

Tesis de Posgrado

Gametas femenina y masculina de Calomys laucha y Calomys musculus : características, comportamiento y sus interacciones

Lasserre, Andrea

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lasserre, Andrea. (1997). Gametas femenina y masculina de Calomys laucha y Calomys musculus : características, comportamiento y sus interacciones. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2986_Lasserre.pdf

Cita tipo Chicago:

Lasserre, Andrea. "Gametas femenina y masculina de Calomys laucha y Calomys musculus : características, comportamiento y sus interacciones". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2986_Lasserre.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Gametas femenina y masculina de *Calomys laucha* y *Calomys musculinus*: características, comportamiento y sus interacciones.

Doctorando: Lic. Andrea Lasserre

Director de Tesis: Dr Alfredo D. Vitullo

**Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
(CEFYBO-CONICET)**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

1997

Female and male gametes of *Calomys laucha* and *Calomys musculinus*: characteristics, behaviour and interactions.

Palabras claves:

Rodentia, *Calomys*, superovulación, activación partenogenética, fecundación interespecífica

Key words:

Rodentia, *Calomys*, superovulation, parthenogenetic activation, interspecies fertilization

*Si todos los ríos son dulces,
de dónde saca la sal el mar*

Pablo Neruda, Libro de las Preguntas

Agradecimientos

A Mariano (Ostuni), por ayudarme a seguir, por darme fuerzas para superar los momentos difíciles y por confiar en mí más que yo misma

A mis padres, Enrique y Beatriz, por su apoyo incondicional siempre

A la “negra” Elisa (Cebal) por su compañerismo, por su apoyo cotidiano, por su enorme paciencia para leer cada capítulo de esta tesis, y, por las cervecitas que fueron menos de las que quisimos

Al CEFYBO y al CONICET, por haberme brindado los medios para realizar esta tesis

A la Dra Ma Cristina Maggese por la orientación de mi carrera de doctorado

Al Dr Alfredo D. Vitullo por la dirección de esta tesis

A Virgina Novaro, Silvina Pérez Martínez, Alicia Motta, Mariel Boquet, Belén Herrero y Alicia Jawerbaum por los mates, los almuerzos, el eterizador, la estufa de cultivo, el flujo laminar y sobre todo las largas charlas reparadoras de espíritu

A Ana Inés Casella e Isabel Zaccardi, que me ayudaron siempre aún en la distancia

Al Dr Claudio Barros por los almuerzos en la Pontificia que contribuyeron a convencerme que escribir esta tesis era posible y sobre todo por sus invaluable lecciones

A Pedro Cortés (Pontificia Universidad Católica de Chile) por haberme hecho “cortesmente” muchas de las Fotos de esta tesis

A Karpluk por su valiosa colaboración, por poner una luz en el camino al bioterio y por no dejarme encerrada adentro más que dos veces

A mis amigos Andrea, Laura y Pablo por su comprensión y por haberme acompañado a inyectar los *Calomys* los fines de semana infinitamente. **A Lidia** por juntarme las “latitas” donde los *Calomys* se refugian.

A todos los roedores que murieron por esta causa

Indice

i. Resumen	11
ii. Abstract	12

Capítulo 1. Introducción

1.1 Quién es <i>Calomys</i>	14
1.1.1 Ubicación taxonómica de la subfamilia Sigmodontinae	
1.1.2 El género <i>Calomys</i> : características epidemiológicas y relaciones filogenéticas de sus especies	15
1.1.3 Morfología espermática del género <i>Calomys</i>	18
1.1.4 Condiciones que permiten elegir a <i>Calomys</i> como modelo experimental	20
1.2 Desde el espermatozoide y el oocito a la formación de pronúcleos	
1.2.1 La gameta femenina de mamíferos: estructura, origen y función del oocito	
Origen del oocito	22
Crecimiento, desarrollo y maduración folicular	23
Detención del oocito en metafase II	25
Ovulación	26
Estructura y función de la zona pelúcida	27
Ciclo estral	29
1.2.2 La gameta masculina de mamíferos: estructura, origen y función del espermatozoide	30
Maduración epididimal del espermatozoide	31
1.2.3 Interacción espermatozoide-oocito	36

Cómo es el mecanismo de entrada y penetración al oocito	40
Especie-especificidad en la interacción entre gametas	43
1.2.4 Activación del oocito	46
1.2.4.1. Activación como posible nivel funcional de incompatibilidad gamética	
1.2.4.2. Variabilidad morfológica espermática y activación del oocito	49
1.2.4.3. Activación por estímulos partenogenéticos	50
Cómo se activa un oocito de modo partenogenético	54
Tipo de partenogenones	56
1.2.5. Decondensación del núcleo del espermatozoide y desarrollo de pronúcleos	
1.3. Objetivos	61

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Animales utilizados	64
2.1.1. <i>Calomys musculinus</i> y <i>Calomys laucha</i>	
2.1.2. <i>Misocricetus auratus</i> (hamster dorado)	
2.1.3. <i>Mus musculus</i>	
2.2. Reactivos y medios de cultivo empleados	65
2.3. Inducción de la superovulación y recolección de los oocitos	67
2.3.1. Protocolo de inducción hormonal	67
2.3.2. Análisis estadístico	67
2.4. Activación partenogenética <i>in vitro</i>	69
2.4.1.a. Protocolo de activación con etanol	69
2.4.1.b. Protocolo de activación con cloruro de estroncio	69

2.4.1	Evaluación de los oocitos	70
2.4.2	Cultivo <i>in vitro</i> de los partenogenones	70
2.4.3	Dinámica de Activación	70
2.4.4	Análisis Estadístico	72
2.5	Comportamiento <i>in vitro</i> de la gameta masculina: estudio de las características <i>in vitro</i> de los espermatozoides de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i>	72
2.5.1	Estudio de la motilidad <i>in vitro</i> de los espermatozoides de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i>	73
2.5.2	Análisis de la reacción acrosomal y técnica de CTC	73
2.5.3	Dinámica de capacitación y test de hamster	74
2.5.4	Análisis estadístico	75
2.6.	Fecundación <i>in vitro</i> homóloga y heteróloga	75
2.6.1	Ensayos de fecundación <i>in vitro</i>	75
2.6.2	Binding y Attachment	76
2.6.3.	Penetración de la zona pelúcida, formación de pronúcleos y desarrollo <i>in vitro</i> preimplantativo	76

Capítulo 3. Resultados

3	Superovulación de hembras de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i>	
3.a.	Superovulación en <i>Calomys musculinus</i>	78
3.a.1.	Determinación del intervalo entre hormonas exógenas	
3.a.2.	Determinación de las dosis hormonales adecuadas	

3.a.3. Análisis del horario de recolección de los oocitos maduros	80
3.a.4. Tipo de respuesta ovulatoria, número medio de oocitos y edad de las hembras	
3.a.5. Calidad de los oocitos obtenidos por superovulación vs. edad de las hembras	
3.b. Superovulación en <i>Calomys laucha</i>	
3.b.1. Determinación del intervalo entre hormonas exógenas	88
3.b.2. Determinación de las dosis hormonales adecuadas	
3.b.3. Análisis del horario de recolección de los oocitos maduros	92
3.b.4. Tipo de respuesta ovulatoria, número medio de oocitos y edad de las hembras	
3.b.5. Calidad de los oocitos y edad de las hembras	97
3.c. Discusión y conclusiones parciales: Superovulación en tres especies comparadas: <i>C. musculinus</i> , <i>C. laucha</i> y <i>C. callidus</i>	99

Capítulo 4. Activación partenogenética de oocitos maduros, timing de formación pronuclear y desarrollo *in vitro* de embriones partenogenéticos de *C. musculinus* y *C. laucha*

4.a. Activación de oocitos maduros de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> con etanol o cloruro de estroncio en presencia y ausencia de las células del cúmulo.	107
4.a.1. Tasa de activación comparada de oocitos de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> con etanol	107
4.a.2. Tasa de activación comparada de oocitos <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> con cloruro de estroncio	111

4.a.3. Tipo de partenogones obtenidos en oocitos <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> por incubación con etanol	116
4.a.4. Tipo de partenogones obtenidos en oocitos <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> por incubación con cloruro de estroncio	121
4.b. Dinámica de formación de pronúcleos de embriones partenogénicos comparada en <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i>	124
4.c. Desarrollo preimplantativo <i>in vitro</i> de los partenogones haploides y diploides de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> por incubación con etanol o cloruro de estroncio	
4.c.1. Influencia del etanol en el desarrollo preimplantativo	126
4.c.2. Influencia del cloruro de estroncio en el desarrollo preimplantativo	128
4.d. Discusión y conclusiones parciales: Activación partenogénica de oocitos de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> : embriones, su desarrollo y dinámica de formación nuclear <i>in vitro</i>	135

Capítulo 5 Interacciones homólogas y heterólogas de las gametas de *C. musculinus*, *C. laucha* y otros roedores

5.a. Estudio de la capacitación espermática, reacción acrosomal, hiperactivación y motilidad en T6 y Talp de los espermatozoides de <i>C. laucha</i> y <i>C. musculinus</i> .	
5.a.1. Motilidad.	146
5.a.2. Hiperactivación.	150
5.a.3. Reacción acrosomal y capacitación	153
5.a.4. Test de Hamster	156

5.b. Interacción espermatozoide-zona pelúcida entre gametas de género <i>Calomys</i>	
5.b.1. Binding y attachment	158
5.b.2. Penetración de la zona pelúcida y formación de pronúcleos	163
5.b.3. Desarrollo preimplantativo <i>in vitro</i>	165
5.c. Interacción entre <i>Calomys</i> y otros roedores	169
5.c.1. Binding y attachment de espermatozoides de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i> a oocitos de hamster dorado y ratón a las 2.5 y 5 hs de incubación <i>in vitro</i> .	
5.c.2. Fecundación interespecífica <i>Calomys</i> -hamster y <i>Calomys</i> -ratón	172
5.d. Discusión y conclusiones parciales: Interacción entre gametas. Unión especie-específica y sus implicancias	177
5.d.1 Adquisición de la capacidad fecundante <i>in vitro</i> de <i>C. musculinus</i> y <i>C. laucha</i>	
5.d.2. Afinidad de los espermatozoides de <i>C. laucha</i> , <i>C. musculinus</i> y <i>C. callidus</i> por oocitos homólogos y heterólogos	183
5.d.3. Relaciones homo y heteroespecíficas dentro del género <i>Calomys</i>	183
5.d.4 Interacciones gaméticas entre <i>Caloms-hamster</i> y <i>Calomys-ratón</i>	190

Capítulo 6. Discusión y conclusiones finales: <i>Calomys</i>, un nuevo modelo para el estudio de la biología del desarrollo	194
--	-----

Capítulo 7. Bibliografía	206
---------------------------------	-----

i. RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron las características biológicas de las gametas femenina y masculina de *C. musculinus* y *C. laucha* y sus interacciones interespecíficas dentro y fuera del género. Brevemente, los parámetros estudiados (superovulación, activación partenogénica, dinámica de capacitación *in vitro* del espermatozoide, fecundaciones homólogas interespecíficas) han mostrado para estas especies que:

- 1- tienen características propias inherentes a su propio género y especie (por ejemplo, ritmo endógeno de LH, activación partenogénica, capacitación *in vitro* del espermatozoide) por lo cual no pueden ser homologables a los modelos convencionales de roedores de laboratorio sino que constituyen en sí mismos un modelo nuevo para estudios de biología del desarrollo.
- 2- las células del cúmulo, la zona pelúcida, y/o la membrana plasmática del oocito no constituyen una barrera efectiva a la fecundación heteróloga intragenérica.
- 3- la diferencia en la morfología espermática entre *C. musculinus* (con gancho acrosomal) y *C. laucha* (ausencia total de gancho acrosómico) mostró una relación especie-específica en el proceso de activación
- 4- las gametas de *Calomys* mostraron mayor afinidad en la interacción con las gametas de hamster (Cricetidae) que con las gametas de ratón (Muridae). Estas observaciones apoyan la hipótesis de Reig (1982) que sostiene que estas especies pertenecen a la familia Cricetidae.

ABSTRACT

The present study focused on the characterization of the biological properties of female and male gametes in *C. musculinus* and *C. laucha* and the interspecific interactions between them and with other extra-generic rodent species. Briefly, the main parameters analyzed (superovulation, parthenogenetic activation, *in vitro* capacitation of spermatozoa, interspecies fertilization) showed that:

- 1- *C. musculinus* and *C. laucha* had specific and inherent features related to their genus and species (i.e. endogenous LH rhythm, a high parthenogenetic activation, *in vitro* capacitation of spermatozoa). They can not be directly related to the typical laboratory rodents. They constitute a new model for developmental biology research.
- 2- cumulus cells, zona pellucida and plasma membrane of the oocyte are not effective barriers to interspecific fertilization.
- 3- the differences on sperm head morphology between *C. musculinus* (hooked head) and *C. laucha* (hookless head) showed a specific relation to the activation process.
- 4- *Calomys*' gametes interacted more easily with golden hamster (Cricetidae) than *Mus musculus* (Muridae) gametes. This observations support the hypothesis that *Calomys* species belong in the Cricetidae family, as previously described by Reig (1982).

Capítulo 1

INTRODUCCION

1.1 Quién es *Calomys*

1.1.1 Ubicación taxonómica de la subfamilia Sigmodontinae

El 43% de las especies actuales de mamíferos de América del Sur se agrupan en el Orden Rodentia, que comprende tres Subórdenes: Sciuomorpha, Caviomorpha y Miomorpha. Este último incluye, aproximadamente 253 especies que representan el 55% de las especies de roedores y el 22% de las especies de mamíferos de este continente. Debe destacarse que todas ellas pertenecen a una única familia: Cricetidae (Reig, 1984). Se ha especulado mucho acerca del origen de estos roedores y su antigüedad en el continente, pero hay fuertes evidencias que sugieren que se diversificaron localmente a partir de sus ancestros, los cricétidos del Viejo Mundo (hamsters) que habrían invadido la región desde América del Norte entrando en el Mioceno temprano antes de que se produjera la ruptura del puente de Panamá (Reig, 1981). Musser y Carleton (1993) han considerado que no es oportuno incluir a estos roedores sudamericanos dentro de la familia Cricetidae (Reig, 1984) por lo cual la subfamilia Sigmodontinae fue eliminada de esta última y pasada a la familia Muridae en el catálogo anual de las especies de mamíferos del mundo (Mammals Species of the World, 1993) y las especies se incluyeron dentro de la familia Muridae (ratas y ratones). Para el desarrollo de esta tesis se ha tomado la ubicación taxonómica de Reig (1981, 1982 y 1984) por considerarse la más apropiada. En base a caracteres morfológicos, craneanos y dentarios, Reig (1981 y 1984) propuso distinguirlos a nivel de Subfamilia con el nombre de Sigmodontinae para diferenciarlos de aquellos del Norte. Los roedores sigmodontinos representan un grupo muy diversificado, que ocupan hábitats tan disímiles como montañas, selvas y praderas (Reig, 1982). Es esta

diversidad morfológica y ecológica la que hace de los sigmodontinos un grupo con interesantes características en sus estrategias reproductivas y comportamentales. Se reconocen 7 tribus dentro de esta subfamilia siendo las tres tribus dominantes por su riqueza de especies: Oryzomini, Akodontini y Phyllotini. Los filotinos representan el 18% de las especies vivientes y poseen especializaciones en su morfología cráneo-dentaria y en su sistema digestivo que los ubicaría en un grado evolutivo más avanzado, tanto en relación a los orizominos como a los akodontinos (Hershkovitz, 1962; Reig, 1984). Dentro de los filotinos vivientes el género *Calomys* sería el más ancestral y estaría muy próximo al hipotético ancestro de la tribu (Reig, 1984).

1.1.2. El género *Calomys*: características epidemiológicas y relaciones filogenéticas de sus especies

Originados en la región de la Puna, estos roedores se dispersaron hacia el Norte y Este de las praderas de Sudamérica y ocupan actualmente una gran variedad de habitats en Argentina, Bolivia, Brasil, Perú, Paraguay, Uruguay y Venezuela. Actualmente se reconocen 9 especies dentro del género. Los hábitats y ecología de estos roedores han sido bien estudiados (Reig, 1965; Crespo, 1966, Lord et al., 1971, Mares, 1977, de Villafañe et al., 1977, Contreras y Rossi 1980, Busch et al., 1984). Gran parte del interés que han despertado estas especies se debe a que son vectores de Arenavirus y protozoos peligrosos para la salud del hombre. *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* actúan como reservorio natural del virus Junín (Sabattini et al., 1977; Weissenbacher y Damonte, 1983), un Arenavirus perteneciente al complejo Machupo-Tacaribe, y que es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina. *Calomys callosus* ha sido reportado como reservorio de otro Arenavirus, el virus Machupo (Johnson et al.,

1966; 1975), y de flagelados tales como *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas (Ribeiro, 1973). Algunos autores han implicado a *Calomys laucha* y *Calomys msuculinus* como posibles reservorios de *T. cruzi* (Moretti et al., 1980).

La dispersión geográfica de *Calomys* fue acompañada por especiación cromosómica. Datos bioquímicos sugieren que la divergencia de estas especies fue temprana y habría ocurrido hace por los menos 6 millones de años (Gardenal et al., 1990). Estudios cromosómicos realizados por Vitullo et al. (1990) y Espinosa et al. (1997) han permitido establecer las relaciones filogenéticas del género en base a sus características cariológicas. Básicamente, a partir de un cariotipo ancestral $2n=70$ (Pearson y Patton, 1976) con todos sus cromosomas telocéntricos, se habrían producido distintas fusiones céntricas e inversiones que habrían ido originando las diferentes especies (Figura i). Según estos estudios las especies podrían agruparse del siguiente modo:

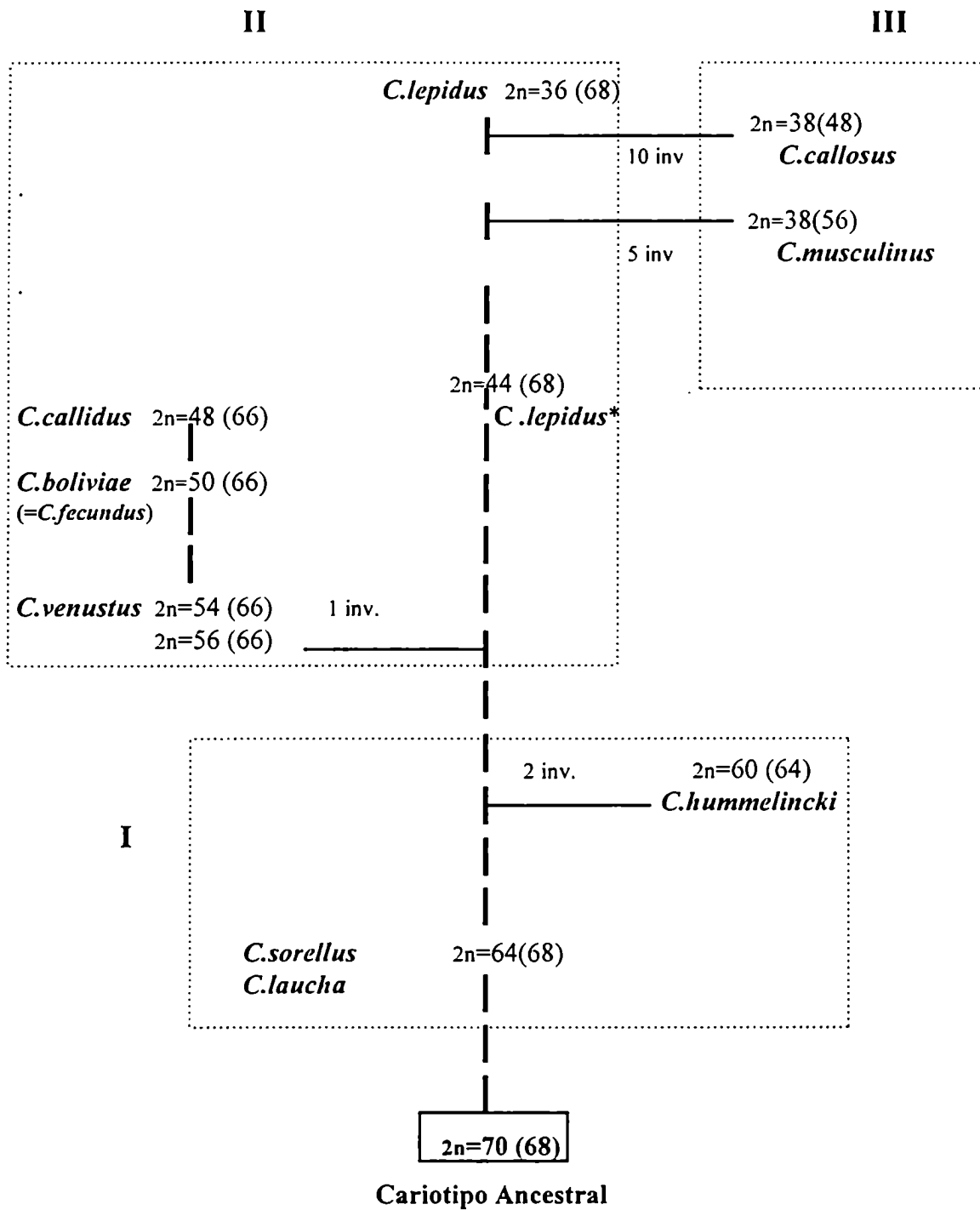
Grupo I: especies con cariotipos con un alto número cromosómico ($2n=64-60$), muy relacionados con el ancestral donde la mayor parte de los cromosomas son telocéntricos: *C. hummelincki*, *C. sorellus* y *C. laucha*.

Grupo II: especies con cariotipos asimétricos con un número cromosómico moderado ($2n=56-48$) y cromosomas bibraquiados y monobraquiados: *C. callidus*, *C. boliviae* (= *C. fecundus*), *C. venustus* y *C. lepidus*.

Grupo III: especies muy distantes del cariotipo ancestral debido a un alto grado de transformaciones. Los cromosomas son metacéntricos, submetacéntricos y subtelocéntricos ($2n=36-38$): *C. musculus* y *C. callosus*.

Figura i

Vías de evolución cromosómica propuestas para el género *Calomys*

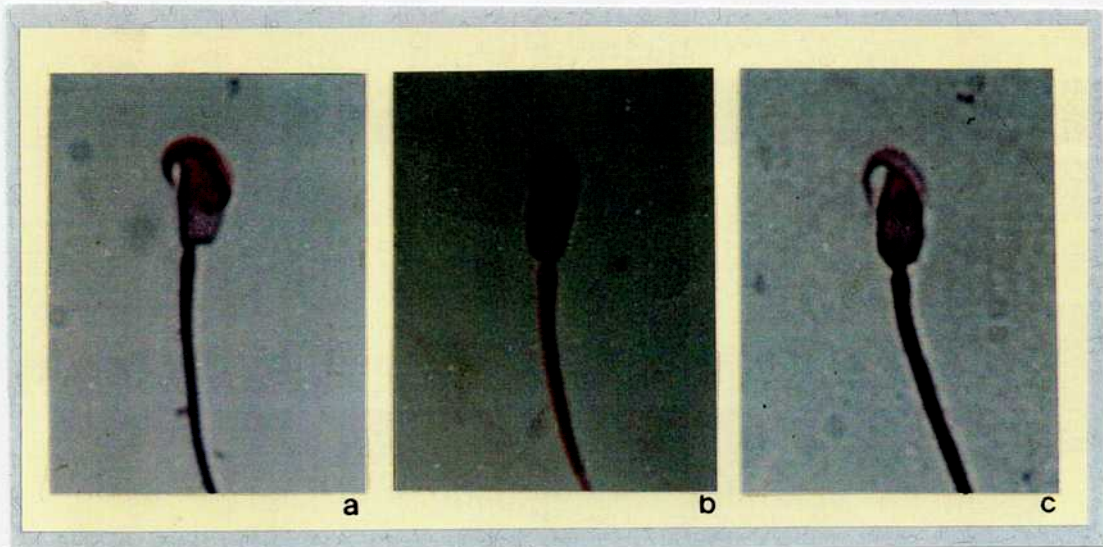


Cada línea vertical indica una fusión Robertsoniana (17 fusiones entre el cariotipo ancestral hipotético y *C. lepidus* 2n=36). Las líneas horizontales muestran inversiones pericéntricas. Los recuadros grandes encierran especies de los grupos cromosómicos I, II, y III. Los números entre paréntesis representan el número fundamental autosómico (NF). El asterisco (*) en *C. lepidus* indica una especie recientemente descrita por Espinosa et al., 1997.

1.1.3 Morfología espermática

En los mamíferos eutherios, la evolución de la morfología del espermatozoide, especialmente en roedores, ha involucrado (a) cambios en la organización de la cabeza que la llevan a grados de complejidad cada vez mayores, y (b) elongación de la cola. Cuando se examinaron los espermatozoides de diferentes especies de *Calomys* (Roldán et al., 1992) se evidenció que las especies más relacionadas con la condición ancestral (por ejemplo *C. laucha*) tenían espermatozoides con la cabeza oval sin gancho acrosomal y de longitud total corta (56 μm). En particular el espermatozoide de *C. laucha* tiene un núcleo piriforme asimétrico y la cola se inserta centralmente en la base de su cabeza chata. Contrariamente, en especies con un alto grado de transformación cariológica los espermatozoides adquieren gancho acrosomal en sus cabezas y se hacen más largos (72-86 μm). Un ejemplo es el espermatozoide de *C. musculinus* tiene un núcleo poligonal, la cabeza es chata y la cola se inserta excéntricamente y es ipsilateral a la cabeza. En el espermatozoide de *C. callidus* el núcleo es piriforme y simétrico, la base de la cabeza es cóncava y la cola se inserta centralmente. Los resultados de morfología espermática y de evolución cromosómica en *Calomys* muestran claramente que los espermatozoides sin gancho acrosomal, cabeza oval y talla corta representan una condición primitiva a partir de la cual luego se produce la transformación morfológica hacia el alargamiento de la región apical (Foto A).

Foto A
Morfología espermática de
Calomys musculus, *Calomys laucha* y *Calomys callidus*.



Los espermatozoides muestran las distintas morfologías espermáticas dentro del género *Calomys*: a) *C. musculus* la cabeza es chata con gancho acrosomal y la cola se inserta excéntricamente y es ipsilateral a la cabeza, b) *C. laucha* la cola se inserta centralmente en la base de su cabeza chata sin gancho acrosomal. y c) *C. Callidus* la base de la cabeza es cóncava, presenta gancho acrosomal y la cola se inserta centralmente .

1.1.4 Condiciones que permiten elegir a *Calomys* como modelo experimental.

La investigación en el área de la biología reproductiva en mamíferos ha progresado mucho en los últimos años mostrando avances sorprendentes como la clonación, la transgénesis, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en los ovocitos, entre otros. Sin embargo, el estudio de animales de laboratorio se ha restringido a muy pocas especies que se han denominado convencionales: rata, ratón, cobayo y hamsters, todas pertenecientes a los roedores del Viejo Mundo. Como consecuencia de este hecho, existen muy pocos estudios realizados en especies no convencionales, a los que pertenecen los roedores sigmodontinos.

Se han hecho muy pocos estudios en especies sudamericanas (Cutrera, 1989; Roldán et al., 1985) lo que ha impedido darle hasta el momento la importancia que se merecen como modelo experimental para biología de la reproducción. Esto ha llevado a un retraso en el conocimiento de las características reproductivas de nuestra fauna en cautiverio y en sus poblaciones naturales.

El género de roedores *Calomys* constituye un modelo animal particularmente adecuado para estudios en esta área dado que:

- 1- Se dispone de un modelo de evolución cromosómica del género que permite interrelacionar las diferentes especies reconocidas a través de reordenamientos cromosómicos por mecanismos de transformación robertsoniana. Esto permite disponer, en el género, de un mismo genoma que ha sufrido una transformación progresiva y generado la separación de diferentes especies plenas.

2- La fecundación interespecífica es posible entre distintas especies del género (Roldán et al., 1985)

3- La morfología espermática es altamente variable en las distintas especies, caracterizándose en algunos casos por la ausencia total de gancho acrosómico (v.g *Calomys laucha*) o bien mostrando diferencias morfológicas del segmento ecuatorial, estructura relacionada al proceso de fusión del espermatozoide al oocito.

1.2. Desde el espermatozoide y el oocito a la activación del genoma embrionario

1.2.1 La gameta femenina de mamíferos: estructura, origen y función del oocito

Origen del oocito:

El ovario es una glándula mixta, *exócrina* -dada por la producción de oocitos- y *endócrina* -dada por la síntesis de hormonas, principalmente estrógenos y progesterona-. Los ovarios son órganos pares cuya forma varía según la especie pero en general son ovales. Su corte longitudinal muestra dos porciones: una externa o cortical y otra interna o medular. En la corteza pueden ubicarse los folículos inmaduros, en crecimiento y de Graaf, los cuerpos lúteos y los cuerpos albicans. La zona medular está compuesta por tejido conectivo, fibras musculares y vasos sanguíneos y linfáticos de mayor tamaño.

La ovogénesis, es decir la formación, desarrollo y maduración de las gametas femeninas, comienza en la vida fetal del individuo con la división mitótica de las oogonias. Estas células se transforman en oocitos y comienzan el proceso de meiosis, el cual permite obtener una célula haploide capaz de ser fecundada. En los mamíferos la ovogénesis comienza en la etapa temprana del desarrollo fetal y termina al alcanzar la madurez sexual. Los oocitos se originan a partir de un pequeño número de células germinales primordiales (stem cells) que tienen origen extragonadal. Su aparición en los embriones tempranos (antes de la formación del surco primitivo) señala el comienzo de la ovogénesis. Estas células, única fuente de células germinales adultas, proliferan durante 2 o 3 días y luego migran (movimientos ameboides controlados por

quemotaxis) hacia los surcos genitales donde se producirá luego la diferenciación gonadal (ovarios o testículos). En el ratón que tiene 21 días de gestación, la diferenciación gonadal ya está completa el día 13. El ovario ya tiene casi la totalidad de sus oogonias cuya característica principal es la mitosis activa. Durante la primera profase meiótica la replicación final de ADN toma lugar en la preparación de la meiosis. Esta actividad de síntesis es la señal que marca la transformación de una oogonia en un oocito primario. El pool de oocitos que se desarrollen entonces será la única fuente de oocitos de que disponga el adulto al alcanzar la madurez sexual. En el ratón serán en promedio 8000 oocitos detenidos en la metafase I de la meiosis. A las dos semanas del nacimiento el 50% de los oocitos mueren como producto de que muchos de ellos se quedan en el epitelio del ovario. Este es un período de gran actividad metabólica ya que el oocito y la célula folicular que lo contiene crecen en forma conjunta (Baker, 1982).

Crecimiento, desarrollo y maduración folicular:

Existen tres fases del crecimiento folicular:

1-Folículo primario: es considerado como tal aquel cuya oogonia es rodeada sólo por una capa de células foliculares (granulosas). En este momento el oocito es una célula de gran tamaño, con un núcleo grande, la vesícula germinal, cromatina dispersa y uno o dos nucléolos prominentes. El citoplasma es pálido con organelas cercanas al núcleo. A medida que el folículo crece, las células foliculares que rodean al oocito se transforman paulatinamente de células planas a células de tipo cúbico y más tarde en células de tipo cilíndrico. Cada folículo se halla rodeado por la membrana basal que lo separa del estroma ovárico (Crisp, 1992; Wassarman, 1994).

2-Folículo en crecimiento: el folículo primario conforme va creciendo se interna en la corteza ovárica. Las células granulosas proliferan y se estratifican en varias capas que se asientan en la membrana basal y lo rodean células de la teca interna. El oocito empieza a crecer y alcanza el doble del tamaño original como producto de la entrada de sustancias nutritivas que atraviesan las células de la granulosa. En este momento aparece una secreción glucoproteica que se asienta entre el oocito y la granulosa, formándose así la corona radiata. El folículo por su parte también aumentará su tamaño por la presencia de vacuolas o cuerpos de Call-exner que por su coalescencia formarán luego el antro folicular. De este modo se origina el folículo maduro o de Graff (Crisp, 1992; Wassarman, 1994).

El crecimiento de los folículos hasta la formación del antro no es estrictamente dependiente de gonadotropinas, pero la formación del folículo maduro sí requiere la presencia de hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). La FSH tiene una función primordial en el inicio de la formación del antro y estimula la mitosis de las células de la granulosa y la formación del líquido folicular. El estradiol aumenta el efecto mitótico de la FSH (Crisp, 1992). Las células de la teca son estimuladas sólo por la LH y hay receptores para esta hormona desde la formación de dichas células. En general en los mamíferos cada folículo contiene un sólo oocito pero en el caso de la cerda pueden formarse folículos con varios oocitos (folículos poliovulares).

3-Folículo de Graaf o maduro: está formado desde dentro hacia afuera por el oocito en forma excéntrica, la membrana pelúcida y la corona radiata (cúmulo ovífero), el antro folicular, las células de la granulosa, la teca interna y la externa. Esta última sólo estará presente en los folículos maduros.

Durante cualquier etapa del desarrollo folicular puede suceder un proceso de regresión del folículo denominado atresia folicular. Este proceso se vincula con cambios histológicos, morfológicos y bioquímicos que varían mucho con el momento de desarrollo del folículo, que estarían relacionados con una alteración de la participación de las células de la granulosa y de la teca interna en el proceso de maduración. La teca interna cumple una función endócrina que consiste en la producción de andrógenos y estrógenos (Crisp, 1992).

Fluido folicular: el fluido folicular se origina principalmente en el plasma periférico y se acumula en el antro. Contiene sustancias específicas como esteroides (17- β -estradiol y progesterona), glucoproteínas, sales, albúmina, inmunoglobulinas (IgA, IgM), glucosa, fructosa y manosa. También contiene una serie de sustancias no esteroides con importantes funciones de regulación del crecimiento folicular, maduración de oocitos, ovulación, transporte de oocitos al oviducto y secreción de gonadotropinas (Wassarman, 1994).

Detención del oocito en metafase II

La detención en metafase II es regulada por varios factores (Whitaker, 1996), entre ellos por la presencia del péptido inhibidor de la maduración del oocito (IMO) que se secreta por las células de la granulosa de pequeños folículos antrales (Yanagimachi, 1994). Existe una correlación directa entre el tamaño del folículo y el grado de maduración del oocito. El fluido folicular de pequeños folículos antrales contiene más IMO que el fluido de folículos preovulatorios (Schultz, 1991; Downs, 1993). Altos niveles de cAMP también evitan la maduración del oocito tanto *in vitro* como *in vivo*. La FSH que incrementa los niveles de cAMP contribuye a esta detención.

Cómo se desencadena el reinicio de la meiosis? La LH controla el reinicio de la meiosis independientemente de la esteroidogénesis lo que incluye la ruptura de la vesícula germinal (GVDB), la formación del huso metafásico, la migración del mismo hacia el cortex del oocito, la separación de los cromosomas homólogos, la formación del primer cuerpo polar y la detención en la metafase II dentro del folículo preovulatorio (Downs, 1993). A pesar de la participación de la LH, la mayor atención se ha puesto en el factor promotor de la maduración (MPF) que regula la condensación cromosómica. La GVDB, dado que su presencia aumenta durante la MI y MII (Schultz, 1991). A su vez el MPF es regulado por niveles de cAMP de modo que altos niveles de cAMP inactivan el MPF que llevan a una detención en MI, y bajos niveles de cAMP activan el MPF promoviendo así la maduración (Schultz, 1991).

Ovulación

La ovulación se manifiesta en respuesta a una combinación de mecanismos endócrinos, bioquímicos, farmacológicos, neuromusculares y neurovasculares. No es un evento explosivo, sino lento (Baker, 1982; Murdock, 1993; Wassarman, 1994). El folículo destinado a ser ovulado es reclutado de una cohorte de muchos folículos preantrales en los primeros días del ciclo. La FSH induce a los receptores de LH en el oocito y las células de la granulosa y de la teca. Las células de la teca interna se unen a la LH y secretan andrógenos, algunos de los cuales son transportados al epitelio folicular para convertirse en estrógenos. La FSH induce enzimas de tipo aromatasas en el retículo endoplasmático liso de las células de la granulosa. Las células de la granulosa convierten los andrógenos en estrógenos. Finalmente la cantidad de oocitos

a ovularse dependerá del aumento en la relación FSH/LH. Al llegar a su máximo crecimiento el folículo maduro sobresale de la superficie ovárica. Los vasos sanguíneos y linfáticos que rodean al folículo determinan un aumento en la tasa de secreción de líquido folicular. Al aumentar la presión se adelgaza la pared folicular en la zona donde luego tendrá lugar la ovulación. Gracias a la acción de factores foliculares y gonadotrofinas el folículo se rompe y el oocito secundario sale rodeado por la membrana pelúcida y de allí es transportado hacia el oviducto (Baker, 1982; Murdock, 1993; Wassarman, 1994).

Las células del cúmulo no pueden distinguirse de las células de la granulosa. La disgregación de estas (corona radiata) liberan al oocito dejándolo cubierto sólo por la zona pelúcida que facilitará la captación del óvulo por el oviducto.

Estructura y funciones de la zona pelúcida

La zona pelúcida es una capa de glicoproteínas que protege los oocitos y los embriones de daños físicos. Si bien la fecundación y el desarrollo son posibles *in vitro* en ausencia de la zona pelúcida, su presencia es esencial para el desarrollo preimplantativo *in vivo*. Sin la zona pelúcida, los blastómeros de un embrión se disociarían uno de otro o se agregarían a blastómeros de otros embriones perdiéndose la individualidad de los embriones. Más aún el embrión podría adherirse al epitelio oviductal y perecer (Yanagimachi, 1994).

El tamaño, la rigidez y el ancho de la zona pelúcida varía de especie en especie. En los marsupiales por ejemplo es muy delgada (1-2 μm), mientras que en el cerdo es más gruesa (16 μm) (Yanagimachi, 1994). En general el material que constituye la zona pelúcida de un oocito maduro es más denso en la cara interna que en la cara externa.

La cara externa está fenestrada y tiene una estructura esponjosa en tanto que la interna es de apariencia granular (Jedlicki y Barros, 1985). Estas diferencias se pueden apreciar fácilmente en el microscopio electrónico de barrido. La apariencia esponjosa de la zona podría reflejar la madurez de la zona y la penetrabilidad del espermatozoide ya que la zona pelúcida de oocitos de humano con la cara externa más lisa son menos penetrables que aquellos de apariencia más esponjosos (Yanagimachi, 1994). Esta diferencia entre ambas caras así como sus distintas densidades ópticas podrían deberse a la adhesión de glicoproteínas oviductales.

La zona pelúcida es la única matriz extracelular que rodea al oocito de mamíferos y está compuesta por glicoproteínas formadas durante la ovogénesis. Estas glicoproteínas se depositan entre el oocito y las células de la granulosa durante la fase temprana del desarrollo folicular. Existen evidencias que en roedores las glicoproteínas de la zona pelúcida se expresan sólo en el oocito, pero en otros mamíferos por ejemplo cerdo y conejo se expresan en el oocito y las células de la granulosa (Yanagimachi, 1994). En el ratón la zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas las cuales se denominan según su patrón de migración en geles de SDS-PAGE como sigue: ZP1 (200 kDa), ZP2 (120 kDa) y ZP3 (80 kDa) (Wassarman, 1992 y 1996). La zona pelúcida de conejo, humano (Dunbar et al 1994), y hamster (Ahuja y Howell, 1983) también está formada por tres glicoproteínas. Por otro lado la zona de cerdo tiene 5 proteínas diferentes: ZP1, ZP2, ZP3a, ZP3b y ZP4 (Dunbar, 1983; Dunbar et al., 1994). Por medio de técnicas moleculares se han clonado y caracterizado muchos de los genes de las glicoproteínas de la ZP. Brevemente, comparando la secuencia aminoacídica de las proteínas de las ZP clonadas se ha hecho una clasificación que comprende 3 familias: 1) *la familia de las ZP3*: incluye la

ZP3 de ratón, ZP3 B de cerdo, ZP3 humano y probablemente conejo R45. 2) *La familia de las ZP2*: incluye la ZP2 de ratón, ZP1 de cerdo, ZP1 humano y conejo R75. 3) Las ZP2 y ZP4 de cerdo provendrían de proteínas derivadas por la proteólisis de ZP1. *La familia de proteínas de 55 kDa* que incluye la R55 de conejo, la Zp3a de cerdo y presumiblemente la ZP2 humana (Dunbar et al., 1994). Wassarman (1992 y 1996) propuso un modelo para la zona pelúcida de ratón en el cual IZP2-ZP3 forman heterodímeros que son organizados en filamentos que serían cruzados y enlazados por la ZP1. La función de cada glicoproteína en particular es estudiada exhaustivamente. En el ratón se ha visto que la ZP3 es el ligando para receptores localizados en la membrana plasmática del espermatozoide. La ZP3 recombinante de humano induce la reacción acrosomal que promueve la fusión entre estos espermatozoides y los oocitos de hamster sin ZP (van Duin et al., 1994).

