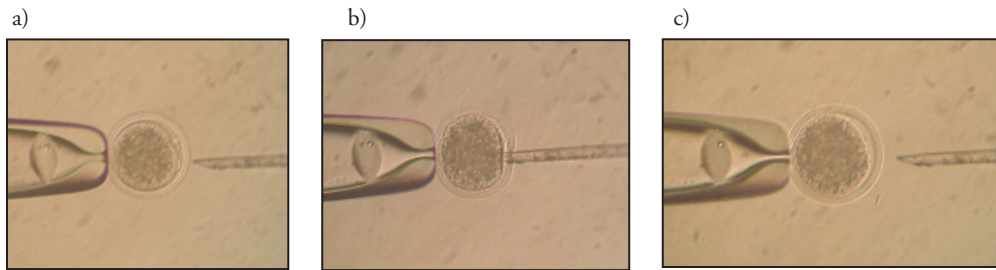


Figura 1. Enucleación de ovocito bovino sin exposición a luz UV. a) Ovocito tratado con DMC desde las 21 h de maduración con protrusión evidente en el citoplasma y primer corpúsculo polar. b) Introducción de la pipeta de enucleación en la protrusión para la aspiración de la metafase II (MII). c) Retiro de la pipeta con la MII y parte del citoplasma en su interior.

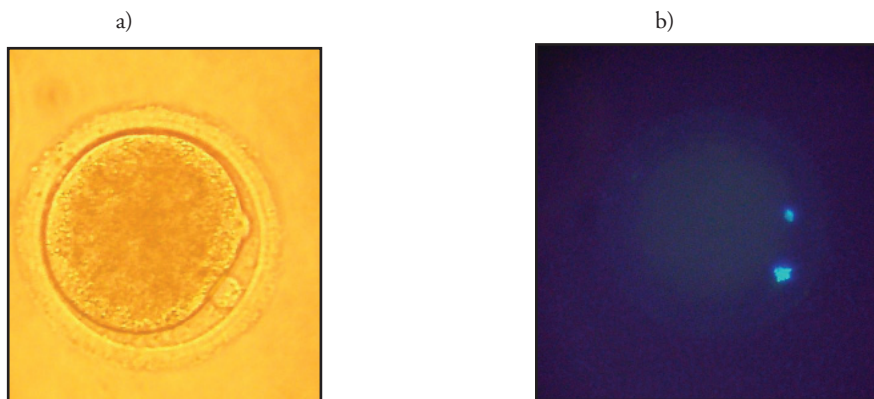


Figura 2. Ovocito bovino madurado *in vitro* y tratado con 0,4 ug/ml demecolcina desde las 21 h de maduración hasta las 24 h, expuesto a luz normal (a) y ultravioleta (b) (400X). En ambos se observa el primer corpúsculo polar y una protrusión citoplasmática conteniendo el núcleo.

enucleados químicamente cuando el tratamiento fue realizado a partir del inicio de la maduración, aunque sí cuando la DMC fue utilizada luego de la exposición a ionomicina.

En base a los resultados obtenidos en el experimento 1, los cuales mostraron altas tasas de formación de protrusión conteniendo la MII, el grupo DMC+21 fue seleccionado para realizar la enucleación sin exposición a luz UV, y luego utilizarlo como recipiente de células embrionarias en el proceso de transferencia nuclear. El grupo de clonación sin UV no mostró diferencias significativas a nivel de desarrollo temprano de los embriones reconstituidos, respecto a los grupos control (clonación con UV y partenogénesis). Sin embargo, se observó una baja tasa de blastocistos en ambos grupos

de clonación siendo éstas significativamente menores que la alcanzada por el grupo partenogénesis. Este último grupo obtuvo un alto porcentaje de blastocistos (47,22%) lo que demuestra un eficiente sistema de cultivo en WOWs. Por lo tanto, la baja eficiencia de la clonación podría deberse al estrés mecánico que sufrieron los ovocitos durante todo el proceso de transferencia nuclear y a la utilización de células embrionarias en diferentes estadios mitóticos, al provenir de embriones tempranos en desarrollo.

En resumen, se lograron producir clones bovinos hasta estadio de blastocisto utilizando enucleación químicamente asistida con DMC, y con tasas de desarrollo similares al control de embriones reconstituidos con exposición a luz UV.

Conclusiones

En el presente trabajo se demostró que es posible ubicar eficientemente el núcleo del ovocito en una protrusión y extraerse sin necesidad de utilizar tinciones de ADN ni exponerlo a luz UV para su visualización. El desarrollo temprano de los embriones reconstituidos por esta técnica fue similar al de los embriones obtenidos por la técnica convencional de clonación (utilizando luz UV durante la enucleación de los ovocitos). Si bien no se observaron diferencias en las tasas de desarrollo *in-vitro*, es necesario evaluar la capacidad de implantación y desarrollo a término de ambos tipos de embriones para concluir de manera más certera los beneficios que podría ofrecer la técnica de clonación libre de exposición a luz UV.

