

AVALUACIÓ DE L'EFICIÈNCIA DEL COLCEMID, NOCODAZOLE I VINBLASTINA PER A L'ENUCLEACIÓ QUÍMICAMENT ASSISTIDA D'OÒCITS DE RATOLÍ I DE CABRA

Nuno Costa-Borges,¹ Maria Teresa Paramio,² Josep Santaló,³ Elena Ibáñez^{4*}

^{1,3,4} Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra. Tel. 935 811 112. Fax 935 812 295. Adreça electrònica: elena.ibanez@uab.es.

² Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona.

08193 Bellaterra. Tel. 935 811 456. Fax 935 811 494.

Resum

L'enucleació de l'oòcit és un dels aspectes clau de la tècnica de clonatge per transferència nuclear (NT). El citoplast preparat ha de ser competent per a reprogramar el nucli transferit i assegurar el correcte desenvolupament de l'embrió reconstruït. Oòcits en metafase II (MII) són habitualment enucleats pel mètode tradicional d'enucleació física, però aquest és un procés invasiu i tècnicament complex. Amb l'objectiu de simplificar aquest procés, en aquest treball s'examina la capacitat de diferents drogues antimitòtiques per a induir la formació d'una protuberància en el còrtex de l'oòcit que contingui tots els cromosomes de l'oòcit i permeti la seva ràpida localització. Per a això es van utilitzar oòcits de ratolí CD1 i B6CBAF1, i oòcits de cabra, que es van tractar amb colcemid, nocodazole i vinblastina a diferents temps. Els millors tractaments van permetre obtenir un percentatge d'oòcits amb protuberància per sobre del 80 % en les dues espècies, i es va observar un clar efecte de la durada del tractament en els oòcits de ratolí. En els oòcits de cabra, l'eficiència dels tractaments va ser dependent de l'addició de sacarosa 0,05 M al medi de cultiu.

Paraules clau Enucleació, clonatge, transferència nuclear, antimitòtics.

Abstract

Evaluation of the efficiency of demecolcine, nocodazole and vinblastine for chemically assisted enucleation of mouse and goat oocytes. Oocyte enucleation is one of the key factors in mammalian cloning by nuclear transfer (NT). The cytoplasm prepared must be competent to reprogram the transferred nucleus and to ensure the correct development of the reconstructed embryo. Metaphase II (MII) oocytes are generally enucleated by the classical mechanical method, which is invasive and technically demanding. With the aim of simplifying this process, here we examine the ability of several antimetabolic drugs to induce a cortical protrusion that contains all the oocyte chromosomes and allows for their rapid localization. Mouse CD1 and B6CBAF1 oocytes and goat oocytes were treated with demecolcine, nocodazole and vinblastine for various times. The best treatments resulted in more than 80% of the oocytes of both species showing a cortical protrusion, and the efficiency was clearly dependent on the duration of the treatment in mouse oocytes. In goat oocytes, the presence of 0,05 M sucrose in the incubation medium was a key factor for protrusion formation.

Key words Enucleation, cloning, nuclear transfer, antimetotics.

INTRODUCCIÓ

Des del naixement, l'any 1996, del primer mamífer clonat a partir d'una cèl·lula somàtica adulta (Wilmut *et al.*, 1997), animals de diferents espècies de mamífer han estat clonats amb la tècnica de transferència nuclear (NT). Aquesta tecnologia és de gran interès per a la producció d'animals modificats genèticament,

la multiplicació d'animals amb característiques genètiques úniques o l'obtenció de cèl·lules mare embrionàries (Wolf *et al.*, 2001), però actualment la seva aplicació és encara limitada a causa de la baixa eficiència. L'enucleació de l'oòcit receptor és un pas crucial de la tècnica, ja que el citoplast preparat ha de ser competent per a reprogramar el nucli transferit i assegurar el correcte desenvolupament de l'embrió reconstruït

