

Partenogénesis: Un modelo para el estudio de los eventos tempranos del desarrollo mamífero

JESÚS A. BERDUGO, JULIO C. BUENO

LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS EN REPRODUCCIÓN ANIMAL han abierto líneas de investigación y con ello se han planteado conceptos que revolucionan el campo de la biología reproductiva y de la genética. Una de éstas es la partenogénesis, la cual ha permitido revelar algunos mecanismos moleculares del desarrollo embrionario. Se la puede definir como la generación de un individuo capaz de reproducirse sin la participación del genoma paterno: su éxito depende de una adecuada activación del oocito y de la normal embriogénesis. Se presenta una revisión de la literatura de los fenómenos asociados a la inducción de la partenogénesis y las potencialidades de uso en la investigación de los eventos tempranos de la biología reproductiva de humanos y animales. La partenogénesis en asocio de las nuevas tecnologías de manipulación de embriones *in vitro* permite aclarar y entender los mecanismos de repartición de los cromosomas, del desarrollo embrionario temprano, el estudio de nuevas formas de herencia y, gracias a la clonación, la interacción del citoplasma y el núcleo en modelos embrionarios.

PALABRAS CLAVE

PARTENOGENESIS

EMBRIONES

.....
DOCTOR JESÚS ALFREDO BERDUGO GUTIÉRREZ. DMV, MSc., Profesor, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Antioquia.

DOCTOR JULIO CÉSAR BUENO SÁNCHEZ. MD. Estudiante de maestría, Posgrado en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

INTRODUCCIÓN

CON LA APARICIÓN DE LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS en reproducción animal se han abierto líneas de investigación y se han formulado conceptos que han revolucionado el campo de la biología reproductiva y de la genética, entre ellas la partenogénesis, la cual ha permitido revelar algunos mecanismos moleculares del desarrollo embrionario.

La partenogénesis se puede definir como la generación de un individuo sin participación del genoma paterno: su éxito depende de una adecuada activación del oocito, de que la embriogénesis sea normal y de la obtención de un nacido vivo capaz de reproducirse. En el caso de los mamíferos no se ha reportado hasta la fecha el nacimiento del primer ser vivo derivado de un embrión exclusivamente partenogénico.

La partenogénesis se ha descrito en diferentes especies dentro de la escala zoológica: insectos (1,2), anélidos (3), marsupiales (4), erizos de mar, batracios (5), peces (6,7), pavos y plantas (8). Es de anotar que a pesar de haber obtenido nacidos vivos con capacidad reproductiva normal, estos animales partenogénicos tienen algún grado de retraso en su desarrollo comparados con los obtenidos por reproducción sexual.

PARTENOGENÉNESIS EN LOS MAMÍFEROS

EN LOS INDIVIDUOS QUE SE REPRODUCEN SEXUALMENTE son necesarios los genomas paterno y materno para un adecuado desarrollo embrionario. In vivo e in vitro se ha observado algún grado de desarrollo cuando

sólo participa uno de los genomas. Tal es el caso de los androgenotes, embriones cuyo genoma es exclusivamente de origen paterno, los cuales alcanzan el estadio de blastocisto pero no superan el de somites temprano. Se ha demostrado que si se introducen en embriones normales células embrionarias provenientes de embriones androgénicos éstas serán casi exclusivamente parte de la placenta y excepcionalmente del embrión. En el caso de embriones con participación exclusivamente materna (ginogenotes), al ser transferidos al útero, pueden llegar a implantarse de una manera inadecuada y no tener un desarrollo normal por el escaso tejido placentario que presentan.

Debido a que una pequeña proporción de oocitos se activan espontáneamente, en ocasiones la formación y el desarrollo de los embriones pueden darse sin la activación del espermatozoide y originar un embrión partenogénico o partenote. Actualmente se pueden obtener mediante la activación artificial de los oocitos y la manipulación de las células embrionarias (9). Normalmente los oocitos de la mayoría de las especies son ovulados en el estado de Metafase II (detención meiótica), luego de que la hormona luteinizante (LH) alcance su pico preovulatorio, y al entrar el espermatozoide son activados para continuar la meiosis, expulsar el segundo cuerpo polar y producir una célula haploide (10).