Ciclo estral

En los mamíferos primates el ciclo ovárico es menstrual, en cambio en los mamíferos no primates el ciclo es estral. Clásicamente las hembras de mamíferos fueron clasificadas de acuerdo al tipo de crecimiento folicular y al estro, como monoéstricas (un sólo estro por estación reproductiva) o poliéstricas (varios períodos de estro al año), y a su vez a éstas últimas se las ha diferenciado en anuales y estacionales, teniendo en cuenta si dichos ciclos ocurren lugar durante todo el año, sin interrupciones, o bien, están restringidos a una o dos estaciones del año en particular. El mecanismo de ovulación puede ser clasificado en espontáneo (entendido como mera culminación del crecimiento folicular), o reactivo (conocido también como ovulación inducida o refleja), desencadenado en general por el coito.

El ciclo estral de *C. musculus* fue caracterizado por Cutrera (1989). Tiene una duración total de cuatro días al igual que rata y ratón con una sucesión corta de estros rápida y fase lutea ultracorta dependiente de LH y FSH.

1.2.2 La gameta masculina de mamíferos: estructura, origen y función del espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de espermatogénesis en el macho que ocurre dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. Esto involucra una serie de divisiones mitóticas de las células espermatogoniales, dos divisiones meióticas de los espermatoцитos, un extensivo modelado morfológico de la espermátida durante la espermatogénesis y la liberación de las espermátidas al lumen de los túbulos seminíferos. El proceso de espermatogénesis produce una célula altamente diferenciada en estructura y función.

El espermatozoide de mamíferos tiene dos componentes, la cabeza y la cola o flagelo. La cabeza consiste en el acrosoma, el núcleo y en menor cantidad en estructuras citoplasmáticas y citoesqueléticas. El acrosoma es un gran gránulo secretor que rodea la región anterior y el extremo del núcleo. El núcleo del espermatozoide es haploide y su cromatina se torna altamente condensada durante la última parte de la espermatogénesis. La cola consiste mayoritariamente en una axonema central rodeado por fibras densas. La parte anterior del flagelo se diferencia por la presencia de mitocondrias. La membrana plasmática que rodea tanto la cabeza como la cola contiene un escaso citoplasma. Aunque todos los espermatozoides de mamíferos tienen estas características generales, hay diferencias especie-específicas en el tamaño,

la forma de la cabeza y del acrosoma, así como del tamaño relativo de los componentes del flagelo.

Maduración epididimal del espermatozoide

Los espermatozoides de mamíferos adquieren su capacidad fecundante progresivamente a medida que pasan por el epidídimo. La necesidad de maduración epididimaria de los espermatozoides de mamíferos contrasta con aquellos de invertebrados y vertebrados inferiores donde los espermatozoides ya son capaces de fecundar al salir de los testículos.

La ubicación anatómica en los epidídimos donde los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante varía según la especie.

Durante el proceso de maduración los espermatozoides desarrollan motilidad y sufren cambios físicos y químicos en los lípidos y proteínas de sus membranas. La membrana se estabiliza con el agregado de colesterol lo cual aparentemente le sería beneficioso para enfrentarse luego al ambiente hostil del tracto femenino (Yanagimachi, 1994). Por otra parte se altera la distribución de antígenos en la membrana acrosomal. Algunos espermatozoides sufren cambios conformacionales en la matriz extracelular del acrosoma. La cabeza se rigidiza para poder atravesar mejor la zona pelúcida y permitir que la cola use la cabeza como un verdadero anclaje.

Los espermatozoides que han madurado en el epidídimo son capaces de moverse activamente pero no tienen la capacidad inmediata para fecundar. Esta capacidad es generada o adquirida luego de residir en el tracto reproductivo femenino por algún período de tiempo. Los cambios fisiológicos (funcionales) que dan lugar a que los

espermatozoides sean capaces de fecundar se denominan en su conjunto capacitación. Este fenómeno fue descrito y estudiado por 40 años (Chang, 1951; Austin, 1951 y 1952) y aún hoy se desconocen sus principios moleculares. En general, se acepta que durante la capacitación la mayor transformación que tiene lugar es la modificación de la membrana plasmática del espermatozoide y procesos necesarios para unirse a los oocitos (Yanagimachi et al., 1981; Saling, 1989; Florman et al., 1991, Moore y Akhondi, 1996). Actualmente se dispone de protocolos de capacitación *in vitro* de una gran variedad de especies de mamíferos (Dunbar y O'Rand 1991) pero aún queda por esclarecer cómo ocurre este fenómeno en el tracto femenino.

Los primeros ensayos de fecundación *in vitro* fracasaron porque no se tuvo en cuenta que debía existir un tiempo de transición entre la recolección de los espermatozoides y la inseminación. Una vez considerado los estudios de capacitación *in vitro* comenzaron empleando fluidos biológicos (fluido oviductal, fluido folicular y suero sanguíneo). Pero fue muy difícil poder determinar qué componentes eran los involucrados en inducir o sostener la capacitación. Hoy en día los medios de rutina para la fecundación y capacitación son soluciones modificadas de Tyrode o Krebs-Ringer suplementadas con una fuente de energía apropiada (glucosa, lactato y piruvato) y albúmina (Yanagimachi, 1994).

Los espermatozoides y oocitos de cada especie requieren su propio microambiente para poder realizar sus funciones más eficientemente. Esto es comprensible ya que las gametas y el microambiente han evolucionado con características propias inherentes a cada especie. Para que la fecundación sea exitosa los espermatozoides deben ser altamente móviles y deben ser capaces de sufrir reacción acrosomal, penetrar la zona pelúcida y fusionarse con el ooplasma. Una fecundación exitosa *in vitro* implica que

el espermatozoide ha podido capacitarse correctamente previamente (Snell, 1996; Yanagimachi, 1994).

Los requerimientos mínimos en cuanto al tiempo y a los medios necesarios para capacitar los espermatozoides varía según la especie. Algunas especies requieren poco tiempo de incubación, como por ejemplo, el espermatozoide de *Microtus montebelli* (Rodentia-Cricetidae-Arvicolinae) requiere 0.5 hs (Wakayama et al., 1995 y 1996), en el ratón 1-2 hs (Toyoda, 1971) y 2-3 hs en el hamster (Yanagimachi, 1970). En otras especies la capacitación puede llevar muchas horas, por ejemplo, 5-7 hs para las ratas (Niwa y Chang, 1974), y 8-12 hs en el coballo (Yanagimachi, 1972), 10 hs en el conejo (Yanagimachi, 1994). El tiempo varía de acuerdo a la fisiología del modelo experimental y a la composición físico-química del medio de cultivo. Los espermatozoides de algunos mamíferos tienen requerimientos especiales. La capacitación de los espermatozoides de bovino se ve facilitada por la presencia de heparina (Parrish et al., 1988), la fecundación *in vitro* de los espermatozoides de monos rhesus se optimiza en presencia de dibutilil cAMP y cafeína (Bavister et al. 1983; Chan et al., 1982; Wolf et al., 1989). Los espermatozoides del hamster dorado necesitan la presencia de un factor de motilidad espermática (SMF) en el medio que puede ser tanto la taurina o hypotaurina. No se sabe precisamente por qué pero la ausencia de este factor en el hamster dorado conduce a la inmotilidad de los espermatozoides y finalmente a su muerte (Bavister, 1976, Yanagimachi, 1969 a, 1969 b y 1970, Lui et al., 1979; Mrsny et al., 1979;). Se ha postulado que este factor podría prolongar la vida del espermatozoide reduciendo la peroxidación de las membranas lipídicas (Alvarez et al., 1982) o por proteger a los espermatozoides de los

radicales libres generados por su propio metabolismo. Alternativamente podría servir como un osmoregulador estabilizante de membrana.

Un indicador de que la capacitación ha sido concluída es la reacción acrosomal (Fraser, 1995) ya que un espermatozoide capacitado puede reaccionar. La reacción acrosomal tiene por lo menos dos funciones: permitir que el espermatozoide sea capaz de penetrar la zona pelúcida y, posibilitar que se fusione con la membrana plasmática del oocito. En algunas especies como el hamster es muy fácil reconocer un espermatozoide con reacción acrosomal de uno que no ha reaccionado. Existen muchas condiciones que pueden inducir reacción acrosomal “bypaseando” la capacitación (cambios de pH, temperatura, presencia de iones en el medio, por ejemplo). Lo más adecuado para poder correlacionar el tiempo necesario de capacitación y la reacción acrosomal es realizar un test biológico que permita corroborar si los espermatozoides evaluados como capacitados son realmente capaces de fecundar.

Algunos espermatozoides se mueven frenéticamente antes de hacer la reacción acrosomal. El término hiperactivación (Yanagimachi, 1981) fue usado para describir este tipo de motilidad. La primera especie en la cual se describió este fenómeno fue el hamster dorado (Yanagimachi, 1969 y 1970). Al ser liberados en el medio de capacitación tienen una motilidad inicial muy alta seguida de un período de quiescencia. Durante esta quiescencia relativa, muchos espermatozoides se aglutinan cabeza-cabeza (Yanagimachi, 1982). Luego de 2 horas los espermatozoides se liberan unos de otros y nadan libremente en el medio lo cual indica que sus características de superficie han cambiado y se han capacitado. En este momento el espermatozoide comienza a moverse mucho más activamente que antes. En principio describen un movimiento lineal pero luego exhiben características más vigorosas batiendo la cola

hasta terminar girando en círculos. El movimiento de hiperactivación variará con la especie (Yangimachi, 1994). Lo importante en la adquisición del movimiento de hiperactivación es el incremento de motilidad de la cola del espermatozoide y no el movimiento particular que describe per se (Yanagimachi, 1994).

El espermatozoide capacitado podrá atravesar las células del cúmulo que rodean al oocito (Austin, 1960) sólo si aún no hecho la reacción acrosomal. Si el espermatozoide conserva intacto su acrosoma, entonces las enzimas en la superficie de la membrana plasmática, hialuronidasa, lo ayudarían en la dispersión de las células del cúmulo. Una vez que entró al cúmulo la última barrera que deberá atravesar es la zona pelúcida (Snell, 1996). Para que los espermatozoides puedan penetrar la zona pelúcida es necesario, aunque no suficiente, que exista previamente un binding muy “fuerte” a la zona pelúcida. Jedlicki y Barros (1985) examinaron el comportamiento de espermatozoides de hamster y ratón en la zona pelúcida de oocitos de especies homólogas y heterólogas, y encontraron que la penetración de la zona es precedida siempre por un “fuerte” binding a la zona pelúcida y por la producción de un “agujero” que aparentemente producirían las enzimas acrosomales por el cual entra la cabeza del espermatozoide aparentemente producido por la acción litica de las enzimas acrosomales. Entonces, el éxito o la falla de la entrada del espermatozoide a la zona podría depender de la capacidad del espermatozoide para unirse e hidrolizar por lo menos la superficie externa de la zona pelúcida. El espermatozoide y la zona pelúcida tienen moléculas complementarias para su interacción. En el espermatozoide estos son los receptores para el binding primario y secundario a la zona pelúcida. Las glicoproteínas de la zona pelúcida son ligandos para estos receptores del

espermatozoide. El attachment y el binding son indicadores simples de cómo se desarrolla la interacción entre gametas.

1.2.3 Interacción espermatozoide-ooocito

La fecundación es el proceso por el cual las gametas individuales de un macho y una hembra se unen para crear un nuevo individuo. Desde el punto de vista de sus genomas los oocitos y los espermatozoides son iguales pero su historia de vida y su comportamiento previo y durante la fecundación son diferentes. El espermatozoide es el que se mueve y siempre es el que debe buscar al oocito, unirse, penetrar e inducir su activación. Una vez que el espermatozoide logra unirse y penetrar y activar al oocito, es el oocito, ahora con dos complementos genómicos, materno y paterno, el que debe eliminar los elementos del espermatozoide extragenómicos e iniciar el desarrollo de un nuevo individuo.

Cuáles son los obstáculos que debe superar el espermatozoide para encontrar al oocito

El oocito de los mamíferos se encuentra rodeado por varias capas que deben ser atravesadas por el espermatozoide antes de llegar a fusionarse con la membrana plasmática. La capa más externa la constituyen las células del cúmulo. El cúmulo oóforo rodea completamente a los oocitos luego de la ovulación. En algunos ungulados (caballos) monotremas y marsupiales, el cúmulo se degrada apenas terminada la ovulación. En estos casos el oocito sólo queda expuesto sólo con su capa más interna, la zona pelúcida (Yanagimachi, 1994). *In vitro* es muy frecuente ver la dispersión de las células del cúmulo antes de la fecundación. Esto es debido a la

presencia de muchos espermatozoides en las cercanías del ovocito, muchos más de los que pueden penetrarlos. *In vivo*, quizás el cúmulo se disperse después de y no antes de la fecundación (Yanagimachi, 1994)

Cualquier espermatozoide puede unirse a las células del cúmulo pero solo aquel espermatozoide capacitado es capaz de poder penetrarlo y sólo si conserva su acrosoma intacto. En erizos de mar y sapos los espermatozoides pueden penetrar el cúmulo de hamster pero no poseen hialuronidasa (Yanagimachi, 1994). Algunos autores opinan que la hialuronidasa ayuda pero no es esencial y especulan que la membrana plasmática de hamster tiene hialuronidasa y esta hialuronidasa externa es la que puede ayudar y no la contenida en el acrosoma. La hialuronidasa no es la única enzima de superficie que está involucrada, también lo están la acrosina, la betagalactosidasa y la arylsulfatasa que se incorporarían a la superficie del espermatozoide durante la espermatogénesis y el tránsito epididimario y/o la capacitación. Algunos autores han llegado a proponer que estas enzimas podrían incorporarse desde el compartimento acrosomal aún con el acrosoma intacto pero las evidencias son confusas (Tesarik et al., 1990, Yanayimachi, 1994).

Una vez que el espermatozoide llega al cúmulo y lo atraviesa cambia su patrón de movimiento ya que la alta viscosidad del cúmulo impide al espermatozoide un movimiento flagelar amplio y sólo cuando sale del cúmulo vuelve a su movimiento de hiperactivación.

Aún no se sabe exactamente cuál es el rol de la hialuronidasa en la fecundación ya que hay muchas especies de mamíferos en las que la hialuronidasa falla en disgregar el cúmulo o bien éste se dispersa apenas concluída la ovulación (bovinos).

Para el espermatozoide que ha llegado al tracto femenino, la zona pelúcida es la última barrera que debe franquear para fecundar al oocito. El oocito en si mismo tiene capacidad intrínseca para bloquear la entrada de muchos espermatozoides, pero en muchas especies parte de este mecanismo es compartido con la zona pelúcida. En muchos animales, el espacio perivitelino de los oocitos fecundados contiene macromoléculas secretadas por el oocito antes y después de la fecundación.

Los espermatozoides capacitados se unen firmemente a la superficie de la zona pelúcida antes de penetrarla. La unión espermatozoide-zona es mediada por la interacción entre las moléculas de la zona y de la superficie del espermatozoide (Snell, 1996). Esto fue demostrado por Gwatkin y Williams (1992) que encontraron que la zonas pelúcidas solubilizadas impiden el binding a la superficie de las zonas intactas *in vitro*. Las zonas pelúcidas solubilizadas aparentemente no afectaron la motilidad de los espermatozoides.

¿Por qué fueron incapaces los espermatozoides de unirse a la zona pelúcida en la presencia de las zonas pelúcidas solubilizadas? Es lógico suponer que la superficie de los espermatozoides tiene receptores para moléculas de la zona pelúcida y que la saturación de estos receptores con las zonas pelúcidas solubilizadas impide al spz reconocer o unirse a las zonas pelúcidas nativas. No hay duda de que la membrana del espermatozoide tiene una o varias moléculas que tienen una fuerte afinidad por la zona pelúcida.

La naturaleza química de las moléculas responsables de la unión espermatozoide-oocito ha sido estudiada extensivamente en el ratón. De acuerdo con Wassarman (1992 y 1996) dos componentes de la zona, ZP2 y ZP3 tienen actividad de unión al spz. En el ratón y quizás en otras especies, la ZP3 es el ligando primario que se une

específicamente a la membrana plasmática del espermatozoide intacto (sin reacción acrosomal); la ZP2 es el ligando secundario el cual se une preferencialmente a la membrana acrosomal interna del espermatozoide reaccionado. La ZP3 de ratón tiene ambas actividades, la de unión al espermatozoide y la de desencadenar la reacción acrosomal. La actividad de binding reside dentro del residuo carboxi-terminal de la ZP3. Las zonas pelúcidas solubilizadas inducen la reacción más rápido que las zonas pelúcidas nativas.

Si bien un espermatozoide no capacitado o epididimario puede unirse a la zona, esta unión es muy débil y puede ser disturbada por pipeteo. Por lo contrario y ya que un espermatozoide capacitado no puede ser separado de la zona pelúcida una vez unido por pipeteo, entonces la unión espermatozoide-zona pelúcida tiene un componente químico mucho más fuerte que el físico. La interacción espermatozoide-zona pelúcida es un fenómeno muy complejo que consiste por lo menos de 3 pasos:

- 1- Binding primario (1°): unión acrosoma intacto a la zona pelúcida
- 2- Binding secundario (2°): unión acrosoma reaccionado a la zona pelúcida
- 3- acrosoma reaccionado penetra la zona pelúcida

Se han propuesto varios candidatos como receptores para el Binding 2° entre ellos, uno de los candidatos más firmes es la acrosina localizada en la membrana acrosomal interna que sería la enzima responsable de reconocer la zona, unirse a ella y participar en su penetración. Barros et al (1996), reportaron la localización de la acrosina en la membrana acrosomal interna en hamster, cobayo y ratón induciendo reacción acrosomal e identificando la acrosina con anticuerpos humanos y de bovinos. En el hamster la actividad de la acrosina desaparece rápido luego de la RA al contrario que en el cobayo.

Tabla i.

**Candidatos propuestos como receptores en la unión
zona pelúcida-espermatozoide(*)**

Especies	Receptor propuesto
ratón	galactosyltransferasa (60 KDa), manosidasa, sialyltransferasa, proteínas de 95, 56 y 15 kDa
hamster	Acrosina y proteína de 26 Kda
guinea pig	Acrosina y proteína de 60-64 Kda
conejo	proteína de 87 Kda
cerdo	Proacrosina (53-55 kDa), proteína distinta de la proacrosina (55kda), una de 15 y una de 18 kDa
caballo, toro	galactosyltransferasa
humano	Acrosina y proteína tipo lectina (54 kDa)

*cuadro adaptado de Yanagimachi (1994)

Cuando los espermatozoides hacen reacción acrosomal en la zona pelúcida una parte del contenido acrosomal se dispersa al medio en tanto que la parte menos difusible junto con las membranas vesiculadas permanece fuertemente unida. Estos son los llamados fantasmas acrosomales y tienen actividad acrosina .

¿Cómo es el mecanismo de entrada y penetración?

En las aves y en los marsupiales los espermatozoides reaccionan con la zona y las enzimas liberadas hacen un hoyo en la zona a través del cual entran los espermatozoides. Entre estas enzimas se encuentran las tripsin-like. En los mamíferos

eutherios los espermatozoides pasan pero su mecanismo no está muy claro. Hay dos grandes hipótesis:

Hipótesis mecánica:

En esta hipótesis las enzimas no juegan ningún papel en la penetración de los espermatozoides, sino que la reacción acrosomal serviría para que la membrana acrosomal interna se esponga y perfora la zona en forma mecánica por el vigoroso movimiento del espermatozoide. Hay evidencias que sostienen esta hipótesis:

- 1- la fuerza generada por el espermatozoide en la zona (3000 μ dyns) es suficiente para romper uniones disulfuro
- 2- el espermatozoide penetrante deja muescas y surcos como cortes en la zona pelúcida
- 3- inhibidores de proteasas bloquean el binding del espermatozoide a la superficie pero una vez hecho el binding no puede impedirse su penetración
- 4- no hay cantidades significativas de acrosina en la membrana acrosomal interna luego de la reacción acrosomal

Hipótesis enzimática

Para esta hipótesis la motilidad e hiperactivación del espermatozoide son despreciables frente a las enzimas. La acrosina liberada durante la reacción acrosomal tendría la capacidad al igual que la tripsina de hidrolizar glicoproteínas de la zona, pero sin alterar las propiedades de la zona pelúcida ni destruir sitios de unión del espermatozoide a la zona. Según Jones (1991) la acrosina facilita la capacidad del binding del espermatozoide a la zona pelúcida.

¿Si la penetración de la zona fuera puramente mecánica, por qué hay enzimas acrosomales en todos los mamíferos con poder de degradación de la zona? Si las enzimas acrosomales fueran un resabio evolutivo por qué no se encuentran algunos mamíferos carentes de acrosoma o de enzimas acrosomales.

Hoy en día se aceptan ambas hipótesis, mecánica y enzimática, y se considera que no estarían en contradicción sino que actuarían de modo complementario (Yanagimachi, 1994).

Una vez que el espermatozoide logró atravesar la zona pelúcida, su paso por el espacio perivitelino es muy rápido. La cabeza del espermatozoide se une rápidamente a la membrana plasmática del oocito y se introduce en ella. Una vez que el espermatozoide se ha fusionado con el ooplasma la cola del espermatozoide deja de moverse (Hirao, 1987) Hiraoka, 1987; Phillips, 1991; Phillips y Shalgi, 1990). En algunas especies como *Microtus montebellis* (Rodentia-Cricetidae, Japón) y *Microtus auratus* (Rodentia-Cricetidae, vulgarmente hamster dorado) la cola es extruída del oocito fecundado (Yanagimachi, 1994).

Bajo condiciones fisiológicas sólo un espermatozoide es capaz de fusionarse con el oolema. *In vitro*, particularmente cuando los oocitos son desnudados de la zona pelúcida se produce una entrada múltiple, poliespermia, que puede conducir a la citólisis del oocito.

En la fecundación *in vitro* entre gametas homólogas es común que algunos oocitos no sean fecundados aún cuando exista un número significativo de oocitos fecundados normalmente. Esta falla sería aparentemente debida a anomalías propias de los oocitos y/o a las “envolturas” del mismo (cúmulo, zona pelúcida, membrana plasmática). En algunos casos, a pesar que los oocitos puedan ser inseminados estos

no presentan luego una morfología normal a pesar de no existir causas aparentes y a pesar que la motilidad y morfología de los espermatozoides fuera normal. Bedford y Kim, 1993 clasificaron la falla de fecundación en cuatro categorías según: (i) ausencia total de binding a la zona pelúcida, (ii) binding tangencial a la zona pelúcida sin entrada del espermatozoide a la zona, (iii) binding frecuente a la superficie y penetración ocasional de la zona, y (iv) binding frecuente a la superficie con muchos espermatozoides penetrando la zona. La falla de la interacción espermatozoide-zona pelúcida en la categoría (i) podría deberse a defectos inherentes al espermatozoide, como ser anomalías en los receptores para la zona pelúcida, maduración incompleta en el epidídimo y/o bloqueo inmunológico de la interacción espermatozoide-zona pelúcida por anticuerpos antizona o antiesperma. La categoría (ii) podría deberse a que el espermatozoide fallara en la reacción acrosomal debido a ligandos defectivos para la unión a la superficie del ovocito. En las categorías (iii) y (iv) la incapacidad de los espermatozoides para atravesar la zona pelúcida podría deberse a anomalías físicas o químicas de la zona pelúcida en particular de la cara interna o a una motilidad reducida de los espermatozoides para terminar de penetrar la zona.

Especie-especificidad en la interacción entre gametas

La jerarquía de especificidades que existe durante el proceso reproductivo implica que el binding de gametas de especies filogenéticamente distantes es muy improbable. La idea de que la especificidad y la complementariedad de las moléculas funciona para mediar la interacción espermatozoide-ovocito fue formulada por Lillie en 1914 (Belton, 1995). Lillie definió los parámetros de fecundación como penetración y

especificidad y propuso que la interacción célula-célula toma lugar entre el espermatozoide y el oocito de modo análogo a la interacción antígeno-anticuerpo. Los elementos esenciales para que esta interacción ocurra según la hipótesis de Lillie deberían ser: un receptor de membrana para el espermatozoide en el oocito, un receptor de membrana para el oocito en el espermatozoide, y un tercer receptor o “cuerpo” extracelular (cúmulo o zona pelúcida en mamíferos) al cual se adhiere el espermatozoide. Se ha sugerido que la aparición de sistemas de reconocimiento célula-célula está relacionado filogenéticamente con la aparición de la sexualidad (Burnet, 1971 en O’Rand, 1988). Durante el proceso reproductivo, existe especificidad en todos los niveles y, cuando se revisa la jerarquía de las especificidades, se ve que las restricciones son el aislamiento geográfico y el comportamiento reproductivo entre las especies (O’Rand, 1986). Esto contribuye en gran medida a mantener la diversidad de especies. Dados estos altos niveles de organización de especies, en muchos animales el espermatozoide y el oocito se encuentran sólo bajo circunstancias especiales y bajo condiciones muy controladas en el tracto reproductivo de la hembra. Sin embargo, a medida que el parentesco entre las especies aumenta, la fecundación heteróloga se hace posible, hecho constatado por la ocurrencia de hibridación interespecífica tanto en condiciones naturales como artificiales. Resulta claro, pues, que en los mamíferos la interacción entre gametas no es estrictamente específica de especie (West et al.,1977; Roldán et al.,1985), si bien las combinaciones heteroespecíficas son menos ventajosas que las homoespecíficas (O’Rand,1988). Estudios realizados *in vitro* con oocitos de *Peromyscus maniculatus* (Rodentia-Muridae) mostraron que estos pueden ser fecundados por espermatozoides de diferentes especies del mismo género (Maddock et al., 1974). La unión de

espermatozoides a la zona pelúcida y la penetración de la zona es posible aún entre diferentes especies, por ejemplo, oocitos de hamster chino x espermatozoides de hamster dorado (Roldán y Yanagimachi, 1989), oocitos de bovino x espermatozoides de cerdo (Slavik et al., 1990), oocitos de bovino x espermatozoides de cabra (Slavik y Fulka, 1992), oocitos de gato doméstico x espermatozoides de *chiita* (Donoghue et al., 1992), oocitos de gibbon x espermatozoides de humano (Bedford, 1977), oocitos de gorila x espermatozoides de humano (Laszendorf et al., 1992), oocitos de humano x espermatozoides de hamster (Uto et al., 1988; Yoshimatsu et al., 1988). En los casos anteriores los cruzamientos reversos no fueron eficientes.

En general se acepta que las barreras que impiden o reducen la fecundación interespecífica provienen de la pérdida gradual de receptores de membrana de las gametas, como producto de la divergencia génica (Olds-Clarke, 1988; O'Rand, 1988). Este hecho conduce finalmente al aislamiento reproductivo entre las especies. De este modo la divergencia génica constituye la causa de la separación de especies, y la reducción de la fecundación interespecífica es, simplemente, el efecto de tal divergencia que mantiene la separación. Sin embargo, no existen estudios concluyentes que permitan establecer que tales barreras no son, en sí mismas, la causa del aislamiento reproductivo.

El establecimiento de barreras en la interacción de gametas podría originarse en forma abrupta en lugar de proceder de modo gradual y constituirse en causal de la separación de linajes o especies. Esta hipótesis ha sido sugerida para roedores del género *Ctenomys* a través del estudio de la distribución geográfica de las especies portadoras de los distintos tipos espermáticos y las relaciones cromosómicas entre ellas (Vitulo et al, 1988; Vitullo y Cook, 1991).

La interacción de gametas heteroespecíficas en los mamíferos puede encontrar diferentes niveles de especificidad que actúan como barreras para impedir la fecundación. Estos niveles comprenden el tracto reproductivo, las células del cúmulo que rodean al ovocito recientemente ovulado, la zona pelúcida y la membrana plasmática del ovocito (O'Rand, 1988). No obstante, aunque en muchos casos estas barreras son exitosamente sorteadas por un espermatozoide heterólogo, el embrión híbrido detiene su desarrollo rápidamente (v.g. en especies de *Mus*, West et al., 1977; o *Calomys*, Roldán et al, 1985). Si bien la detención precoz de tales embriones híbridos puede originarse en la falta de complementariedad de los genomas parentales (incompatibilidad genómica), estos ejemplos advierten también la necesidad de contemplar otro nivel funcional que puede generar incompatibilidad entre gametas heteroespecíficas: la activación del ovocito.

1.2.4 Activación del ovocito

Durante la fecundación en los mamíferos, el espermatozoide realiza dos aportes esenciales para el desarrollo del nuevo organismo. Una contribución es el DNA y todos sus genes asociados que permitirán que el embrión diploide se desarrolle a término (Surani et al, 1984). El otro aporte es "comunicar" al huevo que debe comenzar su desarrollo. Sin este mensaje y, a pesar del DNA paterno, no habrá desarrollo del cigoto. En todas las especies de mamíferos estudiadas el mensaje que el espermatozoide libera al fusionarse al ovocito está escrito en el lenguaje del calcio y sus oscilaciones (Swann, 1996). La fecundación se caracteriza por una serie de eventos tales como la exocitosis de los gránulos corticales, que conduce a la modificación de proteínas de la zona pelúcida para evitar la poliespermia, la

decondensación del genoma del espermatozoide, retomar la segunda división meiótica y extruir el segundo cuerpo polar. Estos eventos preceden la formación de los pronúcleos materno y paterno y los clivajes posteriores (Yanagimachi, 1988). Estos cambios son disparados por el espermatozoide como por agentes partenogénéticos artificiales (Kaufman, 1983; Whittingham, 1980).

Las señales de calcio fueron estudiadas en erizos de mar y sapos antes que en mamíferos. En estas especies, el espermatozoide que penetra un oocito causa un único aumento transitorio de la concentración intracelular de calcio. El Ca^{2+} se incrementa durante 5-10 minutos desde 100 nM hasta un pico de 1-2 μM (Ozil, 1992; Swann, 1996). El origen del Ca^{2+} en cada incremento provendría del retículo endoplásmico y es suficiente para desencadenar el desarrollo embrionario. El descubrimiento de que en los mamíferos la fusión entre las gametas desencadena oscilaciones periódicas de calcio en contraposición con un único incremento monotónico los hace diferentes de cualquier otra gameta no-mamífera (Miyazaki, 1991; Whitaker and Swann, 1993). Dichas oscilaciones duran varias horas y siguen un patrón característico de pulsos que pasan rápidamente del nivel de reposo de 100 nM a 1 μM en 2 o 3 segundos y redesciende bruscamente a su nivel basal (Ozil, 1992). Esto se ha reportado durante la fecundación de cerdo, toro, ratón, rata, conejo y humano (Sun et al., 1992; Fissore et al., 1992; Fissore and Robl, 1993; Taylor et al., 1992). Las oscilaciones en los animales domésticos son generalmente similares a las de los roedores pero tienen una frecuencia inferior al resto. Excepto por las diferencias de frecuencia está claro que la capacidad de desencadenar oscilaciones periódicas de calcio es específica del evento de fecundación de mamíferos.

McCulloh y Chambers (1992) demostraron que entre el momento en que ocurre la fusión oocito-espermatozoide y se dispara la ola de calcio intracelular existe un período “latente” de 7 segundos. Este hallazgo de que la fusión es previa a la liberación de calcio intracelular fue corroborado también por Swann et al., (1994) que recurriendo a una tinción fluorescente pudieron registrar la dinámica de propagación de la ola de calcio.

La liberación de calcio puede ocurrir tanto por canales de calcio dependientes de inositol-3-fosfato (InsP3) como de rianodina. Una suposición es que el espermatozoide use proteínas transmembrana para liberar calcio de modo análogo al modo de acción de las hormonas en las células somáticas. Otra hipótesis alternativa es que el espermatozoide introduce al citoplasma del oocito un factor citosólico que difunde luego de la fusión que actuaría sobre los canales sensibles a InsP3 y rianodina para liberar calcio. El factor espermático citosólico es referido como un “oscilógeno”, término que se usa para referirse a un péptido que desencadena oscilaciones intracelulares de calcio en las fibras del músculo esquelético. El oscilógeno espermático se ha aislado y parece ser una proteína con una sola subunidad de 33 Kda que se ha localizado en la región ecuatorial del espermatozoide de hamster, humano y cerdo. Esta proteína sería la responsable de mantener luego las oscilaciones de calcio intracelular (Swann, 1996). Esto explicaría aún mejor la causa por la cual sea cual fuere el estímulo partenogénico, los oocitos con pronúcleos o los citoplastos nunca generan oscilaciones periódicas (Kono et al, 1996). Aún los pronúcleos de oocitos activados con estroncio (que desencadena oscilaciones intracelulares de calcio; Swann,1996) son inefectivos. Estos resultados apoyan la idea de que sólo un factor

asociado al espermatozoide fecundante es el que confiere la capacidad liberadora de calcio al pronúcleo del embrión naciente (Swann, 1996).

1.2.4.1 La activación como posible nivel funcional de incompatibilidad gamética

La activación del oocito de mamíferos va acompañada de una serie de incrementos de la concentración del calcio intracelular desencadenada por la fusión del espermatozoide en el momento de la fecundación (Miyazaki, 1990). Esta actividad repetitiva del calcio intracelular es esencial para el normal desarrollo de la activación puesto que regula la exocitosis de los gránulos corticales (Cherr et Ducibella, 1990), la finalización de la segunda división meiótica y la organización temporal del desarrollo de los pronúcleos (Vitullo y Ozil, 1992). Las alteraciones en el ritmo de esta actividad pueden provocar una activación anómala abortiva, caracterizada por una nueva detención del oocito en metafase, denominada Metafase III, (Kubiak, 1989; Vitullo y Ozil, 1992) incompatible con el desarrollo ulterior de la cigota. Este hecho sugiere que la activación puede constituir un nivel funcional de incompatibilidad gamética desencadenado por la fusión de un espermatozoide atípico en el momento de la fecundación, especialmente dado que los ritmos de oscilación de Ca^{2+} intracelular parecen ser específicos de especie.

1.2.4.2. Variabilidad morfológica espermática y activación del oocito.

Las variaciones morfológicas en los espermatozoides pueden relacionarse con modificaciones en el área de contacto entre oocito y espermatozoide en el momento de la fusión (Feito y Barros, 1982). Así, estas variaciones pueden desencadenar distintos

ritmos de oscilación del Ca^{2+} y promover activaciones abortivas incompatibles con el desarrollo. En roedores, en particular, la morfología espermática es altamente variable (Roldán et al,1992). Incluso entre razas ó cepas de una misma especie es factible observar alteraciones sutiles de morfología espermática que caracteriza a un linaje particular. De hecho, las distintas cepas de *Mus musculus* muestran variaciones morfológicas en sus espermatozoides y es de destacar que para esta especie (usando distintas cepas) se han descrito diferentes ritmos de oscilación del Ca^{2+} intracelular en el momento de la fecundación (Ozil y Swann, 1995). La variabilidad espermática puede constituir, pues, un elemento fundamental en la incompatibilidad gamética entre especies estrechamente relacionadas.

1.2.4.3. Activación por estímulos partenogénéticos

El término "partenogénesis" fue empleado por primera vez por Richard Owen (1849) para describir la "procreación sin influencia inmediata de un macho". Más adelante fue definida como la "producción de un embrión, con o sin eventual desarrollo de un adulto, a partir de una gameta femenina en ausencia de cualquier contribución de una gameta masculina" (Kaufman, 1979, modificada de Beatty, 1957). Esta simple definición excluye dos fenómenos estrechamente relacionados: androgénesis y ginogénesis. En el primer caso el huevo es estimulado para desarrollarse por un espermatozoide pero donde sólo el genoma paterno conducirá el desarrollo, en tanto que en el segundo caso el huevo comienza a dividirse por el estímulo de un espermatozoide cuyo genoma no intervendrá en la conducción del desarrollo del embrión. El interés biológico en este fenómeno radica en que este es capaz de dar origen al desarrollo de muchas especies en cuyo caso los embriones resultantes

tendrán un genoma exclusivamente de origen materno. En la naturaleza se encuentran muchas especies animales que se reproducen exclusivamente por este proceso. Algunas especies de la familia Lacertidae alternan la partenogénesis con la reproducción sexual (partenogénesis cíclica) y en otras de peces y anfibios el huevo es capaz de desarrollarse tanto por fecundación como por activación partenogenética (partenogénesis facultativa). Cabe señalar que la partenogénesis no debe confundirse con la "reproducción asexual" ya que la primera involucra la producción, activación y desarrollo de un huevo, que es una célula especializada en reproducción. Se ha sugerido que el proceso partenogenético podría ser observado como una forma incompleta de la reproducción sexual.

Se han observado oocitos recién ovulados de varias especies de mamíferos con activación espontánea y posterior desarrollo de modo que la presencia de estadios de clivaje tempranos dentro del oviducto no es un hecho infrecuente. Las primeras observaciones de activación espontánea de oocitos dentro del ovario (ratón: Holmes y Wells, 1920; cobayo: Harman y Kirgris, 1938, Dempsey, 1939, humano: Krafka, 1939) no pudieron comprenderse por tratarse de casos aparentemente aislados. En 1974, Stevens y Varnum, descubrieron que la cepa de ratón LT/Sv presenta una alta incidencia de partenogénesis espontánea y desarrollo de los partenogonones hasta implantación dentro de los ovarios de hembras de más de 30 días de edad (Maleszewski and Yanagimachi, 1995). El conocimiento de esta cepa proveyó una excelente demostración de la capacidad inherente de la gameta femenina para dividirse y diferenciarse aún en ausencia de la gameta masculina. Si bien es frecuente en muchas especies de mamíferos, encontrar oocitos con el segundo cuerpo polar extruído el día siguiente a la ovulación, ellos raramente clivan y su activación parece

ser la consecuencia de un cambio degenerativo acompañado por el envejecimiento en el oviducto (Graham, 1974). En humanos la activación espontánea de los oocitos en el ovario son conocidos vulgarmente como teratomas.

El interés experimental en el desarrollo inducido de la partenogénesis en mamíferos comenzó en 1940 con los trabajos de Pincus y colaboradores, donde los experimentos consistían en someter oocitos de conejo a un shock térmico de baja temperatura para estudiar su efecto *in vitro*. En los años 1940 y 1950 experimentos similares de activación de oocitos de conejo, hamster, rata y ratón fueron realizados (Thibault, 1949; Chang, 1957; Austin y Braden, 1954). En estos se ensayaba el efecto sobre la activación del oocito por diferentes estímulos tales como el shock térmico por calor y por frío, el shock osmótico, la incubación breve en hialuronidasa, el eter y la electricidad. Este aspecto de la embriología experimental cobró más interés con la publicación de dos trabajos en 1970 que mostraban dos métodos de activación completamente diferentes para obtener partenogéneses de ratón. Graham (1970) trató oocitos de ratón *in vitro* con medio de cultivo suplementado con hialuronidasa y obtuvo exitosamente partenogéneses hasta el estadio de blastocisto. En tanto que Tarkowski y colaboradores (1970) activaron oocitos de ratón *in vivo* estimulando el oviducto de una hembra anestesiada con un shock eléctrico.

Desde ese entonces la partenogénesis se convirtió en una herramienta de estudio que ha permitido comprender muchos mecanismos relacionados con la activación del oocito, la dinámica de progresión nuclear, la fecundación y el desarrollo preimplantativo en mamíferos y otras especies.