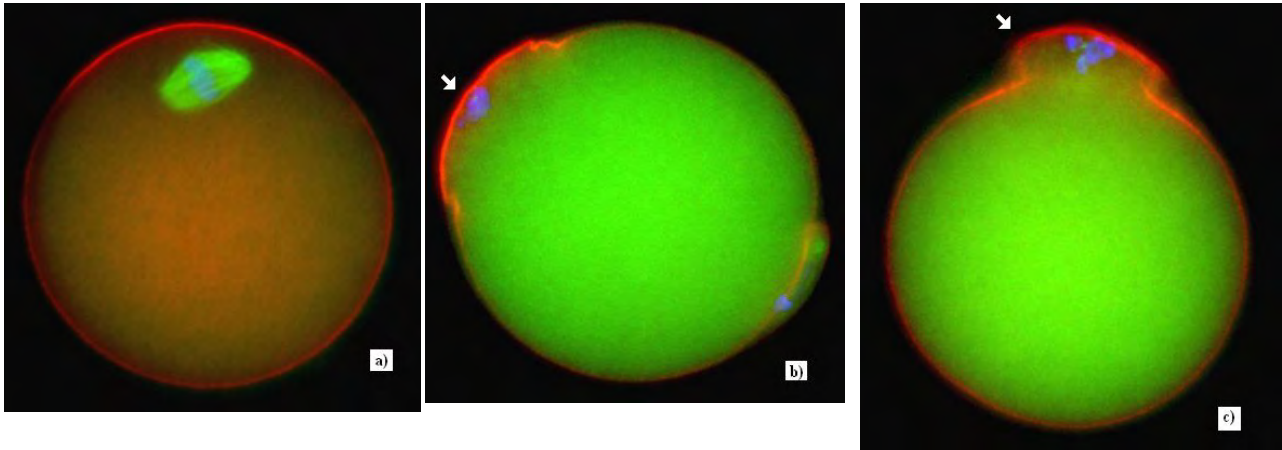


Figura 1 Oòcits de ratolí de la soca CD1. **(a)** Oòcit MII sense tractar (control). **(b)** Protuberància de tipus A (fletxa), en un oòcit CD1 tractat 30 min amb nocodazole 0,3 µg/ml. **(c)** Oòcit CD1 tractat 60 min amb vinblastina 0,1 µg/ml, amb una protuberància de tipus B (fletxa). Els microtúbuls apareixen en verd, els microfilaments en vermell i la cromatina en blau.

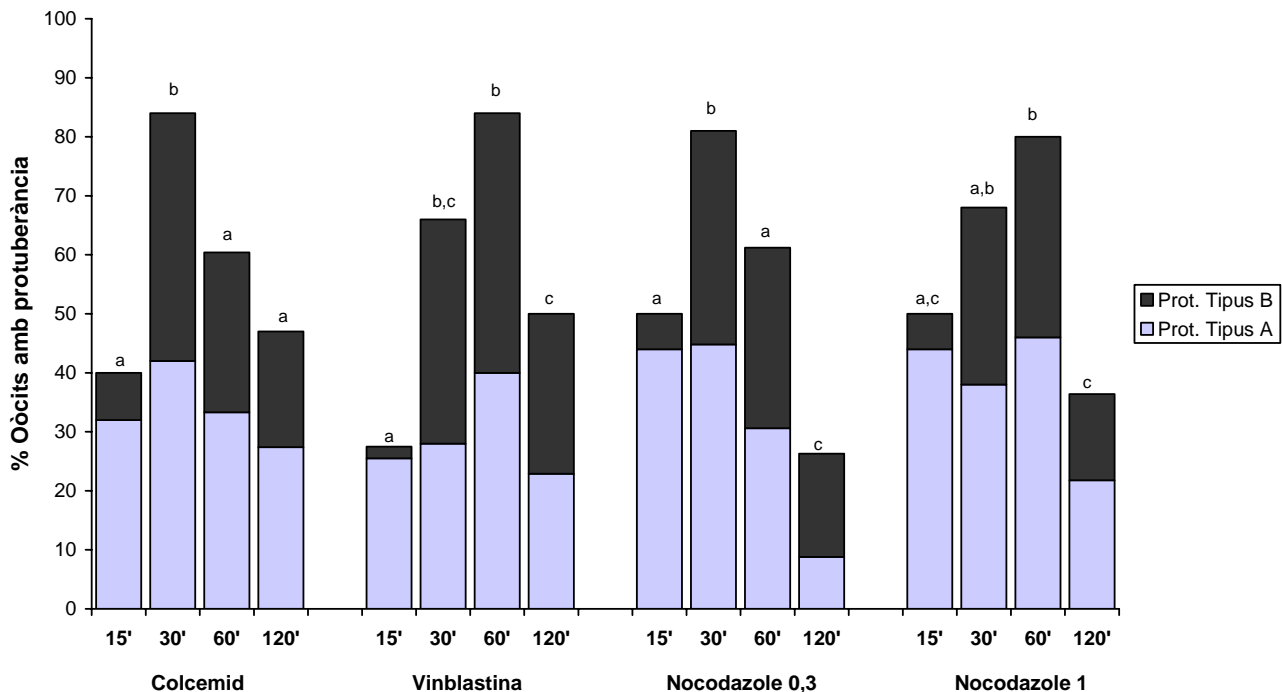


Figura 2 Percentatge d'oòcits amb protuberància i tipus de protuberància en oòcits de ratolí de la soca CD1 sotmesos a diferents tractaments amb antimitòtics.