ACTIVACIÓN DE LOS OOCITOS

LOS OOCITOS ACTIVADOS, bien sea espontáneamente o inducidos, son indistinguibles desde el punto de vista morfológico. Las proporciones de inducción espontánea de la partenogénesis bovina varían desde 3.6% a 57% (11). Se ha demostrado que la penetración de los espermatozoides en el oocito está acompañada de la inducción de oscilaciones del calcio intracelular, evento que se ha caracterizado en

murinos, humanos y bovinos luego de fertilización in vitro (12). Los picos de Ca^{++} generados se propagan a través del oocito fertilizado a manera de una onda cuya cascada de eventos da lugar a una exocitosis gránulo-cortical y al escape de la detención meiótica (13). El efecto final de estos cambios es la inactivación del Factor Promotor de la Maduración (MPF), cuyos niveles altos en el citoplasma mantienen al oocito en detención meiótica. Otros efectos son la alteración en el tiempo de formación pronuclear y la tasa de compactación de la cromatina (13).

La activación de los oocitos en metafase II puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos químicos cuya efectividad disminuye a medida que el oocito envejece (14). Estos estímulos permiten la movilización del Ca^{++} intra o extracelular y los consecuentes eventos similares a los observados en la fertilización. Se encuentran entre estos el etanol (15,16), el ionóforo de calcio A23187 (16), la solución ácida de Tyrode (17), la puromicina (18,19) y la estimulación eléctrica. Cada especie responde a la activación en una forma diferente: en los bovinos se ha reportado hasta un 64% de activación utilizando etanol al 7%. Otros estudios como el de Marshall y col. (20) informan un 92% de activación partenogénica con pulsos eléctricos en el modelo del mono tití; en los humanos Levron y col. (21) mostraron un 95% de activación utilizando manitol y electricidad, y finalmente Winston y col. (16) obtuvieron un 16% utilizando etanol. La puromicina produce una activación de los oocitos del 20% pero compromete el desarrollo, dado que el 90% de los embriones no se dividen (18).

No se han reportado nacidos vivos provenientes de embriones partenogénicos, pero pueden alcanzar algún grado de desarrollo. Aprovechando esta característica y las modernas técnicas de cultivos celulares se han realizado ensayos que muestran la formación de tejidos derivados de estos embriones y además la formación de teratomas y teratocarcinomas ováricos de origen partenogénico in vivo.

Los embriones obtenidos pueden ser haploides o diploides dependiendo de la extrusión o no del segundo cuerpo polar. Los embriones diploides (cromosómicamente normales) son los que usualmente alcanzan el estado de blastocisto y sus células pueden formar parte de individuos nacidos vivos. Sin embargo, varios reportes demuestran que estos embriones tienen un menor potencial de desarrollo que puede ser explicado por la baja celularidad al compararlos con embriones de la misma edad obtenidos por fertilización in vivo o in vitro (22). Estos embriones activados en ciertas especies no alcanzan estadios de desarrollo avanzados y en el humano no pasan del estadio de 8 células cuando se cultivan in vitro (16). De la Fuente y King (23) demostraron que los embriones partenogénicos tenían menos células de la masa celular interna y del trofoblasto que los obtenidos por fertilización, y que además su constitución genética estaba alterada siendo poliploides o mixoploides.

De otro lado, utilizando sistemas de agregación celular embrionaria en murinos, Surani y col. (24) en 1977 obtuvieron nacidos vivos a partir de embriones quiméricos que tenían tanto blastómeras de embriones normales como de partenogénicos diploides; reportaron en su estudio que del 30 al 50% de las células de los nacidos vivos eran de origen partenogénico. Estos hallazgos demostraron la posibilidad de que las células de embriones partenogénicos pudieran ser parte de individuos adultos, y dejaban abierta la factibilidad de su manipulación.

Como se mencionó al principio no se han reportado nacidos vivos provenientes de embriones

partenogénicos, pero pueden alcanzar algún grado de desarrollo. Aprovechando esta característica y las modernas técnicas de cultivos celulares se han realizado ensayos que muestran la formación de tejidos derivados de estos embriones y además la formación de teratomas y teratocarcinomas ováricos de origen partenogénico *in vivo*. Es así como Marshall y col. (20), evidenciaron en 1998 la implantación de embriones partenogénicos de mono titi (*Callithrix jacchus*) activados con pulsos eléctricos y con etanol. Otro estudio, el de Strain y col. en 1995 (25), informó el nacimiento de un ser humano proveniente de una quimera partenogénica cuyos leucocitos de sangre periférica provenían de una línea partenogénica 46XX originada durante las primeras divisiones del embrión (se demostró por métodos moleculares que los cromosomas X eran totalmente idénticos); además, los resultados del estudio de los fibroblastos del paciente revelaron una constitución genética de 46 XY. Como en reportes anteriores se informa que los individuos con tejidos de origen partenogénico presentan retardo en su desarrollo.