La partenogénesis experimental ha sido estudiada en profundidad en el **ratón** de laboratorio, *Mus musculus* (Whitte, 1970; Bender, 1995; Colledge et al., 1994,

Croteau et al., 1995; Henery and Kaufman, 1992 a y b, 1993 a y b; Kaufman, 1983; Cuthbertson, 1983); **rata** (Ben-Yosef, 1995, Bos-Mikich et al, 1995 a y b); **conejo** (Yang et al., 1992; Ozil, 1992; Fissore et al., 1992), hamster (Kaufman, 1983); **animales de interés zootécnico** (Mayes et al, 1995; Laurincik et al., 1995; Presicce et al., 1994; Collas et al., 1993; Fukui et al., 1992 Didion, 1990; Kono et al, 1989; King et al., 1988; Wall et al., 1988; Nagai, 1987), y en **humano** (De Sutter et al., 1992). Sin embargo, ninguno de estos métodos ha permitido lograr el desarrollo de los embriones partenogenéticos más allá del estadio de 25-somitos, y menos aún la gestación a término. La muerte de los partenogones en la mitad de la gestación se transformó, de este modo, en un tema recurrente y emergieron dos hipótesis para explicar sus posibles causas. Dado que los embriones partenogenéticos son esencialmente homocigotas, la expresión de genes letales recesivos podría dar cuenta de la falla en su desarrollo. La segunda explicación propone como causa de la falta de desarrollo a término a la ausencia de factores extragenéticos necesarios para el desarrollo, aportados por el espermatozoide en el momento de la fecundación (Graham, 1974). Durante los años '80, se logró descartar ambas hipótesis y establecer que la causa real de la falta de desarrollo a término del partenogón de mamíferos radica en la ausencia del genoma paterno en estos embriones antes que en su condición homocigota o en la falta de factores extragenéticos aportados por el espermatozoide (Surani & Barton, 1983; Mann y Lovell-Badge, 1984). El desarrollo a término del embrión de mamíferos requiere la presencia de los genomas haploides de origen materno y paterno, dado que estos genomas son marcados diferencialmente durante la ovogénesis o espermatogénesis para expresarse de modo complementario durante el desarrollo embriológico (Surani et al, 1986a, 1986b, 1990). Así, el genoma materno

regula preferencialmente el desarrollo del embrión propiamente dicho en tanto que el genoma paterno dirige principalmente el desarrollo de las membranas extraembrionarias, en particular del trofoblasto. Los partenogones muestran un desarrollo normal del embrión propiamente dicho pero un escaso desarrollo de las membranas extraembrionarias (Surani et al., 1986.a.). Complementariamente, los embriones con genoma de origen exclusivamente paterno, androgenones, muestran un desarrollo normal de las membranas extraembrionarias acompañado de un escaso desarrollo fetal. Esta actividad diferencial de los genomas paternos que se conoce como impronta genómica, es considerada como un mecanismo generalizado de regulación del desarrollo de los mamíferos (Surani et al., 1990).

Cómo se activa un oocito de mamíferos de modo partenogénico

El oocito de mamíferos puede ser activado por una gran variedad de estímulos físicos o químicos (ver Tabla ii). El estímulo partenogénico incrementa los niveles intracelulares de Ca^{2+} tanto por promover el influjo de Ca^{2+} , como por la movilización de Ca^{2+} desde los canales internos, o por efecto de ambos. Por ejemplo, la exposición de 5-10% de etanol por algunos minutos es un eficiente protocolo para activar oocitos de ratón (Cuthbertson et al.,1981; Kaufman, 1983). El etanol provoca un único incremento monotónico de Ca^{2+} que se mantiene tanto como se expongan los oocitos a su presencia (Cuthbertson et al.,1981; Shiina et al.,1993). Debido a que este Ca^{2+} intracelular se reduce notablemente al incubar los oocitos en medio libre de calcio se sugiere que el etanol actuaría causando influjo de Ca^{2+} (Shiina et al.,1993). Contrariamente el cloruro de estroncio (Sr^{2+}), otro excelente agente inductor de la partenogénesis (Marcus, 1990; O'Neill et al., 1991) actúa movilizándolo desde

Tabla ii
Métodos de activación partenogenética *in vitro*

FISICOS

1- Mecánicos

- a) manipulación de los oocitos
- b) por punción de la membrana

2- Térmicos

- a) por shock a baja temperatura
- b) por shock a alta temperatura

3- Estimulación eléctrica

QUIMICOS

4- Enzimáticos

hialuronidasa, pronas, etc.

5- Osmóticos

- a) hipotonicidad
- b) hipertonicidad

6- Iónicos

- a) cationes divalentes (Sr^{2+} , Ca^{2+})
- b) ionóforos de calcio (A23187)

7- Anestésicos

- a) anestesia general
- b) anestesia local
- c) etanol
- d) tranquilizantes derivados de las fenotiacinas

8- Inhibidores de la síntesis proteica

los depósitos celulares en el retículo endoplasmático vía INsP3 y genera, a diferencia del etanol, breves oscilaciones de calcio (Swann, 1996). Con respecto al calcio y su rol en la partenogénesis se ha confirmado que cualquiera sea la vía por la cual se induce su aparición explosiva en el interior del oocito, sólo su incremento monotónico es suficiente para desencadenar el clivaje de un embrión y así iniciar su desarrollo partenogenético (Swann et al., 1994; Schultz et al., 1995). Otro evento que diferencia la fase de activación partenogenética de aquella de la fecundación es que en la primera no se evidencia la exocitosis de gránulos corticales de modo que no habrá bloqueo para la polispermia (Miyazaki et al., 1996).

Los métodos de activación partenogenética no son igualmente efectivos en todos los modelos experimentales. La proporción de oocitos que puede activarse varía considerablemente según la especie (Kaufman, 1983), y aún si son ratones pueden presentarse variaciones de cepa en cepa. Estas variaciones dependerán entre otras causas de la edad postovulatoria de los oocitos en el momento del tratamiento. Este factor puede no influenciar la frecuencia total de activación, pero tiende a incidir en la proporción de los diferentes tipos de partenogénesis observados (Kaufman, 1983). Las razones no son muy claras pero se ha propuesto que los oocitos podrían incrementar su susceptibilidad a la activación debido a la pérdida gradual de proteínas que son necesarias para el bloqueo en metafase II de la meiosis (Whittingham, 1980).

Tipo de partenogénesis

Los oocitos de mamífero se ovulan detenidos en la metafase II de la meiosis. Al tratarse adecuadamente para inducir su desarrollo partenogenético retoman la meiosis y se denominan entonces "activados". Dependiendo de las condiciones

experimentales, se pueden distinguir diferentes tipos de partenogones (ver Figura ii). Dichos embriones se definen de acuerdo a si han extruído o no el 2°CP, el timing y la naturaleza de la división celular, y la formación de pronúcleos (Kaufman, 1983).

1- Haploides (H)

Los oocitos desarrollan un pronúcleo simple después de extruir el segundo corpúsculo polar (2°CP). Los embriones que derivan de estos oocitos contienen un clon simple de células que son genéticamente idénticas. Es una forma de desarrollo haploide uniforme.

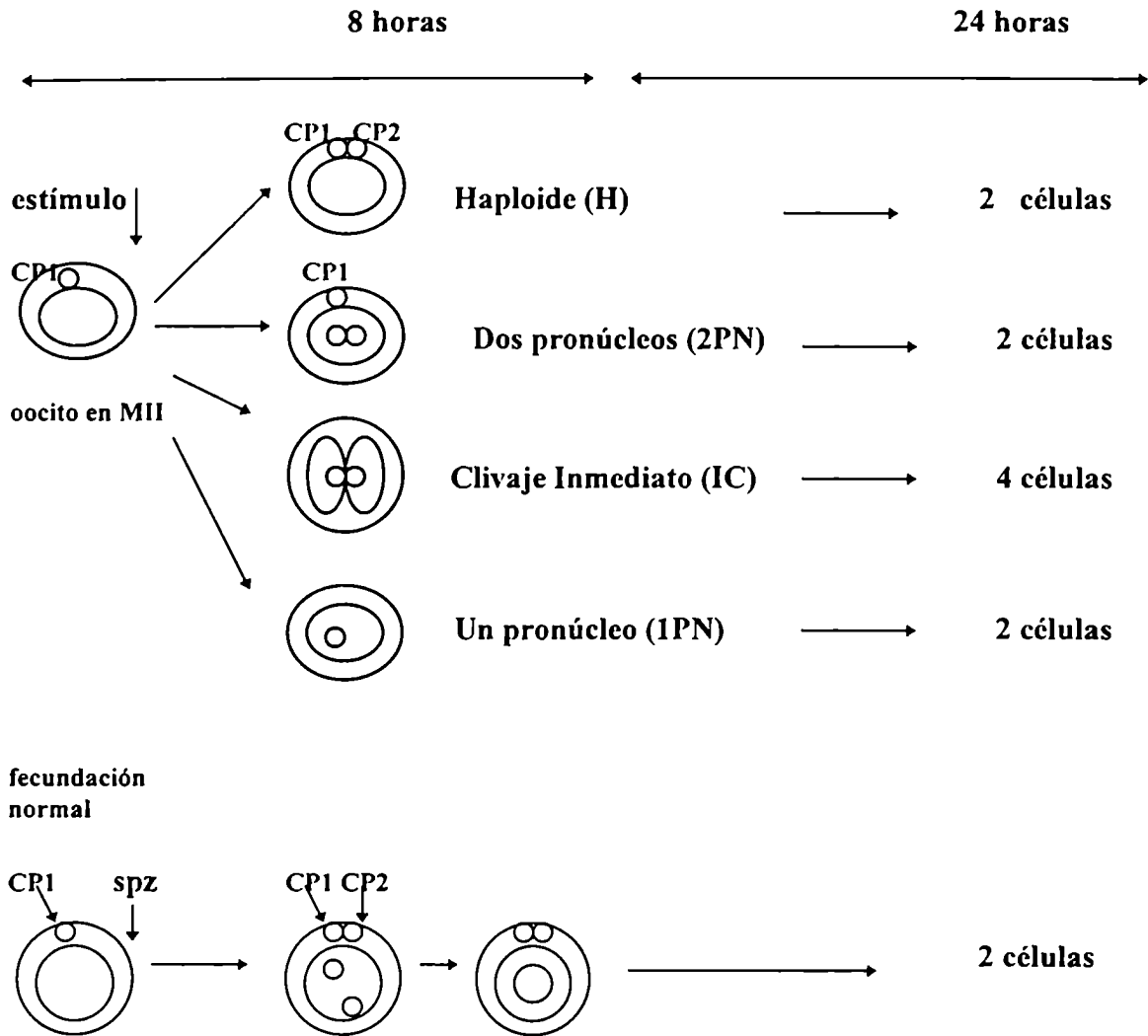
2- Clivaje Inmediato (IC) (Austin y Braden, 1954)

Los oocitos se dividen en dos blastómeros iguales, cada uno de los cuales contiene un pronúcleo haploide derivado cada uno de los dos productos de la segunda división meiótica. Uno de estos blastómeros es en esencia el 2°CP . Los embriones derivados de este tipo de partenogón poseen dos clones de células que son genéticamente distintos, lo que da lugar a un mosaico haploide.

3- Diploide heterocigota con dos pronúcleos

Los oocitos no extruyen el segundo cuerpo polar y desarrollan dos pronúcleos (2PN) haploides producto cada uno de la segunda división meiótica. Estos embriones permanecen en el estadio de 1 célula hasta el primer clivaje (alrededor de 15 hs post-activación) momento en que se amalgaman los cromosomas de los pronúcleos para dar lugar a un embrión diploide heterocigota.

Figura ii
Vías de desarrollo y constitución genética de oocitos activados por partenogénesis y fecundación



MII: metafase; CP1 y CP2: cuerpos polares 1 y 2 respectivamente; spz: espermatozoide

4- Diploide heterocigota de un pronúcleo

Los oocitos no extruyen el segundo cuerpo polar y desarrollan un pronúcleo (1PN) diploide producto de la unión de los productos de la segunda división meiótica. Estos embriones al igual que los de 2PN permanecen en el estadio de 1 célula hasta el primer clivaje (alrededor de 15 hs post-activación) momento en que se amalgaman los cromosomas de los pronúcleos para dar lugar a un embrión diploide heterocigota.

1.2.1 Decondensación del núcleo del espermatozoide y desarrollo de pronúcleos

Cuando el espermatozoide entra en el citoplasma del oocito, la envoltura nuclear que rodea el núcleo del espermatozoide desaparece y aparece una nueva envoltura nuclear que rodea a la cromatina que ya está sufriendo decondensación. La síntesis de ADN en el espermatozoide y el oocito es casi sincrónica con el desarrollo de los pronúcleos (Szollosi (1966) en Yanagimachi 1994). Los dos pronúcleos una vez que están formados totalmente se dirigen hacia el centro del oocito acercándose, sus envolturas desaparecen y sus cromosomas inician la primera división mitótica (Kaufman, 1983; Kubiak, 1991; Presicce et al., 1994). En casi todos los mamíferos, la membrana acrosomal interna, el material perinuclear, el cuerpo basal, la pieza conectora, los centriolos, las mitocondrias y otros componentes de la cola son incorporados en el ovoplasma durante la fusión espermatozoide-oocito. Estos componentes se desintegrarán y no formarán parte del embrión (Szollosi 1994), pero se desconoce cómo se digieren. Tampoco se conocen en profundidad los mecanismos que controlan el desarrollo de los pronúcleos. Cuando un gran número de espermatozoides entra al oocito las cabezas de éstos se decondensan pero no forman pronúcleos. En tanto que

el oocito activado desarrolla un pronúcleo con nucléolos (Hirao, 1996). Esto sugiere que el factor responsable del desarrollo de pronúcleos en el oocito no es el mismo que controla el desarrollo de pronúcleos en el espermatozoide. Se identificó un factor que controla el desarrollo de pronúcleos en el espermatozoide (SPDF) que ya está presente en los oocitos maduros antes de la entrada del espermatozoide. SPDF no sería especie-específico ya que espermatozoides heterólogos son capaces de decondensarse (Yanagimachi, 1977). Uehara y Yanagimachi (1977) microinyectaron espermatozoides de hamster en el ovoplasma y encontraron que los espermatozoides se decondensaban independientemente de si los oocitos se activaban o no, pero los pronúcleos bien desarrollados del espermatozoide sólo se encontraron cuando los oocitos estaban activados. Esto sugiere que SDPF funciona sólo cuando el citoplasma del oocito está bien activado.

1.3 OBJETIVOS

- 1) Definir las características biológicas de la gameta femenina de *C. musculus* y *C. laucha* para establecer las condiciones óptimas de superovulación con gonadotrofinas exógenas que permitan obtener poblaciones numerosas y homogéneas de oocitos maduros y morfológicamente normales

- 2) Analizar el comportamiento *in vitro* de la gameta femenina de *C. musculus* y *C. laucha* para conducir la activación del oocito, la dinámica de extrusión del segundo cuerpo polar y de formación de pronúcleos. La activación *in vitro* de los oocitos de ambas especies permitirá comparar la capacidad de las mismas para formar embriones partenogénéticos, y conducir el desarrollo preimplantativo *in vitro* en ausencia del genoma paterno, con respecto a los modelos convencionales. Por otra parte permitirá establecer si existen diferencias a este nivel entre ambas especies.

- 3) Caracterizar el comportamiento *in vitro* de la gameta masculina de *C. musculus* y *C. laucha* con el fin de establecer condiciones óptimas de capacitación de los espermatozoides para su utilización en estudios de fecundación *in vitro* homóloga y heteróloga.

- 4) Estudiar la capacidad de binding y capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides de *Calomys* en interacciones homo y heteroespecíficas dentro del género *Calomys* para caracterizar el nivel efectivo de la prevención de la fecundación entre estas especies: células del cúmulo, zona pelúcida, membrana plasmática y/o activación del oocito.

- 5) Analizar el rol de la variabilidad morfológica espermática en la inducción del normal desarrollo de la activación del oocito, dado que ha sido sugerido que la inducción de activaciones anómalas puede provenir de la fusión de espermatozoides con morfologías atípicas (Vitulo & Ozil, 1992) y sus consecuencias sobre el desarrollo híbrido preimplantativo.

- 6) Analizar la interacción gamética *Calomys*-hamster, *Calomys*-ratón para discutir los objetivos 4) y 5) a nivel interespecífico extragenérico y profundizar en las relaciones filogenéticas de *Calomys* dentro del Orden Rodentia.

Capítulo 2

MATERIALES y METODOS

2.1 . ANIMALES UTILIZADOS

2.1.1. *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*

La colonia de *Calomys musculinus* fue iniciada en 1992 a partir de dos machos y una hembra capturados en la localidad de Donovan, Pcia de San Luis por el Dr Enrique Caviedes. La colonia de *Calomys laucha* se inició en 1994 a partir de 3 machos y 3 hembras provenientes del bioterio de la Universidad Nacional de Córdoba, donados por la Dra Noemí Gardenal. Ambas especies fueron adaptadas a condiciones de cría experimental en el bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO) según fuera descripto por Hodara et al. (1984 y 1989). Los animales fueron mantenidos con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad con alimento comercial balanceado para ratón y agua disponibles ad libitum. Tanto los machos como las hembras fueron identificados al destete y mantenidos en cajas standard para ratón en grupos de dos y tres hasta el momento en que fueron usados para experimentación.

2.1.2. *Mesocricetus auratus* -Hamster-

Los hamster empleados en este estudio fueron mantenidos en condiciones de cría experimental en el bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Santiago de Chile. Los animales fueron mantenidos con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad con alimento comercial balanceado para hamster y agua disponibles ad libitum. Tanto los machos como las hembras fueron aislados al destete y mantenidos en cajas standard en grupos de seis a ocho hasta el momento en que fueron usados para experimentación.

2.1.3. *Mus musculus*- Ratón-

Los ratones, *Mus musculus* híbridos F1 (CBA x C57) empleados en este estudio, fueron adaptados a condiciones de cría experimental en el bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO). Los animales fueron mantenidos con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad con alimento comercial balanceado para ratón y agua disponibles ad libitum. Tanto los machos como las hembras fueron mantenidos en cajas standard para ratón en grupos de seis a ocho hasta el momento en que fueron usados para experimentación.

2.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

Todos las sales y los reactivos empleados fueron comprados en Sigma. Para la preparación de los medios de cultivo se usó agua testeada para embriones (Sigma). La seroalbúmina bovina (BSA) fracción V (Sigma) cristalizada y liofilizada se conservó a 4°C y se agregó en el momento de cada experimento. Los medios preparados se filtraron con millipore (0.22 μ m) y se almacenaron a 4°C. Se emplearon diferentes medios que según su composición y función se usaron para distintos experimentos. El M2 es una solución de Krebs-Ringer modificada (Fulton y Whittingham, 1978), para recolección de oocitos de la ampula y para manipulación de oocitos en atmósfera de aire; el M16 (Whittingham, 1971) para la activación partenogenética en atmósfera de CO₂ y para el cultivo de embriones; el T6 (solución de Tyrode modificada, Wood, 1987) para la capacitación y fecundación de espermatozoides de ratón y de *Calomys*, y el TALP-10K (Barros et al., 1984) para la capacitación y fecundación de espermatozoides de hamster y de *Calomys*; el M199 se emplea para la capacitación y

fecundación de espermatozoides de *Mus musculus*(Whittingham, 1971) La composición de los medios se detalla a continuación:

**Composición de los medios de cultivo empleados
para el manejo *in vitro* de las gametas**

Componente (g/l)	M2	M16	T6	M199	TALP-10K
NaCl	5.533	5.533	5.719	5.803	6.890
KCl	0.356	0.356	0.106	0.201	0.746
KH ₂ PO ₄	0.162	0.162			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.293	0.293			
Na lactato 60%	4.349	2.610	2.791	3.5 (ml)	16,8 (ml)
D-Glucosa	1.000	1.000	1.000	1.000	0.990
Penicilina G	0.060	0.060	0.060	0.063	
Estreptomicina	0.050	0.050	0.050	0.050	
NaHCO ₃	0.349	2.101	2.101	2.106	1.000
Piruvato de sodio	0.036	0.036	0.0052	5.0 (ml)	0.099
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.252	0.252			0.200
Hepes	4.969				
MgCl ₂ ·6H ₂ O			0.096		0.100
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O			0.129	0.056	0.050
Taurina					0.625
Epinefrina					0.091
BSA	4.000	4.000	15.00	30.00	15.00
Rojo fenol	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010

2.3. INDUCCION DE LA SUPEROVULACION y RECOLECCION DE LOS OOCITOS

2.3.1 Protocolo de inducción hormonal

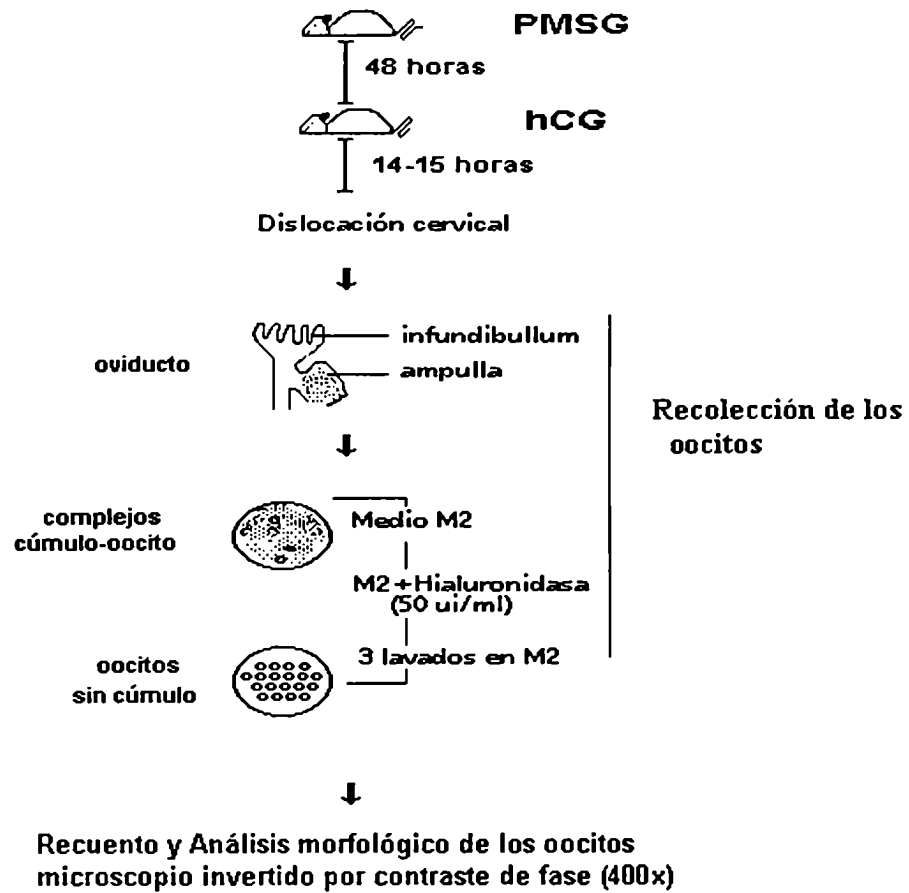
Las hembras fueron inyectadas intraperitonealmente con diferentes dosis de PMSG (gonadotropina sérica equina, Folligon, Intervet) y hCG (gonadotropina coriónica humana, Intervet). Las dosis de PMSG y hCG así como los intervalos entre ellas, fueron variados para obtener los óptimos. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical entre las 14 y 15 hs post-hCG y los cúmulos se recuperaron por ruptura de ampula en medio M2-BSA y se dispersaron con hialuronidasa (50 UI/ml, SIGMA) a temperatura ambiente. Los oocitos fueron lavados tres veces en M2-BSA fresco, y examinados en microscopio invertido por contraste de fase para testear la cantidad y calidad en función de la edad de las hembras. Para establecer el timing de la ovulación las hembras fueron sacrificadas en diferentes horarios post-hCG. Se disectaron los ovarios y se evaluó el número de folículos sin romper y el número y el tipo de los oocitos recuperados por la punción de los mismos que se compararon con aquellos obtenidos por ruptura de la ampula. Esta metodología se esquematiza en la Figura 2.

2.3.2 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como número medio \pm sd. Los valores fueron comparados con un test t-student donde valores $p < 0.005$ fueron considerados significativos.

Figura 2

Protocolo de recolección y análisis morfológico de los oocitos



2.4. ACTIVACION PARTENOGENETICA

2.4.1. Tratamiento con etanol

La activación con etanol fue realizada según Cuthbertson (1983) modificado. Los oocitos se incubaron en M16-BSA con etanol 7% (7%EtOH-M16) durante 1, 2, y 5 minutos. Luego fueron lavados en M16-BSA y cultivados en el mismo medio bajo aceite mineral (SIGMA, testado para embriones) a 37°C en una estufa gaseada con 5% CO₂ en aire. El efecto de la presencia o ausencia de las células del cúmulo fue testado realizando el tratamiento con y sin células del cúmulo. En todos los casos se realizaron tratamientos controles en los que los oocitos no se sometieron al etanol sino únicamente al medio de cultivo durante el mismo tiempo que los grupos experimentales.

2.4.2. Tratamiento con cloruro de estroncio

La activación con cloruro de estroncio fue realizada según previamente lo describieran O'Neill et al. (1991). Los oocitos se activaron por incubación a 37°C durante 30, 60 y 90 minutos en M16 fresco modificado, donde el CaCl₂ fue reemplazado con una concentración equimolar de SrCl₂ (1.6 mM). Luego de la exposición al Sr²⁺ los oocitos se lavaron en M16 sin Sr²⁺ y se cultivaron en gotas de 100µl de M16+BSA cubiertas con aceite mineral (SIGMA) a 37°C en una estufa gaseada con 5% CO₂ en aire. El efecto de la presencia o ausencia de las células del cúmulo fue testado realizando el tratamiento con y sin células del cúmulo. En todos los casos se realizaron tratamientos controles en los que los oocitos no se sometieron al Sr²⁺ sino

únicamente al medio de cultivo durante el mismo tiempo que los grupos experimentales.

2.4.3. Evaluación de los oocitos

Después del tratamiento con ambos agentes, 7% EtOH-M16 y Sr^{2+} -M16, los oocitos se examinaron a las 2.5, 4, 6, y 8 horas para determinar el tipo de partenogones formados. La clasificación fue hecha de acuerdo a Kaufman (1978): “1PN” (un pronúcleo con extrusión del segundo cuerpo polar), “2PN” (dos pronúcleos haploides), o “IC” (embriones donde cada blastómero exhibe un pronúcleo simple). La extrusión del segundo cuerpo polar (2°CP) fue examinada en un microscopio invertido, Olympus, usando contraste de fase. La formación de pronúcleos fue estudiada por tinción de los oocitos con el fluorocromo vital Hoescht 33342 (0.5 $\mu\text{g/ml}$). La metodología se resume en el esquema de la Figura 3.

2.4.4. Cultivo *in vitro* de los partenogones

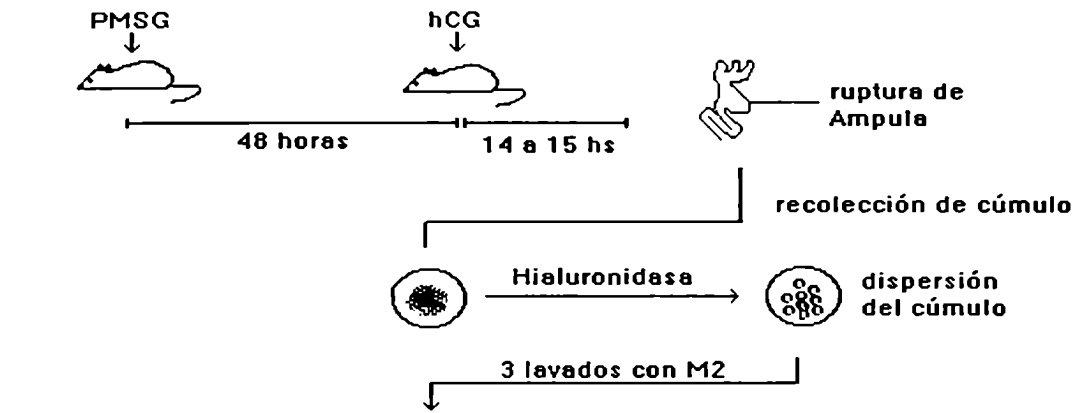
Los embriones activados tanto con etanol como con cloruro de estroncio fueron incubados en cápsulas de plástico estériles (Corning) en gotas de 100 μl bajo aceite mineral testado para embriones (Sigma). El medio de cultivo empleado en los experimentos fue pre-equilibrado en estufa de 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 en aire.

2.4.5 Dinámica de activación

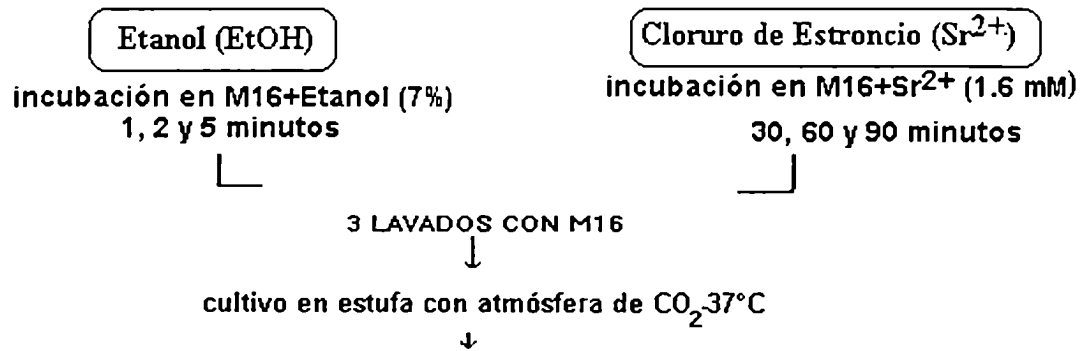
Un grupo de oocitos fue expuesto a 7%EtOH-M16 durante 5 minutos, lavado sucesivamente en gotas de M16-BSA y cultivado en el mismo medio bajo aceite

Figura 3

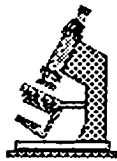
Protocolo de activación partenogenética



ACTIVACION PARTENOGENETICA



ANALISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DE LA RESPUESTA A LA ACTIVACION PARTENOGENETICA



- * observación de pronúcleos (PN), cuerpos polares (CP)
- * clasificación de los partenogones
- * desarrollo in vitro de los embriones

mineral en estufa de 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂ en aire. Los oocitos fueron examinados usando Hoescht 33342 (0.5 ug/ml) en diferentes tiempos: T0, T2, T3, T4, T6, T7, T8 (tiempos expresados en horas post-activación donde T0 representa el tiempo de activación inicial). Los oocitos fueron considerados activados cuando ellos progresaron desde metafase dos (MII) hasta anafase y telofase dos (AII/TII) o hasta el estadio de pronúcleos (1PN, 2PN, 3 PN).

2.4.6 Análisis estadístico

Los resultados de activación partenogénica fueron analizados estadísticamente utilizando el test de Chi-cuadrado con un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias fueron consideradas significativas para valores con $P < 0.05$.

2.5. COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE LA GAMETA MASCULINA

Los espermatozoides de *Calomys musculus* y *Calomys laucha* fueron estudiados para conocer su perfil de motilidad, timing de capacitación y reacción acrosomal, movimiento de hiperactivación y desarrollo de la capacidad fecundante *in vitro*. Se ensayaron dos medios de fecundación, T6, empleado normalmente para la fecundación de ratón, y TALP, empleado normalmente para la capacitación y fecundación de hamster dorado. Dado que la capacitación de los espermatozoides de hamster procede en presencia de epinefrina, se realizó el siguiente diseño experimental:

- disección mecánica de colas de epidídimo
- evaluación de la concentración

- incubación en medio T6 y TALP (con y sin epinefrina) en concentraciones de $1-2 \times 10^6$ y $1-2 \times 10^7$
- evaluación de la motilidad, capacitación, reacción acrosomal e hiperactivación en función del tiempo: 0, 30, 60, 90, 120 minutos.

Los distintos parámetros fueron evaluados como se indica a continuación:

2.5.1. Estudio de la motilidad *in vitro* de los espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha*

Se estimó por recuento de espermatozoides móviles e inmóviles en cámara de Neubauer., donde además pudieron discernirse los espermatozoides vivos de los muertos tanto por la técnica de tinción con Eosina, como por la tinción con el fluorocromo Hoechst 33258 (que muestra como fluorescentes los espermatozoides muertos).

2.5.2. Análisis de la Reacción Acrosomal Espontánea y Técnica de CTC

La reacción acrosomal se observó luego de diferentes tiempos de incubación de modo espontáneo y fue evidenciada según la **técnica de tinción con clortetraciclina (CTC)** (Storey, 1992). Esta técnica tiñe los espermatozoides que pueden diferenciarse en tres categorías:

F: se tiñe la cabeza completa del espermatozoide; espermatozoide no capacitado

B: se tiñe la región acrosomal y no la postacrosomal; espermatozoide capacitado

AR: no se tiñe la cabeza del espermatozoide; espermatozoide con reacción acrosomal.

En todos los casos se tiñe siempre la pieza intermedia.

Las observaciones se hicieron en microscopio con contraste de fase y luz uv + filtro adecuado para CTC.

2.5.3. Dinámica de capacitación y Test de Hamster

Si bien las técnicas usadas para determinar la reacción acrosomal espontánea permitieron encontrar una relación adecuada entre tiempo, medio empleado y capacitación de los espermatozoides, una vez encontrado este parámetro se recurrió a un test biológico para validar estos resultados bioquímicos.

Test de hamster (Barros y col 1978)

El test de hamster se utiliza mundialmente de rutina para comprobar la capacitación de los espermatozoides humanos. Este test prevé la obtención de oocitos de hamster por superovulación (50 UI PMSG y 50 UI de hCG con un intervalo de 56 horas entre ellas), la disgregación de las células del cúmulo con hialuronidasa y la eliminación de la zona pelúcida de hamster con tripsina (0.1% p/v). Los oocitos recuperados en medio Talp-BSA se incubaron con espermatozoides de *Calomys laucha* y *Calomys musculinus*, que habían sido previamente capacitados durante 60 y 90 minutos respectivamente, durante 4 horas en medio TALP en estufa en atmósfera de CO₂ a 37°C. Los oocitos se lavaron brevemente, se fijaron con glutaraldehído 2.5% y se incubaron algunos minutos con Hoechst supravital 33258. Luego se montaron entre porta y cubreobjetos para ser observados y fotografiados en microscopio de epifluorescencia. Algunos de ellos fueron fijados en glutaraldehído 2.5%, deshidratados en concentraciones crecientes de acetona, secados en aparato de punto crítico, teñidos con oro paladio durante 3 minutos y montados para ser observados en microscopio electrónico de barrido (Jeol 25MSII). El test de hamster se realizó en el Laboratorio de Embriología de la Pontificia Universidad Católica de Chile a cargo del Prof. Dr. Claudio Barros. Los hamster fueron provistos por el bioterio de la misma Universidad.

Los epidídimos de *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* fueron extraídos de machos adultos del bioterio del CEFYBO, cubiertos con aceite mineral y transportados en eppendorf a temperatura ambiente para su estudio. Los espermatozoides transportados de este modo pudieron sobrevivir para ser utilizados hasta 72 horas más tarde a temperatura ambiente.

2.5.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedios de los porcentajes parciales de los experimentos realizados. Los valores fueron comparados con Anova de dos factores donde $p < 0.05$ fue considerado ser significativo

2.6. FECUNDACION *IN VITRO* HOMOLOGA Y HETEROLOGA

2.6.1. Ensayos de fecundación *in vitro*

Se realizaron fecundaciones *in vitro* homólogas: *C. musculinus* x *C. musculinus*, *C. laucha* x *C. laucha*, *M. auratus* x *M. auratus* y *M. musculus* x *M. musculus* y heterólogas: *C. musculinus* x *C. laucha*, *C. laucha* x *C. musculinus*, *M. auratus* x *C. musculinus*, *M. auratus* x *C. laucha*, *M. musculus* x *C. musculinus* y *M. musculus* x *C. laucha*. Los medios de cultivo empleados y los tiempos de capacitación variaron según cada especie (ver cuadro más abajo). En todos los casos los oocitos se recuperaron de hembras superovuladas y se incubaron con los espermatozoides en gotas de 100 μ l bajo aceite mineral (SIGMA) en estufa de 37°C en una atmósfera de aire con 5% de CO₂.

Protocolos empleados para cada especie de roedores

Fecundación (hembra x macho)	Superovulación (PMSG- hCG)	Recolección oocitos (hs post-hCG)	Medio de Capacitación	Medio de Fecundación
Cm x Cm-Cl	12 -15	14-15	Talp	Talp
Cl x Cl-Cm	8 - 8	14-15	Talp	Talp
Hamster x Cm-Cl	50 - 50	16-17	Talp	Talp
Ratón x Cm-Cl	10 - 10	18-20	M199	M199
Cm x ratón	12 -15	14-15	M199	M199
Cl x ratón	8 - 8	14-15	M199	M199

2.6.2. Binding y attachment

Se evaluaron el attachment y el binding a las 2.5 y 5 horas luego de iniciada la fecundación a efectos de comparar la afinidad de los espermatozoides por los oocitos homólogos y heterólogos. El attachment se definió como el número de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida, y el binding como el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida luego de pipetear mecánicamente el oocito.

2.6.3. Penetración de la zona pelúcida, formación de pronúcleos y desarrollo *in vitro* preimplantativo

Algunos oocitos fueron examinados con el fluorocromo Hoechst 33342 (0.5 µg/ml) evaluar la formación de pronúcleos. Otros fueron dejados en cultivo para evaluar su pasaje a 2 células en medio M16 y TALP y seguir observando su posterior cultivo *in vitro*.

Capítulo 3

Superovulación de hembras de
Calomys musculinus y *Calomys laucha*

3.a. Inducción de la ovulación de *Calomys musculinus*

3.a.1. Determinación del intervalo óptimo entre hormonas

En un primer experimento exploratorio se trataron dos grupos de 3 hembras maduras que fueron inyectadas con 12 UI de PMSG y 15 UI de hCG. Cuando el intervalo entre hormonas fue de 72 horas, las hembras no mostraron evidencia de dilatación de la ampula a las 14-15 hs post-hCG. El lavado de los oviductos permitió obtener 2, 10 y 2 oocitos en cada hembra respectivamente. Estos oocitos estaban rodeados por un cúmulo muy laxo y escaso y mostraron alteraciones morfológicas y lisis. Por lo contrario, la ampula fue fácilmente identificada cuando las hembras se trataron con un intervalo de 48 hs entre ellas con las mismas dosis hormonales. En este caso las masas de cúmulo eran compactas y abundantes y se recuperaron 7, 8 y 21 oocitos para cada hembra, sin alteraciones morfológicas. **Este experimento permitió decidir el uso de un intervalo de 48 horas entre hormonas para proseguir con los análisis posteriores.**

3.a.2. Determinación de las dosis adecuadas

En una segunda serie de experimentos tres grupos de 10 hembras cada uno fueron inyectadas con 12-10; 12-15 y 16-20 UI de PMSG y hCG respectivamente, con 48 hs entre ellas. La dosis de 12-15 UI permitió obtener el nivel de respuesta más alto (80%), el mayor número medio de oocitos por hembra, 15.2 ± 5.7 , ($p < 0.005$, t-student) y el rango más amplio (9-21) (Tabla 1). **En virtud de los resultados obtenidos en estos experimentos iniciales se decidió seguir ensayando la ovulación con 12 UI de PMSG y 15 UI de hCG con un intervalo de 48 horas entre ellas.**

Tabla 1
Efecto de varias dosis de PMSG y hCG
en la inducción de la ovulación en *Calomys musculinus*

Dosis (UI) de PMSG	Dosis (UI) de hCG	Nº de hembras ovuladas/ Nº total de hembras (%)	Nºde oocitos/hembra ovulada media ± sd (rango)
12	10	7/10 (70)	11.0 ± 4.8 (7-15) (a)
12	15	8/10 (80)	15.2 ± 5.7 (9-21) (b)
16	20	6/10 (60)	10.5 ± 5.7 (4-18) (c)

UI: unidades internacionales

(b) difiere significativamente de (a) y (c), $p < 0.005$, t-student

3.a.3. Análisis del horario de recolección de los oocitos maduros

Con el fin de conocer el momento aproximado del inicio de la ovulación se analizaron cuatro grupos de 8 hembras inyectadas con 12-15 UI de PMSG-hCG, con un intervalo de 48 hs entre ellas. Los animales fueron examinados a las 10, 12, 14 y 17 hs post-hCG. La ovulación se inició a las 10 hs y fue completada a las 14 hs post-hCG (Tabla 2). Las hembras analizadas a las 17 hs post-hCG no mostraron un incremento en el número de los oocitos ovulados.

Estos experimentos permitieron concluir que el tiempo óptimo en que debían ser recuperados los oocitos por ruptura de ampulla era entre las 14-15 hs post-hCG. Esto permitió obtener poblaciones frescas de oocitos maduros no envejecidos en el oviducto.