(Fulka *et al.*, 2004). El protocol estàndard d'enucleació física és clarament invasiu i traumàtic per a l'oòcit. A més de comportar l'eliminació del fus meiótic i dels factors que hi estan associats, resulta en una reducció significativa del volum citoplasmàtic. Tot això pot comprometre la competència de l'oòcit i, per tant, el posterior desenvolupament de l'embrió reconstruït per NT (Tsunoda i Kato, 2000). Per altra banda, la impossibilitat de detectar la localització del fus meiótic en els oòcits de la majoria d'espècies d'interès ramader fa necessari tenyir-los amb Hoechst 33342, per

marcar la cromatina, i irradiar-los amb llum ultravioleta (UV) abans de dur a terme l'enucleació. Aquesta irradiació UV, malgrat que és breu, provoca una disminució significativa de la capacitat de desenvolupament embrionari a causa principalment d'alteracions en la membrana i en components intracel·lulars dels oòcits i de lesions en el DNA mitocondrial, que poden alterar el metabolisme dels embrions reconstruïts (Smith *et al.*, 1993).

Amb l'objectiu de millorar i simplificar els protocols d'enucleació d'oòcits, s'han desenvolupat diver-

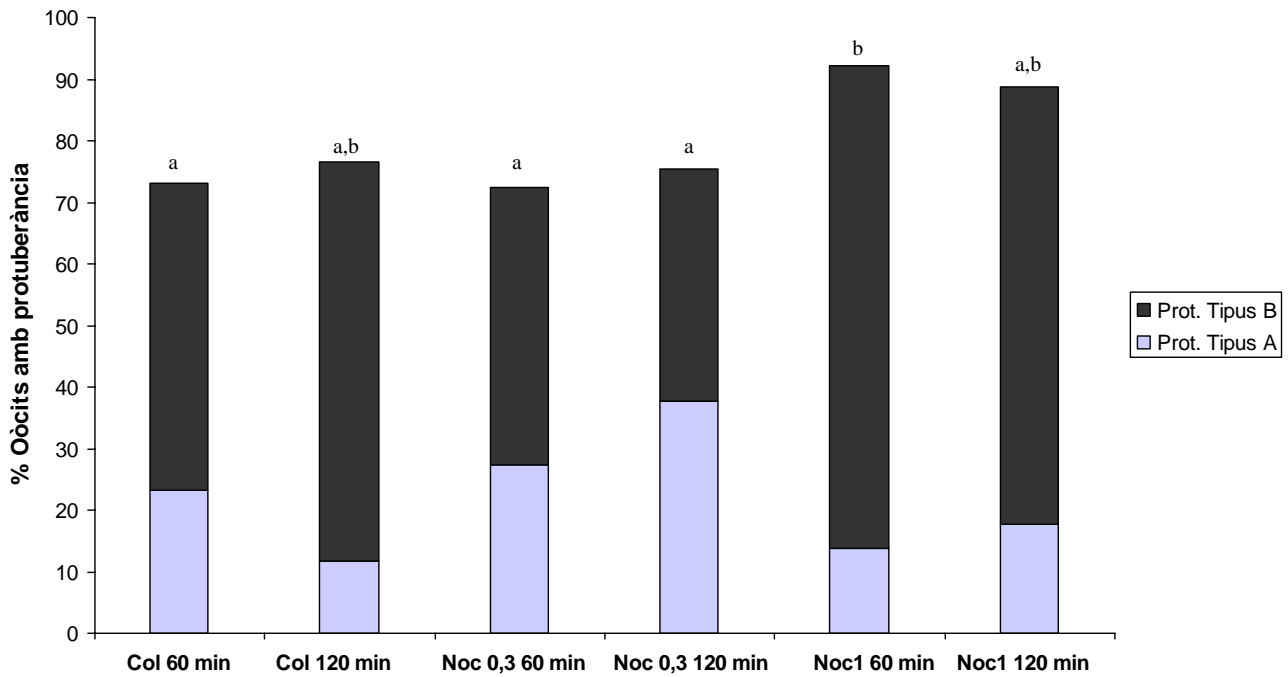


Figura 3 Percentatge d'òocits amb protuberància i tipus de protuberància en òocits de cabra sotmesos a diferents tractaments amb antimetabòlics.