Se ha realizado la clonación mediante la transferencia de núcleos de células provenientes de embriones partenogénicos a oocitos activados, para así poder aclarar las interacciones citoplasma núcleo a escala embrionaria (26). Esta interacción puede evidenciarse por el hinchamiento del núcleo, la condensación prematura de la cromatina y los cambios en la estructura de los nucléolos (27), en condiciones de ausencia del genoma materno o paterno.

La producción de embriones partenogénicos es importante para el análisis de los mecanismos que regulan el desarrollo embrionario, el crecimiento de los embriones y potenciales individuos uniparentales. En el modelo murino se ha estudiado el papel de los genomas paterno y materno durante el desarrollo, sentando con ello las bases de la impronta genética y también de los patrones de herencia de los centrosomas.

El desarrollo de las técnicas de clonación mediante la transferencia de núcleos se conoce desde 1977,

cuando se transfirieron núcleos de células embrionarias a oocitos enucleados (24). De estos estudios se pudo demostrar la totipotencialidad de los núcleos de las células de las primeras divisiones embrionarias y la pérdida de esta propiedad conforme avanza el desarrollo. El caso de Dolly (28), la ovejita clon, es el ejemplo más publicitado de los nuevos conceptos en biología reproductiva y genética, que se han generado gracias a la manipulación de los gametos, embriones y células somáticas. Para este caso, el núcleo de una célula somática sometida a un tratamiento, borra su mensaje genético y al ser transferido a un citoplasma adecuado es inducido a expresar los mensajes necesarios para el desarrollo embrionario, bien sea en forma directa o indirecta, hasta convertirse en un nacido vivo capaz de reproducirse.

En el análisis de los mecanismos que regulan el desarrollo y el crecimiento de los embriones uniparentales, se ha informado en el modelo murino que el gen del factor de crecimiento insulinoide II (IGFII) que se expresa en los individuos, es el de origen paterno. Se ha observado en estudios de quimeras de agregación una fuerte selección hacia las células de origen partenogénico, excluyéndolas prácticamente de algunos tejidos como el músculo esquelético; esta es una evidencia indirecta de la necesidad de la impronta parental de los genomas (29)

Se ha demostrado en los centrosomas (las organelas celulares en donde se organiza el huso mitótico para la división celular) que su forma de herencia es paterna y por lo tanto, en la mayoría de las especies, su construcción y sus patrones de herencia son motivo de activa investigación (30). Los embriones partenogénicos son fuente de información en esta área dado que dividen sus células sin replicar su centrosoma.

Todo lo expuesto muestra cómo en los mamíferos se pueden observar fenómenos genéticos y de desarrollo que no se observan en otros modelos animales, y que además en asocio de las nuevas tecnologías *in vitro* de manipulación de embriones se pue-

den aclarar y entender los mecanismos de repartición de los cromosomas, del desarrollo embrionario temprano, del estudio de nuevas formas de herencia y, finalmente, gracias a la clonación, la interacción del citoplasma y el núcleo en los modelos embrionarios.

SUMMARY

PARTHENOGENESIS: A MODEL FOR THE STUDY OF EARLY EVENTS OF MAMMALIAN DEVELOPMENT

THE DEVELOPMENT OF NEW REPRODUCTIVE technologies has opened new research lines and allowed to propose concepts in the field of reproductive biology and genetics; one of them is parthenogenesis, defined as the birth of a reproduction-capable individual without the participation of the paternal genome. The successful results depend on the normal activation of the oocyte and the embryonic development. The aim of this paper is to review the molecular events related to the induction of parthenogenesis and their potential use in studying the early events of development in humans and animals. The induction of parthenogenesis associated with new embryo micromanipulation technologies and clonation allow to study chromosome separation, early development, centrosomes and new forms of inheritance and nucleus-cytoplasm interactions.