Agradecimientos

Los autores le agradecen al CIALE por proveer de material biológico utilizado. Este trabajo fue financiado por PICT CABBIO 2008 N_00145 y UBACYT G808.

Bibliografía

1. Bavister, B.D.; Yanaguimachi. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1977; 16:228-37.
2. Bondioli, K.; Ramsoondar, J.; Williams, B.; Costa, C.; Fodor, W. Cloned pigs generated from cultured skin fibroblasts derived from a H-transferase transgenic boar. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; 60:189-95.
3. Brackett, B.; Oliphant, G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1975; 12:260-74.
4. Critser, E.S.; First, N.L. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. *Stain Technol.* 1986; 61:1-5.
5. Folch, J.; Cocero, M.J.; Chesne, P.; et al. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology.* 2009; 71:1026-34.
6. Fulka, J. Jr; Moor, R.M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1993; 34:427.
7. Gurdon, J.B. The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. *Quantitative Journal of the Microscopic Society.* 1960; 101:299-311.
8. Holm, P.; Booth, P.; Schmidt, M.; Greve, T.; Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology.* 1999; 52:683-700.
9. Hou, J; Lei, T; Liu, L; Cui, X; An, X; Chen, Y. Demecolcine-induced enucleation of sheep meiotically maturing oocytes. *Reprod Nutr Dev*, 2006; 46:219-26
10. Kishigami, S.; Wakayama, S.; Hosoi, Y.; Iritani, A.; Wakayama, T. Somatic cell nuclear transfer: infinite reproduction of a unique diploid genome. *Exp. Cell. Res.* 2008; 314:1945-50.
11. Köteles, G.J. New aspects of cell membrane radiobiology and their impact on radiation protection. *At Energy Rev.* 1979; 17:3-30.
12. Leal, C.L.; Lee, C.; Moor, R.M. UV irradiation of pig metaphase chromosomes maturation-promoting factor degradation, nuclear cytology and cell cycle progression. *J. Reprod. Fertil.* 1999; 116:363-71.
13. Li, J; Du, Y; Zhang, et al. Chemically Assisted Handmade Enucleation of Porcine Oocytes. *Cloning and Stem cells*, 2006; 8:241-50
14. Liu, L.; Ju, J.C.; Yang, X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 1998; 59:537-45.
15. Miyoshi, K; Mori, H; Yamamoto, H; Kishimoto, M; Yoshida, M. Effects of Demecolcina and Sucrose on the Incidence of Cytoplasmic Protrusions Containing Chromosomes in Pig Oocytes Matured *In Vitro*. *Journal of Reprod and Dev*, 2008; 54:117-21
16. Niemann, H.; Tian, X.C.; King W.A.; Lee R.S.F. Focus on mammalian embryogenomics epigenetic reprogramming in embryonic and fetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction.* 2008; 135:151-63.

17. Salamone, D.; Baraao L.; Santos C.; et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *Journal of Biotech.* 2006; 124:469-72.
18. Saraiva, N.Z; Perecin, F; Meo, S.C; Ferreira, C.R; Tetzner, T.A; Garca, J.M. Demecolcine effects on microtubule kinetics and on chemically assisted enucleation of bovine oocytes. *Cloning Stem Cells*, 2009; 11:141-52.
19. Smith, L.C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hochst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1993; 99:39-44.
20. Stice, S.; Robl, J.; Ponce de Leon, F.; et al. Cloning new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology.* 1998. 49:129-38.
21. Tatham, G.G; Dowsing, A.T.; Trounson, A.O. Enucleation by centrifugation of *in vitro*-matured bovine oocytes for use in nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 1995; 53:1088-94.
22. Tervit, H.; Whittingham, D.; Rowson, L. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972; 30:493-97.
23. Tetsuya, T.; Hiroaki, S.; Kato, Y.; Tsunoda, Y. Demecolcine-assisted enucleation for bovine cloning. *Cloning and Stem Cells.* 2006; 8:61-66.
24. Tsunoda, Y.; Shioda, Y.; Onodera, M.; Nakamura; Uchida. Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hochst staining and ultraviolet irradiation. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1988; 82:173-78.
25. Vajta, G.; Peura, T.; Holm, P.; et al. New method for culture of zona-included or zona-free Embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol. Rep. Dev.* 2000. 55: 256-64.
26. Vajta, G; Maddox-Hyttel, P; Skou, C.T; et al. Highly efficient and reliable chemically assisted enucleation method for handmade cloning in cattle. *Reprod Fertil Dev*, 2005;17:791-7
27. Wall, R.J; Powell, A.M; Paape, M.J; et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*, 2005; 23:445-51.
28. Wells, D.N.; Forsyth, J.T.; McMillan, V.; Oback, B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells.* 2004; 6:101-10.
29. Wilmut, I.; Archibald, A.; Harris, S.; McClenaghan, M.; Simons, J.; Whitelaw, C.; Clark, A. Modification of milk composition. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 41:135-46.
30. Yang, X.; Zhang, L.; Kovacs, A.; Tobback, C.; Foote, R.H. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, sub-zona insertion and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Rep. Dev.* 1990; 27:118-129.