ses alternatives a l'enucleació física convencional (Li *et al.*, 2004; Fulka *et al.*, 2004). Una de les més atractives, per la seva simplicitat tècnica, és la preparació de citoplasts receptors a partir d'òocits preactivats i tractats amb colcemid. Aquesta tècnica, anomenada *enucleació química induïda*, resulta en l'expulsió de tota la cromatina de l'òocit en el segon corpuscle polar, a causa de l'activació de l'òocit i la despolimerització del fus meiótic, sense que sigui necessària l'aplicació de tècniques de micromanipulació. La seva eficiència ha estat demostrada en òocits de ratolí (Baguisi i Overström, 2000; Ibáñez *et al.*, 2003), cabra (Ibáñez *et al.*, 2002) i vaca (Fischer *et al.*, 2002) i ha permès l'obtenció de ratolins clonats a partir de cèl·lules del cúmulus (Baguisi i Overström, 2000) i de cèl·lules mare embrionàries (Gasparrini *et al.*, 2003). Tot i els prometedors resultats d'aquesta tècnica, però, el fet que sigui necessària l'activació prèvia de l'òocit podria comprometre la posterior competència del citoplast per a reprogramar el nucli transferit. De fet, alguns estudis suggereixen que la capacitat dels òocits activats per la reprogramació genètica del nucli transferit seria més limitada que la dels òocits en MII, a causa de la disminució dels nivells d'activitat de les cinases MPF (*maturation promoting factor*) i MAPK (*mitogen activated protein kinase*) després de l'activació (Kono, 1997). Una manera d'evitar aquest problema és aplicar el tractament amb antimetabòlics en òocits en MII, no activats. En aquest cas, la despolimerització del fus

meiótic induïda per l'antimetabòlic induïx la formació d'una protuberància a la superfície de l'òocit on es localitza la cromatina condensada. Tot i que, igual com en l'enucleació física, continua sent necessari eliminar aquesta protuberància per micromanipulació per a enuclear l'òocit. El fet que la protuberància sigui fàcilment visible al microscopi facilita enormement el procés. Aquesta variació de la tècnica, anomenada *enucleació químicament assistida*, ha estat recentment aplicada en òocits de porc i de vaca (Yin *et al.*, 2002b; Kawakami *et al.*, 2003; Vajta *et al.*, 2003), usant com a antimetabòlics tant el colcemid com el nocodazole, i ha permès obtenir vaques i porcs clonats.

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un protocol eficient per a l'enucleació químicament assistida d'òocits de ratolí i de cabra. Per aquest motiu, òocits en MII de dues soques diferents de ratolí i de cabra s'han tractat amb diferents drogues antimetabòliques (colcemid, nocodazole i vinblastina) i s'han analitzat per immuno fluorescència per a determinar la taxa de formació de protuberàncies.

MATERIALS I MÈTODES

Obtenció d'òocits de ratolí i de cabra

Els òocits de ratolí es van obtenir de femelles (6-12 setmanes d'edat) de la soca no consanguïna CD1 i

de la soca híbrida B6CBAF1 (C57BL/6JxCBA/J), prèviament sotmeses a un protocol de superovulació (5 IU PMSG i 5 IU hCG 48 h més tard). Els oòcits en MII es van recollir a les 14-15 h després d'hCG i, després d'un tractament de cinc minuts a 37° C amb hialuronidasa (156 U/ml) per a dispersar les cèl·lules del cúmulus, els oòcits es van rentar dues vegades en medi mKSOM-H (Biggers *et al.*, 2000).

Els oòcits de cabra es van obtenir a partir d'ovaris de cabres prepúbbers recollits en un escorxadador. Es va fer *slicing* dels ovaris per a alliberar els complexos cúmulus-oòcits (COC) que, després de rentats, es van posar a madurar en medi TCM-199 complementat amb 275 µg/ml de piruvat sòdic, 146 µg/ml d'L-glutamina, 50 µg/ml de gentamicina, 10% de sèrum de vedell castrat, 10 µg/ml d'LH, 10 µg/ml de FSH, 1 µg/ml de 17β-estradiol i 400 µg/ml de cisteamina (Urdaneta *et al.*, 2003). Després de 27 h de maduració a 38,5° C, els oòcits es van alliberar de les cèl·lules del cúmulus mitjançant un tractament de cinc minuts a 37° C en hialuronidasa (600 U/ml) i es van rentar en medi mKSOM-H.