3.a.4. Tipo de respuesta a la ovulación, número medio de oocitos y edad de las hembras

Para optimizar el uso de los animales y mejorar la calidad de los oocitos, se estudió si había un efecto edad-dependiente en la inducción de la ovulación. Con este fin 138 hembras de diferentes intervalos de edades (30-60, 61-90, 91-120 y 121-368 días) fueron inyectadas con 12 UI de PMSG y 15 UI de hCG con un intervalo de 48 hs entre ellas. La mayor parte de estas hembras (114, 82.61%) respondieron al tratamiento mostrando una respuesta “ovulatoria” (63, 55.26%) (Tabla 3) con un número medio de 7.05 ± 2.38 oocitos/hembra (rango:1-10) (Tabla 4),

Tabla 2**Tiempo de ovulación post-hCG en *Calomys musculinus***

Horas posthCG	N° de hembras ovuladas/ N° total de hembras (%)	N° de oocitos/hembra media ± sd (rango)	N°foliculos sin romper/hembra media ± sd (rango)
10	4/8 (50.0)	5.4 ± 4.4 (2-7)	15.7 ± 7.1 (10-27)
12	7/8 (87.5)	9.2 ± 8.5 (5-15)	9.8 ± 3.7 (3-17)
14	7/8 (87.5)	15.7 ± 2.5 (11-17)	5.2 ± 1.5 (4-8)
17	8/8 (100)	14.5 ± 3.9 (11-21)	5.7 ± 1.5 (4-8)

“superovulatoria” (51, 44.74%) (Tabla 3) con un número medio de 17.63 ± 7.35 oocitos/hembra (rango:12-45) (Tabla 4). El límite entre la “ovulación” y la “superovulación” fue establecido de acuerdo al tamaño de camada máximo (N=10) registrado en nuestra colonia. Aunque en todos los intervalos de edades analizados el porcentaje de respuesta fue alto (74-90%), este no se distribuyó en forma homogénea. Tanto las hembras más jóvenes como las más viejas mostraron la respuesta más baja y con una mayor tendencia a la ovulación más que a la superovulación (Tabla 3). En contraste, las hembras de 61 a 120 días de edad mostraron la respuesta más alta (90%) al tratamiento y de tipo superovulatoria (58-70% de los casos) (Tabla 3). El número medio de oocitos superovulados también mostró ser edad-dependiente (Tabla 4), ya que las hembras de 61-90 días mostraron el número medio y rango más altos en cuanto a oocitos superovulados (Tabla 4).

En síntesis, existe una respuesta edad-dependiente en cuanto al tipo de respuesta, ovulatoria o superovulatoria (Tabla 3), y al número de oocitos ovulados en cada grupo de hembras (Tabla 4). Si dejamos de lado el tipo de respuesta, y sólo concentramos la atención en la cantidad de oocitos que se pueden recuperar en función de la edad de la hembra, veremos que de todos modos el intervalo de edad de entre 61-90 días es el que más oocitos permite obtener con este tratamiento de inducción de la ovulación (Figura 4)

Tabla 3
Efecto de la edad de las hembras en la respuesta
al tratamiento superovulatorio en *Calomys musculinus*

Edad (días)	Nº de hembras que responden/total (%)	Nº de hembras que ovulan/responden (%)	Nº de hembras que superovulan/responden (%)
30-60	35/47 (74.5)	25/35 (71.43)	10/35 (28.57) (a)
61-90	46/51 (90.2)	19/46 (41.30)	27/46 (58.70) (b)
91-120	18/20 (90.0)	9/18 (50.00)	9/18 (50.00) (c)
>120	15/20 (75.0)	10/15 (66.70)	5/15 (33.33) (d)
total	114/138 (82.61)	63/114 (55.26)	51/114 (44.74)

(b) difiere significativamente de (a), (c) y (d), $p < 0.005$, t-student

Tabla 4

Efecto de la edad de las hembras en el número medio de los oocitos ovulados y superovulados en *Calomys musculinus*

Edad (días)	Respuesta ovulatoria media \pm sd (rango)	Respuesta superovulatoria media \pm sd (rango)
30-60	5.36 \pm 2.60 (1-10)	15.22 \pm 2.90 (12-20) (a)
61-90	7.52 \pm 2.50 (4-10)	20.77 \pm 9.60 (12-45) (b)
91-120	8.11 \pm 2.30 (4-10)	16.00 \pm 4.80 (15-25) (c)
>120	7.64 \pm 2.70 (5-10)	12.20 \pm 0.40 (12-19) (d)
total	7.16 \pm 2.52 (1-10)	16.05 \pm 4.42 (12-45)

El número medio de oocitos obtenido en la respuesta ovulatoria no difiere entre sí al comparar las distintas edades. Sin embargo al tener en cuenta la respuesta superovulatoria los valores de (b) difieren significativamente de (a), (c) y (d).

3.a.5. Calidad de los oocitos obtenidos por inducción de la ovulación vs. edad de las hembras de *Calomys musculinus*

Una observación cuidadosa en microscopía óptica por contraste de fase permitió analizar la calidad de los oocitos recuperados por inducción ovulatoria en todos los intervalos de edades (N=1082). Las alteraciones encontradas (Foto A) fueron clasificadas como morfológicas (fragmentación, muerte, vitelo retraído, zona pelúcida vacía) y de activación espontánea (con 2CP extruído y con dos blastómeros). La mayoría de los oocitos (977, 90.3%) fue morfológicamente normal. Las anomalías detectadas fueron relativamente bajas para todos los intervalos de edades aunque fueron más evidentes entre 30-60 y >91 días (Tabla 5). Se encontraron oocitos activados espontáneamente pero en un porcentaje muy bajo, en las hembras más jóvenes (Tabla 5). Los oocitos maduros de *C. musculinus* tienen un diámetro medio de $80 \pm 5 \mu$ (incluyendo la zona pelúcida) y su citoplasma presenta muchas granulaciones citoplasmáticas que en algunos casos dificulta la observación de pronúcleos y nucléolos.

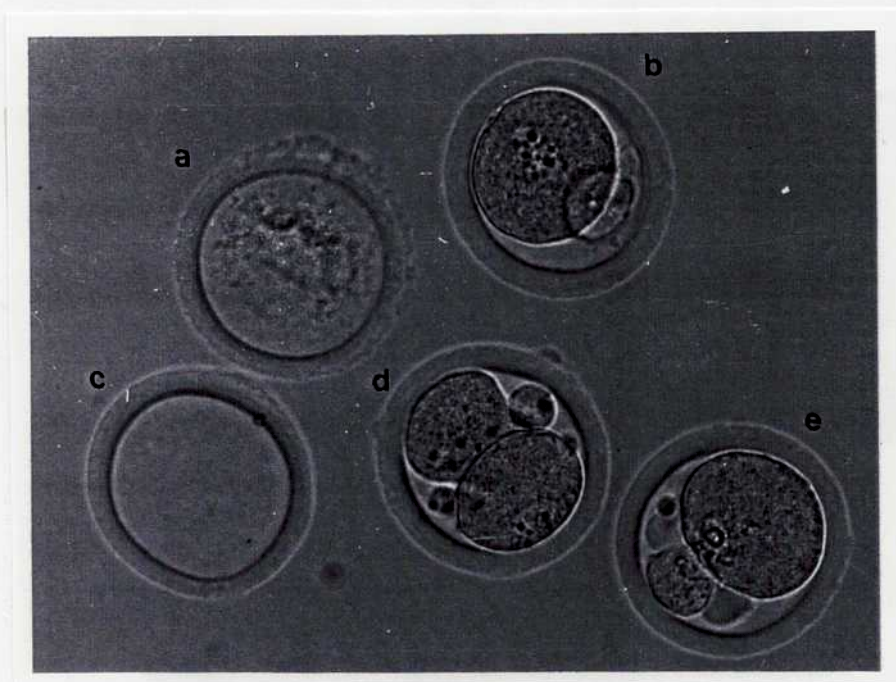
Brevemente, la inducción de la ovulación en *C. musculinus* se logra con 12 UI de PMSG y 15 UI de hCG con un intervalo de 48 hs entre ellas. Pueden inducirse hembras de diferentes edades independientemente del momento del ciclo estral, pero se incrementa el nivel de la respuesta y el número y calidad de los oocitos si las hembras tiene entre 61-90 días. El horario óptimo de recolección de los oocitos es entre las 14-15 hs post-hCG.

Tabla 6
Calidad de los oocitos en las hembras superovuladas
de *Calomys musculinus* en relación a la edad

Edad (días)	Oocitos analizados	Morfológicamente normales (%)	Alteraciones morfológicas (%)	Activación espontánea (%)
30-60	287	241 (83.97)	33 (11.50)	13 (4.53)
61-90	449	419 (93.32)	20 (4.45)	10 (2.30)
91-120	186	165 (88.71)	21 (11.30)	0
>120	160	152 (95.00)	8 (5.00)	0
total	1082	977 (90.29)	82 (7.58)	23 (2.12)

Foto A

Alteraciones morfológicas y de activación espontánea en oocitos recuperados por punción de la ampulla en *Calomys musculinus* entre 14 y 15 horas post-hCG (12 UI de PMSG - 15 UI hCG).



La Fotografía muestra distintas alteraciones en oocitos recuperados por superovulación: **a-** oocito lisado; **b-** oocito activado con extrusión del segundo cuerpo polar; **c-** oocito fantasma, sólo se ve la zona pelúcida; **d-** oocito clivado a 2 células; **e-** oocito con fragmentaciones perivitelinas. Fotografía tomada en microscopio invertido, contraste de fase (20x).

3.b. Inducción de la ovulación de *Calomys laucha*

3.b.1. Determinación del intervalo óptimo entre hormonas

Teniendo en cuenta que *Calomys laucha* se asemeja más a *C. musculinus* que a *C. callidus* debido a su pequeño tamaño, el primer intervalo ensayado entre las hormonas fue el de 48 horas. Se trataron 5 hembras, con 12 UI de PMSG y 15 UI de hCG, que mostraron signos de haber ovulado debido a la capilarización del ovario y oviducto, presencia de puntos de ovulación indicando folículos que ovularon y oocitos maduros que pudieron ser recuperados con las células del cúmulo por ruptura de la ampula. La ampula pudo ser reconocida por su dilatación prominente en el oviducto. Estas observaciones permitieron fijar el intervalo en 48 horas para ensayar las distintas dosis para obtener las óptimas.

3.b.2. Determinación de las dosis adecuadas

Debido a que las dosis óptimas en *Calomys musculinus* son 12 UI de PMSG y 15 UI de hCG se comenzó suministrando estas dosis a 24 hembras de 4 intervalos de edades diferentes (30-60; 61-90; 91-120; 121-200 días). Sólo respondieron positivamente 8 hembras (33.33%) con un número medio de oocitos/ hembra de 5.91 ± 8.39 y con un rango muy amplio (0-40) debido a que las hembras de 61-90 días mostraron una ovulación muy variable (10, 5 y 40 oocitos por hembra) (Tabla 6). Cabe remarcar que las hembras de 30-60 días no respondieron en tres casos, y en los otros dos los 5 oocitos obtenidos presentaban anomalías morfológicas severas (Foto B). Esta observación fue la

Tabla 6

**Efecto de diferentes dosis de PMSG - hCG
en la inducción de la ovulación en *Calomys laucha***

Edad (días)	12-15 UI PMSG-hCG		8-8 PMSG-hCG	
	Nº hembras que responden/total (%)	Nº oocitos por hembra ovulada media ± sd (rango)	Nº hembras que responden/total (%)	Nº oocitos por hembra ovulada media ± sd (rango)
30-60	3/6 (50.00)	3.30 ± 1.69 (1-5) ^a	6/6 (100)	22.60 ± 5.64 (16-30) ^d
61-90	3/6 (50.00)	18.33 ± 15.46(5-40) ^b	5/6 (83.33)	10.40 ± 2.33 (8-14) ^e
91-120	0/6		4/6 (66.66)	7.50 ± 1.80 (5-10) ^f
>120	2/6 (33.33)	2.00 ± 0.00 (2-) ^e	6/6 (100)	9.83 ± 3.23 (6-13) ^g
total	8/24 (33.33)	5.91 ± 8.39 (1-40)	21/24 (87.50)	12.58 ± 6.79 (5-30)

b difiere significativamente de **a** y **c** (P<0.005, t-student)

d difiere significativamente de **e**, **f** y **g** (P<0.005, t-student)

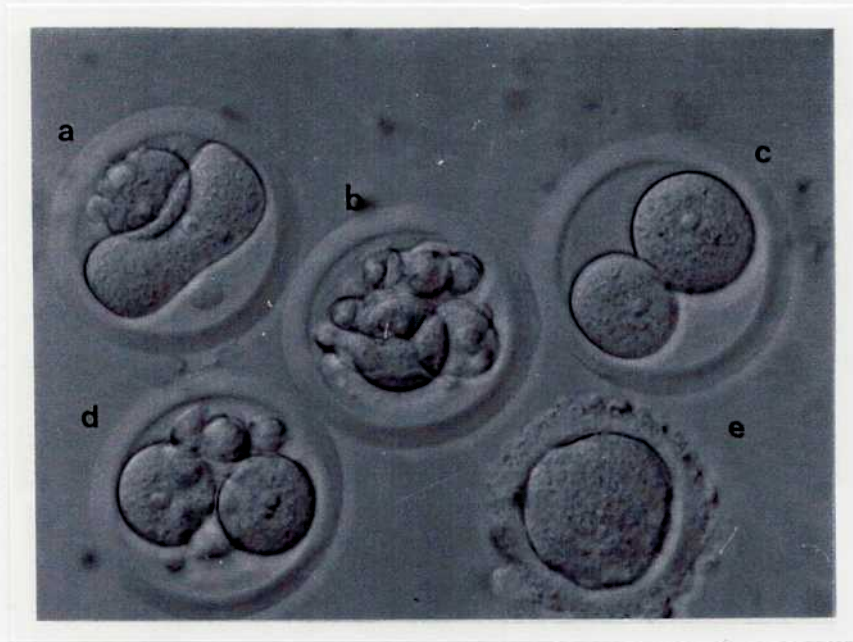
que permitió suponer que las dosis empleadas eran muy altas, pudiendo provocar estas anomalías visibles y una disminución en el nivel de la respuesta (superovulación).

Se inició entonces otro ensayo variando las dosis a 8 UI de PMSG y 8 UI de hCG, en otras 20 hembras, respetando los mismos intervalos de edades. Con estas dosis las hembras de los 4 intervalos de edades respondieron positivamente al tratamiento aunque las de 30-60 días presentaron los mejores resultados de cantidad (22.60 ± 5.64 ; rango:16-30, $p < 0.005$, t-student) y calidad de respuesta ya que todas las hembras presentaron respuesta de tipo superovulatoria (Tabla 7).

Este experimento permitió tomar la decisión de utilizar la dosis 8 UI de PMSG y 8 UI de hCG de ahora en adelante para estudiar la diferencia de respuesta entre las diferentes edades de las hembras y sus alteraciones morfológicas y el timing de ovulación.

Foto B

Alteraciones morfológicas y activación espontánea en oocitos maduros de una hembra de *Calomys laucha* superovulada con 12-15 UI (PMSG-hCG).



La Fotografía muestra oocitos recientemente ovulados con alteraciones morfológicas: **a-** oocito con los blastómeros malformados, en los que se pueden apreciar los pronúcleos, **b-** oocito fragmentado, **c-** oocito con dos blastómeros exhibiendo sus 2 pronúcleos, **d-** oocito con dos blastómeros y fragmentaciones perivitelinas, y **e-** oocito muerto..

3.b.3. Análisis del horario de recolección de los oocitos maduros

El momento preciso de la ovulación fue analizado en cuatro grupos de 5 hembras inyectadas con 8-8 UI de PMSG-hCG, con un intervalo de 48 hs entre ellas. Los animales fueron examinados a las 8, 10, 12 y 14 hs post-hCG. A las 8 horas, (Tabla 7) no se recuperaron más que 5 oocitos de 5 hembras y el número de folículos sin romper fue de 20.6 ± 3.01 . A las 10 horas se inicia la ovulación, y a medida que transcurre el tiempo aumenta el número de oocitos ovulados por hembra y disminuye el número de folículos sin romper. La ovulación se completó a las 14 hs post-hCG (Tabla 7). Las hembras analizadas a las 16 hs post-hCG no mostraron un incremento significativo en el número de los oocitos ovulados (resultados no mostrados).

En síntesis, el horario óptimo de recolección de oocitos maduros de *Calomys musculinus* de la ampulla es entre las 14-15 horas post-hCG.

Tabla 7

Tiempo de ovulación post-hCG en *Calomys laucha*

Horas post-HcG	Nº hembras ovuladas/ Nº total hembras (%)	Nº oocitos /hembra media ± sd (rango)	Nº folículos s/ romper media ± sd (rango)
8	1/5	5.00 ± 0.00 (0-5) ^a	20.6 ± 3.01 (18-25) ^e
10	3/5 (60.00)	8.00 ± 0.82 (7-9) ^b	15.80 ± 3.86 (8-21) ^f
12	4/5 (80.00)	13.00 ± 2.16 (10-15) ^c	11.30 ± 2.93 (7-15) ^g
14	4/5 (80.00)	15.25 ± 1.48 (13-17) ^d	10.15 ± 3.25 (6-13) ^h

El número medio de oocitos por hembra aumenta significativamente entre las 8 y las 14 hs post-hCG:

a y b no difieren entre si

c y d no difieren entre si

a-b difieren de c-d significativamente, $p < 0.005$, t-student

El número de folículos sin romper disminuye con el tiempo de modo significativo:

e difiere significativamente de f, g y h, $p < 0.005$, t-student

g y h no difieren entre sí significativamente

3.b.4. Tipo de respuesta a la ovulación, número medio de oocitos y edad de las hembras

Con el fin de establecer si había un efecto edad-dependiente en la inducción de la ovulación, y a los efectos comparativos con *C. musculus*, 92 hembras de diferentes intervalos de edades (30-60, 61-90, 91-120 y 121-368 días) fueron inyectadas con 8 UI de PMSG y 8 UI de hCG con un intervalo de 48 hs entre ellas.

El 86.74 % (71/92) de las hembras tratadas respondieron al tratamiento (Tabla 8) mostrando una respuesta “ovulatoria” (52.05 %) con un número medio de 7.19 ± 2.14 oocitos/hembra (rango:3-10), o “superovulatoria” (47.95 %) con un número medio de 15.72 ± 4.45 oocitos/hembra (rango:11-30). El límite entre la “ovulación” y la “superovulación” fue establecido de acuerdo al tamaño de camada máximo (N=10) registrado en la colonia. El porcentaje y tipo de respuesta varió según la edad de las hembras. Aquellas más jóvenes mostraron sólo una respuesta de tipo superovulatoria., en tanto que las >60 días tuvieron los dos tipos de respuesta (Tabla 8). El número medio de oocitos superovulados también mostró ser edad-dependiente (Tabla 9), ya que las hembras de 30-60 días mostraron el número medio y rango más altos en cuanto a oocitos superovulados.

Tabla 8
Efecto de la edad de las hembras en la respuesta
al tratamiento superovulatorio en *Calomys laucha*

Edad (días)	Nº de hembras que responden/total (%)	Nº de hembras que ovulan/responden (%)	Nº de hembras que superovulan/responden (%)
30-60	20/23 (86.96)	0/20	20/20 (100) *
61-90	19/29 (65.52)	10/19 (52.63)	9/19 (47.37)
91-120	15/20 (75.00)	14/15 (93.33)	1/15 (6.67)
>120	17/20 (85.00)	14/17 (82.36)	3/17 (17.65)
total	71/92 (77.18)	38/71 (53.52)	33/71 (46.48)

* es el único valor que difiere estadísticamente del resto, $p < 0.005$

Tabla 9

Efecto de la edad de las hembras en el número medio de los oocitos ovulados y superovulados en *Calomys laucha*

Edad (días)	Respuesta ovulatoria media ± sd (rango)	Respuesta superovulatoria media ± sd (rango)
30-60	- (*)	18.00 ± 4.31 (12-30) ^a
61-90	8.70 ± 1.05 (7-10)	10.89 ± 3.60 (11-14) ^b
91-120	7.86 ± 2.13 (5-10)	11.00 ± 0.00 (11-) ^c
>120	6.23 ± 1.97 (3-10)	13.33 ± 1.24 (12-15) ^d
total	7.60 ± 1.26 (3-10)	13.31 ± 3.33 (11-30)

a difiere de b, c y d, p<0.005

(*) en las hembras de entre 30-60 días de edad no hubo respuesta de tipo ovulatoria sino sólo de tipo superovulatoria

3.b.5. Calidad de los oocitos superovulados y edad de las hembras

Los oocitos recuperados por superovulación fueron analizados (N=810) con microscopía de contraste de fase para determinar la incidencia de las alteraciones morfológicas y la activación espontánea luego de la inducción ovulatoria. Las alteraciones encontradas fueron clasificadas como morfológicas (fragmentación, muerte, vitelo retraído, zona pelúcida vacía) y de activación espontánea (con 2CP extruído y/o con dos blastómeros). La mayoría de los oocitos (96.57%) fue morfológicamente normal (Tabla 10). Las anomalías detectadas fueron bajas para todos los intervalos de edades aunque fueron más evidentes en las hembras de 61-90 días (4.61%) y >120 días (4.96%), en tanto que en los otros intervalos las anomalías fueron menores 2.66% (30-60 días) y 2.54% (91-120 días)

Brevemente, las hembras de *Calomys laucha* pueden ser inducidas a ovular con gonadotrofinas exógenas con 8 UI de PMSG y 8 UI de hCG independientemente del ciclo estral. La calidad de la respuesta y el número y calidad de los oocitos pueden optimizarse empleando hembras 30 a 60 días de edad. El tiempo óptimo de recuperación de los oocitos es entre las 14-15 horas.

Tabla 10
Calidad de los oocitos en las hembras superovuladas
de *Calomys laucha* en relación a la edad

Edad (días)	Oocitos analizados	Morfológicamente normales (%)	Alteraciones morfológicas (%)	Activación espontánea (%)
30-60	376	366 (97.34)	3 (0.8)	7 (1.86)
61-90	195	186 (95.38)	0	9 (4.61)
91-120	118	115 (97.45)	0	3 (2.54)
> 120	121	115 (95.04)	6 (4.96)	0
total	810	782 (96.54)	9 (1.12)	19 (2.34)

3.c. Discusión y conclusiones parciales: Superovulación comparada en tres especies del género *Calomys*: *C. musculinus*, *C. laucha* y *C. callidus*

La obtención de poblaciones numerosas y homogéneas de oocitos maduros resulta indispensable en cualquier estudio analítico de fecundación y desarrollo. Para ello se han desarrollado dos metodologías, una prevé el crecimiento, punción folicular y maduración *in vitro* de oocitos, y la otra es factible mediante la administración de hormonas exógenas que inducen crecimiento y ruptura folicular *in vivo*. Este último método es el que se empleó para el presente trabajo ya que los oocitos de ratón adquieren un bajo nivel de capacidad para ser activados cuando se maduran *in vitro* mientras que se tornan óptimos cuando se recuperan luego de la ovulación, indicando la importancia de su envejecimiento en el oviducto (Kaufman, 1983; Eppig et al, 1994; Hartshorne et al, 1994). Este método consiste en suministrar una primera dosis de PMSG (gonadotrofina sérica equina) seguida por otra de hCG (gonadotrofina coriónica humana) con un intervalo entre ellas de entre 48 a 72 horas que varía según el modelo experimental. Cabe mencionar que el uso de gonadotrofinas exógenas puede incidir en la calidad del oocito. Algunos de los trastornos más frecuentes y citados en la bibliografía son las aneuploidías (Maudlin y Fraser, 1977) y las alteraciones morfológicas que impiden luego su normal desarrollo hasta blastocisto. Estas últimas se han correlacionado negativamente con el aumento de las gonadotrofinas (Sautmauer et al, 1994). No obstante es factible trabajar con dosis adecuadas que permiten obtener un resultado superovulatorio óptimo minimizando los trastornos antes mencionados. El tiempo transcurrido entre cada hormona está íntimamente relacionado con el ciclo luz-oscuridad al que está sujeto el animal. La mejor sincronización se obtiene cuando la hCG se suministra antes de la liberación

endógena de la hormona luteinizante (LH), la cual es regulada por el Fotoperíodo (Hetherington, 1987). Existen además otros factores que influyen sobre la respuesta individual tales como la nutrición, el estrés y las variaciones estacionales. Si bien en los programas de superovulación en animales domésticos tales como vaca, cerdo y cabra se hace un estudio previo del ciclo estral y esto permite obtener grandes mejoras en los resultados superovulatorios, en ratón, hamster dorado, hamster chino y *C. callidus* se vio que el resultado de la superovulación no depende de la fase del ciclo estral en que se suministren las hormonas (Gates, 1971; Roldán y Yanagimachi, 1987). En el caso de *C. musculus* y *C. laucha* se hace muy difícil el estudio de dicho ciclo ya que las paredes uterinas altamente cornificadas impiden hacer frotis y preparados para establecer certeramente cada fase del ciclo estral sin sacrificar al animal (Cutrera, 1989). De todos modos en este trabajo se observó que es factible superovular tanto a *C. laucha* como a *C. musculus* independientemente del momento del ciclo estral y que a pesar de la diferencia en las dosis necesarias para inducir ovulación en cada especie ambas requieren un intervalo entre hormonas de 48 entre ellas. En contraste, estudios realizados previamente por Roldán et al., (1985) en *C. callidus* mostraron que esta requería un intervalo entre hormonas de 72 horas. Estos datos sugerirían que existen diferentes ritmos de liberación de LH endógena dentro del género. Se ha visto que las hembras de *C. musculus* tienen una alta incidencia de anestros y parece tener un mecanismo ovulatorio que es básicamente espontáneo (Cutrera, 1989) y se vio que si bien las hembras aisladas de machos muestran la secuencia completa del crecimiento folicular hasta la formación de los cuerpos lúteos, tendrían un mecanismo subyacente para liberación de LH, que podría actuar como un estímulo adicional para la ovulación. Este mecanismo ha sido demostrado en otras

especies ovuladoras espontáneas como la rata de laboratorio. Por otra parte la corta duración del ciclo estral en esta especie, que es típica de los muroideos que presentan ovulación espontánea, podría interpretarse como sugestiva de la falta de una fase lútea, funcional y espontánea en esta especie. Si así fuera, el ciclo de *C. musculinus* correspondería al tipo ovulación espontánea, fase lútea inducida. Sin embargo, la fase lútea ultracorta de esta especie parece ser funcional, y no requiere, por tanto, su prolongación por los estímulos del coito, a diferencia de los mekansimos que han sido prolijamente descritos en los muroideos del viejo mundo (Cutrera, 1989). La modalidad de control de la fase lútea, en esta especie, parece constituir un tipo claramente distinto a los conocidos hasta ahora entre los mamíferos, por lo que cabe preguntarse si se trata de una excepción, o, si se trata de la forma propia de los cricétidos sudamericanos, que sería una forma de transición entre las fases lúteas características de la mayoría de las hembras poliéstricas, y las fases lúteas reactivas (pseudopreñeces) propias de los múridos y cricétidos del Viejo Mundo. La medición de la progesterona circulante, en distintas fases del ciclo ovárico de hembras de *C. musculinus* aisladas de machos, mostró una curva semejante en su forma a la conocida en la rata (Smith et al., 1975), ya que mostró dos incrementos sobre el nivel basal, uno preovulatorio (en el estro) y otro postovulatorio (en el diestro), siendo este último de menor magnitud que el primero. A pesar de la semejanza con la curva de rata, hay que remarcar que los niveles circulantes de progesterona de *C. musculinus* son mucho menores que los de rata. De este modo *Calomys musculinus* dispondría, como la mayoría de los muroideos de ovulación espontánea, de una forma de control luteal que también permite la rápida sucesión de estros (sin largas pausas luteales). Pero esta adaptación filogenética, que es tan importante para especies que se

encuentran sometidas a una alta predación (Conaway, 1971), se ha alcanzado en *Calomys* mediante una combinación de (1) fase lútea ultracorta, (2) adelantamiento de la implantación embrionaria; y (3) disminución de los requerimientos de progesterona para la implantación (Cutrera, 1989).

Las especies de *Calomys* son agrupadas en función de su tamaño corporal en dos grupos: “grandes” y “pequeñas”, aunque no está claro si se trata de una convergencia morfológica o de una divergencia cladística (Corti et al., 1987). *C. musculinus* y *C. laucha* pertenecen al grupo de especies pequeñas mientras que *C. callidus* al de las grandes, pero a pesar de las diferencias en el intervalo entre hormonas el nivel de respuesta al tratamiento es muy similar para las tres especies (Ver Cuadro comparativo #1). Cada especie tiene un requerimiento diferente en cuanto a las dosis hormonales adecuadas para obtener una respuesta superovulatoria óptima. Estas diferencias podrían probablemente deberse a las diferencias en el tamaño corporal entre ellas. Cabe aclarar que en el caso de *C. callidus* las dosis adecuadas sean probablemente inferiores a las mencionadas en el cuadro # 1 (50-75 UI) ya que la marca de las hormonas empleadas presentaba títulos pocos seguros (Roldán et al., 1985). Por otra parte, *C. venustus* otra especie dentro del grupo de las de tamaño “grande” del género *Calomys*, no requirió dosis tan elevadas como *C. callidus* ya que ha ovulado con dosis de 15-20 (datos no mostrados) y probablemente estas sean las dosis adecuadas para *C. callidus*.

La ovulación en *C. musculinus* y en *C. laucha* se inicia alrededor de las 10 hs y se completa entre las 14-15 hs post hCG. Estos resultados no coinciden con aquellos publicados para los modelos experimentales de roedores más comúnmente utilizados. En ratón, rata y hamster dorado la ovulación se completa como muy temprano entre

las 16 y 20 hs post-hCG (Yanagimachi et Chang, 1964; Gates 1971; Niwa et Chang, 1974) y en el hamster chino ésta se inicia entre las 13-14 hs post-hCG y se completa entre las 20-21 hs post -hCG (Roldán et al., 1987). El análisis de los folículos sin romper a distintos tiempos post-hCG mostró que el nivel de hormonas suministrado para *C. musculus* y *C. laucha* fue adecuado ya que la mayoría de los oocitos completaron la maduración dentro del folículo (Tablas 2, 3, 9 y 10). Un nivel inapropiado de hCG puede producir una luteinización del folículo e interferir tanto con la maduración como con la ruptura folicular. Con dosis inapropiadas permanece un elevado número de folículos sin romper en cualquier horario post-hCG (Roldán et al., 1987). Este no fue el caso del folículos sin romper en los ovarios (Tablas 2 y 9).

En algunos casos, la superovulación puede mejorarse reemplazando la hCG por otras hormonas como la hormona pituitaria luteinizante (PLH). En el hamster chino, el uso de la PLH en lugar de la hCG mejora ostensiblemente el número de oocitos recuperados por superovulación (Roldán et al., 1987). Para *C. musculus* y *C. laucha* esta hormona no mostró incrementar las tasas superovulatorias (resultados no mostrados).

Los oocitos de ambas especies pudieron recuperarse por ruptura de ampula, pero cabe mencionar que la dilatación de la misma no es tan prominente como en el caso de las ampulas de ratón y rata que se superovularon a efectos comparativos (datos no mostrados).

Cuadro comparativo #1
Superovulación comparada en tres especies del género *Calomys*:
C. callidus, C. laucha, C. musculinus.

Especie	<i>C. musculinus</i>	<i>C. laucha</i>	<i>C. callidus</i>(1)
dosis hormonales (UI) óptimas	12 - 15	8-8	50-75
intervalo hormonas (hs)	48	48	72
número de hembras	138	83	62
respondieron (%)	114 (82.61)	72 (86.74)	54 (87.09)
respuesta ovulatoria **	63/114 (55.26)	38/72 (52.78)	20/54 (37.03)
oocitos/hembra (x±sd)	7.05 ± 2.38	7.19 ± 2.14	4.00 ± 2.10
rango	4 a 10	5 a 10	6 a 10
rpta superovulatoria*	51/114 (44.74)	34/72 (47.22)	34/54 (62.96)
oocitos/hembra (x±sd)	17.08 ± 7.35	15.72 ± 4.45	26.8 ± 11.51
rango	12 a 45	12 a 40	12 a 51
alteraciones: morfológicas + act. Espontánea (%)	9.67	2.93	no hay datos

** ovulatoria: oocitos recuperados en número menor o igual a 10

* superovulatoria: oocitos recuperados en número mayor a 10 en forma estricta

(1) datos tomados de Roldán et al. (1985)

La respuesta al tratamiento hormonal varió en función de la edad de las hembras y la edad óptima difirió para *C. laucha* y *C. musculinus*. En la primera, la edad óptima es entre 30-60 días en tanto que para la segunda es entre 61-90 días de edad. *Calomys laucha* puede compararse en este caso con *Mus musculus* donde se trabaja habitualmente con hembras prepúberes, entre los 28-35 días de edad, y se obtienen los mejores resultados de superovulación (Hetherington, 1987; Kaufman, 1983; Kubiak, 1991). En el caso de *C. laucha*, se registraron en el bioterio casos de hembras que tuvieron su camada entre los 47 y 54 días de edad lo cual indica son sexualmente maduras a partir de los 30 días de edad.

Por último la calidad morfológica de los oocitos obtenidos por inducción hormonal no se vió afectada por las gonadotrofinas exógenas administradas (PMSG-hCG) para ninguna de las especies tratadas. El análisis de la superovulación permitió obtener poblaciones frescas de oocitos maduros detenidos en metafase II y de buena calidad morfológica. El conocimiento del timing de la ovulación, las dosis adecuadas y la edad de las hembras a superovular fue necesario para poder realizar los estudios posteriores, asegurar una buena calidad de las gametas y optimizar el uso de los animales en el bioterio.

Capítulo 4

Activación partenogenética de oocitos maduros, timing de formación pronuclear y desarrollo *in vitro* de embriones partenogenéticos de *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*.

4.a. Activación con etanol y cloruro de estroncio de oocitos maduros de *C. musculus* y *C. laucha* en presencia y ausencia de las células del cúmulo

Para poder analizar comparativamente la capacidad del genoma materno para dirigir el desarrollo en ausencia del genoma paterno se estudió la activación partenogenética en *Calomys musculus* y *C. laucha*. En una primera etapa fue necesario conocer qué estímulos *in vitro* podían activar los oocitos de estas especies. Para ello se emplearon como agentes partenogenéticos, etanol 7% y cloruro de estroncio 1.6 mM. Se estudió la respuesta de los oocitos a estos tratamientos en cuanto a la cantidad y calidad de los oocitos activados.

Tanto en *C. musculus* como en *C. laucha* se pudo inducir exitosamente activación partenogenética con ambos estímulos, etanol o cloruro de estroncio. Las tasas de activación obtenidas para ambas especies en comparación con los tratamientos controles reflejan que las tasas de activación no pueden ser atribuidas a manipulación ni a activación espontánea, sino exclusivamente a los tratamientos con los agentes partenogenéticos.

4.a.1. Tasa de activación comparada de oocitos de *C. musculus* y *C. laucha* tratados con etanol en presencia y ausencia de las células del cúmulo

Las tasas de activación más altas se obtuvieron incubando los oocitos durante 5 minutos en ausencia de las células del cúmulo, 95.41% en *C. musculus* (Tabla 11.a) y 93.87% para *C. laucha* (Tabla 11.b).

Estos valores de activación con 5 minutos de incubación en ambas especies son muy similares, y al comparar las tasas de activación obtenidas con 1 y 2 minutos de activación se ve que en general no existen grandes diferencias tampoco entre ambas especies, tanto con como sin cúmulo. Cabe destacar que en *C. musculus* los oocitos incubados en diferentes tiempos mostraron tasas de activación mayores en ausencia de las células del cúmulo que con cúmulo ($p < 0.001$). Por lo contrario los oocitos de *C. laucha* no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de activación (Tabla 11.b) en relación a la presencia o ausencia de células del cúmulo si bien en presencia de las células del cúmulo fueron levemente más bajas.

Los controles de estos experimentos se indican en las Tablas 11. a y b como “C” donde para cada tiempo de incubación el control correspondiente está debajo (C1, C2 y C5) al tratamiento. Una diferencia notable entre ambas especies es la tasa de activación espontánea que mostró ser mayor en *C. musculus* que en *C. laucha*: 11.11-10.67% vs. 4.40-3.07%.

Esta diferencia podría ser explicada teniendo en cuenta que *C. musculus* mostró una mayor tasa de activación espontánea en el oviducto que *C. laucha* al inducir superovulación y esto podría reflejar una mayor susceptibilidad por parte de esta especie a la activación espontánea por manipulación. Si bien es elevada la activación espontánea en *C. musculus*, la activación por el tratamiento con etanol es 85 a 71 veces mayor por lo cual la activación espontánea se vuelve despreciable frente a la obtenida con etanol por 5 minutos.

Tabla 11. a.

Tasa de activación comparada de oocitos de *C. musculus* tratados con etanol en presencia y ausencia de las células del cúmulo

Min	Con células del cúmulo				Sin células del cúmulo			
	N	No activ	Activ	%Activ	N	No activ	Activ	%Act
1	87	37	43	49.42	109	19	69	63.30
C1	25	24	1	4.00	30	30	0	0.00
2	75	34	37	49.33	106	1	79	74.53
C2	28	26	1	3.57	30	29	1	3.45
5	118	12	97	82.23	109	5	104	95.41
C5	45	33	5	11.11	75	67	8	10.67

Abreviaturas: min: tiempo de incubación expresado en minutos; N: número de oocitos tratados, No activ: oocitos tratados que no se activaron; %Activ: oocitos activados expresados como porcentaje sobre el total de los tratados. C1, C2 y C5 representan los controles realizados para cada período de incubación (1, 2 y 5 minutos) respectivamente.

Resumen estadístico (χ^2)

Dentro de tratamientos		Con cúmulo vs. sin cúmulo	
0 min		0.01	P<0.9395
1 min		7.01	P<0.0081
2 min		19.96	P<0.0001
5 min		9.75	P<0.0088

Entre tratamientos	sin cúmulo	con cúmulo
1 min vs. 2 min	16.53 P<0.0001	0.04 P<0.8405
1 min vs. 5 min	24.51 P<0.0001	29.84 P<0.0001
2 min vs. 5 min	1.67 P<0.196	30.73 P<0.0001

Tabla 11. b.

Tasa de activación comparada de oocitos de *C. laucha* tratados con etanol en presencia y ausencia de las células del cúmulo

Min	Con células del cúmulo				Sin células del cúmulo			
	N	No activ	Activ	%Activ	N	No activ	Activ	%Act
1	101	35	66	65.35	104	23	81	77.88
C1	45	43	2	4.44	50	50	0	0.00
2	103	58	45	43.70	103	59	44	42.72
C2	50	50	0	0.00	50	50	0	0.00
5	107	29	78	72.90	98	6	92	93.87
C5	72	69	3	4.17	65	63	2	3.07

Abreviaturas: min: tiempo de incubación expresado en minutos; N: número de oocitos tratados, No activ: oocitos tratados que no se activaron; %Activ: oocitos activados expresados como porcentaje sobre el total de los tratados. C1, C2 y C5 representan los controles realizados para cada período de incubación (1, 2 y 5 minutos) respectivamente.

Resumen estadístico (χ^2)

Dentro de tratamientos	con cúmulo vs. sin cúmulo	
0 min	0.12	p<0.7341
1 min	3.97	p<0.0463
2 min	0.02	p<0.8881
5 min	15.90	p<0.0001

Entre tratamientos	sin cúmulo		con cúmulo	
1 min vs. 2 min	26.75	p<0.0001	9.64	p<0.0463
1 min vs. 5 min	10.50	p<0.0012	1.39	p<0.2383
2 min vs. 5 min	60.07	p<0.0001	18.45	p<0.0001

Los oocitos activados de *C. laucha* nunca mostraron procesos de fragmentación.

En *C. musculus* se observaron algunos casos de fragmentación cuando los oocitos se trataron durante 1 y 2 minutos tanto con y sin cúmulo (10-13%). La fragmentación no se observó en el caso de la activación con 5 minutos que fue el tiempo de incubación que permitió lograr la mejor tasa de activación. Esta observación permite suponer que la incubación por 5 minutos es la óptima, entonces, no sólo por la cantidad de oocitos activados sino por la calidad, ya que no se produciría fragmentación. En las incubaciones más breves, 1 y 2 minutos, estos estímulos por no ser los adecuados producirían activaciones anormales que se reflejarían en las fragmentaciones para el caso de *C. musculus*.

4.a.2. Tasa de activación de oocitos de *C. musculus* y *C. laucha* tratados con cloruro de estroncio

El tratamiento de activación con **cloruro de estroncio**, en *C. musculus* indujo las tasas de activación más altas incubando los oocitos durante 60 (74.28%) y 90 (69.44%) min en ausencia de las células del cúmulo (Tabla 12.a). En *C. laucha* las tasas más altas se obtuvieron cuando los oocitos fueron incubados durante 30 (80.00%) y 60 (88.43%) min sin células del cúmulo (Tabla 12.b). En *C. musculus* la diferencia en las tasas de activación no se vió influenciada por la presencia o ausencia de las células del cúmulo sino únicamente por el tiempo de incubación de los oocitos, y mostró ser creciente a lo largo del mismo. La activación lograda con 30 min de incubación fue significativamente más baja ($p < 0.0001$). Si bien las tasas de activación más altas fueron obtenidas con 60 y 90 min de incubación cabe destacar que durante la incubación con 90 minutos, el 9.72% de los oocitos tratados murieron como resultado de la exposición prolongada. La fragmentación también sufrió un aumento

significativo del 18% con respecto a 30 min, y del 12% con respecto a 60 min. Los oocitos muertos y fragmentados a los 90 min de incubación tomados en forma conjunta representan un 30.55% del total de los oocitos tratados. Esta cifra es demasiado elevada y mereció ser tomada en cuenta como indicador de que este tiempo de incubación es demasiado prolongado para inducir una tasa de activación adecuada. Los controles que se muestran en la Tabla 13.a como "C" fueron agrupados para simplificar la comprensión de los resultados pero fueron realizados en un número de 20 oocitos para cada caso experimental (total N=80 oocitos). Los oocitos que mostraron activación espontánea con cúmulo correspondieron al caso control del tratamiento por 60 min. Estos porcentajes de activación espontánea no son significativos para ninguno de los casos ya que representan un 2.5% en relación al total de los oocitos experimentales sin cúmulo y un 2.00% para aquellos con cúmulo.