BIBLIOGRAFÍA

1. GOTTLIEB Y, ZCHORI-FEIN E. Phylogenetic analysis of parthenogenesis-inducing Wolbachia in the genus *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Mol Biol* 1998; 7: 393-396.
2. STOUTHAMER R, BREEUWERT J, LUCK R, WERREN J. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature* 1993; 361: 66-68.
3. STEPHANO J, GOULD M. Parthenogenesis in *Urechis caupo* (Echiura). I. Persistence of functional maternal asters following activation without meiosis. *Dev Biol* 1995; 167: 104-117.
4. ANDERSON R, BREED W. In vivo parthenogenetic activation of ovulated oocytes in a marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *Zygote* 1993; 1: 231-236.
5. KLOTZ C, DABAUVALLE M, PAINTRAIND M. Parthenogenesis in *Xenopus* eggs requires centrosomal integrity. *J Cell Biol* 1990; 110: 405-415.
6. MATZUK F, MEYER H, HORSMANN C. A specific alpha-tubulin is associated with the initiation of parthenogenesis in *Salmo* wheat lines. *Hereditas* 1997; 126: 219-224.
7. WASHITANI-NEMOTO S, NEMOTO S. Activation at the terminal vesicle stage of starfish oocytes produces parthenogenetic development through the failure of polar body extrusion. *Dev Growth Differ* 1997; 39: 295-303.
8. CASSARG, JOHN T, ETCHES R. Observations on ploidy of cells and on reproductive performance in parthenogenetic turkeys. *Poult Sci* 1998; 77: 1.457-1.462.
9. PRESICCE G, YANG X. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Mol Reprod Develop* 1994; 37: 61-68.
10. KAUFMAN M. Methodology: in vitro and in vivo techniques. In: KAUFMAN M (ed). *Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies*. Cambridge: Cambridge University Press; 1983: 20-26.
11. LECHNIAK D, CIÉSLAK D, SOSNOWSKI J. Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology* 1998; 49: 779-785.
12. TAYLOR T. Calcium signals and human oocyte activation: implications for assisted conception. *Hum Rep* 1994; 9: 980-984.
13. LOI P, LEDDA S, FULKA J, CAPPAL P, MOOR R. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol Reprod* 1998; 58: 1.177-1.187.

14. KAUFMAN M. Parthenogenesis: a system facilitating understanding of factors that influence early mammalian development. In: HARRISON R, HOLMES R, eds. *Progress in Anatomy*. Cambridge: Cambridge University Press; 1981: 1-34.
15. NAGAI T. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete Res* 1987; 3: 243-249.
16. WISTON N, JOHNSON M, PICKERING S, BRAUDET P. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. *Fertil Steril* 1991; 56: 904-912.
17. JOHNSON M, PICKERING S, BRAUDE P, VINCENT C, CANT A, CURRIE J. Acid Tyrode's solution can stimulate parthenogenetic activation of human and mouse oocytes. *Fertil Steril* 1990; 53: 266-270.
18. BALAKIER H, CASPER R. Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum Rep* 1993; 8: 740-743.
19. DE SUTTER P, DOZORTZEV D, CIESLAK J, WOLF G, VERLINSKY Y, DYBAN A. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *Assist Reprod Gen* 1992; 9: 740-743.
20. MARSHALL V, WILTON L, MOORE H. Parthenogenic activation of Marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of Marmoset parthenogenotes in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1998; 59: 1.491-1.497.
21. LEVRON J, COHEN J, WILLADSEN S. Highly effective method of human oocyte activation. *Zygote* 1995; 3:157-161.
22. DYBAN AP, BARANOW WS. HAPLOIDIE. In: DYBAN AP, BARANOW, ES (eds): *Die Zytogenetik der Sauger-Embryogenese*. Pareys Studentexte 64, Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey ; 1989: 216-268.
23. DE LA FUENTE R, KING A. Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod* 1998; 58: 952-962 .
24. SURANI H, BARTON S, KAUFMAN M. Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilized embryos. *Nature* 1977; 270: 601-603.
25. STRAIN L, WARNER J, JOHNSTON T, BONTHRON D. A human parthenogenetic chimaera. *Nature Gen* 1995; 11: 164-169.
26. BOEDIONO A, SAHA S, SUMANTRI C, SUZUKI T. Development in vitro and in vivo of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 1995; 5: 1.073 –1.079.
27. WINGER Q. Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development. *Dev Genet* 1997; 2: 160-166.
28. WILMUT I, SCHENKE AE, MCWHIRE J, KIND AJ, AMPBELL K. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810 -813.
29. NAGY A, SASS M, MARKKULA M. Systematic non-uniform distribution of parthenogenic cells in adult mouse quimeras. *Development* 1989; 106 : 321- 324.
30. SCHATTEN G, SIMERLY C, SCHATTEN H. Maternal inheritance of centrosomes in mammals? Studies on parthenogenesis and polispermy in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 6.785 -6.789.