Tractament i fixació dels oòcits

Els oòcits de ratolí de la soca CD1 es van tractar amb els antimetabòlics colcemid (0,4 µg/ml), nocodazole (0,3 i 1 µg/ml) i vinblastina (0,1 µg/ml) durant 15, 30, 60 i 120 min a 37° C en medi KSOMaag. Els oòcits B6CBAF1 es van sotmetre únicament a aquells tractaments que millor resultat van donar en la soca CD1 (30 min en colcemid 0,4 µg/ml o nocodazole 0,3 µg/ml; 60 min en vinblastina 0,1 µg/ml). Immediatament després del tractament els oòcits es van fixar durant 30 min a 37° C en *microtubule stabilizing buffer-extraction fixative* (MTSB-XF) compost per 100 mM de PIPES, 5 mM de MgCl₂, 2,5 mM d'EGTA, 1 mM de ditiotretol, 1 µM de taxol, 0,01% d'aprotinina, 45% d'òxid de deuteri, 3,7% de formaldehid i 1% de Triton X-100 (Messinger i Albertini, 1991).

Els oòcits de cabra es van tractar amb colcemid (0,4 µg/ml) i nocodazole (0,3 i 1 µg/ml) durant 60 i 120 min a 38,5° C en medi KSOMaag amb 0,05 M de sacarosa. Seguidament es van fixar en 2% de paraformaldehid 5 min a 37° C i en MTSB-XF 30 min a 37° C.

Els oòcits fixats es van guardar a 4° C en solució *block* composta per 0,2% d'azida sòdica, 1% de BSA, 0,2% de llet descremada en pols, 2% de sèrum de cabra desactivat, 0,1 M de glicina i 0,01% de Triton X-100 (Wickramasinghe i Albertini, 1992). Cadascun dels tractaments es va repetir al menys tres vegades i es van analitzar aproximadament cinquanta oòcits per grup.

Anàlisi per immunofluorescència

Els oòcits fixats es van sotmetre a un protocol de triple tinció per a la detecció simultània dels microtúbuls, els microfilaments i la cromatina per microscòpia de fluorescència. Els oòcits de ratolí es van incubar durant una hora a 37° C en una barreja d'anticossos de ratolí anti-α/β-tubulina (1:1000). Després es van rentar dues vegades en PBS+1% de BSA durant 5 min a temperatura ambient i es van incubar durant 30 min a 37° C en solució *block*, seguit d'una incubació de 30 min a 37° C en anticòs secundari contra IgG de ratolí conjugat amb Alexa Fluor 488 (6 µg/ml). Es van rentar un altre cop en PBS+1% BSA i es van incubar a 37° C durant 30 min en faloidina conjugada amb Alexa Fluor 594 (1,5 U/ml) per a la visualització dels microfilaments. Finalment, es van rentar dues vegades més en PBS+1% BSA i es van incubar en Hoechst 33258 (10 µg/ml) durant 15 min a temperatura ambient per a la detecció de la cromatina. Els oòcits de cabra es van sotmetre al mateix protocol de tinció, però amb les següents diferències: incubació tota la nit a 4° C amb l'anticòs primari contra la tubulina, incubació durant 3 h amb l'anticòs secundari, incubació durant 20 min en faloidina conjugada amb Alexa Fluor 594 (1 U/ml), i rentats en solució *block* (tres rentats: 5, 5, i 15 min).

Un cop tenyits els oòcits es van muntar en portaobjectes en una solució de 50% glicerol/PBS amb 25 mg/ml d'azida sòdica i es van guardar a 4° C. Les preparacions es van examinar en un microscopi d'epifluorescència *Olympus BX60* equipat amb filtres específics i amb un sistema de captura i anàlisi d'imatges (programari Genux versió 3.0).

Anàlisi estadística

Els resultats es van analitzar mitjançant el test de χ^2 o el test exacte de Fisher. Valors de $P < 0,05$ es van considerar estadísticament significatius.

RESULTATS

Per a cada oòcit es va analitzar el grau de despolimerització dels microtúbuls del fus meiótic, l'estat dels cromosomes i la presència o no de protuberància a la superfície de l'oòcit. Les protuberàncies induïdes pel tractament amb antimetabòlics es van classificar en dos tipus: *a* o *b* (vegeu la figura 1). Les protuberàncies del tipus *a* es caracteritzen per un àrea relativament extensa de la membrana de l'oòcit que es projecta cap enfora, però no molt pronunciada. Les protuberàncies del tipus *b* són més pronunciades, amb un àrea de projecció més delimitada i de menor volum que les del

Taula 1 Formació i tipus de protuberàncies induïdes per diferents tractaments amb antimetabòlics en oòcits de ratolí de les soques CD1 i B6CBAF1.