Tabla 12.a.

Tasa de activación comparada de oocitos de *C.musculinus* tratados con cloruro de estroncio en presencia y ausencia de las células del cúmulo

Min	Con células del cúmulo				Sin células del cúmulo			
	N	No activ	Activ	%Activ	N	No activ	Activ	%Act
C	80	77	1	2.00	80	73	2	2.50
30	70	50	20	28.57	60	33	22	36.67
45	65	32	25	41.67	80	38	38	47.50
60	80	20	59	73.75	70	16	52	74.28
90	70	19	45	64.28	72	0	50	69.44

Referencias: **min**: tiempo de incubación expresado en minutos; **N**: número de oocitos tratados, **No activ**: oocitos tratados que no se activaron; **%Activ**: oocitos activados expresados como porcentaje sobre el total de los tratados. **C**, representa el control realizado para cada grupo de experimentos.

Resumen estadístico (χ^2)

Dentro de tratamientos	con cúmulo vs. sin cúmulo	
control	NS, 0.03	p<0.8535
30 min	NS, 0.97	p<0.3252
60 min	NS, 0.1	p<0.9405
90 min	NS, 0.43	p<0.4924

Entre tratamientos	con y sin cúmulo	
30 min vs. 60 min	S 18.65	p<0.0001
30 min vs. 90 min	S 18.65	p<0.0001
60 min vs. 90 min	NS 0.41	p<0.5214

Tabla 12.b.

Tasa de activación comparada de oocitos de *C.laucha* tratados con cloruro de estroncio en presencia y ausencia de las células del cúmulo

Min	Con células del cúmulo				Sin células del cúmulo			
	N	No activ	Activ	%Activ	N	No activ	Activ	%Act
C	60	59	1	2.00	60	58	2	3.33
30	80	25	55	68.75	80	16	64	80.00
60	85	21	64	75.30	95	11	84	88.43
90	75	39	36	48.00	74	36	38	51.35

Referencias: **min**: tiempo de incubación expresado en minutos; **N**: número de oocitos tratados, **No activ**: oocitos tratados que no se activaron; **Fragm**: oocitos tratados que se fragmentaron; **%Activ**: oocitos activados expresados como porcentaje sobre el total de los tratados. **C**, representa el control realizado para cada grupo de experimentos.

Resumen estadístico (χ^2)

Dentro de tratamientos	con cúmulo vs. sin cúmulo	
30 min	NS, 2.66	P<0.1032
60 min	NS, 5.29	P<0.0215
90 min	NS, 0.17	P<0.6825

Entre tratamientos	con cúmulo	sin cúmulo
30 min vs. 60 min	NS, 2.36 p<0.1245	NS, 0.88 p<0.3488
60 min vs. 90 min	S, 28.47 p<0.0001	S, 12.66 p<0.0004
30 min vs. 90 min	S, 14.11 p<0.0002	S, 6.88 p<0.0087

En *C. laucha* las tasas más elevadas de activación se observaron a los 30 y a los 60 min de incubación con cloruro de estroncio (Tabla 12.b). Sin embargo, la tasa de activación más baja se registró cuando los oocitos fueron incubados por 90 min sin cúmulo (53%), y con cúmulo (48%). Estas tasas con y sin cúmulo a los 90 min difieren significativamente de las obtenidas con 30 y 60 min ($p < 0.0001$) ya que representan entre un 29-37% menos de activación. Los oocitos de *C. laucha* no mostraron fragmentación ni muerte al ser incubados con cloruro de estroncio para ninguno de los tiempos probados ni aún en los casos de los controles, "C". Los controles que se muestran en la Tabla 12.b fueron agrupados para simplificar la comprensión de los resultados pero fueron realizados en un número de 20 oocitos para cada caso experimental. De este modo cabe mencionar que tanto con cúmulo como sin cúmulo los oocitos que se activaron corresponden al caso control del tratamiento por 60 min. Estos porcentajes de activación espontánea no son significativos para ninguno de los casos ya que representan un 3.33% sin cúmulo y un 2.00% con cúmulo.

Las tasas de activación más elevadas obtenidas con cloruro de estroncio para ambas especies son significativamente menores a aquellas obtenidas con etanol ($p < 0.0001$). La incubación de los oocitos en presencia de cloruro de estroncio por sólo 5 minutos no produjo ninguna alteración ni activación (resultados no mostrados).

4.a.3. Tipo de partenogones obtenidos en oocitos de *C. musculus* y *C. laucha* por incubación con etanol o cloruro de estroncio

En *C. musculus* como en *C. laucha* la activación partenogenética con etanol o con cloruro de estroncio permitió obtener los cuatro tipos de partenogones esperados: haploides (H), de clivaje inmediato (IC), de un pronúcleo (1PN) y de dos pronúcleos (2PN). Sin embargo los predominantes fueron sólo los “H” e “IC”. En la Foto C se muestran las características generales de estos tipos de partenogones a modo ilustrativo donde se evidencian los núcleos con el fluorocromo vital Hoechst 33342.

El tipo de partenogones obtenido no se vió influenciado por la presencia o ausencia de las células del cúmulo ni por el agente partenogenético empleado. El tiempo de incubación con etanol fue el factor más influyente en la frecuencia de aparición de cada partenogón. La influencia de la activación con etanol, con y sin cúmulo, en el tipo de partenogón se ve representada en la Figura 13.a (*C. musculus*) y 13.b (*C. laucha*). Para ambas especies el tipo de partenogón predominante fue el “H”, el “IC” en menor importancia y por último el de “2PN” y muy rara vez el de “1PN”. En *C. musculus* no se encontraron diferencias significativas en los tipos de partenogones formados a partir de oocitos incubados con y sin cúmulo, excepto cuando la incubación fue por 2 min y sólo en lo referente a los embriones de tipo IC (χ^2 15.75 $p < 0.0001$).

Foto C

Tipo de partenogones obtenidos con los agentes partenogénicos, etanol o cloruro de estroncio en *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*.

a- oocito detenido en metafase II

b- clivaje inmediato (IC)

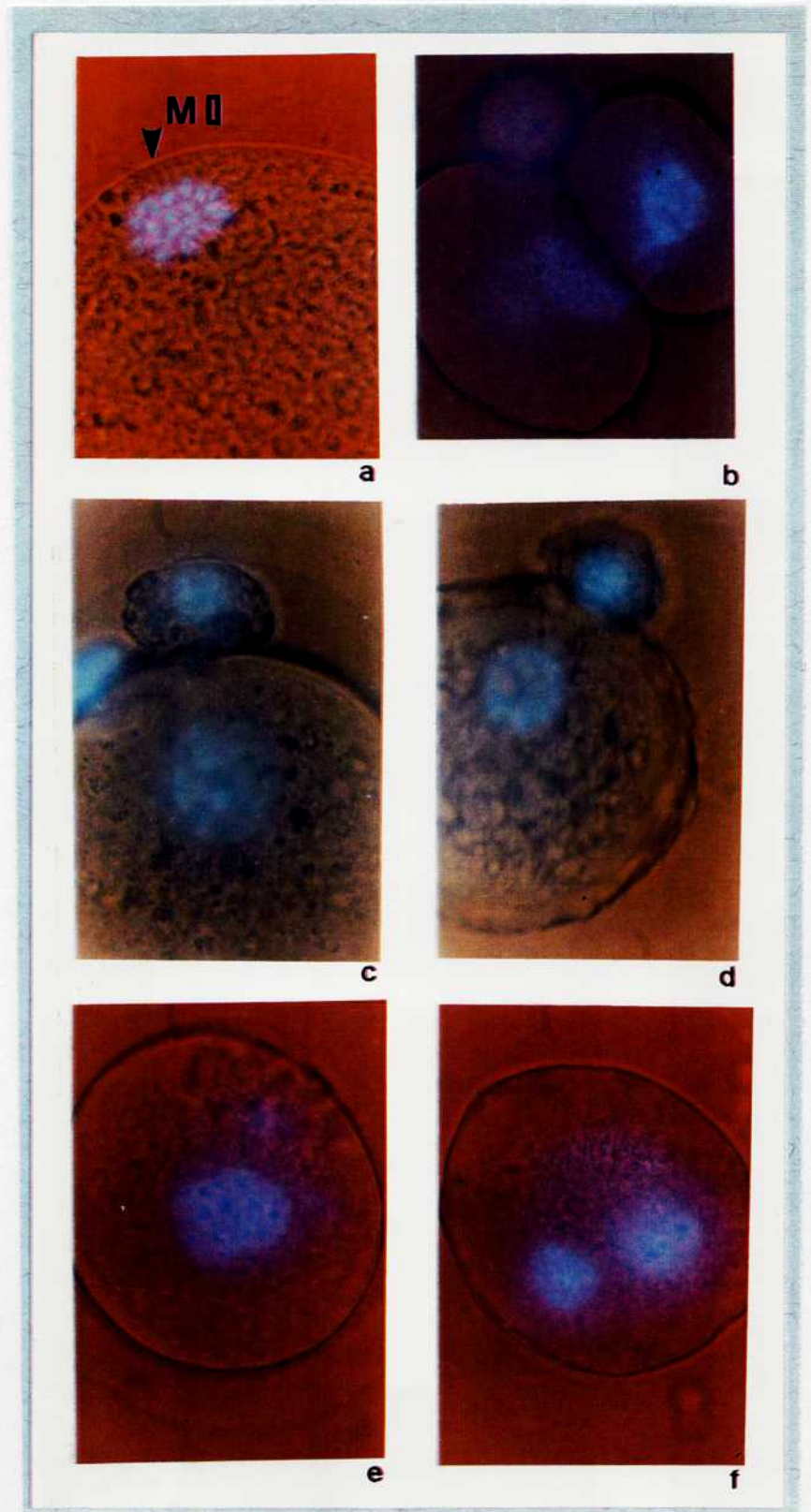
c- embrión haploide (H) con 1°CP y 2°CP extruídos

d- embrión haploide (H) con 2°CP extruído

e- oocito activado con un pronúcleo (1PN)

f- oocito activado con dos pronúcleos (2 PN)

Fotografías tomadas en microscopio óptico con fluorescencia y baja intensidad en campo claro al mismo tiempo. Aumento 1000x

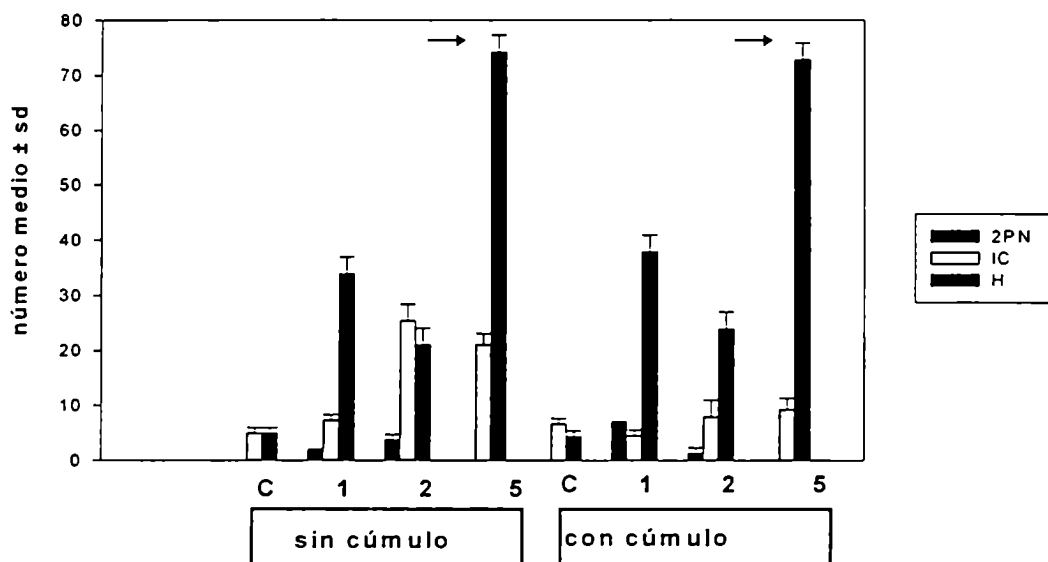


En los casos controles que presentaron activación espontánea los partenogones fueron sólo “H” o “IC”, no hallándose nunca los de “2PN” (Figura 13.a). *C. musculus* mostró más variedad en el tipo de partenogones que *C. laucha*, donde sólo se encontraron partenogones “IC” en la incubación por 5 min y partenogones 2PN con 1 y 5 minutos pero en frecuencias muy bajas con respecto a los “H” (Figura 13.b). En *C. laucha* los embriones de tipo “H” representaron el 90% de los embriones partenogénicos. La calidad de los embriones no se vió afectada para esta especie por la presencia o ausencia de las células del cúmulo excepto en el caso en que la incubación se realizó por 5 minutos para el caso particular de los embriones de tipo “H” donde aquellos incubados con cúmulo fueron un 17% menores a los incubados sin cúmulo (χ^2 , $p < 0.0089$). En *C. laucha* en los casos controles que presentaron activación espontánea los partenogones fueron sólo de tipo “H”, no hallándose “IC” ni “2PN” (Figura 13.b.).

En síntesis, la incubación con etanol durante 5 min es la que permite obtener un mayor número de embriones haploides en ambas especies.

Figura 13.a.

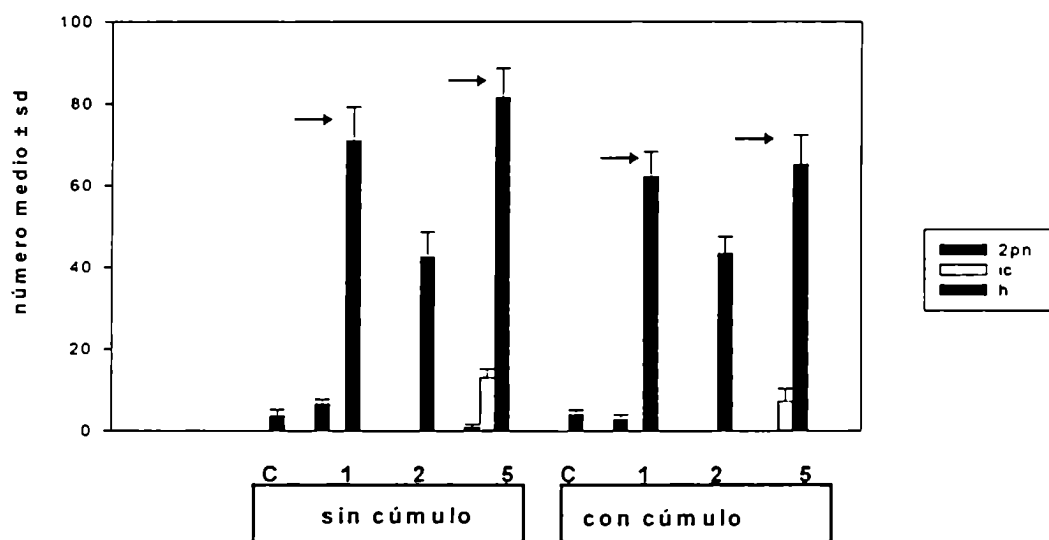
Tipo de partenogénesis obtenidos en *Calomys musculus* por incubación con etanol 7% sin y con células del cúmulo.



→ p<0.0001

Figura 13.b.

Tipo de partenogones obtenidos en *Calomys laucha* por incubación con etanol 7% sin y con células del cúmulo.



→ $p < 0.0001$

4.a.4. Tipo de partenogones obtenidos en *C. musculus* y *C. laucha* activados con cloruro de estroncio

En el tratamiento de activación con cloruro de estroncio, se hallaron los mismos tipos de embriones partenogénéticos al igual que con etanol. En ambas especies el porcentaje de embriones obtenidos no mostró diferencias significativas en cuanto a si fueron o no incubados con las células del cúmulo (Figura 14.a. y b.). Las mayores diferencias estuvieron dadas por el tiempo de incubación. En *C. musculus* los embriones "H" fueron los predominantes ya que representaron el 68.3% de los embriones totales (sin cúmulo) y el 60.6% (con cúmulo) ya que se observaron para todos los tiempos de incubación con y sin cúmulo. Los embriones "IC" también se observaron en todos los tiempos de incubación, 31.1% de los casos sin cúmulo y 36.13% con cúmulo. Los embriones "2PN" sólo se encontraron a los 30 sin cúmulo (6.7%) y con cúmulo (3.22%). Los embriones activados en forma espontánea para estos tratamientos sólo fueron de un tipo: "H" (Figura 14.a). En *C. laucha* la relación entre los embriones "H", "IC" y "2PN" fue diferente. Los embriones "H" fueron predominantes al igual que en *C. musculus* pero en *C. laucha* la relación entre los embriones fue distinta: 80.85% (H), 5.3% (IC), y 13.83% (2PN) sin cúmulo a los 30, 60 y 90 minutos respectivamente. En tanto que con cúmulo el porcentaje de embriones fue de 99.23% (H), 1.28% (IC) y 4.48% a los 30, 60 y 90 minutos respectivamente (Figura 14.b). Tanto en *C. musculus* como en *C. laucha*, los embriones partenogénéticos que se activaron espontáneamente en los casos controles fueron sólo de tipo "H" (Figura 14.b).

En síntesis, en *C. musculus* la relación de importancia entre los embriones fue de mayor a menor H>IC>2PN, en tanto que en *C. laucha* fue H>2PN>IC.

Figura 14.a.

Tipo de partenogones obtenidos en *Calomys musculinus* por incubación con cloruro de estroncio con y sin células del cúmulo.

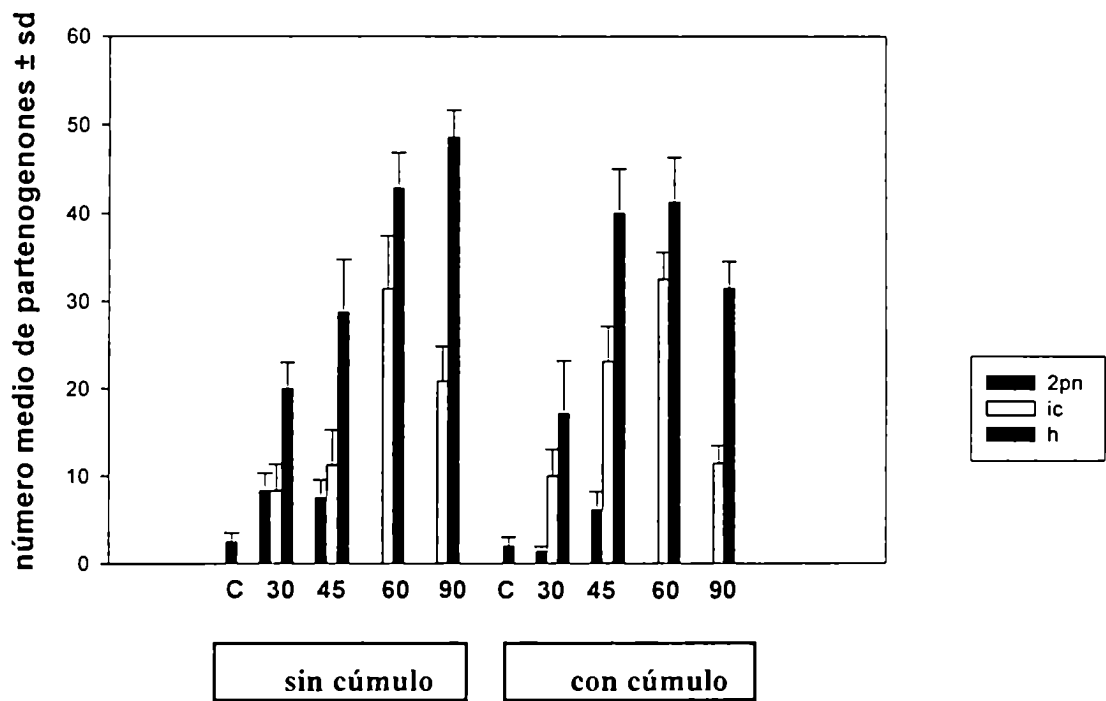
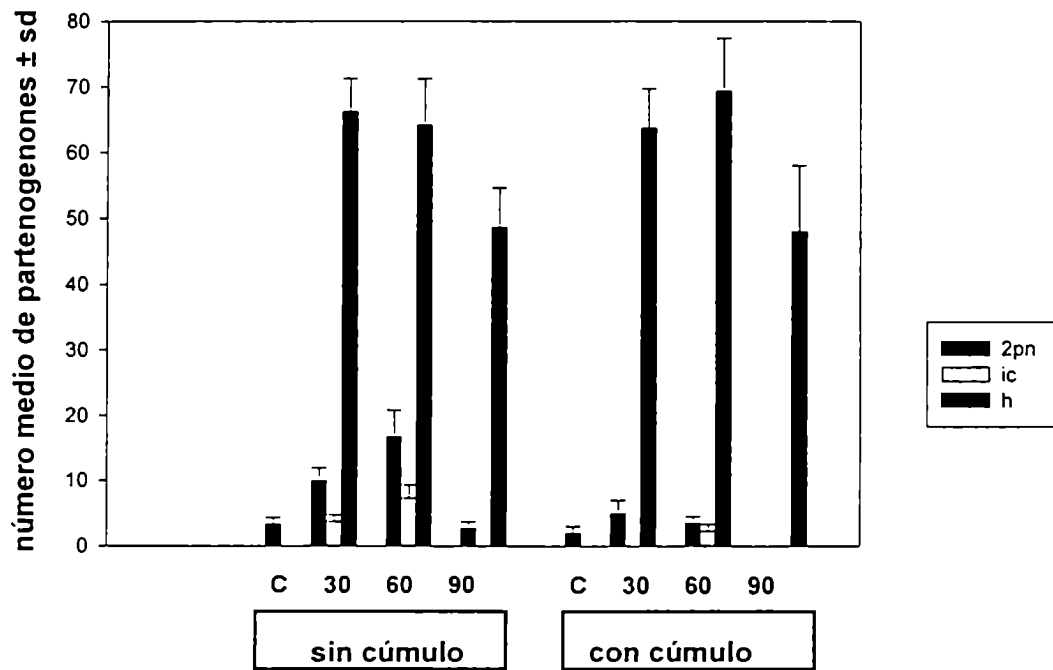


Figura 14.b.

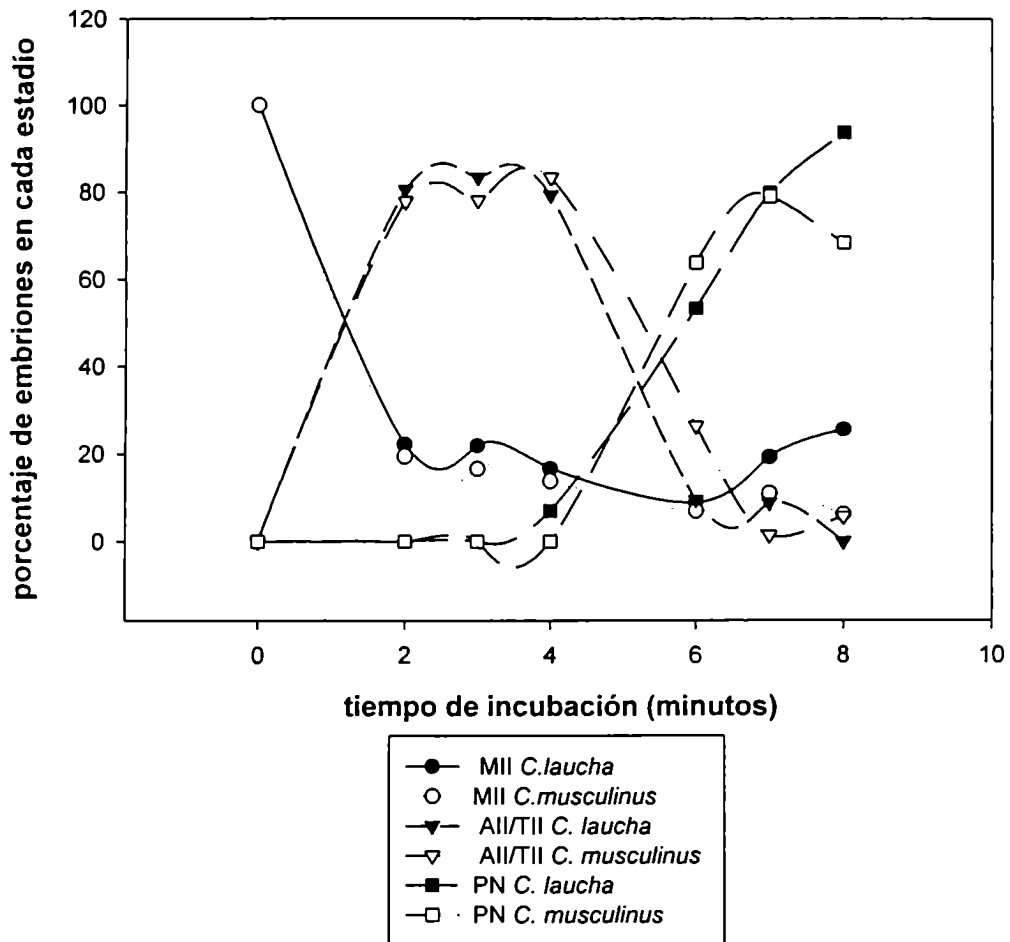
Tipo de partenogones obtenidos en *Calomys laucha* por incubación con cloruro de estroncio con y sin células del cúmulo.



4.b. Dinámica de formación de pronúcleos de embriones partenogénéticos comparada en *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*.

Se monitoreó la dinámica de formación de pronúcleos de los oocitos activados partenogénicamente con etanol para ambas especies. Se observaron 283 oocitos para *C. musculinus* y 219 oocitos para *C. laucha*. Los oocitos activados mostraron un segundo cuerpo polar (2°CP) bien definido y fácil de diferenciar con respecto al 1CP. Ambos cuerpos polares fueron muy rara vez encontrados juntos (Foto F). La progresión nuclear estudiada durante un período de 8 horas (posterior al evento de activación) se muestra en detalle en la Figura 17. Los eventos fueron categorizados como sigue: Metafase II (MII), Anafase II-Telofase II (AII/TII), 1 Pronúcleo (1PN), 2 pronúcleos (2PN). Tanto en *C. musculinus* como en *C. laucha* la dinámica de formación de pronúcleos fue similar y no se encontraron diferencias estadísticamente representativas al comparar su desarrollo. En ambas especies la respuesta al tratamiento de activación comenzó alrededor de las 2-2.5 hr post-activación con etanol, por lo que se fijó ese horario para iniciar las observaciones. Alrededor de las 4 hs la estructura nuclear dominante fue AII/TII. Por lo menos un 85.94% (*C. musculinus*) y 65.71% (*C. laucha*) de los oocitos activados contenían un pronúcleo(1PN) y nucléolos alrededor de las 8 hs post-activación mientras que sólo un 7.81% (*C. musculinus*) y 3% (*C. laucha*) formó dos pronúcleos. En este último caso, el 2CP no pudo ser identificado.

Figura 17
Dinámica de formación de pronúcleos vs. tiempo post-activación
en ovocitos de *C. musculus* y *C. laucha* activados con etanol.



4.c. Desarrollo preimplantativo *in vitro* de los embriones partenogénéticos haploides: “H”, “IC” y “2PN” de *C. musculus* y *C. laucha* por inducción de la activación con etanol o cloruro de estroncio

4.c.1. Influencia del etanol en el desarrollo preimplantativo

Los embriones partenogénéticos obtenidos por activación con etanol o cloruro de estroncio de *C. musculus* y *C. laucha* fueron incubados para analizar su capacidad de desarrollo preimplantativo *in vitro*.

Los embriones partenogénéticos activados con etanol de *C. musculus* no progresaron más allá del estadio de 4 células indistintamente de haberse incubado en presencia o ausencia de las células del cúmulo (Tabla 15.a). La capacidad de los embriones para desarrollarse hasta el estadio de 4 células estuvo dada por el tiempo de incubación (activación) con etanol. En el caso en que estos fueron incubados por 1 minuto sólo progresaron hasta 4 células en un 23.81% de los casos, en tanto que con 2 y 5 minutos de incubación lo hicieron en un 53-50% sin cúmulo y 50-45% con cúmulo. Notese que aquellos que progresaron hasta el estadio de 4 células fueron los de tipo “IC” (haploides). Los embriones partenogénéticos activados con etanol en *C. laucha* mostraron progresión hasta el estadio de 8 células sólo en el caso de los embriones “IC” en ausencia de las células del cúmulo (15%) y sólo en el caso en que fueron activados durante 5 minutos (Tabla 15.b). Los embriones “H”, si bien clivaron a 2 células, no progresaron más allá con o sin células del cúmulo y excepto para el caso de 2 minutos de incubación no hubo diferencias significativas entre los casos incubados con o sin células del cúmulo.

Tabla 15

Desarrollo preimplantativo *in vitro* de partenogones activados con etanol

a. *Calomys musculus*

min	part	sin cúmulo			con cúmulo		
		N	2 cell (%)	4 cell (%)	N	2 cell (%)	4 cell (%)
1	H	25	9 (36)	0	40	15 (37.50)	0
	IC	21		5 (23.81)	4		1 (25.00)
2	H	30	14 (46.67)	0	18	10 (55.56)	0
	IC	15		8 (53.33)	6		3 (50.00)
5	H	56	18 (32.14)	0	50	14 (28.00)	0
	IC	10	-	5 (50.00)	11	-	5 (45.45)

b. *Calomys laucha*

min	part	sin cúmulo				con cúmulo		
		N	2 cell (%)	4 cell (%)	8 cell(%)	N	2 cell (%)	4 cell (%)
1	H	74	26 (35.1)	0	0	68	19 (27.9)	0
2	H	44	8 (18.2)	0	0	50	22 (44.0)	0
5	H	80	20 (25.0)	0	0	75	18 (24.3)	0
	IC	13		2 (15.3)	2 (15.3)	15		4 (26.7)

Referencias: min: tiempo de incubación en minutos, part: tipo de partenogón "IC"o "H", 2 cell-8 cell representa el estadio de división celular desde 2 células hasta 8 células

En síntesis, el desarrollo preimplantativo *in vitro* de partenogones haploides obtenidos por incubación con etanol fue muy diferente al comparar las dos especies. En *C. musculinus* hubo partenogones de tipo “H” e “IC” para todos los tiempos de incubación y los únicos que clivaron hasta 4 células fueron los “IC”. En *C. laucha* los embriones predominantes fueron los de tipo “H” y sólo se desarrollaron *in vitro* los “IC” cuando se incubaron con etanol por 5 min y fueron éstos últimos los únicos que alcanzaron un desarrollo máximo de 8 células (Tabla 15 a. y b.)

4.c.2. Influencia del cloruro de estroncio en el desarrollo preimplantativo

Los embriones partenogenéticos activados con cloruro de estroncio de *C. musculinus* como de *C. laucha* no progresaron *in vitro* cuando se incubaron por 30 y 45 minutos. La capacidad de los embriones para llegar hasta el estadio de blastocisto estuvo dada por el tiempo de incubación (activación) con cloruro de estroncio (Tabla 16.a y 16.b) . En el caso de *C. musculinus* con o sin células del cúmulo, los resultados fueron similares y no se encontraron diferencias significativas en función de esta variable. En el caso en que estos fueron incubados por 60 minutos se encontró un 13.3-15.1% de embriones de tipo “H” (sin y con cúmulo respectivamente) y un 9.1-11.5% de embriones de tipo “IC” que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto temprano (Tabla 16.a). En el caso de *C. laucha*, al igual que en *C. musculinus*, tampoco se encontraron diferencias en los resultados de desarrollo *in vitro* en relación a la presencia o ausencia de las células del cúmulo (Tabla 16.b). Sólo se obtuvo desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto cuando los embriones se incubaron por 60

minutos y en los tipo "1C": 33.3% (sin cúmulo) y 36.5% (con cúmulo). Cabe observar que todos estos embriones aún siendo haploides

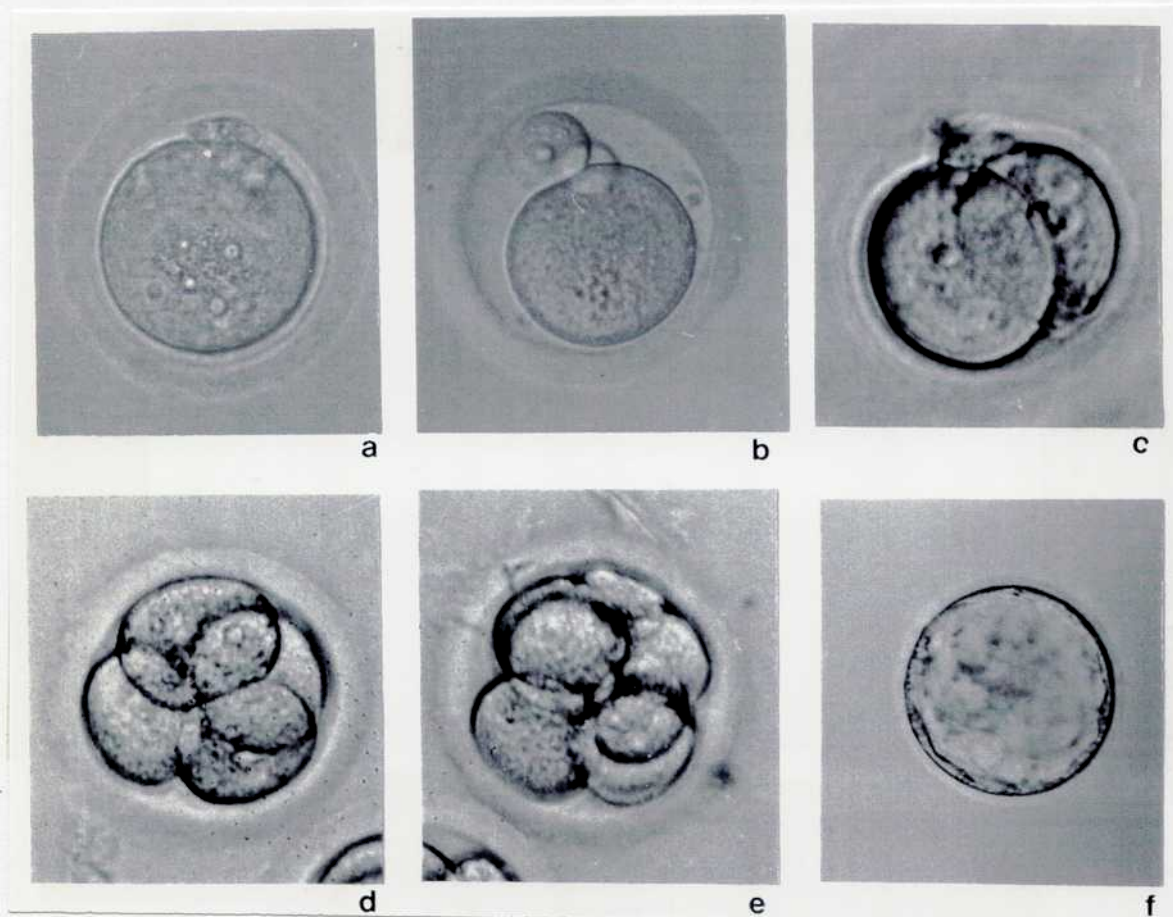
Tabla 16.a.

Desarrollo preimplantativo *in vitro* de partenogones de *Calomys musculus* activados con cloruro de estroncio

min		sin cúmulo					con cúmulo				
		N	2 cell (%)	4 cell (%)	M (%)	B (%)	N	2 cell (%)	4 cell (%)	M (%)	B (%)
60	H	30	24 (80)	20 (66.7)	18 (60.0)	4 (13.3)	33	28 (84.8)	21 (63.6)	19 (57.6)	5 (15.1)
	IC	22		18 (81.8)	12 (54.5)	2 (9.1)	26		15 (57.7)	14 (53.8)	3 (11.5)
90	H	30	0	0	0	0	22	2 (9.09)	0	0	0
	IC	15		4 (26.7)	2 (13.3)		8		4 (50.0)	1 (12.5)	0

Los casos de 30 min con Sr²⁺ no se detallan porque no se desarrollaron *in vitro*.
Referencias: cell: células, M: mórula y B: blastocistos

FOTO D
Desarrollo preimplantativo *in vitro* de embriones partenogénicos
de *Calomys musculinus*



La Fotografía muestra una secuencia del proceso de desarrollo preimplantativo de embriones de *C. musculinus* tomadas en microscopio invertido con contraste de fase. **a-** oocito activados de una célula, **b-** embrión partenogénico de 2 células, **c-** embrión de 4 células, **d-** embrión de 8 células, **f-** embrión en estadio de blastocisto

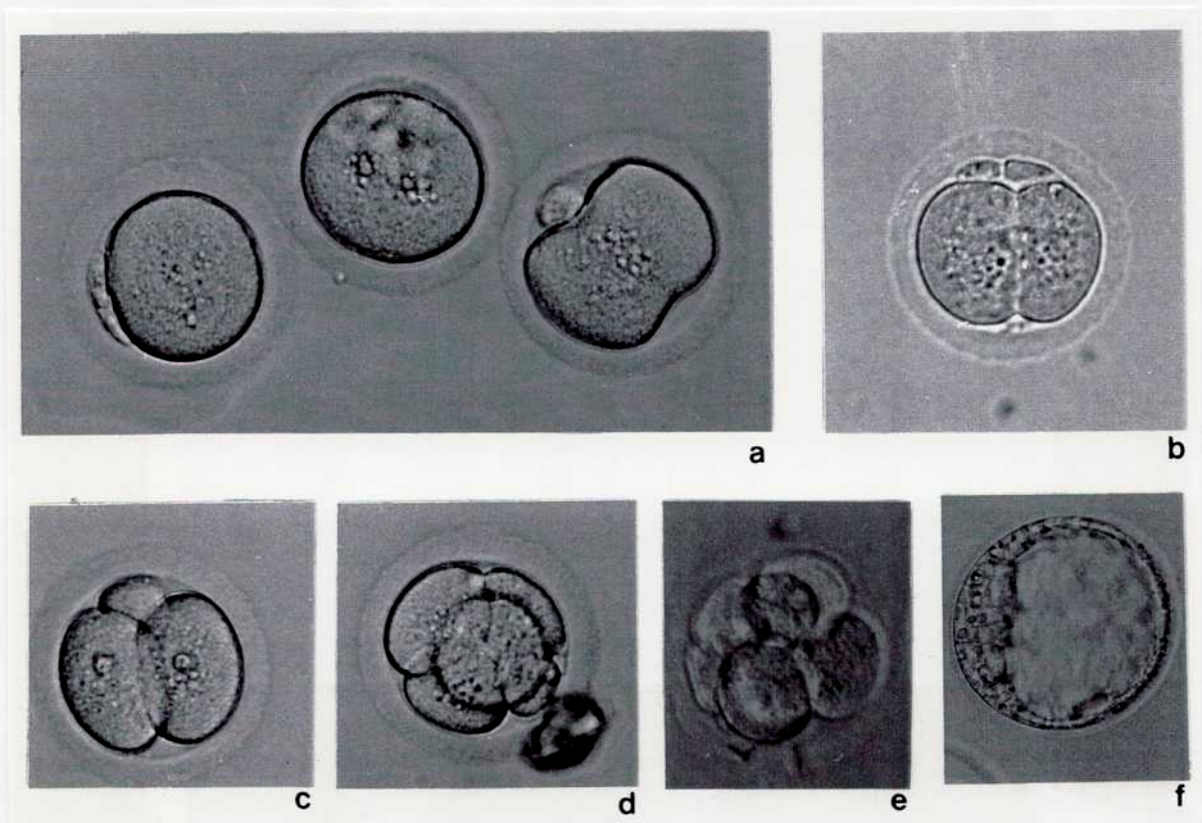
Tabla 16.b.