Tractament	Soca	n	% -P (n)	% PA (n)	% PB (n)
Colcemid 30 min	CD-1	50	16 % (8) ^a	42 % (21) ^a	42 % (21) ^a
B6CBAF1	52	28,8 % (15) ^a	28,8 % (15) ^a	42,4 % (22) ^a	
Vinblastina 60 min	CD-1	50	16 % (8) ^a	40 % (20) ^a	44 % (22) ^a
B6CBAF1	55	25,5 % (14) ^a	21,8 % (12) ^a	52,7 % (29) ^a	
Nocodazole 0,3 µg/ml 30 min	CD-1	58	19 % (11) ^a	44,8 % (26) ^a	36,2 % (21) ^a
B6CBAF1	49	28,6 % (14) ^a	40,8 % (20) ^a	30,6 % (15) ^a	
Nocodazole 1 µg/ml 30 min	CD-1	50	32 % (16) ^a	38 % (19) ^a	30 % (15) ^a
B6CBAF1	46	52,2 % (24) ^a	17,4 % (8) ^b	30,4 % (14) ^a	

-P: sense protuberància; PA: protuberància de tipus A; PB: protuberància de tipus B.

Els diferents superíndexs indiquen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre les dues soques de ratolí per a cadascun dels tractaments.

tipus *a*. En tots dos tipus, els cromosomes es localitzen dins la protuberància, generalment en forma d'una massa compacta.

Resultats en oòcits de ratolí CD1

Per a totes les drogues testejades, els oòcits fixats als 15 min de tractament presentaven un fus meiotic poc despolimeritzat, amb una densitat de tubulina més reduïda en la part central del fus, i els cromosomes poc compactats. Només un 27,5-50 % (segons el tractament) d'aquests oòcits presentaven protuberàncies, que majoritàriament eren del tipus *a* (vegeu la figura 2). Els oòcits tractats durant 30 o 60 min amb antimetabòlic presentaven un fus meiotic pràcticament despolimeritzat per complet i els cromosomes força compactats. De fet, aquests tractaments van resultar ser els més eficients pel que fa a la taxa de formació de protuberàncies. Concretament, el percentatge d'oòcits amb protuberància en els tractaments de 30 min amb colcemid (84 %) i nocodazole 0,3 µg/ml (81 %) van ser significativament superiors als de més curta (15 min) o més llarga durada (60 i 120 min). Pel que fa a la vinblastina i al nocodazole 1 µg/ml, els tractaments de 30 (66 % i 68 %, respectivament) i de 60 min (84 % i 80 %, respectivament) van resultar superiors a la resta i estadísticament similars entre si, tot i que amb una tendència més elevada en els de 60 min (vegeu la figura 2). Independentment del tipus de droga, aproximadament un 50 % dels oòcits amb protuberància als 30 o 60 min de tractament presentaven una protuberància de tipus *b*.

Tractaments més llargs, de 120 min, van resultar en una reducció significativa en el nombre final d'oòcits amb protuberància per a totes les drogues (vegeu la figura 2), comparat amb els tractaments de 30 i 60 min, tot i que els percentatges relatius d'oòcits amb

protuberàncies de tipus *a* o *b* continuava mantenint-se al voltant del 50 %. Així, el temps de tractament clarament influeix en el nombre total de protuberàncies formades però no el seu tipus. De fet, la disminució del nombre d'oòcits amb protuberància en allargar el temps de tractament podria ser atribuïble a la dispersió dels cromosomes. Un percentatge pròxim als 50 % d'oòcits tractats amb qualsevol dels antimetabòlics durant 120 min mostraven els cromosomes dispersos per tot el citoplasma, fet que no s'observava en els tractaments més curts (dades no mostrades).

Resultats en oòcits de ratolí B6CBAF1

Els tractaments amb millors resultats en la soca CD1 es van provar en els oòcits B6CBAF1. En estudis anteriors amb la tècnica d'enucleació química induïda s'havia demostrat com el fons genètic dins d'una mateixa espècie influïa en els resultats (Ibáñez *et al.*, 2003). La comparació estadística del mateix tractament entre les dues soques de ratolí va indicar que en aquest cas el fons genètic no sembla ser important. No es van detectar diferències estadísticament significatives per a cap tractament entre les dues soques de ratolins pel que fa referència al percentatge d'oòcits amb protuberància o a la tendència a formar protuberàncies del tipus *a* o *b* (vegeu la taula 1).

D'altra banda, la comparació entre els diferents tractaments aplicats en els oòcits B6CBAF1 va revelar que no existeixen diferències significatives quant al percentatge d'oòcits amb protuberància entre els tractaments amb colcemid (71,2 %), vinblastina (74,5 %) i nocodazole 0,3 µg/ml (71,4 %), però sí entre aquests i el nocodazole 1 µg/ml (47,8 %), que sembla ser el menys eficaç. Els millors tractaments, pel que fa al percentatge final d'oòcits amb protuberàncies de tipus *b*, van ser els de vinblastina 60 min (52,7 %), superior als

tractaments amb nocodazole, i de colcemid 30 min (42,4 %).

Resultats en oòcits de cabra

Els oòcits de cabra són morfològicament diferents als oòcits de ratolí. Una de les diferències és el reduït espai perivitellí que presenten. Estudis previs fets al nostre laboratori amb les drogues antimitòtiques diluïdes en medi KSOMaag van revelar la impossibilitat que es formessin protuberàncies en un espai tan reduït. L'addició de sacarosa 0,05 M al medi d'incubació KSOMaag augmenta l'espai perivitellí, i facilita la formació de protuberàncies, tal i com havia estat demostrat en treballs amb oòcits de porc (Yin *et al.*, 2002b).

El tractament més efectiu per a la formació de protuberàncies en els oòcits de cabra va ser el de 60 min amb nocodazole 1 µg/ml (92,2 %), tot i que les diferències amb el tractament de 120 min (88,7 %) o fins i tot amb el de 120 min amb colcemid (76,5 %) no van ser significatives (vegeu la figura 3). Cal dir, però, que el nombre d'oòcits analitzats en aquest darrer grup ($n = 17$) és encara insuficient per a treure conclusions definitives. Fent la comparació estadística entre el percentatge d'oòcits amb protuberàncies de tipus *b* en cada tractament, s'observa com els tractaments amb nocodazole 1 µg/ml de 60 i 120 min són significativament els més eficaços (78,4 % i 71 %, respectivament).

DISCUSSIÓ

Tal com s'ha demostrat prèviament en oòcits de porc i de vaca (Yin *et al.*, 2002b; Kawakami *et al.*, 2003; Vajta *et al.*, 2003), el tractament d'oòcits en MII amb drogues antimitòtiques com el colcemid o el nocodazole indueix la formació d'una protuberància en la superfície de l'oòcit que facilita la localització del DNA durant el procés d'enucleació previ a la NT. A més, el volum citoplasmàtic que s'elimina durant el procés d'enucleació és inferior que quan s'utilitza el mètode d'enucleació física convencional, de manera que presumiblement la competència de l'oòcit no es veu tant afectada. Si bé aquesta estratègia no elimina la necessitat d'utilitzar tècniques de micromanipulació per a enuclear l'oòcit, simplifica bastant aquest procés.

L'optimització de les taxes de formació de protuberàncies és un pas fonamental abans d'aplicar l'enucleació química assistida en la preparació de citoplasts per a ser usats com a receptors en la NT. En treballs previs amb la tècnica d'enucleació química induïda s'observà que l'eficiència de la tècnica varia en funció del fons genètic dels oòcits i que el protocol ha de ser adaptat per a cada espècie amb la que es treballa

(Ibáñez *et al.*, 2002, 2003; Fischer *et al.*, 2002). Per aquest motiu, l'objectiu principal del present treball era optimitzar el protocol d'enucleació química assistida en oòcits de ratolí i de cabra, dues espècies on aquesta tècnica encara no ha estat aplicada. Al mateix temps, es pretenia investigar si existeixen diferències específiques o dependents del tipus d'antimitòtic emprat pel que fa a l'eficiència de la tècnica.

Els resultats obtinguts demostren que tots els antimitòtics emprats són capaços d'induir la formació de protuberàncies en els oòcits en MII, tant de ratolí com de cabra. Les protuberàncies de tipus B són les més interessants, ja que són fàcils de localitzar i contenen un petit volum de citoplasma, on es troben tots els cromosomes de l'oòcit. Aquest és un aspecte molt important, ja que a l'hora d'enuclear s'evitarà l'eliminació de grans quantitats de citoplasma amb possibles factors importants per al posterior desenvolupament dels embrions reconstruïts. En aquest estudi es conclou que el temps d'actuació de cada droga és determinant per a la formació de protuberàncies però, excepte en els tractaments més curts (15 min) en ratolí, no sembla influir en el tipus de protuberàncies que formen. D'altra banda, el temps de tractament depèn clarament de l'espècie d'oòcit amb la qual es treballa. Així, els tractaments més efectius en oòcits de ratolí són de 30 o 60 min, i els tractaments més llargs (120 min) perden eficiència, possiblement a causa d'una dispersió dels cromosomes amb el temps. En els oòcits de cabra, en canvi, els tractaments de 60 i 120 min són els que proporcionen un major percentatge d'oòcits amb protuberància.