Desarrollo preimplantativo *in vitro* de partenogonones de *Calomys laucha*
activados con cloruro de estroncio

min		N	sin cúmulo				con cúmulo				
			2 cell (%)	4 cell (%)	M (%)	B (%)	N	2 cell (%)	4 cell (%)	M (%)	B (%)
60	H	30	28 (93.3)	6 (20.0)	0	0	27	17 (62.9)	0	0	0
	IC	24		24 (100)	16 (66.7)	8 (33.3)	22		18 (81.8)	11 (50.0)	8 (36.4)
90	H	28	24 (85.7)	0	0	0	25	21 (84.0)	0	0	0
	IC	14		10 (71.4)	3 (21.4)	0	16		7 (43.8)	0	0

Los casos de 30 min con Sr²⁺ no se detallan porque no se desarrollaron *in vitro*.
Referencias: cell: células, M: mórula y B: blastocistos

FOTO E
**Desarrollo preimplantativo *in vitro* de embriones partenogenéticos
de *Calomys laucha***



La Fotografía muestra una secuencia del proceso de desarrollo preimplantativo de embriones de *C. laucha* tomadas en microscopio invertido con contraste de fase: **a**-oocitos activados de una célula en proceso de división, **b**-embrión partenogenético en la fase inicial de división a 2 células, **c**-embrión de 2 células, **d**- embrión de 4 células, **e**-embrión de 8 células, **f**-embrión en estadio de blastocisto.

podieron progresar *in vitro* hasta el estadio de blastocisto cuando se incubaron por 60 minutos con cloruro de estroncio.

Brevemente, tanto en *C. musculus* como en *C. laucha*, oocitos maduros incubados convenientemente con etanol o cloruro de estroncio pudieron ser activados partenogénicamente *in vitro*. Ambos agentes partenogénicos indujeron la formación de los mismos tipos de embriones H, IC, 2PN, y 1PN (en orden de mayor a menor importancia) en ambas especies. El etanol permitió obtener tasas de activación más elevadas en tanto que el cloruro de estroncio permitió obtener un mejor desarrollo preimplantativo *in vitro*. Aquellos oocitos incubados con cloruro de estroncio y activados partenogénicamente pudieron desarrollarse hasta el estadio de blastocisto temprano. Los porcentajes de activación y su posterior desarrollo *in vitro* variaron en relación a la especie y al tiempo de incubación con cada agente. Por otra parte no mostraron relación con la presencia o ausencia de las células del cúmulo durante el período de incubación. El análisis de la dinámica de formación de pronúcleos en ambas especies mostró que esta comienza entre las 2-2.5 hs post-activación y a partir de las 6 horas ya se encontraron pronúcleos formados.

4.d. **Discusión y conclusiones parciales: Activación partenogenética de oocitos de *Calomys musculus* y *Calomys laucha*: embriones, su desarrollo y dinámica de formación nuclear *in vitro***

La partenogénesis es una herramienta excelente para profundizar en el estudio de la cinética de la activación del oocito (Powell y Barnes, 1992; Schultz, 1995), el reinicio de la segunda metafase meiótica y la extrusión del segundo cuerpo polar (Zernicka-Goetz, 1993; Polanski, 1995) y los requerimientos genómicos de los embriones para el desarrollo preimplantativo (Surani et al., 1990; Kaaufman, Sturm, 1994; Penkov, 1995; Ottoi, 1996).

La partenogénesis experimental ha sido estudiada en profundidad en el ratón de laboratorio, *Mus musculus* (Bender, 1995; Colledge et al., 1994, Croteau et al., 1995; Henery and Kaufman, 1992 a y b, 1993 a y b; Cuthbertson, 1983) ; *rata* (Ben-Yosef, 1995, Bos-Mikich et al, 1995 a y b;), *conejo* (Yang et al., 1992; Ozil, 1992; Fissore et al., 1992), *hamster* (Kaufman, 1983) y **animales de interés zootécnico** (Mayes et al, 1995; Laurincik et al., 1994; Presicce et al., 1994; Collas et al., 1993; Fukui et al., 1992 Didion, 1990; Kono et al, 1989; King et al., 1988).

Es difícil poder establecer comparaciones entre los resultados obtenidos en *Calomys* y modelos convencionales ya que no existe uniformidad de criterios en cuanto a los horarios de recolección de los oocitos, la concentración y el tiempo de incubación en etanol, y los medios de cultivo empleados. Todas estas son variables que pueden influir en la respuesta de los oocitos y el tipo de partenogénesis obtenidos y su posterior desarrollo *in vitro*.

En el presente estudio, los agentes partenogénicos testados, etanol y cloruro de estroncio indujeron en oocitos maduros de *C. musculus* y *C. laucha* la extrusión del segundo cuerpo polar y este evento fue completado en menos de 2.5 horas. Las observaciones en este tiempo de activación mostraron que los cromosomas permanecían agrupados en el vitelo donde generalmente estaban compactados en una masa densa.

Se observaron en algunos casos para las dos especies pequeños fragmentos citoplasmáticos que fueron extruídos al espacio perivitelino. Estos fragmentos son probablemente extruídos durante el primer clivaje. Witkowska (1973) indicó que su presencia podría reflejar una reacción cortical anormal en estos embriones. Aún si los gránulos corticales no estuvieran implicados directamente, la presencia de estas fragmentaciones perivitelinas está reflejando un incremento en el grado de inestabilidad de la membrana plasmática del oocito, o un daño de los elementos del citoesqueleto asociados con la membrana celular inducidos en el momento de la activación o inmediatamente después.

La observación de fragmentaciones fue poco frecuente en *C. laucha* en tanto que en *C. musculus* las fragmentaciones se hicieron más frecuentes y especialmente en el caso de la activación con cloruro de estroncio.

De la comparación de los resultados de *C. laucha* y *C. musculus* con algunos de los protocolos más representativos de la literatura surge claramente que tanto *C. musculus* como *C. laucha* son modelos en los que se puede inducir fácilmente la activación *in vitro* tanto con etanol (Cuadro comparativo # 2) como con cloruro de estroncio (Cuadro comparativo #3).

Las tasas de activación de *Calomys* son más elevadas que las obtenidas en las distintas cepas de *Mus* aún siendo que los oocitos de *Calomys* se recolectan entre 2-6 hs más temprano que los últimos. La recolección tardía de los oocitos los vuelve más vulnerables a la activación (Kaufman, 1987) y no puede discernirse entre el efecto del agente partenogénico y la degeneración por envejecimiento en el oviducto. Los tiempos de incubación óptimos con etanol 7% fueron de 5 minutos para *C. musculus* y *C. laucha* sin cúmulo. Los resultados obtenidos en *C. musculus* y *C. laucha* están en contradicción con los de Marcus (1990) quien reportó en la cepa de ratón TRF que las células del cúmulo influenciarían la susceptibilidad de los oocitos a la activación, pero están en coincidencia con aquellos de Pinyopummin et al (1994) donde oocitos de los híbridos F1 (C57J/CBA) presentaron resultados de activación similares con y sin cúmulo (Pinyopummin et al., 1994). Estas diferencias podrían explicarse si se tiene en cuenta que las células del cúmulo fueron removidas inmediatamente antes de la incubación con etanol y que esta fue muy breve. En cambio no podría explicarse del mismo modo para la activación con cloruro de estroncio donde los resultados también fueron menores en presencia de las células del cúmulo pero los tiempos de activación fueron más largos.

En el caso del cloruro de estroncio los resultados fueron más controvertidos al comparar con otros autores. Por ejemplo aún empleando protocolos similares, 1.6mM de $M16+Sr^{2+}$ durante 60 min, las tasas de activación fueron 86.3% (TRF) y 42.2% (ICR) (Marcus et al., 1990), y 13% (C57) (O'Neill et al., 1991). Ozil et al., (1992) obtuvo valores de activación elevados (87%) sólo incrementando el horario de recolección de los oocitos, con la cepa de ratón B6C. La manipulación *in vitro* de oocitos puede resultar en una alta tasa de activación espontánea (Kaufman, 1973;

Cuadro comparativo #2
Tasas de activación por incubación con etanol en oocitos de
***Calomys musculus* (Cm), *Calomys laucha* (Cl) y otros roedores**

Autor	año	cepa/ especie	hs post- hCG	% etanol	min etanol	sin cumulo %	con cúmulo %
Cuthbertson	1983	C57	18	8.6	1	57.9	
	1983	C57	18	8.6	2	91.9	
	1983	C57	18	8.6	5	74.9	
Onodera	1989	CD-1	16-17	7	5	81	
Marcus	1990	TRF	20-22	7	5	15	55
Didion	1990	FVB	?	7	5	22	
Shiina	1993	B6C3	?	7	1	>65	
					2-5	>45	
Lasserre	1997	Cm	14-15	7	1	63.3	49.42
				7	2	74.53	49.33
				7	5	95.41	82.23
		Clau	14-15	7	1	65.35	77.88
				7	2	43.70	42.72
				7	5	72.90	93.87

Keefe y Schultz, 1982; Zernicka-Goetz, 1991; Yanagimachi, 1994). En *C. musculus* la tasa de activación espontánea fue más alta que en *C. laucha* pero no fue significativa en ninguno de los casos frente a las tasas de activación obtenidas con los estímulos partenogenéticos. La activación con etanol y con cloruro de estroncio ha favorecido más un tipo de partenogones que otro. El más frecuente fue el tipo Haploide. Este fenómeno también ocurre con otros tipos de estímulos (Kaufman, 1983), pero el etanol permite obtener resultados más reproducibles que el resto de los agentes partenogenéticos (Kaufman, 1983; Webb, 1986). El etanol podría inducir aneuploidías como resultado de la no-disyunción que podría involucrar cualquier cromosoma (Kaufman, 1982 y 1983). La formación del segundo cuerpo polar (Webb, 1986) no está relacionada con la presencia o no de aneuploidías, ya que los oocitos activados son capaces de formar el cuerpo polar independientemente de este hecho. En *C. musculus* y *C. laucha* se han visto en algunos casos aislados que las metafases presentaban algunos pequeños defectos que han sido descritos (Pinto-Correia, 1993) como posibles fragmentos de cromatina o posibles cromosomas enteros que podrían haberse separado de la placa metafásica.

La capacidad para extruir el segundo cuerpo polar y desarrollar pronúcleos indica que el estímulo de activación no interfiere significativamente en la reorganización de los elementos del citoesqueleto durante la segunda división meiótica (Kaufman, 1983). Los oocitos de ambas especies fueron capaces de activarse y extruir el segundo cuerpo polar iniciando el primer ciclo celular, clivar y progresar *in vitro* aún en estado haploide hasta el estadio de blastocisto. Estas pequeñas fallas han sido correlacionadas en el conejo con el efecto a largo plazo en la supervivencia de los embriones.

Cuadro Comparativo #3
Tasas de activación con cloruro de estroncio en oocitos de
***Calomys musculus* (Cm), *Calomys laucha* (Cl) y otros roedores**

Autor	año	cepa/ especie	hs post- hCG	Sr ²⁺ mM	min Sr ²⁺	sin cúmulo %	con cúmulo %
Marcus	1990	TRF	20-22	1.6	15	82	
					60	86.3	
		ICR	20-22	1.6	15	12.2	
					60	42.2	
O'Neill	1991	C57	18	1.6	30	21.2	
					60	13.5	
Kline	1992	Swiss	13-14	4.6	30-40	42	
					9.2	30-40	88
Ozil	1993	B6C	13	1.6	90	53	
			15	1.6	90	87	
Otaegui	1993	?	10	5	30	1.0	
			10	5	60	1.0	
			14	5	30	22.0	
			14	5	60	52.0	
			18	5	60	85	
			18	5	30	88.0	
Lasserre	1997	Cm	14-15	1.6	30	36.67	28.57
			√	√	45	47.50	41.67
			√	√	60	74.28	73.75
			√	√	90	69.44	64.28
Lasserre	1997	Cl	14-15	1.6	30	80.00	68.75
			√	√	60	88.43	75.30
			√	√	90	51.35	48.00

Esto podría explicar por qué los embriones que han llegado hasta el estadio de blastocisto no han podido hacer hatching (Pinto-Correia, 1993).

Algunos embriones partenogénéticos haploides en el estadio de mórula que inicialmente parecen compactos sufrieron luego una fase de decompactación antes de progresar normalmente hasta blastocisto. Este proceso, que fue descrito previamente por Kaufman (1991), puede ser también la causa de que muchos embriones que llegaron hasta el estadio de mórula luego de decompactarse fallen en la recompactación para formar luego el blastocisto. Esta “decompactación” parece ser una característica de algunos embriones haploides y no parece ocurrir en los embriones diploides de origen partenogénético ni en los fecundados normalmente (Kaufman, 1991).

El análisis de la dinámica nuclear de partenogénones activados con etanol en *C. musculinus* y *C. laucha* mostró que la progresión del desarrollo de pronúcleos es similar a la encontrada en otros modelos de roedores (Kaufman, 1983; Zoernicka-Goetz, 1992). Los oocitos de *Calomys* al igual que la mayoría de los mamíferos se ovulan detenidos en Metafase II (MII) y permanecen detenidos en este estadio hasta que son estimulados (por el espermatozoide o por un estímulo partenogénético) a reiniciar la meiosis. Se ha hipotetizado que los oocitos maduros sintetizan constantemente un grupo de proteínas, el factor citostático (CSF) o la proteína del gen *c-mos* entre ellas, que ejercerían la función de mantener los oocitos detenidos en MII. El espermatozoide fecundante inicia normalmente numerosas y periódicas oscilaciones de calcio en el oocito que durarán varias horas dependiendo de las especies (Cuthbertson et al., 1981; Miyazaki, 1990; Kline and Kline, 1992; Fisore and Robl, 1992; Schultz, 1995). Se cree que la función de estas oscilaciones de Ca^{2+} es la

de destruir el CSF existente e impedir su síntesis de novo (Masui et al., 1984; Parrish et al., 1992) lo que reanudaría la meiosis. En contraste con el efecto del espermatozoide el etanol induce un único incremento de Ca^{2+} que podría destruir el CSF existente pero tal vez no podría impedir totalmente la síntesis de novo (Cuthbertson et al., 1981; Fissore and Robl, 1992). Esta podría ser la causa por la cual no todos los oocitos se activan.

El desarrollo de los eventos nucleares y la progresión desde un estadio hacia el otro procedió al igual que en los modelos convencionales. Los oocitos de ambas especies reiniciaron la meiosis haciéndose visible la extrusión del 2ºCP entre 2-2.5 horas post estímulo. A las 6 horas la mayoría de los oocitos mostraron signos de estar formando los pronúcleos que estaban claramente diferenciados a las 8 horas.

Hasta el momento, ninguna de las técnicas, *in vivo* o *in vitro*, de activación permite obtener un partenogén a término a partir de un oocito de mamífero debido a que para el desarrollo a término es necesaria la presencia de ambos genomas, materno y paterno (Surani y Barton, 1984). La falla del desarrollo es muy diferente dependiendo del origen del genoma faltante. La presencia del genoma paterno resulta esencial desde el inicio del desarrollo y el genoma materno parece estar más implicado que el paterno en el desarrollo preimplantativo (Surani y Barton, 1984). La funcionalidad diferencial de ambos genomas no implica exclusión mutua sino que por el contrario ambos se complementan funcionalmente para permitir el desarrollo integral del embrión y sus anexos. El rol diferencial y complementario de la información genética aportada por el macho y la hembra se conoce como impronta genómica ("imprinting"). El imprinting "asegura" que las especies de desarrollo vivíparo no puedan recurrir a la partenogénesis como recurso reproductivo alternativo. Si bien el

marco teórico de la impronta genómica se ha ampliado de manera importante en los últimos años, muy poca es la evidencia experimental que permita poner a prueba muchas de las hipótesis sugeridas.

La partenogénesis provee a tal respecto una excelente herramienta experimental para aproximarse al estudio evolutivo de la plasticidad del genoma materno para dirigir el desarrollo.

Estos primeros estudios realizados en la activación y la conducción del desarrollo preimplantativo en *C. musculus* y *C. laucha*, no sólo brindan nuevos conocimientos sobre la embiogénesis temprana de estas especies, sino que permiten avanzar en la posibilidad de analizar en un futuro mediato la capacidad de desarrollo partenogenético en grupos de especies estrechamente emparentadas que permitan profundizar sobre el significado evolutivo de la impronta genómica, su función en el aislamiento reproductivo y la separación de especies.

El género de roedores *Calomys* constituye un modelo animal particularmente adecuado para estudios de activación partenogenética comparada dado que se dispone de un modelo de evolución cromosómica del género que permite interrelacionar las diferentes especies reconocidas a través de reordenamientos cromosómicos por mecanismos de transformación robertsoniana. Este tipo de reordenamiento ha generado la modificación progresiva del número diploide desde 64 hasta 36 cromosomas mediante 17 fusiones robertsonianas. Dentro de este camino básico de reordenamiento del genoma es factible ubicar las 9 especies del género y establecer las relaciones de parentesco cromosómico entre sí y con el cariotipo ancestral hipotético (Vitullo et al., 1990). Esto permite disponer, en el género, de un mismo

genoma que ha sufrido una transformación progresiva y generado la separación de diferentes especies plenas.

La capacidad de los oocitos de *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* para ser activados por el etanol y el cloruro de estroncio y su capacidad para conducir el desarrollo preimplantativo aún en estado haploide, permite concluir que estas especies constituyen un modelo óptimo para el estudio de la partenogénesis en mamíferos, disponiendo además de especies filogenéticamente emparentadas lo que constituye una oportunidad única para el estudio de la biología del desarrollo.

Capítulo 5

**Interacciones homólogas y heterólogas de las gametas de
Calomys musculinus, *Calomys laucha*, y otros roedores**

5. Interacción entre gametas homólogas y heterólogas de *Calomys musculinus*, *Calomys laucha*, y otros roedores

Para poder analizar las interacciones entre gametas se deben conocer las particularidades de las gametas femenina y masculina en detalle. Las gametas femeninas de *C. musculinus* y *C. laucha*, fueron caracterizadas en los capítulos 3 y 4 . Las características biológicas de las gametas masculinas debieron ser estudiadas. En una primera etapa se analizaron los parámetros de motilidad, capacitación, reacción acrosomal e hiperactivación de *C. musculinus* y *C. laucha*. Dichos estudios se abordaron en una primera etapa y su realización fue necesaria antes de llevar a cabo las fecundaciones homólogas y heterólogas.

5.a. Estudio de la capacitación espermática, reacción acrosomal, hiperactivación y motilidad *in vitro* en medios TALP y T6 de espermatozoides de *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*

5.a.1. Motilidad

Los resultados obtenidos mostraron que los espermatozoides de *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* tienen una motilidad muy elevada. En las Figuras 18.a. y 18.b. y 19.a. y 19.b. se muestran los porcentajes de la motilidad de los espermatozoides de ambas especies en los diferentes medios de cultivo ensayados en función de la concentración y del tiempo de incubación. Los resultados se expresaron como promedios de los porcentajes parciales obtenidos de 10 experimentos (10 machos adultos) que fueron testeados estadísticamente usando Anova de dos factores ($F > 9$ fue considerado significativo, con $p < 0.005$). Los resultados mostraron que para ambas

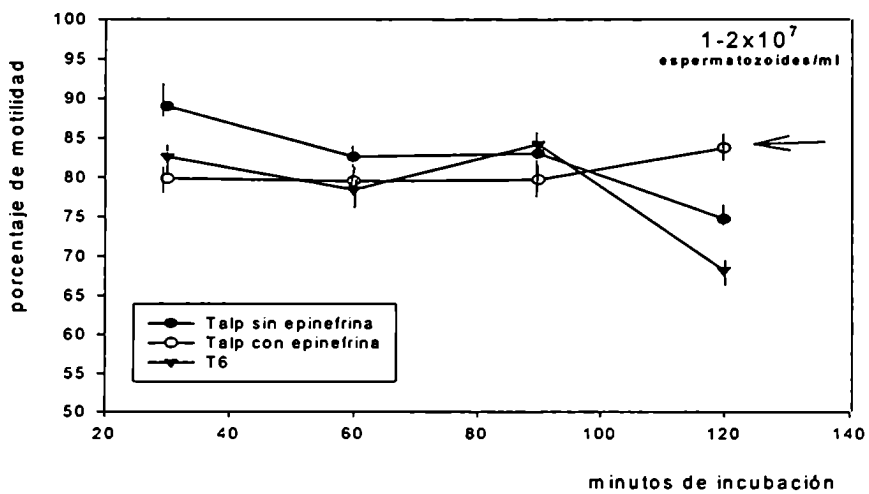
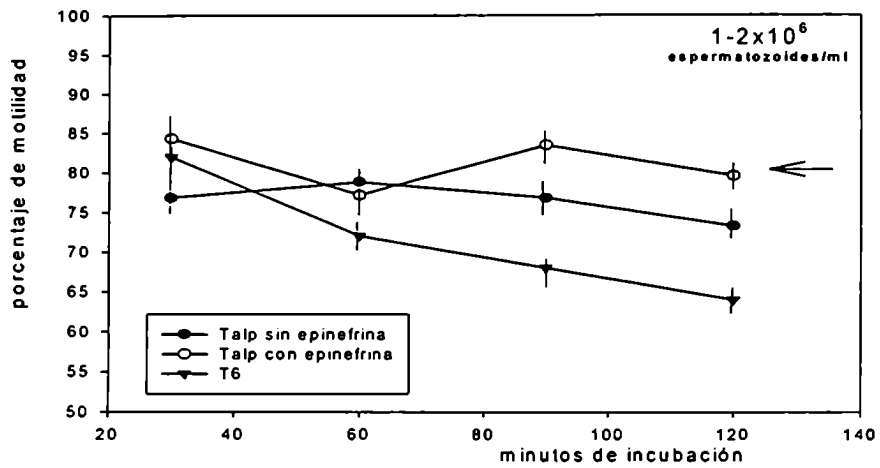
especies la motilidad no se modifica de modo significativo a lo largo del tiempo comparando las concentraciones $1-2 \times 10^6$ y $1-2 \times 10^7$ espermatozoides/ml.

La motilidad se vio afectada según si el medio fuera T6, Talp sin epinefrina o Talp con epinefrina. Se vió reflejado a lo largo del tiempo de incubación en que la motilidad disminuyó al incubarse los espermatozoides con T6. Cuando los espermatozoides se incubaron con TALP, la motilidad se mantuvo de modo constante a lo largo del tiempo con ambas concentraciones. En el caso en que la epinefrina se encontró presente, los valores de motilidad fueron mejores que sin epinefrina.

En resumen, los espermatozoides de *Calomys musculus* y *Calomys laucha* presentaron altas tasas de motilidad que pudieron mejorarse aún más en función del tipo de medio de cultivo donde estos se incubaron. El medio de incubación óptimo para ambas especies resultó ser el Talp con epinefrina.

Figura 18

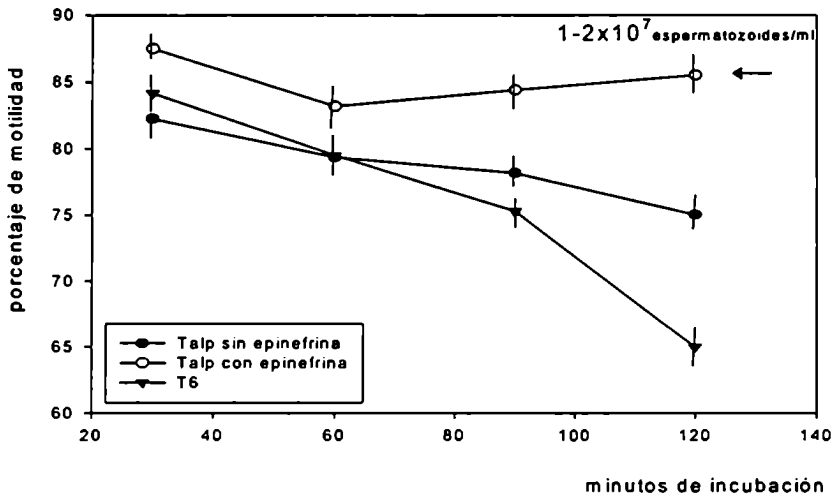
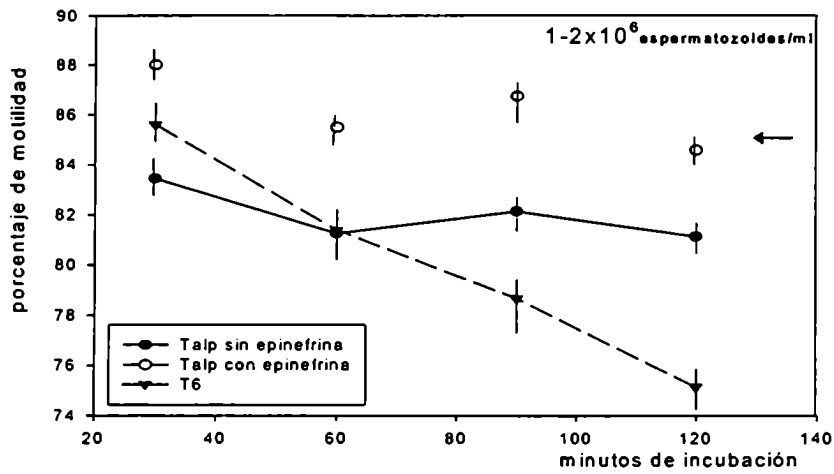
Motilidad vs. tiempo de incubación con una concentración constante de espermatozoides de *Calomys musculus* (a) $1-2 \times 10^6$ y (b) $1-2 \times 10^7$



← los valores señalados con la flecha difieren significativamente del resto , $p < 0.001$

Figura 19

Motilidad vs. tiempo a una concentración constante de espermatozoides de *Calomys laucha* (a) $1-2 \times 10^6$ y (b) $1-2 \times 10^7$



← los valores señalados con la flecha difieren significativamente del resto, $p < 0.001$

5.a.2. Hiperactivación

Los resultados se ven en las Figuras 20.a y 20.b. Para ambas especies, el Talp con epinefrina resultó ser más efectivo para permitir la hiperactivación de los espermatozoides que el T6. A diferencia de los resultados obtenidos para motilidad, donde la concentración no afectó este parámetro, en el caso de la hiperactivación, se vió claramente que ésta está éinfluenciada por la concentración de los espermatozoides y por la presencia de epinefrina en el medio de capacitación. La concentración óptima para la hiperactivación espermática fue $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/ml dado que ésta permitió obtener, tanto con y sin epinefrina, una hiperactivación del 22-27% a los 90 min, para *Calomys musculinus*, y de 22-25% a los 60 min de incubación para *Calomys laucha*.

Dentro de cada concentración hubo diferencias significativas en el tiempo que evidenciaron la existencia de una progresión de la hiperactivación en ambas especies a lo largo del tiempo.

Resumidamente, *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* necesitan un período de incubación previo, capacitación, para adquirir su hiperactivación. El movimiento de hiperactivación encontrado para estas especies es similar al descrito para hamster y no guardó ninguna relación con el descrito para ratón. La hiperactivación en *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* está directamente relacionada con el tiempo de incubación (90 min para *C.musculinus*, 60 min para *C.laucha*) y a la concentración ($1-2 \times 10^6$ spz/ml), que no difirió en presencia o ausencia de epinefrina.

Figura 20

Hiperactivación de espermatozoides de *C. laucha* en medios T6 y Talp vs. tiempo de incubación con (a) $1-2 \times 10^6$ y (b) $1-2 \times 10^7$ espermatozoides/ml.

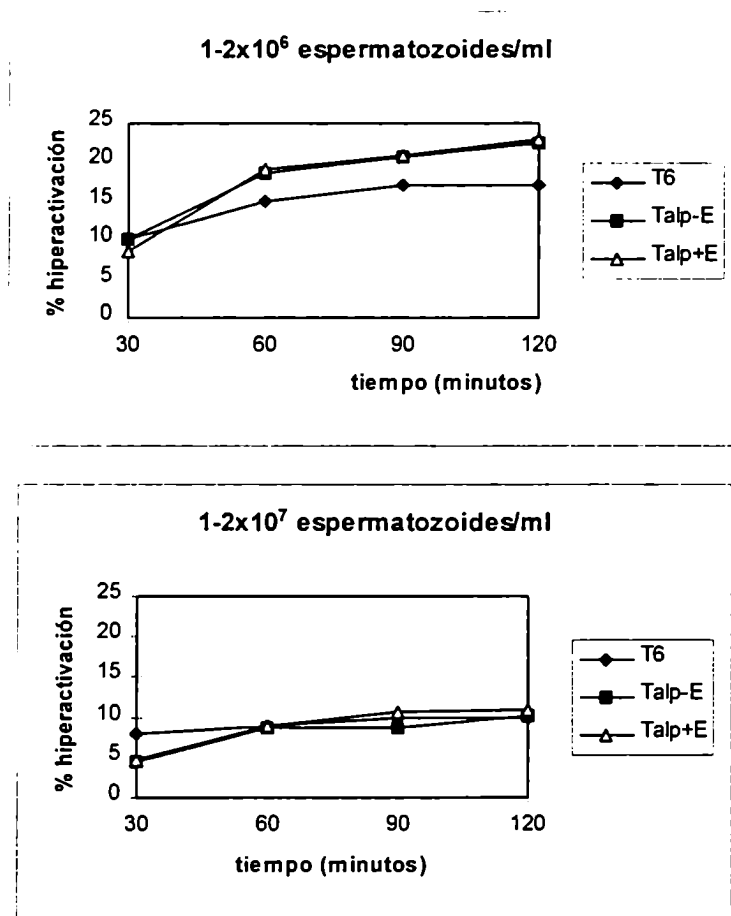
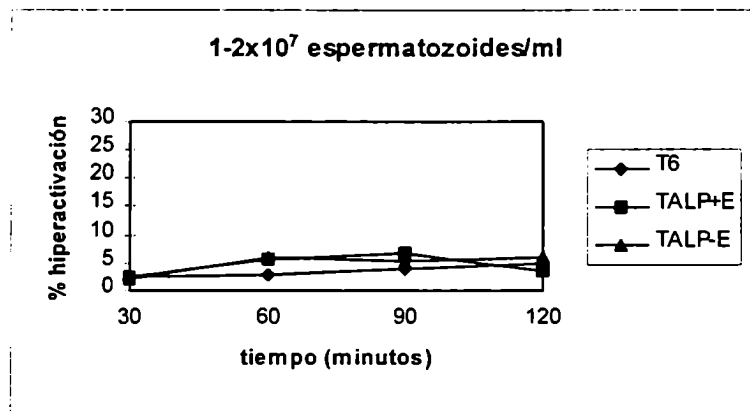
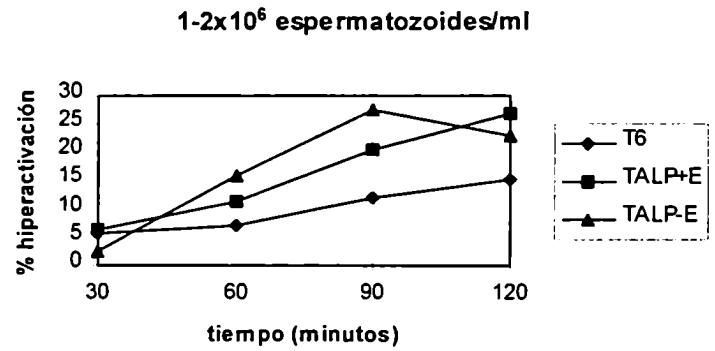


Figura 21

Hiperactivación de espermatozoides de *C.laucha* en medios T6 y Talp vs. tiempo de incubación con (a) $1-2 \times 10^6$ y (b) $1-2 \times 10^7$ espermatozoides/ml.



5.a.3 Reacción Acrosomal y Capacitación

Los resultados que se presentan a continuación son los obtenidos con la técnica de CTC ya que la técnica de eosina no pudo ser puesta a punto de modo reproducible para estas especies. La reacción acrosomal procedió en ambas especies en medio Talp en presencia de epinefrina. La reacción acrosomal en *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* estuvo directamente relacionada con el tiempo de incubación (90 min para *C.musculinus*, 60 min para *C.laucha*) y a la concentración ($1-2 \times 10^6$ spz/ml).

En el caso en que los espermatozoides fueran incubados en medio T6, la reacción acrosomal aumentó muy rápido: 50% *C. musculinus* y 57% *C. laucha* a los 60 min.

En el caso en que los espermatozoides fueron incubados en Talp la reacción procedió más lentamente alcanzando valores de 15-20% a los 90 minutos para *C. musculinus* y de 16-21% a los 60 minutos para *C. laucha*. Figura 22 y Foto F.

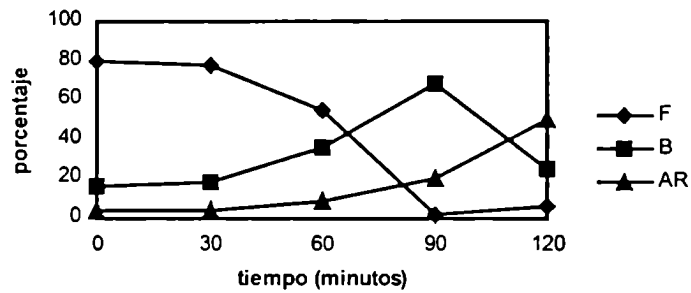
En función de los resultados obtenidos previamente (capítulos 3 y 4), el estudio de la capacitación se realizó sólo en medio Talp y se encontró que con la misma concentración ($1-2 \times 10^6$ spz /ml), los espermatozoides de *Calomys laucha* a los 60 min ya tenían un 70% de B y un 15% de AR, en tanto que para *Calomys musculinus* esta relación se alcanzó a los 90 minutos. Cada especie exhibió un tiempo óptimo de capacitación propio, 90 min para *Calomys musculinus* y 60 min para *Calomys laucha*.

La presencia o ausencia de epinefrina no mostró ninguna influencia en la capacitación (resultados no mostrados).

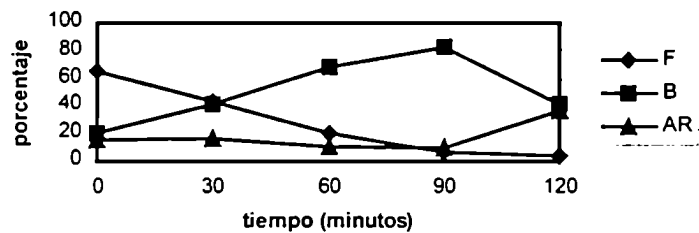
Figura 22

Reacción acrosomal y Capacitación in vitro de espermatozoides de *C. musculus* (a) y *C. laucha* (b) en función del tiempo en medio Talp

(a) *Calomys musculus*



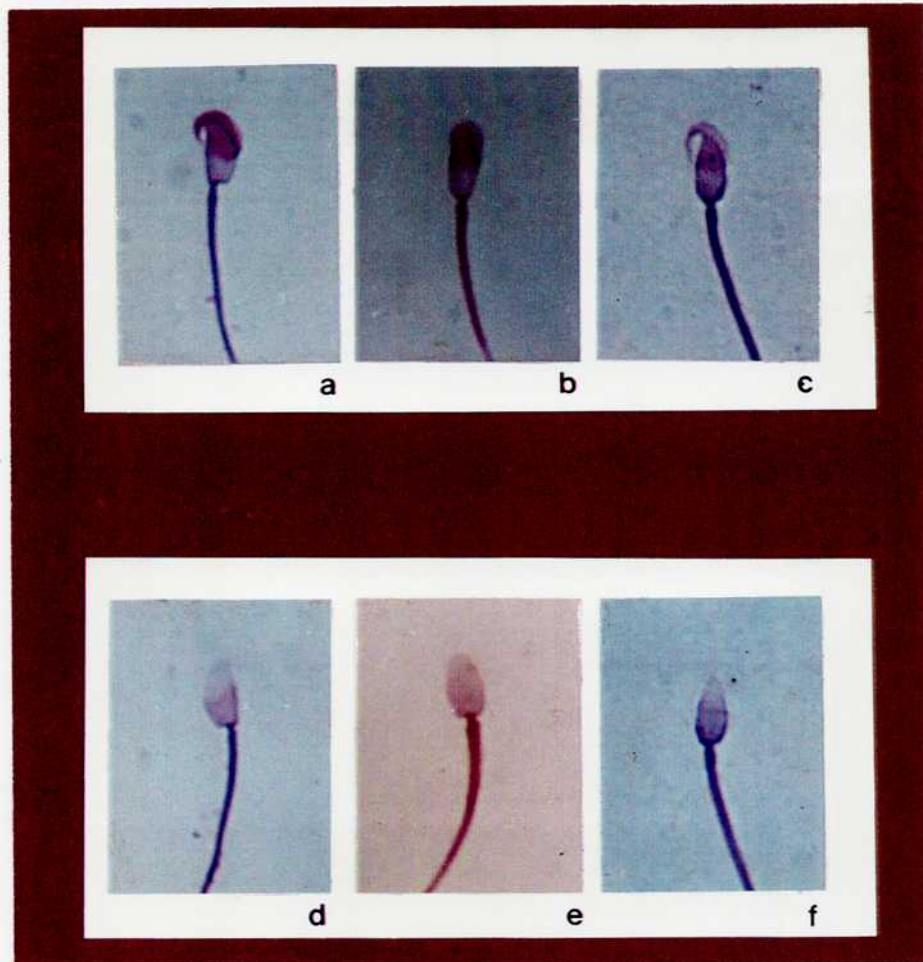
(b) *Calomys laucha*



F: se tiñe la cabeza completa del espermatozoide, espermatozoide no capacitado; B: se tiñe la región acrosomal y no la postacrosomal, espermatozoide capacitado; AR: no se tiñe la cabeza del espermatozoide, espermatozoide con reacción acrosomal.

Foto F

Reacción acrosomal de espermatozoides de
Calomys musculinus, *Calomys laucha* y *Calomys callidus*



La fotografía muestra: espermatozoides con su acrosoma intacto: a- *C. musculinus*, b- *C. laucha*, y c- *C. callidus*, y espermatozoides con reacción acrosomal que se evidencia por la pérdida de su acrosoma: d- *C. musculinus*, e- *C. laucha*, f- *C. callidus*.

5.a.4. Test de Hamster

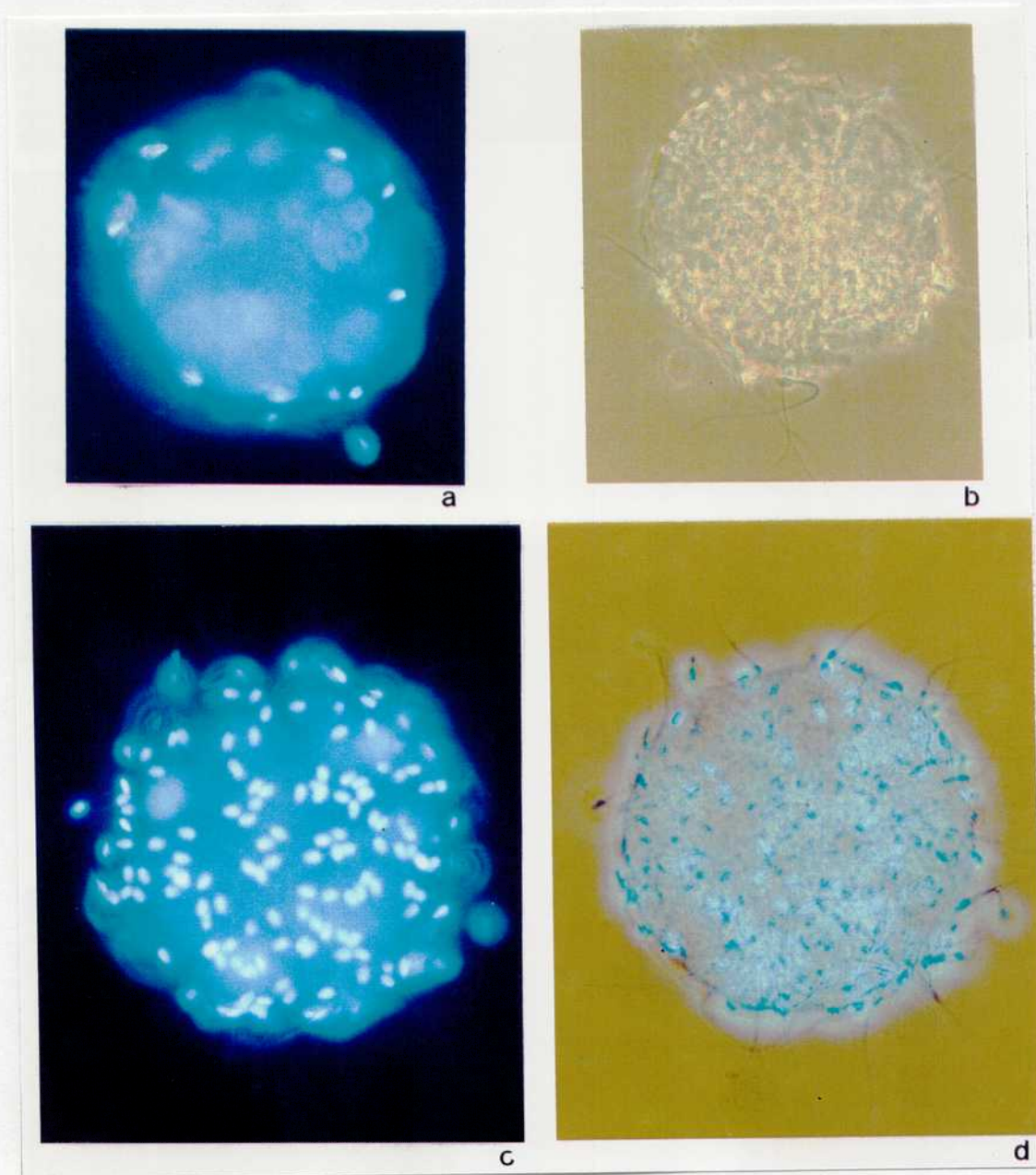
En virtud de los resultados obtenidos en esta etapa experimental donde se vió que el Talp con epinefrina permitía obtener los parámetros óptimos de motilidad, capacitación, reacción acrosomal e hiperactivación, se decidió realizar un ensayo biológico simple para validar estas observaciones bioquímicas y comportamentales. Se recurrió al test de hamster como ensayo biológico empleando una concentración de $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/ml y 90 minutos de incubación para el caso de *C. musculinus* y 60 minutos para el caso de *C. laucha*. Se realizaron 3 experimentos para cada especie donde se emplearon 30 oocitos de hamster en cada caso.