A diferència del que s'observa quan el tractament amb antimitòtics s'aplica en oòcits activats (Ibáñez *et al.*, 2003), en els oòcits MII no s'observen diferències significatives en l'eficiència de la tècnica entre les dues soques de ratolí. Malgrat això, sí que hi ha diferències en funció de l'espècie. Així, si es considera el percentatge final d'oòcits amb protuberància de tipus B, els valors són força més elevats en els oòcits de cabra (màxim del 78,4 %) que en els de ratolí (màxim del 52,7 %). Taxes superiors al 70 % han estat descrites en oòcits de porc (Kawakami *et al.*, 2003) i de vaca (Li *et al.*, 2004).

Per finalitzar, cal destacar que la utilitat dels antimitòtics en l'enucleació química assistida és evident sempre i quan es comprovi que l'efecte d'aquestes drogues és reversible i no afecta el potencial de desenvolupament de l'oòcit. En aquests moments al nostre laboratori s'estan duent a terme estudis de reversibilitat dels tractaments aquí presentats i, per tant, el tractament més eficient per a l'enucleació química assistida serà el que, entre els que tenen major capacitat per a formar protuberàncies del tipus *b*, sigui més reversible.

AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen Begoña Anguita i Ana Jiménez-Macedo per proporcionar els oòcits de cabra madurats *in vitro*. Aquest treball s'ha realitzat amb el finançament d'un projecte per a grups emergents de la Universitat Autònoma de Barcelona (EME2004-24).

BIBLIOGRAFIA

- BAGUISI, A.; OVERSTRÖM, E. W. (2000). «Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals». *Theriogenology*, 54:209.
- BIGGERS, J.; MCGUINNIS, L. K.; RAFFIN, M. (2000). «Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free KSOM». *Biol. Reprod.*, 63:281-293.
- FISCHER, D.; IBÁÑEZ, E.; CIBELLI, J.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2002). «Activated bovine cytoplasts produced by induced enucleation support development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*». *Biol. Reprod.* 66(supl. 1):238.
- FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G.; NAGAI, T. (2004). «Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts». *Trends Biotechnol.*, 22:279-283.
- GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A.; FLETCHER, J.; MCGARRY, M.; RITCHIE, W. A.; SPRINGBETT, A. J.; OVERSTRÖM, E. W.; WILMUT, I.; DE SOUSA, P. A. (2003). «Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation». *Biol. Reprod.*, 68:1259-1266.
- IBÁÑEZ, E.; SANFINS, A.; COMBELLES, C.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2002). «Induced enucleation of mouse and goat oocytes: kinetic and phenotypic characterizations». *Theriogenology*, 57:421.
- IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2003). «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.*, 68:1249-1258.
- KAWAKAMI, M.; TANI, T.; YABUUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; MURAKAMI, H.; FUJIMURA, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. (2003). «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*, 5:379-387.
- KONO, T. (1997). «Nuclear transfer and reprogramming». *Rev. Reprod.*, 2:74-80.
- LI, G. P.; WHITE, K. L.; BUNCH, T. D. (2004). «Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: State of the art». *Cloning Stem Cells*, 6:5-13.
- MESSINGER, S. M.; ALBERTINI, D. F. (1991). «Centrosome and microtubule dynamics during meiotic maturation of the mouse oocyte». *J. Cell. Sci.*, 100:289-298.
- SMITH, L. C. (1993). «Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*». *J. Reprod. Fertil.*, 99:39-44.
- TSUNODA, Y.; KATO, Y. (2000). «The recent progress on nuclear transfer in mammals». *Zool. Sci.*, 17:1177-1184.
- URDANETA, A.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. (2003). «Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test (BCB)». *Zygote*, 11:347-354.
- VAJTA, G.; LEWIS, I. M.; TROUNSON, A. O. (2003). «Hand-made somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*». *Biol. Reprod.*, 68:571-578.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. (1997). «Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells». *Nature* 385:810-813.
- WOLF, D. P.; MITALIPOV, S.; NORGREN, JR., R. B. (2001). «Nuclear transfer technology in mammalian cloning». *Archives of Medical Research*, 32:609-613.
- WICKRAMASINGHE, D.; ALBERTINI, D. F. (1992). «Centrosome phosphorylation and the developmental expression of meiotic competence in mouse oocytes». *Dev. Biol.*, 170:62-74.
- YIN, X. J.; TANI, T.; YONEMURA, I.; KAWAKAMI, M.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, R.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. (2002b). «Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes». *Biol. Reprod.* 67:442-446.