Para ambas especies se pudo comprobar en microscopía óptica en contraste de fase que los espermatozoides pudieron unirse a la membrana plasmática de todos los oocitos de hamster (Foto G). Un análisis más detallado con microscopía de fluorescencia mostró la decondensación de las cabezas de los espermatozoides en el citoplasma de los oocitos de hamster. Se observó un gran número de decondensaciones en los oocitos lo cual indicó que hubo poliespermia, que es típica en este Test debido a la remoción total de la zona pelúcida (Foto G).

Brevemente, ensayos bioquímicos (CTC) y biológicos (Test de hamster) han mostrado que los espermatozoides de *Calomys laucha* y *Calomys musculinus* necesitan un tiempo de incubación previo antes de enfrentarse a la gameta femenina. Ese tiempo de incubación, necesario para la capacitación de los espermatozoides fue de 60 min para *C. laucha* y 90 minutos para *C. musculinus*.

Foto G

Interacción entre espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* con la membrana plasmática de oocitos de Hamster (sin zona pelúcida)



a- espermatozoides de *Calomys laucha* muestran decondensaciones en el citoplasma del oocito de hamster (fluorescencia), b- la misma muestra observada con contraste de fase donde se ven las colas de los espermatozoides en la membrana del oocito de hamster, c- espermatozoides de *Calomys musculus* muestran decondensaciones en el citoplasma del oocito de hamster (fluorescencia), d- la misma muestra observada con campo claro y fluorescencia al mismo tiempo donde se ven las colas de los espermatozoides en la membrana del oocito de hamster. a-b fueron tomadas con 400x, c-d fueron tomadas con 1000x.

5.b Interacciones espermatozoide- zona pelúcida entre gametas del género

Calomys

En virtud de los resultados de la sección anterior en los experimentos siguientes se empleó Talp+E, para la capacitación y la fecundación *in vitro*. Los oocitos se obtuvieron por superovulación (capítulo 3). Los primeros experimentos fueron conducidos para evaluar binding y attachment.

5.b.1. Binding y attachment

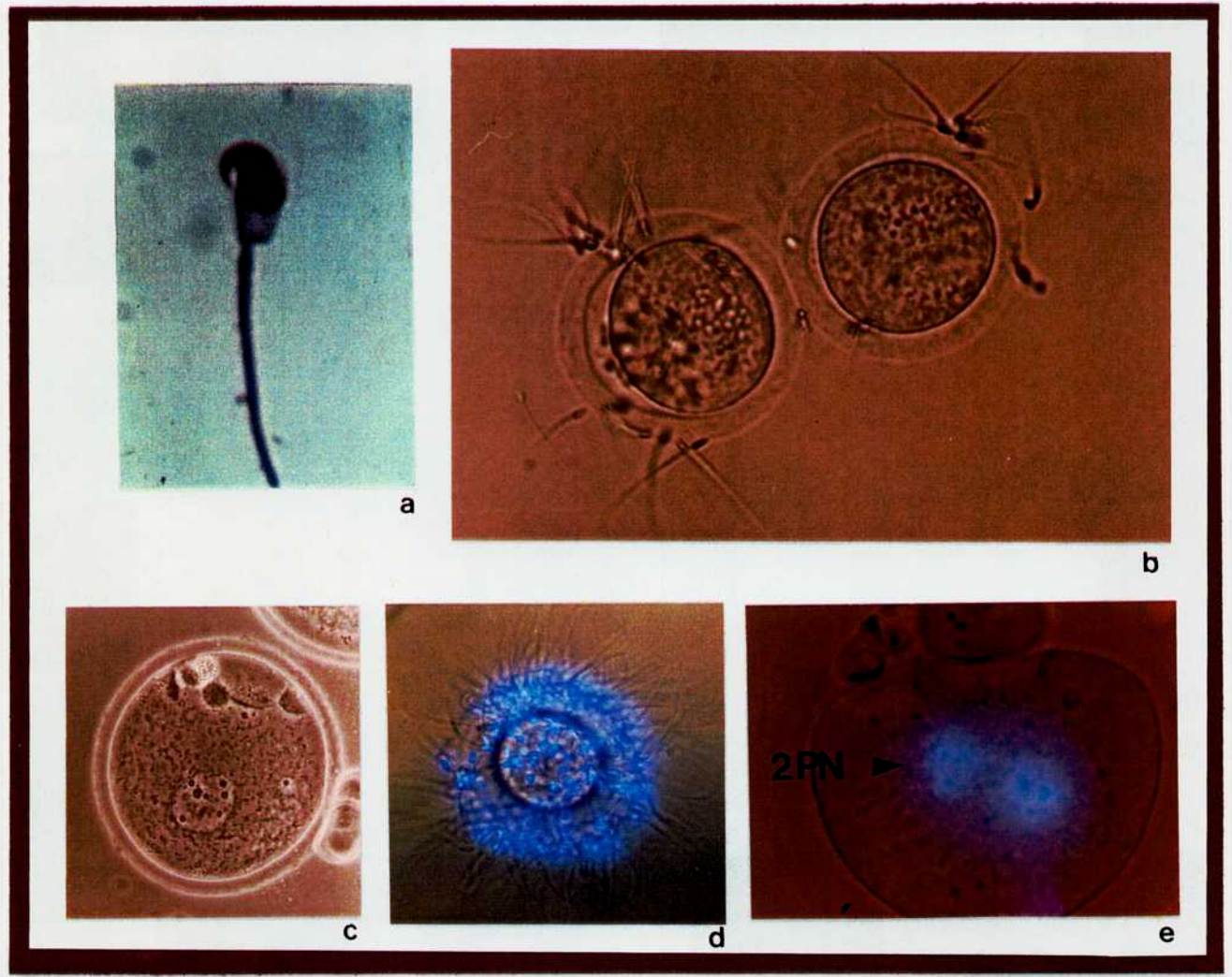
Los oocitos se inseminaron y se evaluaron en todos los casos (*C. musculinus* x *C. musculinus*, *C. laucha* x *C. laucha*, *C. laucha* x *C. musculinus* y *C. musculinus* x *C. laucha*) los parámetros de attachment y binding que se detallan en la Tabla 13.

Al analizar el comportamiento de las gametas homólogas, es decir, oocitos de *C. musculinus* x espermatozoides de *C. musculinus* (Foto H) y oocitos de *C. laucha* x espermatozoides de *C. laucha* (Foto I), se vió que para ambas especies a las 2.5 hs de incubación ya han comenzado tanto el "attachment" como el "binding". Para *C. musculinus*, no hay diferencia en el número de espermatozoides que hacen attachment (2-6) y binding (7-12) a las 2.5 hs y a las 5 hs post-inseminación respectivamente. En cambio en la fecundación homóloga de *C. laucha* el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida se vió incrementado con respecto a *C. musculinus* ya que los valores aumentaron de 7-12 espermatozoides a las 2.5 hs a 13-20 a las 5 horas.

En el caso de las fecundaciones heterólogas, los espermatozoides de *C. laucha* tuvieron más "attachment " y binding" (>20 espermatozoides por oocito) por los oocitos de *C. musculinus* que los espermatozoides *C. musculinus* por los oocitos de su propia especie.

Foto H

Calomys musculus: interacción homóloga entre sus gametas



a- espermatozoide de *C. musculus*, **b-** interacción espermatozoide-oocito (microscopio invertido 5 horas post-fecundación, 400x), **c-** oocito fecundado observado en microscopio óptico con contraste de fase que evidencia los pronúcleos (400x), **d-** oocito con espermatozoides preincubados con Hoechst 33342 antes de la fecundación (200x), **e-** oocito fecundado con dos pronúcleos (Fotografía tomada con campo claro y fluorescencia al mismo tiempo, 400x)

En el caso contrario, los espermatozoides de *C. musculus* tuvieron poca afinidad (1-6 espermatozoides por oocito) por los oocitos de *C. laucha* y esta fue menor a la afinidad que mostraron los mismos espermatozoides de *C. musculus* por los oocitos homólogos.

Tabla 13

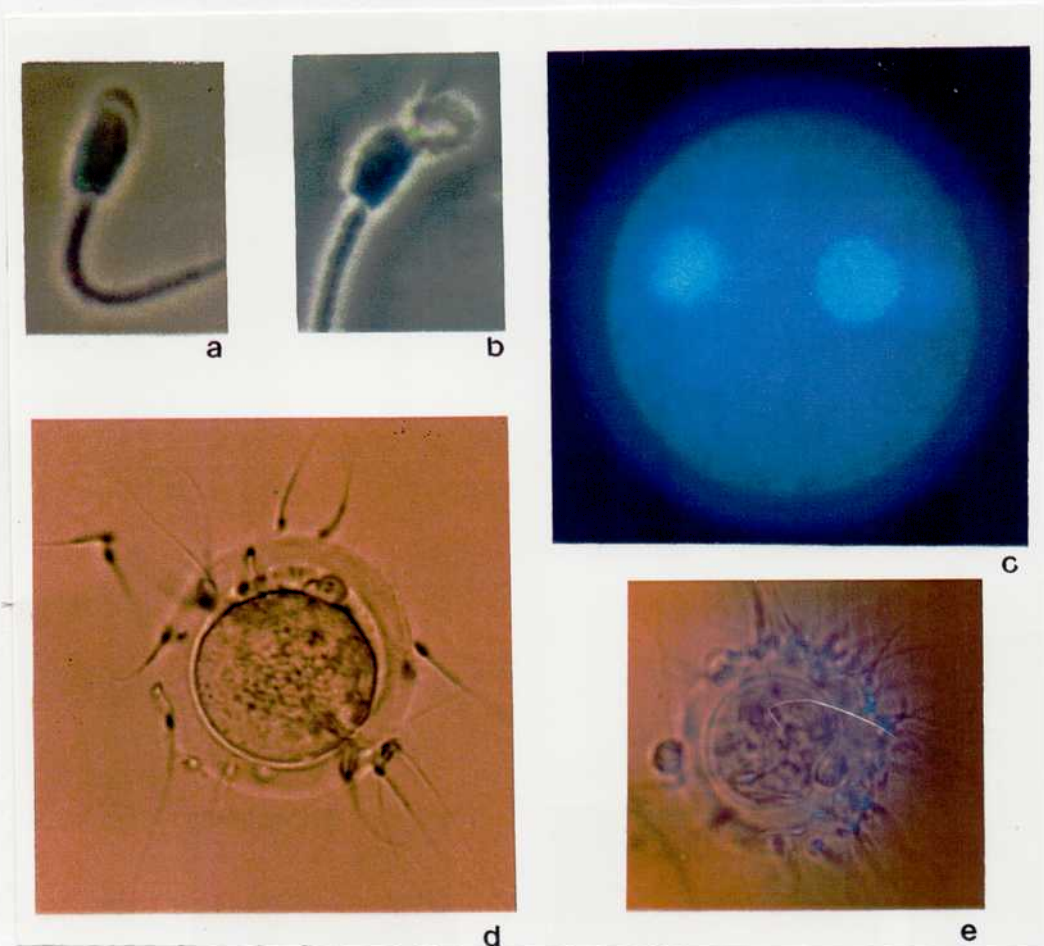
**Binding y attachment de espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha*
con oocitos homólogos y heterólogos.**

oocitos x spz	2.5 hs de incubación		5 hs de incubación	
	attachment	binding	attachment	binding
CM x CM	++	+++	++	+++
CL x CL	+++	+++	++++	++++
CM x CL	+++++	+++++	+++++	+++++
CL x CM	+	+ / ++	+ / ++	+ / ++

Los resultados son promedios de 5 experimentos diferentes. El número de espermatozoides se expresa por oocito como sigue: (+) 1, (++) 2-6; (+++) 7-12; (++++) 13-20; (+++++) >20 espermatozoides. Abreviaturas: spz: espermatozoides; CM: *c.musculus* y CL: *c.laucha*.

Foto I

Calomys laucha: interacción homóloga entre sus gametas



a- espermatozoide intacto (contraste de fase, 1000x), **b-** espermatozoide con capuchón acrosomal desprendiéndose (contraste de fase, 1000x), **c-** oocito con dos pronúcleos (fluorescencia, 1000x), **d-** espermatozoides y oocito 5 horas post-fecundación (microscopio invertido, 400x), **e-** oocito con espermatozoides preincubados con Hoechst 33342 antes de la fecundación (200x) donde puede verse el segundo polar extruído..

5.b.2. Penetración de la zona pelúcida y formación de pronúcleos

Para evaluar la tasa de fecundación *in vitro*, y la dinámica de formación de pronúcleos, los oocitos fueron incubados con Hoechst 33342 y fijados con glutaraldehído 2,5% para examinar tanto la decondensación de las cabezas de espermatozoides homólogas o heterólogas y el contenido nuclear. Las observaciones se hicieron en distintos horarios para evaluar la dinámica de activación de los oocitos en función del tiempo.

Las tasas de fecundación *in vitro* en los casos de interacciones homólogas en ambas especies fueron similares, 55% -*C. musculus* x *C. musculus*- y 53% -*C. laucha* x *C. laucha*- (Tabla 14).

Las tasas de fecundación interespecíficas fueron significativamente inferiores ($p < 0.005, \chi^2$) a las fecundaciones homólogas. La interacción oocitos de *C. musculus* x espermatozoides de *C. laucha* (28% de fecundación) tuvo un 10% más de éxito que la interacción oocitos de *C. laucha* x espermatozoides de *C. musculus* (18% de fecundación). Esto se vió por un lado en la interacción espermatozoide-zona pelúcida lo que quedó evidenciado en la afinidad de binding (Tabla 13) y en la capacidad de penetración de los espermatozoides de *C. laucha* que tuvieron más afinidad por los oocitos de *C. musculus* que a la inversa.

Las fecundaciones homólogas fueron más exitosas que las heterólogas pero las heterólogas fueron posibles en ambos sentidos del cruzamiento: oocitos *C. musculus* x espermatozoides de *C. laucha* y oocitos de *C. laucha* por espermatozoides de *C. musculus*.

Tabla 14

Incidencia de activación por fecundación *in vitro* homóloga y heteróloga comparada en *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*

oocitos x spz	N	MII	Fragm	Activación (%)	Fecundados (%)
CM x CM	120	24 (20.0)	14 (11.6)	16 (13.33)	66 (55.00) (a)
CL x CL	83	9 (10.8)	15 (18.0)	11 (12.22)	48 (53.33) (b)
CM x CL	75	34 (45.3)	6 (8.0)	16 (22.67)	21 (28.00) (c)
CL x CM	88	55 (62.5)		18 (22.50)	15 (18.75) (d)

Referencias: **spz**, espermatozoides; **N**: número de oocitos; **MII**, oocitos detenidos en MII no fecundados; **fragm**, fragmentados; **2°CP**, oocitos con extrusión del 2°CP; **Activación**: oocitos con activación partenogenética evidenciado por coloración de Hoechst 33342; **fecundados**, oocitos donde se vió la formación de 2 pronúcleos por coloración de Hoechst 33342.

(a) y (b) no difieren entre sí.

(c) y (d) no difieren entre si.

(c) y (d) difieren vs. (a) y (b) significativamente ($p < 0.0001$) χ^2

En ambas especies se encontró activación anómala en el citoplasma del oocito distinta de la originada por la presencia de espermatozoides, tales como de las decondensaciones o formación de pronúcleos.

Las activaciones anómalas generadas durante las fecundaciones homólogas, 12.5 y 13.3% estas no estarían tan alejadas de aquellas obtenidas en los controles de las activaciones partenogénicas (capítulo 4). Pero en las fecundaciones heterólogas las activaciones anómalas fueron más elevadas, 22.5 y 22.67%. Entre las observaciones de activación anómala se encontraron tanto activaciones de tipo partenogénica como activaciones de tipo abortiva debido probablemente a una falla ocurrida durante la fecundación heteróloga.

Las fragmentaciones fueron observadas frecuentemente en las fecundaciones homólogas y en la fecundación heteróloga de oocitos de *C. musculus* por espermatozoides de *C. laucha*. El porcentaje de fragmentaciones no difirió significativamente entre sí para ninguno de los casos excepto para el caso de la fecundación heteróloga donde se cruzaron oocitos de *C. laucha* por espermatozoides de *C. musculus* donde los oocitos de *C. laucha* no se fragmentaron.

5.b.3. Desarrollo preimplantativo *in vitro*

Una parte de los oocitos fecundados fueron incubados en estufa gaseada para evaluar el desarrollo *in vitro*. Los embriones provenientes de las interacciones homólogas -*C. musculus* x *C. musculus* y *C. laucha* x *C. laucha*- clivaron a 2 células a las 24 horas tanto en M16 como en TALP (61 y 70%). La tasa de clivaje a 2 células no mostró relación con el medio de cultivo empleado (Tabla 15) debido a que el porcentaje de embriones que llegó al estadio de 2 células obtenido con estos medios

de cultivo no difirieron entre sí estadísticamente. El porcentaje de embriones que lograron clivar a 2 células fue significativo con respecto a los embriones que permanecieron arrestados en 1 célula a pesar de estar fecundados.

Los embriones provenientes de las fecundaciones heterólogas -*C. laucha* x *C. musculus* y *C. musculus* x *C. laucha*- no clivaron a 2 células bajo estas condiciones de estudio.

Si bien los embriones provenientes de las fecundaciones homólogas se mantuvieron en cultivo para permitir su desarrollo, estos nunca progresaron más allá del estadio de 2 células. Esto podría deberse al “bloqueo en 2 células” que ya ha sido descrito en rata, algunas cepas de *Mus musculus* y hamster, y que sólo en algunos casos pueden superarse *in vitro* bajo condiciones de cultivo especiales que le aporten al embrión los nutrientes necesarios que no le están siendo suministrados en los medios que se usan durante la fecundación.

Tabla 15

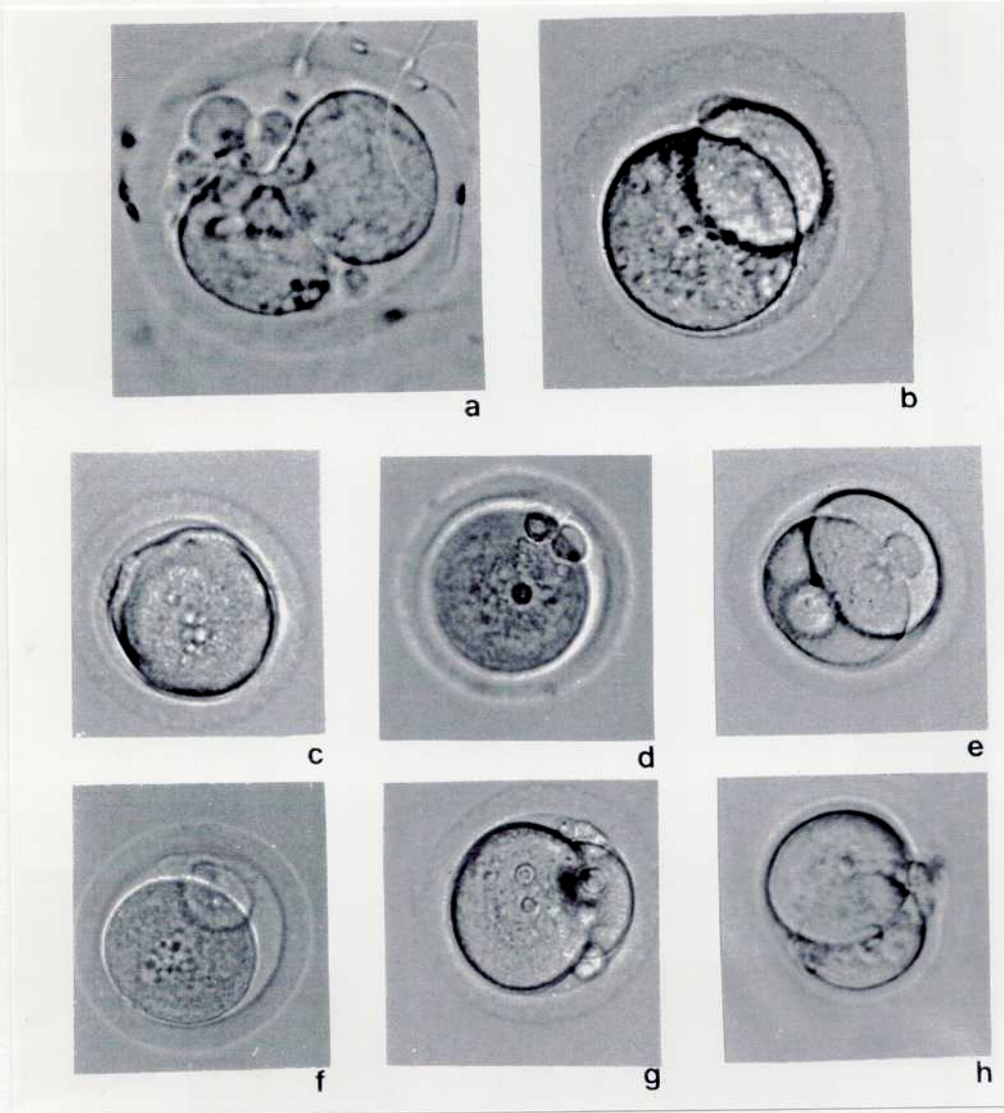
Desarrollo preimplantativo *in vitro* de embriones provenientes de fecundaciones homólogas y heterólogas entre *C. musculus* y *C. laucha*

Medio de cultivo	M16				TALP			
	oocitos x spz	N	1 cell (%)	muer (%)	2 cell (%)	N	1 cell (%)	muer (%)
CM x CM	80	20 (25.0)	4 (5.00)	56 (70.0)	75	26 (34.7)	3 (4.00)	46 (61.3)
CL x CL	70	21 (30.0)	5 (7.14)	44 (61.4)	70	16 (22.8)	6 (8.57)	48 (68.6)
CM x CL	78	65 (83.3)	15 (19.2)	0	70	56 (80.0)	14 (20.0)	0
CL x CM	80	70 (87.5)	10 (12.5)	0	80	65 (81.2)	15 (18.7)	0

Observaciones de los embriones a las 24 horas de la fecundación. Referencias: N: número de oocitos inseminados; 1 cell: embrión de 1 célula, 2 cell: embrión de 2 células; muer: embrión muerto a las 24 horas; CM: *C. musculus*; CL: *C. laucha*.

Foto J

Activación y clivaje a dos células de oocitos fecundados de
Calomys musculinus y *Calomys laucha*



a- y b- oocitos de *C. musculinus* producto de la fecundación homóloga, a- oocito clivando a 2 células (19 horas post-fecundación) con fragmentaciones perivitelinas y espermatozoides homólogos aún unidos a la zona pelúcida, b- oocito de dos células (24-26 horas post-fecundación)

c-d- y e- oocitos de *C. laucha* producto de la fecundación homóloga, c- en el oocito se ve material subnuclear que muestra que comenzó la activación ya que este material es distinto del que mostraría una metafase II de un oocito no activado, donde falló la extrusión del segundo cuerpo polar (6 horas post-fecundación), d-, e- oocito de dos células con núcleos en cada blastómero (24-26 horas post-fecundación)

f-g- y h- oocitos de *C. laucha* producto de la fecundación heteróloga con espermatozoides de *C. musculinus* (24-26 horas post-fecundación), f- oocito con el segundo cuerpo polar extruído y formación de pronúcleos donde falló la división a dos células, g- oocito de dos células con los blastómeros desiguales, h- oocito de dos células con núcleos en cada blastómero.

5.c.1. Binding y attachment de espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* a oocitos de hamster dorado y ratón a las 2.5 y 5 hs de incubación *in vitro*.

Luego de 2.5 hs de incubación de los espermatozoides con los oocitos, se pudo comprobar unión de los espermatozoides a los oocitos homólogos como heterólogos.

El número de espermatozoides homólogos que se unen por oocito es variable según cada especie (Tabla 16). En *C. musculus* no hubo diferencia en el número de espermatozoides que hicieron attachment (2-6) y binding (7-12) a las 2.5 hs y a las 5 hs post-inseminación. En cambio para *C. laucha* los valores se incrementaron de 7-12 a las 2.5 hs hasta 13-20 a las 5 hs. En hamster dorado el número de espermatozoides por oocito que presentaron binding fue de 2 a 6 a las 2.5 hs y se incrementó hasta 7-12 espermatozoides por oocito a las 5 horas. En el caso de *M. musculus* el número de espermatozoides unidos a la zona pelúcida de oocitos de *M. musculus* fue de 2 a 6 tanto a las 2.5 como a las 5 hs.

Las observaciones de la afinidad de los espermatozoides de cada una de estas especies en relación a oocitos heterólogos mostró interacciones sorprendentes.

Interesantemente, los espermatozoides de *C. laucha* y de *C. musculus* tuvieron más capacidad de "attachment" (1-6) y "binding" (0-1) por los oocitos de hamster dorado que por los espermatozoides de ratón en cuyo caso no se registró ni attachment ni binding. De todos modos la afinidad que mostraron tener los espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* por oocitos heterólogos de hamster dorado y de ratón fue menor que la que mostraron por los oocitos homólogos y aún heterólogos del género *Calomys* (Tablas 15 y 16).

Tabla 16

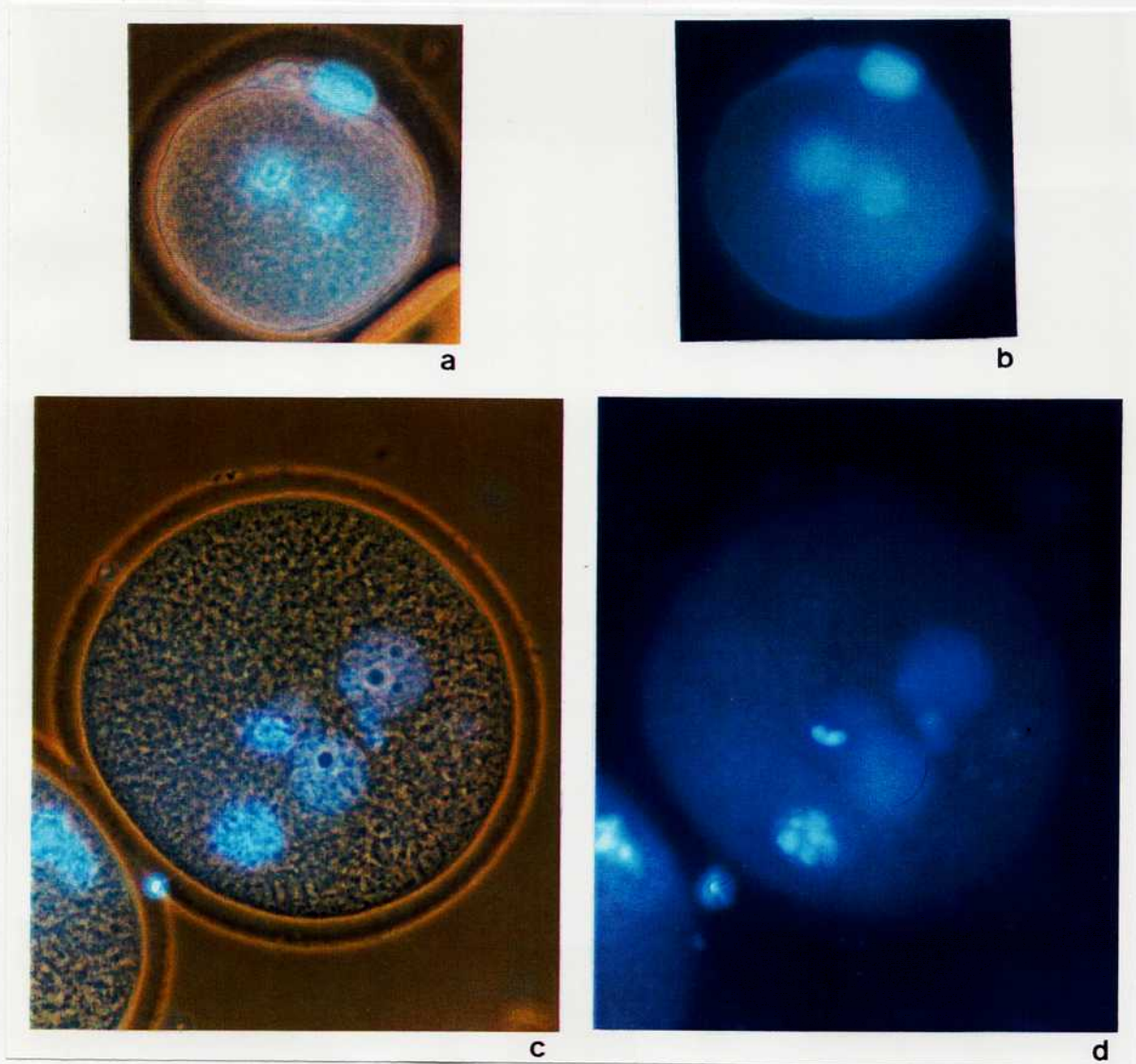
Binding y attachment de espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* a oocitos de hamster dorado y ratón a las 2.5 y 5 hs de incubación *in vitro*.

oocitos x spz	2.5 hs de incubación		5 hs de incubación	
	attachment	binding	attachment	binding
CM x CM	++	+++	++	+++
CL x CL	+++	+++	++++	++++
H x Hamster	+++	++	++++	+++
Hamster x CL	+ / ++	- / +	+ / ++	- / +
Hamster x CM	+ / ++	- / +	+ / ++	- / +
Ratón x Ratón	++ / +++	++	++ / +++	++
Ratón x CM				
Ratón x CL				
CM x Ratón			+	+
CL x Ratón			+	+

Los resultados son promedios de 3 experimentos diferentes. El número de espermatozoides se expresa por oocito como sigue: (+) 1, (++) 2-6; (+++) 7-12; (++++) 13-20; (+++++) >20 espermatozoides. Abreviaturas: spz: espermatozoides; CM: *C. musculus* y CL: *C. laucha*. Ratón: *Mus musculus*

Foto K

Penetración de la zona pelúcida del oocito de Hamster por el
espermatozoide de *Calomys laucha* y *Calomys musculinus*



a- oocito de hamster con pronúcleos luego de la incubación con espermatozoides de *Calomys laucha* (Fotografía tomada con campo claro y fluorescencia), b- la misma muestra observada sólo con fluorescencia donde se destaca mejor la formación de los dos pronúcleos y la extrusión del segundo cuerpo polar, c- oocito de hamster fecundado por espermatozoides de *Calomys musculinus* (Fotografía tomada con campo claro y fluorescencia), d- la misma muestra observada sólo con fluorescencia . a-b fueron tomadas con 400x, c-d fueron tomadas con 1000x.

La interacción entre *Calomys* y *Mus musculus* no fue positiva ni cuando se incubaron oocitos de *Calomys* con espermatozoides de *Mus* ni al incubar oocitos de *Mus* con espermatozoides de *Calomys*. Esto se vió reflejado en que no hubo binding de los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* a la zona pelúcida de *Mus musculus* y en que los espermatozoides de *Mus* tuvieron muy poca afinidad por los oocitos de *C. musculinus* y *C. laucha* (0-1 espermatozoide por oocito)

5.c.2. Fecundación interespecífica *Calomys*-hamster y *Calomys*-ratón

A pesar que el binding y el attachment de los espermatozoides de *C. musculinus* y de *C. laucha* por los oocitos de hamster fue bajo para ambas especies (Tabla 16) esta unión fue suficiente para que los espermatozoides de *Calomys* pudieran penetrar la zona pelúcida, unirse a la membrana plasmática, inducir la activación de los oocitos de hamster y formar pronúcleos (Tabla 17, Foto K).

Los resultados más interesantes se reflejaron en que la interacción de los espermatozoides de *Calomys* con los oocitos de hamster fue más exitosa que las interacciones: *C. musculinus* x *C. laucha* y *C. laucha* x *C. musculinus* (Tabla 18).

La interacción ratón x *Calomys* fue negativa en los dos sentidos, es decir oocitos de *Calomys* vs espermatozoides de ratón y oocitos de ratón vs. espermatozoides de *Calomys*. La observación de los oocitos luego de la inseminación no mostró evidencias ni de penetración de la zona pelúcida, ni de decondensaciones de cabezas de espermatozoides por lo cual no se observó tampoco la formación de pronúcleos.

Tabla 17

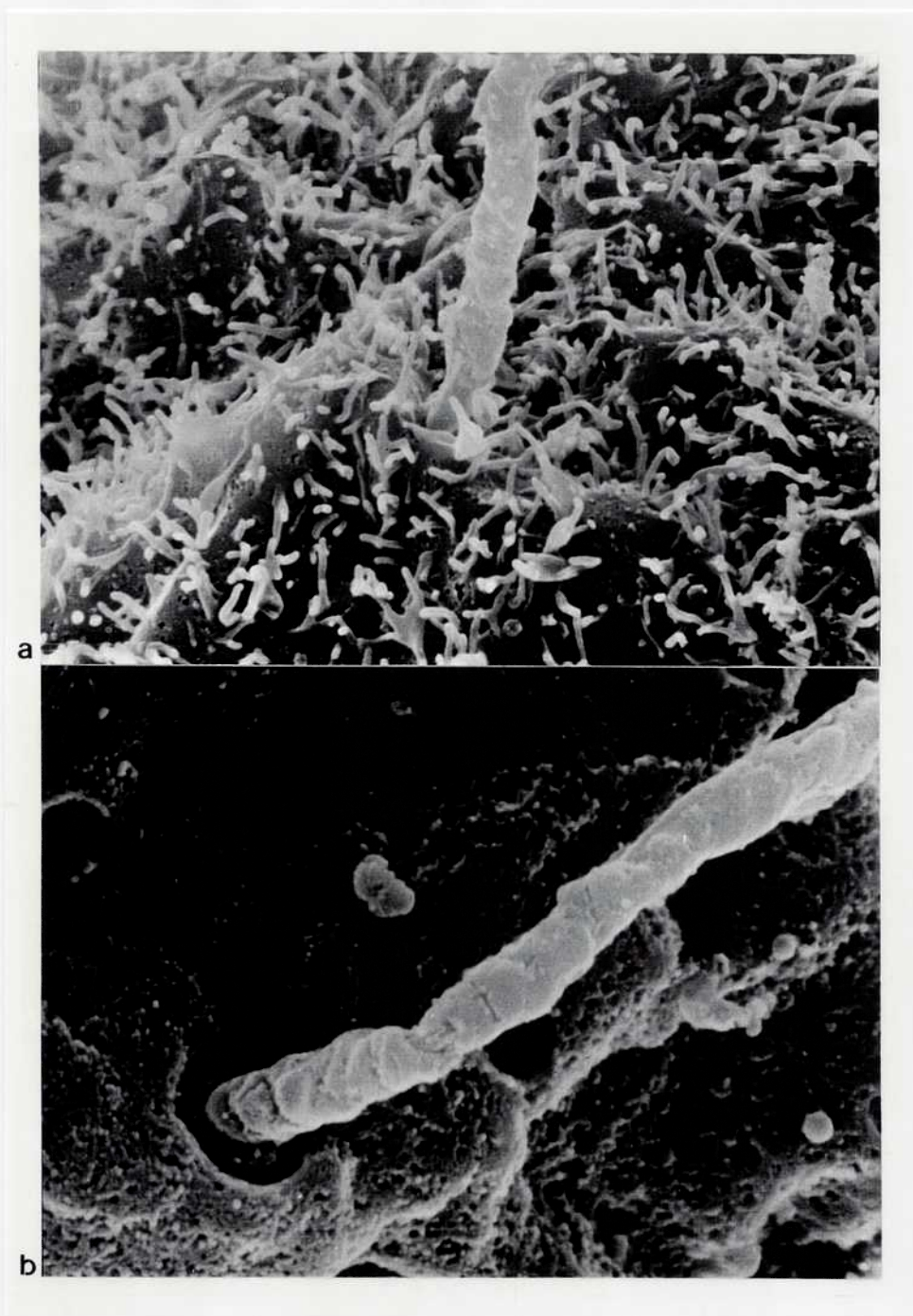
**Incidencia de activación por fecundación *in vitro*
homóloga y heteróloga comparada entre *Calomys*-hamster y *Calomys*-ratón**

oocitos x spz	N	MII (%)	Fragm (%)	Activados	Fecundados (%)
CM x CM	120	24 (20.00)	14 (11.67)	16 (13.33)	66 (55.00)
CL x CL	83	9 (10.84)	15 (18.07)	11 (12.22)	48 (53.33)
Hamster x H	150	31 (20.7)	0	7 (4.67)	112 (74.67)
Hamster x CM	180	95 (52.78)	0	0	85 (47.22)
Hamster x CL	170	80 (47.06)	0	0	90 (52.94)
Ratón x Ratón	160	19 (11.8)	13 (8.10)	8 (5.00)	120 (75.00)
Ratón x CL	150	138 (92.00)	12 (8.00)	0	0
Ratón x CM	160	152 (95.00)	8 (5.00)	0	0
CM x Ratón	42	34 (80.95)	5 (11.9)	3 (7.15)	0
CL x Ratón	25	21 (84.00)	3 (12.00)	1 (4.00)	0

Referencias: **spz**, espermatozoides; **N**: número de oocitos; **MII**, oocitos detenidos en MII no fecundados; **fragm**, fragmentados; **2°CP**, oocitos con extrusión del 2°CP; **Activados**: oocitos con activación partenogenética evidenciado por coloración de Hoechst 33342; **fecundados**, oocitos donde se vió la formación de 2 pronúcleos por coloración de Hoechst 33342. **CM**: *C. musculus* y **CL**: *C. laucha*.

Foto L

Penetración de la zona pelúcida de Hamster por el espermatozoide de *C. laucha* evidenciado en microscopía electrónica de barrido



a- espermatozoide de *C. laucha* penetrando la membrana plasmática del oocito de hamster
b- espermatozoide de *C. laucha* penetrando la zona pelúcida del oocito de hamster
Fotografías tomada en microscopio electrónico de barrido aumento 10.000x

Tabla 18

Capacidad fecundante de los espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha*
por oocitos homólogos y heterólogos

oocitos	Espermatozoides			
	<i>C. musculus</i>		<i>C. laucha</i>	
	binding (5 hs) # spz	fecundación (%)	binding (5 hs) # spz	fecundación (%)
<i>C. musculus</i>	7-12	55.00	>20	28.00
<i>C. laucha</i>	1-6	18.00	13-20	53.33
hamster	0-1	47.22	0-1	52.94
raton	0	0.00	0	0.00

Brevemente, los espermatozoides de *Calomys* (Cricetidae) han mostrado tener capacidad de fecundar oocitos en fecundaciones homólogas *C. musculinus* x *C. musculinus*, *C. laucha* x *C. laucha*, y heterólogas de especies pertenecientes al mismo género, *C. musculinus* x *C. laucha* y *C. laucha* x *C. musculinus*.

Por otra parte espermatozoides de *C. laucha* y *C. musculinus* han podido interactuar con oocitos de *Mesocricetus auratus* (Cricetidae), “hamster dorado”. Esta interacción se vió reflejada en la afinidad de binding de los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* por la zona pelúcida de oocitos de hamster y en la formación de pronúcleos.

Espermatozoides de *Calomys* no fueron capaces de unirse a la zona pelúcida de oocitos de *Mus musculus* (Muridae). No se observó fecundación ni decondensación de la cabeza de espermatozoides de *Calomys* en el citoplasma y menos aún formación de pronúcleos en el citoplasma de los oocitos de *Mus*. Los cruzamientos recíprocos tampoco arrojaron resultados positivos.

5.d.Discusión y conclusiones parciales: Interacción entre gametas. Unión especie-específica y sus implicancias

5.d.1.Adquisición de la capacidad fecundante *in vitro* de *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*

Los espermatozoides que han madurado en el epidídimo son capaces de moverse activamente pero no tienen la capacidad inmediata para fecundar. Esta capacidad es adquirida, *in vivo*, luego de residir en el tracto reproductivo femenino por algún período de tiempo (Yanagimachi et al., 1981; Saling, 1989; Florman and Storey, 1982, Moore et al., 1996). Actualmente se dispone de protocolos de capacitación *in vitro* para una gran variedad de especies de mamíferos (Dunbar y O'Rand 1991). Todos ellos consisten en la incubación de los espermatozoides en soluciones modificadas de Tyrode o Krebs-Ringer suplementadas con una fuente de energía apropiada (glucosa, lactato y piruvato) y albúmina (Yanagimachi, 1994).

Los espermatozoides y oocitos de cada especie requieren su propio microambiente para poder realizar sus funciones más eficientemente. Esto es comprensible ya que las gametas y el microambiente han evolucionado con características propias inherentes a cada especie. Para que la fecundación sea exitosa los espermatozoides deben ser altamente móviles y deben ser capaces de sufrir reacción acrosomal, penetrar la zona pelúcida y fusionarse con el ooplasma. Una fecundación exitosa *in vitro* implica que el espermatozoide ha podido capacitarse correctamente previamente (Yanagimachi, 1994).

Los requerimientos mínimos en cuanto al tiempo y a los medios necesarios para capacitar los espermatozoides varían según la especie. El tiempo mínimo de capacitación puede ser menos que una hora en algunas especies (ratón, gato y probablemente humano) mientras que en otras especies puede tomar muchas horas (conejo). El tiempo variará de acuerdo a la fisiología del modelo experimental y a la composición fisico-química del medio de cultivo. Los espermatozoides de algunos mamíferos tienen requerimientos especiales. Los espermatozoides del hamster dorado necesitan la presencia de un factor de motilidad espermática (SMF) en el medio que puede ser tanto la taurina o hypotaurina cuya ausencia conduce a la inmotilidad de los espermatozoides y finalmente a su muerte (Bavister, 1976, Yanagimachi, 1969 a, 1969 b y 1970, Lui et al., 1979; Mrsny et al., 1979;). Se ha postulado que este factor podría prolongar la vida del espermatozoide reduciendo la peroxidación de las membranas lipídicas (Alvarez et al., 1982) o por proteger a los espermatozoides de los radicales libres generados por su propio metabolismo. Alternativamente podría servir como un osmoregulador estabilizante de membrana. Este medio de cultivo, Talp, que fue diseñado para conformar los requerimientos de capacitación y fecundación de los espermatozoides de hamster ha sufrido modificaciones cuantitativas (Yanagimachi 1971, Barros 1984) pero no cualitativas. En el ratón los medios comunmente empleados son modificaciones de Tyrode, uno de ellos el T6 no fue tan efectivo como el Talp para obtener espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* con características fecundantes adecuadas.

El Talp mostró ser el medio óptimo tanto para *C. musculinus* como para *C. laucha* y esto se vió reflejado en que los espermatozoides de ambas especies 1) mantuvieron

tasas elevadas de motilidad a lo largo del tiempo de incubación y 2) adquirieron su capacidad fecundante.

Los parámetros analizados en los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha*: motilidad, reacción acrosomal e hiperactivación se vieron afectados por la concentración que mostró ser óptima entre $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/ml con respecto a los otros valores ensayados de $1-2 \times 10^7$ espermatozoides/ml. En hamster se emplea para la capacitación epinefrina. La presencia de epinefrina en la incubación de los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* mejoró significativamente los porcentajes de espermatozoides móviles y de reacción acrosomal. En el caso de hiperactivación no se encontraron diferencias significativas en relación a la presencia o ausencia de epinefrina en el medio de capacitación. Cabe destacar que los espermatozoides de hamster no se capacitan en ausencia de epinefrina en tanto que en los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* si bien mejoran la motilidad y la reacción acrosomal, la ausencia de epinefrina no sería condicionante de que la capacitación ocurra.

Un indicador de que la capacitación ha sido concluída es la reacción acrosomal (Fraser, 1995) ya que un espermatozoide capacitado puede reaccionar. En el espermatozoide de *C. musculinus*, al igual que en el espermatozoide de hamster, es muy fácil reconocer un espermatozoide con reacción acrosomal de uno que no ha reaccionado dado que la reacción acrosomal involucra la pérdida del prominente capuchón acrosomal con gancho y pueden verse los capuchones sueltos y hasta desprendiéndose de la cabeza del espermatozoide. En *C. laucha* no hay gancho acrosomal, el capuchón acrosomal es más pequeño y esto hace más difícil distinguir

entre un espermatozoide reaccionado de uno no reaccionado por simple contraste de fase.

Existen muchas condiciones que pueden inducir reacción acrosomal sobrepasando la capacitación (cambios de pH, temperatura, presencia de iones en el medio, por ejemplo) e inclusive se puede confundir la reacción acrosomal “verdadera” con la “falsa”. Lo más adecuado para poder correlacionar el tiempo necesario de capacitación y la reacción acrosomal es realizar un test biológico que permita corroborar si los espermatozoides evaluados como capacitados son realmente capaces de fecundar. Espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* en los que con ensayos bioquímicos se había determinado que su timing de capacitación y reacción acrosomal era de 90 min y 60 min respectivamente se evaluó si estos tiempos de incubación eran suficientes para adquirir su capacidad fecundante. Se recurrió para ello al test de hamster donde los espermatozoides se preincubaron 90 min para *C. musculus* y 60 min para *C. laucha* y luego se usaron para inseminar oocitos de hamster sin zona pelúcida. Los espermatozoides de las dos especies fueron capaces de unirse a la membrana plasmática, fusionarse, penetrarla y fecundar los oocitos de hamster en coincidencia con los tiempos de capacitación encontrados previamente: 90 min, *C. musculus* y 60 min para *C. laucha*. Los espermatozoides no sólo mostraron que estos tiempos de incubación empleados eran suficientes para capacitarse sino también que eran capaces de decondensar sus cabezas en el ooplasma donde fueron observados en niveles poliespérmicos.

Algunos espermatozoides se mueven frenéticamente antes de hacer la reacción acrosomal. El término hiperactivación (Yanagimachi, 1981) fue usado para describir este tipo de motilidad. La primera especie en la cual se describió este fenómeno fue el

hamster dorado (Yanagimachi, 1969 y 1970). Al ser liberados en el medio de capacitación tienen una motilidad inicial muy alta seguida de un período de quiescencia. Durante esta quiescencia relativa, muchos espermatozoides se aglutinan cabeza-cabeza (Yanagimachi, 1982). Luego de 2 horas los espermatozoides se liberan unos de otros y nadan libremente en el medio lo cual indican que sus características de superficie han cambiado y se han capacitado. En este momento el espermatozoide comienza a moverse mucho más activamente que antes. En principio describen un movimiento lineal pero luego exhiben características más vigorosas batiendo la cola hasta terminar girando en círculos. El movimiento de hiperactivación varía con la especie (Yanagimachi, 1994). En el caso de *C. musculus* y *C. laucha* el movimiento de hiperactivación observado fue similar al descrito para hamster. Los espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* liberados en el medio de cultivo mostraron un dinamismo en su movimiento muy elevado. El patrón del movimiento en un inicio es lineal para ir haciéndose circular a medida que avanza el tiempo de incubación. Se observó aglutinación en algunos casos pero esta duró menos tiempo que en el caso de los hamster ya que a los 60 min los espermatozoides de *C. laucha* ya estaban capacitados y los de *C. musculus* lo hacían a los 90 min. El movimiento del espermatozoide hiperactivado de *C. musculus* y *C. laucha* no mostró en ningún momento el patrón de hiperactivación característico de ratón, denominado movimiento en “x” (Yanagimachi, 1994).

Lo importante en la adquisición del movimiento de hiperactivación es el incremento de motilidad de la cola del espermatozoide y no el movimiento particular que describe per se (Yanagimachi, 1994).

Cuadro comparativo # 4

Medios y timing de capacitación comparados en espermatozoides de
C. musculus, *C. laucha* y roedores convencionales

Espece	medio de capacitación	tiempo de capacitación (min)	Movimiento de Hiperactivación
<i>Mus musculus</i>	M199	90-120 (1)	en "x"
<i>Mesocricetus auratus</i>	Talp	120-180 (2)	circular
<i>C. musculus</i>	Talp	90	circular
<i>C. laucha</i>	Talp	60	circular

(1) Toyoda et al., 1971

(2) Yanagimachi et al., 1970

5.d.2. Afinidad de los espermatozoides de *Calomys laucha* y *Calomys musculinus* por oocitos homólogos y heterólogos

El espermatozoide capacitado podrá atravesar las células del cúmulo que rodean al oocito (Austin, 1960) sólo si aún no ha hecho la reacción acrosomal. Si el espermatozoide conserva intacto su acrosoma, entonces las enzimas en la superficie de la membrana plasmática, hialuronidasa, lo ayudarían en la dispersión de las células del cúmulo. Una vez que entró al cúmulo la última barrera que deberá atravesar es la zona pelúcida.

Para que los espermatozoides puedan penetrar la zona pelúcida es necesario, aunque no suficiente, que exista previamente un binding muy “fuerte” a la zona pelúcida. Entonces, el éxito o la falla de la entrada del espermatozoide a la zona podría depender de la capacidad del espermatozoide para unirse e hidrolizar por lo menos la superficie externa de la zona pelúcida. El espermatozoide y la zona pelúcida tienen moléculas complementarias para su interacción. En el espermatozoide estos son los receptores para el binding primario y secundario a la zona pelúcida. Las glicoproteínas de la zona pelúcida son ligandos para estos receptores del espermatozoide. El attachment y el binding son indicadores simples de cómo se desarrolla la interacción entre gametas.

5.d.3. Relaciones homo y heteroespecíficas dentro del género *Calomys*

En dos especies del género *Calomys* se desarrolló un método de capacitación y fecundación *in vitro* que permitió luego analizar la interacción de sus gametas de modo interespecífico tanto intra como intergenérico.

Las fecundaciones homólogas *C. musculus* x *C. musculus* y *C. laucha* x *C. laucha* fueron exitosas en un 55% y 53% de los casos respectivamente (Tablas 13 y 14). Ensayos de fecundación *in vitro* en otra especie de *Calomys* (Roldán et al., 1985), *C. callidus*, obtuvieron tasas de fecundación de 46.6% utilizando el medio BWB y sin capacitación previa de los espermatozoides. Si bien las tasas de fecundación varían notablemente bajo condiciones experimentales diferentes (Niwa et al., 1980) las tasas de fecundación *in vitro* obtenidas en las distintas especies de *Calomys* resultan inferiores a aquellas que se hallaron y se describen en la literatura para las fecundaciones homólogas de ratón y de hamster. En la fecundación *in vitro* entre gametas homólogas es común que algunos oocitos no sean fecundados aún cuando exista un número significativo de oocitos fecundados normalmente. Esta falla podría deberse a anomalías propias de los oocitos y/o a las “envolturas” del mismo (cúmulo, zona pelúcida, membrana plasmática). En algunos casos, a pesar que los oocitos puedan ser inseminados estos no presentan luego una morfología normal a pesar de no existir causas aparentes y a pesar que la motilidad y morfología de los espermatozoides fuera normal (Bedford y Kim, 1993).

Las variaciones morfológicas en los espermatozoides pueden relacionarse con modificaciones en el área de contacto entre oocito y espermatozoide en el momento de la fusión (Feito y Barros, 1982). Así, estas variaciones pueden desencadenar distintos ritmos de oscilación del Ca^{2+} y promover activaciones abortivas incompatibles con el desarrollo. En roedores, en particular, la morfología espermática es altamente variable (Roldán et al,1992). Incluso entre razas ó cepas de una misma especie es factible observar alteraciones sutiles de morfología espermática que caracteriza a un linaje particular. De hecho, las distintas cepas de *Mus musculus* muestran variaciones

morfológicas en sus espermatozoides y es de destacar que para esta especie (usando distintas cepas) se han descrito diferentes ritmos de oscilación del Ca^{2+} intracelular en el momento de la fecundación (Ozil & Swann, 1995). La variabilidad espermática puede constituir, pues, un elemento fundamental en la incompatibilidad gamética entre especies estrechamente relacionadas.

A pesar de las diferencias morfológicas entre los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* estos fueron capaces de fecundar *in vitro* oocitos heterólogos -*C. musculinus* x *C. laucha* y *C. laucha* x *C. musculinus*- . Los cruzamientos heterólogos entre *C. musculinus* y *C. laucha* mostraron distintas relaciones de afinidad entre sus gametas que se vió reflejado en la capacidad de binding (Tabla 13) como en la fecundación (Tabla 14). Los espermatozoides de *C. laucha* tuvieron más afinidad por los oocitos de *C. musculinus* que a la inversa pero la unión no fue unidireccional como ocurre generalmente en las interacciones heterólogas (Bedford, 1977; Roldán y Yanagimachi, 1987; Uto et al., 1988; Yoshimatsu et al., 1988; Slavik et al., 1990; Slavik y Fulka, 1992; Donoghue et al., 1992; Laszendorf et al., 1992) ya que el cruzamiento funcionó en los dos sentidos. La capacidad de unión entre oocitos de *C. laucha* y espermatozoides de *C. musculinus* y, a la inversa, oocitos de *C. musculinus* y espermatozoides de *C. laucha* implicaría que existen ligandos y receptores en la superficie de estas gametas que son capaces de reconocerse entre si y permitir los cruzamientos recíprocos (O'Rand, 1988). En la fecundación *in vitro* entre gametas heterólogas, además de las fallas corrientes que ocurren en una fecundación normal mencionadas se suman las de especificidad en la unión espermatozoide-zona pelúcida. La interacción zona pelúcida-espermatozoide entre especies diferentes pero del mismo género no sería entonces tan complicada desde el punto de vista bioquímico-molecular

como aquella entre especies de distinto género aún estrechamente emparentadas. Al diferir en el género o ser filogenéticamente distantes la interacción zona pelúcida-espermatozoide se vuelve complicada ya que los espermatozoides no compartirían el mismo receptor ni los ligandos adecuados que faciliten esta interacción. Estos conocimientos bioquímicos y moleculares refuerzan la hipótesis que las barreras que impiden o reducen la fecundación interespecífica provienen de la pérdida gradual de receptores de membrana de las gametas, como producto de la divergencia génica (Olds-Clarke, 1988; O'Rand, 1988). Este hecho conduce finalmente al aislamiento reproductivo entre las especies. De este modo la divergencia génica constituye la causa de la separación de especies, y la reducción de la fecundación interespecífica es, simplemente, el efecto de tal divergencia que mantiene la separación.

El establecimiento de barreras en la interacción de gametas podría originarse en forma abrupta en lugar de proceder de modo gradual y constituirse en causal de la separación de linajes o especies. Esta hipótesis ha sido sugerida para roedores del género *Ctenomys* a través del estudio de la distribución geográfica de las especies portadoras de los distintos tipos espermáticos y las relaciones cromosómicas entre ellas (Vitullo et al, 1988; Vitullo y Cook, 1991).

La interacción de gametas heteroespecíficas en los mamíferos puede encontrar diferentes niveles de especificidad que actúan como barreras para impedir la fecundación: tracto reproductivo, células del cúmulo, zona pelúcida y membrana plasmática del oocito (O'Rand, 1988). Para los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha*, las células del cúmulo, la zona pelúcida y la membrana plasmática no representaron barreras efectivas en su búsqueda *in vitro* de los oocitos de modo que

no actuaron para impedir el binding, ni la fecundación ni la formación de pronúcleos en los cruzamientos recíprocos.

En estudios previos (Roldán et al., 1985) de fecundaciones interespecíficas en el género *Calomys* los cruzamientos *in vitro*, de espermatozoides de *C. musculinus* x oocitos de *C. callidus* y espermatozoides de *C. laucha* x oocitos de *C. callidus* tampoco mostraron barreras a la interacción entre las gametas, y se obtuvieron porcentajes de fecundación de 13% y 4% respectivamente que representan porcentajes menores a los encontrados para las interacciones entre *C. musculinus* y *C. laucha* en la presente investigación (Cuadro comparativo #5).

En todos los casos, las fecundaciones homólogas fueron más exitosas que las fecundaciones heterólogas. Se encontraron activaciones anómalas, que fueron en algunos casos diferentes de las activaciones partenogénicas observadas tanto por la activación proveniente del oviducto (ver 3.1) como por la activación *in vitro* por manipulación (ver 3.2). Cabe suponer, entonces, que la activación podría ser producto de la interacción entre las gametas interespecíficas y muy probablemente como producto de activaciones de tipo abortivas.

Si bien las combinaciones heteroespecíficas son posibles, son menos ventajosas que las homoespecíficas (O'Rand, 1988) y, aunque en muchos casos las barreras son exitosamente sorteadas por un espermatozoide heterólogo, el embrión híbrido detiene su desarrollo rápidamente (v.g. en especies de *Mus*, West et al., 1977; o *Calomys*, Roldán et al., 1985). Estudios preliminares en *C. callidus* mostraron que los oocitos de ésta podían ser fecundados por espermatozoides heterólogos de *C. musculinus* y *C. laucha* (Roldán et al., 1985). Sin embargo, las cigotas no progresaron en muchos casos más allá del primer ciclo celular.

Cuadro Comparativo #5

Fecundación *in vitro* de oocitos de *C. musculus*, *C. laucha* y *C. callidus* por espermatozoides homólogos y heterólogos del mismo género

oocitos	Espermatozoides	
	<i>C. musculus</i>	<i>C. laucha</i>
	fecundación (%)	fecundación (%)
<i>C. musculus</i>	55	28.
<i>C. laucha</i>	18	53.33
<i>C. callidus</i> *	12.7	4.3

* datos tomados de Roldán et al., 1985

Las fecundaciones heterólogas entre *C. musculus* y *C. laucha* mostraron que la zona pelúcida y la membrana plasmática de sus oocitos pudieron ser penetradas por los espermatozoides de modo recíproco. Esto reforzaría la hipótesis que las fecundaciones interespecíficas son posibles y que la barrera de aislamiento reproductivo entre estas especies simpátricas no estaría a nivel de la zona pelúcida. Los embriones híbridos de estas especies no progresaron más allá del primer ciclo celular. Si bien la detención precoz de tales embriones híbridos puede originarse en la falta de complementariedad de los genomas parentales (incompatibilidad genómica), estos ejemplos advierten también la necesidad de contemplar otro nivel funcional que puede generar incompatibilidad entre gametas heteroespecíficas: la activación del oocito.

La activación del oocito de mamíferos va acompañada de una serie de incrementos de la concentración del calcio intracelular desencadenada por la fusión del espermatozoide en el momento de la fecundación (Miyazaki, 1990). Esta actividad repetitiva del calcio intracelular es esencial para el normal desarrollo de la activación puesto que regula la exocitosis de los gránulos corticales (Cherr et Ducibella, 1990), la finalización de la segunda división meiótica y la organización temporal del desarrollo de los pronúcleos (Vitullo & Ozil, 1992). Las alteraciones en el ritmo de esta actividad pueden provocar una activación anómala abortiva, caracterizada por una nueva detención del oocito en metafase (Metafase III, Kubiak, 1989) (Vitullo & Ozil, 1992) incompatible con el desarrollo ulterior de la cigota. Este hecho sugiere que la activación puede constituir un nivel funcional de incompatibilidad gamética desencadenado por la fusión de un espermatozoide atípico en el momento de la

fecundación, especialmente dado que los ritmos de oscilación de Ca^{2+} intracelular muestran especificidad de especie (Schultz y Kopf, 1995).

En el caso de *C. musculus* y *C. laucha* no puede concluirse que la falla en la progresión de los embriones híbridos se debió a la alteración en los ritmos de oscilación de calcio ya que en las fecundaciones homólogas los embriones tampoco pudieron desarrollarse más allá del primer ciclo celular. Las fallas de este desarrollo permanecen entonces en el plano especulativo ya que estos estudios necesitan ser profundizados para determinar sus posibles causas.

5.d.4. Interacciones gaméticas entre *Calomys*-hamster y *Calomys*-ratón.

Los espermatozoides de *Calomys* se comportan de modo particular y exhiben características que sorprendentemente son más parecidas a las de los espermatozoides de los cricétidos del Viejo Mundo (hamster) que a los de los múridos del Viejo Mundo (ratón y rata).

Las observaciones de la afinidad de los espermatozoides de cada una de estas especies en relación a oocitos heterólogos mostró interacciones sorprendentes.

Interesantemente, los espermatozoides de *C. laucha* y de *C. musculus* tuvieron más capacidad de "attachment" y "binding" por los oocitos de hamster dorado que por los espermatozoides de ratón.

La interacción espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* por oocitos heterólogos de hamster dorado y de ratón fue menos frecuente que la que mostraron por los oocitos homólogos y aún heterólogos del género *Calomys* (Tablas 15 y 16).

La interacción entre *Calomys* y *Mus musculus* no fue positiva ni cuando se incubaron oocitos de *Calomys* con espermatozoides de *Mus* ni al incubar oocitos de *Mus* con

espermatozoides de *Calomys*. Esto se vió reflejado en que no hubo binding de los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* a la zona pelúcida de *Mus musculus* y en que los espermatozoides de *Mus* tuvieron muy poca afinidad por los oocitos de *C. musculinus* y *C. laucha*. La observación de los oocitos luego de la inseminación no mostró evidencias ni de penetración de la zona pelúcida, ni de decondensaciones de cabezas de espermatozoides por lo cual no se observó tampoco la formación de pronúcleos.

A pesar que el binding y el attachment de los espermatozoides de *C. musculinus* y de *C. laucha* por los oocitos de hamster fue bajo para ambas especies esta unión fue suficiente para que los espermatozoides de *Calomys* pudieran unirse a la zona pelúcida de hamster, atravesarla, fusionarse con la membrana plasmática, activar el oocito de hamster y poner en marcha la maquinaria nuclear para dar origen a la formación de pronúcleos.

Lo más sorprendente de estos resultados es que las interacciones espermatozoides de *C. musculinus* x oocitos de hamster y *C. musculinus* x oocitos de *C. musculinus* mostraron porcentajes de fecundación similares (cuadro comparativo #6). Contrariamente los espermatozoides de *C. musculinus* tuvieron menos capacidad para fecundar a los oocitos de *C. laucha* que a los oocitos de hamster (cuadro comparativo #6). En *C. laucha* ocurrió lo mismo. Las interacciones espermatozoides de *C. laucha* x oocitos de hamster y *C. laucha* x oocitos de *C. laucha* mostraron porcentajes de fecundación similares (Cuadro comparativo #6). Contrariamente los espermatozoides de *C. laucha* tuvieron menos capacidad para fecundar a los oocitos de *C. musculinus* que a los oocitos de hamster (Cuadro comparativo #6).

Cuadro comparativo #6

**Capacidad fecundante de los espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha*
por oocitos homólogos y heterólogos**

	Espermatozoides			
	<i>C. musculus</i>		<i>C. laucha</i>	
oocitos	binding (5 hs)	fecundación (%)	binding (5 hs)	fecundación (%)
<i>C. musculus</i>	7-12	55	>20	28.
<i>C. laucha</i>	1-6	18	13-20	53.33
<i>C. callidus</i> *	?	13	?	4
hamster	0-1	47.22	0-1	52.94
ratón	0	0	0	0

*Tomado de Roldán et al., 1985; ?: no hay datos

Estos resultados resultan sorprendentes. Cabría esperar que los espermatozoides de *Calomys* fecundaran más frecuentemente a oocitos del mismo género que otros de distinto género.

Los conocimientos sobre las interacciones entre espermatozoide-zona pelúcida en mamíferos y los sorprendentes resultados de interacción gamética entre cricétidos del Viejo Mundo (hamster), y Muridos (ratón) y los *calomys* que son cricétidos del Nuevo Mundo brindan muchas herramientas para profundizar en la naturaleza de estas interacciones. En primer lugar el hecho de que *Calomys* sea capaz de unirse y atravesar la zona pelúcida de hamster, y activar el oocito de hamster permite suponer que existiría más afinidad entre *Calomys*-hamster que entre *Calomys*-ratón. Esta especulación, basada en las características de los espermatozoides de estas especies y en su interacción sustentaría la clasificación taxonómica de Reig (1982) que contempla a los *Calomys* dentro de la familia Cricetidae junto con los hamster pero en una subfamilia aparte, Sigmodontinae. Esto nos permitiría suponer que los *Calomys* tendrían ligandos en el oocito o receptores en el espermatozoide emparentados a los de hamster.

Capítulo 6

Discusión final: *Calomys*, un nuevo modelo para el estudio de la biología del desarrollo.

Calomys ha sido objeto de numerosos estudios ecológicos y epidemiológicos, pero no se le ha tenido en cuenta hasta el momento como modelo experimental para biología del desarrollo. Esto ha llevado a un retraso en el conocimiento de las características reproductivas de este género en cautiverio y en sus poblaciones naturales.

Gran parte del interés que han despertado las especies del género *Calomys* se debe a que son vectores de Arenavirus y protozoos peligrosos para la salud del hombre. *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* actúan como reservorio natural del virus Junín (Sabattini et al., 1977; Weissenbacher y Damonte, 1983), un Arenavirus perteneciente al complejo Machupo-Tacaribe, y que es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina. *Calomys callosus* ha sido reportado como reservorio, de otro Arenavirus, del virus Machupo (Johnson et al., 1966; 1975), y de flagelados tales como *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas (Ribeiro, 1973). Algunos autores han implicado a *Calomys laucha* y *Calomys msuculinus* como posibles reservorios de *T. cruzi* (Moretti et al., 1980). La dispersión geográfica de *Calomys* fue acompañada por especiación cromosómica. Datos bioquímicos sugieren que la divergencia de estas especies fue temprana y habría ocurrido hace por los menos 6 millones de años (Gardenal et al., 1990). Estudios cromosómicos realizados por Vitullo et al. (1990) y Espinosa et al. (1997) han permitido establecer las relaciones filogenéticas del género en base a sus características cariológicas. Básicamente, a partir de un cariotipo ancestral $2n=70$ (Pearson y Patton, 1976) con todos sus cromosomas telocéntricos, se habrían producido distintas fusiones céntricas e inversiones que habrían ido originando las diferentes especies. Este modelo de evolución cromosómica del género permite interrelacionar las diferentes especies reconocidas a través de reordenamientos cromosómicos, y, permite disponer, en el

género, de un mismo genoma que ha sufrido una transformación progresiva y generado la separación de diferentes especies plenas.

En el presente estudio se caracterizaron las gametas femenina y masculina de *Calomys musculinus* y *Calomys laucha*. Esta caracterización ha puesto de manifiesto resultados sorprendentes que dan un valor adicional a estas especies sudamericanas. Los parámetros analizados en esta tesis han mostrado que las gametas de *Calomys* tienen requerimientos biológicos propios y que no pueden extrapolarse a ellos las condiciones estudiadas en los modelos convencionales.

El análisis detallado de la inducción ovulatoria en estas especies permitió establecer las condiciones óptimas de superovulación con gonadotrofinas exógenas. A pesar de la dificultad que presentan *Calomys musculinus* y *Calomys laucha* para establecer citológicamente las distintas fases del ciclo estral, debido a que las paredes uterinas están altamente cornificadas (Cutrera, 1989), se demostró que es factible superovular tanto a *C. laucha* como a *C. musculinus* independientemente del momento del ciclo estral y que a pesar de la diferencia en las dosis necesarias para inducir ovulación en cada especie ambas requieren un intervalo entre hormonas de 48 entre ellas. En contraste, estudios realizados previamente por Roldán et al., (1985) en *C. callidus* mostraron que esta requería un intervalo entre hormonas de 72 horas. Estos datos sugieren la existencia de diferentes ritmos de liberación de LH endógena dentro del género lo cual constituiría una particularidad entre los cricétidos sudamericanos. Aunque presentan diferencias, en las concentraciones hormonales y en el intervalo entre hormonas, el nivel de la respuesta al tratamiento es muy similar para las tres especies. Estas diferencias podrían probablemente deberse a las diferencias en el peso corporal entre ellas.

Tanto para *C. musculinus* como *C. laucha* la ovulación se inicia alrededor de las 10 horas post-hCG y se completa entre las 14-15 hs post hCG. Esto representa una diferencia más con ratón, rata y hamster dorado (ver cuadro comparativo #7) donde la ovulación se completa como muy temprano entre las 16 y 20 hs post-hCG (Yanagimachi et Chang, 1964; Gates 1971; Niwa et Chang, 1974) y en el hamster chino ésta se inicia entre las 13-14 hs post-hCG y se completa entre las 20-21 hs post -hCG (Roldán et al., 1987). Si bien los oocitos de *C. musculinus* y *C. laucha* pudieron recuperarse por ruptura de ampulla, cabe mencionar que la dilatación de la misma no es tan prominente como en el caso de las ampulas de ratón y rata que se superovularon a efectos comparativos (datos no mostrados). En *C. musculinus* las hembras que presentaron una mejor respuesta superovulatoria son aquellas de entre 61-90 días de edad, en tanto que en *C. laucha* las hembras de entre 30-60 días de edad fueron aquellas que respondieron mejor.

Dada la calidad y vitalidad de los oocitos obtenidos mediante los protocolos superovulatorios establecidos en esta tesis, han sido factible su uso para estudios de activación partenogenética y fecundación *in vitro* homóloga y heteróloga.

La respuesta a los estímulos de activación partenogenética *in vitro* de *C. musculinus* y *C. laucha* fue positiva. Los oocitos maduros de ambas especies han podido activarse *in vitro* con etanol y cloruro de estroncio mostrando porcentajes de activación superiores a los de los modelos convencionales. Los embriones partenogenéticos de ambas especies pudieron desarrollarse *in vitro* permitiendo conocer su dinámica de activación, extrusión del segundo cuerpo polar, y formación de pronúcleos. Los oocitos de *Calomys* al igual que todos los mamíferos se ovulan detenidos en Metafase II (MII) y permanecen detenidos en este estadio hasta que son estimulados

(por el espermatozoide o por un estímulo partenogénico) a reiniciar la meiosis. Se ha hipotetizado que los oocitos maduros sintetizan constantemente un grupo de proteínas, el factor citostático (CSF) o la proteína de c-mos entre ellas, que ejercerían la función de mantener los oocitos detenidos en MII. El espermatozoide fecundante inicia normalmente numerosas y periódicas oscilaciones de calcio en el oocito que durarán varias horas dependiendo de las especies (Cuthbertson et al., 1981; Miyazaki, 1990; Kline and Kline, 1992; Fissore and Robl, 1992, Schultz, 1995). Se cree que la función de estas oscilaciones de Ca^{2+} es la de destruir el CSF existente e impedir su síntesis de novo (Masui et al., 1984; Parrish et al., 1992) lo que reanudaría la meiosis. En contraste con el efecto del espermatozoide, el etanol induce un único incremento de Ca^{2+} que podría destruir el CSF existente pero tal vez no podría impedir totalmente la síntesis de novo (Cuthbertson et al., 1981; Fissore and Robl, 1992). Esta podría ser la causa por la cual no todos los oocitos se activan.

El desarrollo de los eventos nucleares y la progresión desde un estadio hacia el otro procedió de manera comparable a los modelos convencionales. Los oocitos de ambas especies reiniciaron la meiosis haciéndose visible la extrusión del segundo cuerpo polar entre 2-2.5 horas post-estímulo partenogénico. A las 6 horas la mayoría de los oocitos mostraron signos de estar formando los pronúcleos que estaban claramente diferenciados a las 8 horas.

A diferencia de los oocitos maduros de ratón, los de *Calomys* pudieron ser activados sin necesidad de envejecimiento previo en el oviducto. Esto además está en estrecha relación con el timing de ovulación de *Calomys* ya que los oocitos maduros pueden ser recuperados entre 4-5 horas antes que los de ratón.

Los oocitos de *C. musculus* y *C. laucha* pudieron ser activados por espermatozoides homólogos y heterólogos.

La gameta masculina de *C. musculus* y *C. laucha* al igual que la gameta femenina, también mostró requerimientos propios para la especie.

Los espermatozoides de *C. musculus* y *C. laucha* incubados en medio Talp lograron adquirir su capacidad fecundante al igual que los espermatozoides de hamster pero requieren tiempos de capacitación de 90 min para *C. musculus* y 60 min para *C. laucha*. Cuando los espermatozoides están hiperactivados giran en círculos al igual que el espermatozoide de hamster diferenciándose del patrón de hiperactivación característico de ratón, denominado movimiento en “x” (Yanagimachi, 1994).

Si bien las combinaciones heteroespecíficas son posibles, son menos ventajosas que las homoespecíficas (O’Rand, 1988) y, aunque en muchos casos las barreras son exitosamente sorteadas por un espermatozoide heterólogo, el embrión híbrido detiene su desarrollo rápidamente (v.g. en especies de *Mus*, West et al., 1977; o *Calomys*, Roldán et al., 1985). Estudios preliminares en *C. callidus* mostraron que los oocitos de ésta podían ser fecundados por espermatozoides heterólogos de *C. musculus* y *C. laucha* (Roldán et al., 1985). Sin embargo, las cigotas no progresaron en muchos casos más allá del primer ciclo celular.

Las fecundaciones heterólogas entre *C. musculus* y *C. laucha* mostraron que la zona pelúcida y la membrana plasmática de sus oocitos pudieron ser penetradas por los espermatozoides de modo recíproco. Esto reforzaría la hipótesis que las fecundaciones interespecíficas son posibles y que la barrera a la fecundación interespecífica entre estas especies no estaría a nivel de la zona pelúcida. Los embriones híbridos de estas especies no progresaron más allá del primer ciclo celular. Si bien la detención precoz

de tales embriones híbridos puede originarse en la falta de complementariedad de los genomas parentales (incompatibilidad genómica), estos ejemplos advierten también la necesidad de contemplar otro nivel funcional que puede generar incompatibilidad entre gametas heteroespecíficas: la activación del oocito. La activación del oocito de mamíferos va acompañada de una serie de incrementos de la concentración del calcio intracelular desencadenada por la fusión del espermatozoide en el momento de la fecundación (Miyazaki, 1990). Esta actividad repetitiva del calcio intracelular es esencial para el normal desarrollo de la activación puesto que regula la exocitosis de los gránulos corticales (Cherr et Ducibella, 1990), la finalización de la segunda división meiótica y la organización temporal del desarrollo de los pronúcleos (Vitullo & Ozil, 1992). Las alteraciones en el ritmo de esta actividad pueden provocar una activación anómala abortiva, caracterizada por una nueva detención del oocito en metafase (Metafase III, Kubiak, 1989) (Vitullo & Ozil, 1992) incompatible con el desarrollo ulterior de la cigota. Este hecho sugiere que la activación puede constituir un nivel funcional de incompatibilidad gamética desencadenado por la fusión de un espermatozoide atípico en el momento de la fecundación, especialmente dado que los ritmos de oscilación de Ca^{2+} intracelular muestran especificidad de especie (Schultz y Kopf, 1995).

Los espermatozoides de *Calomys* se comportan de modo particular y exhiben características que sorprendentemente son más parecidas a las de los espermatozoides de los cricétidos del Viejo Mundo (hamster) que a los de los múridos del Viejo Mundo (ratón y rata). Las observaciones de la afinidad de los espermatozoides de cada una de estas especies en relación a oocitos heterólogos mostró interacciones sorprendentes.

Interesantemente, los espermatozoides de *C. laucha* y de *C. musculinus* tuvieron más capacidad de "attachment " y "binding" por los oocitos de hamster dorado que por los espermatozoides de ratón. La interacción espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* por oocitos heterólogos de hamster dorado y de ratón fue menos frecuente que la que mostraron por los oocitos homólogos y aún heterólogos del género *Calomys*.

La interacción entre *Calomys* y *Mus musculus* no fue positiva ni cuando se incubaron oocitos de *Calomys* con espermatozoides de *Mus* ni al incubar oocitos de *Mus* con espermatozoides de *Calomys*. Esto se vió reflejado en que no hubo binding de los espermatozoides de *C. musculinus* y *C. laucha* a la zona pelúcida de *Mus musculus* y en que los espermatozoides de *Mus* tuvieron muy poca afinidad por los oocitos de *C. musculinus* y *C. laucha*. La observación de los oocitos luego de la inseminación no mostró evidencias ni de penetración de la zona pelúcida, ni de decondensaciones de cabezas de espermatozoides por lo cual no se observó tampoco la formación de pronúcleos.

A pesar que el binding y el attachment de los espermatozoides de *C. musculinus* y de *C. laucha* por los oocitos de hamster fue bajo para ambas especies esta unión fue suficiente para que los espermatozoides de *Calomys* pudieran unirse a la zona pelúcida de hamster, atravesarla, fusionarse con la membrana plasmática, activar el oocito de hamster y poner en marcha la maquinaria nuclear para dar origen a la formación de pronúcleos.

Los conocimientos sobre las interacciones entre espermatozoide-zona pelúcida en mamíferos y los sorprendentes resultados de interacción gamética entre cricétidos del Viejo Mundo (hamster), y Muridos (ratón) y *Calomys* (cricétidos del Nuevo Mundo) sustentaría la clasificación taxonómica de Reig (1982) que contempla a los *Calomys*

sustentaría la clasificación taxonómica de Reig (1982) que contempla a los *Calomys* dentro de la familia Cricetidae junto con los hamster pero en una subfamilia aparte, Sigmodontinae. Esto nos permitiría suponer que los *Calomys* tendrían ligandos en el oocito o receptores en el espermatozoide emparentados a los de hamster.

En síntesis, el desarrollo de esta tesis ha logrado aportar nuevos conocimientos en el área de la biología del desarrollo en el género *Calomys*.

Los parámetros estudiados (superovulación, activación partenogenética, dinámica de capacitación *in vitro* del espermatozoide, fecundaciones homólogas interespecíficas) **han mostrado que estas especies tienen características propias inherentes a su propio género y especie** (por ejemplo, ritmo endógeno de LH, activación partenogenética, capacitación *in vitro* del espermatozoide) **por lo cual no pueden ser homologables a los modelos convencionales de roedores de laboratorio sino que constituyen en sí mismos un modelo nuevo para estudios de biología del desarrollo.**

Ha confirmado que las células del cúmulo, la zona pelúcida, y/o la membrana plasmática del oocito no constituyen un nivel efectivo a la fecundación heteróloga intragenérica.

Ha evidenciado que la diferencia en la morfología espermática entre *C. musculinus* (con gancho acrosomal) y *C. laucha* (ausencia total de gancho acrosómico) no representa en sí misma una causa del aislamiento reproductivo ni ha mostrado tener una relación con las activaciones anómalas en el proceso de activación.

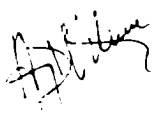
Ha revelado sorprendentemente que las gametas de *Calomys* tienen mayor afinidad por las gametas de hamster (Cricetidae) que por las gametas de ratón (Muridae). Estas últimas observaciones permiten reafirmar la hipótesis de que estas especies pertenecerían a la misma familia, Cricetidae, tal como lo propusiera Reig (1982).

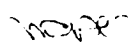
Por otra parte, estos hallazgos, refuerzan la hipótesis que las barreras que impiden o reducen la fecundación interespecífica provienen de la pérdida gradual de receptores de membrana de las gametas, como producto de la divergencia génica (Olds-Clarke, 1988; O'Rand, 1988). Este hecho conduce finalmente al aislamiento reproductivo entre las especies. De este modo la divergencia génica constituye la causa de la separación de especies, y la reducción de la fecundación interespecífica es, simplemente, el efecto de tal divergencia que mantiene la separación.

La comparación de las características reproductivas entre *Calomys* y el resto de los roedores (cuadro comparativo 7) muestra que existen diferencias fundamentales entre ellos. Si comparamos con ratón, por ejemplo, veremos que el período de gestación es de 21 días para *Calomys* y de 20 días para ratón; que *Calomys* tiene un ciclo estral de 4 días que es imposible de determinar por extendido vaginal, en tanto que en ratón el ciclo oscila entre los 4-5 días y puede determinarse por extendido vaginal. El timing de ovulación es más corto en *Calomys* que en ratón, hecho que se refleja en el horario de recolección de los oocitos maduros que es entre las 14-15 horas post-hCG en *Calomys* y entre las 18-20 horas en ratón. No sólo la gameta femenina de *Calomys* tiene características distintas. Los espermatozoides de *Calomys* han mostrado que se capacitan mejor en medio para hamster, Talp-10K, que en medio de ratón, T6. Por

otra parte el patrón de hiperactivación del espermatozoide de *Calomys* es similar al de hamster y no se asemeja en nada al de ratón. Más allá las diferencias en la fecundación *in vitro*, la fecundación *in vivo* también presenta diferencias ya que se ha observado, por ejemplo, que luego del coito las hembras de *Calomys* no muestran el tapón vaginal característico de las hembras de ratón demostrando la cópula. En el caso de *Calomys* es necesario hacer un frotis vaginal para observar la presencia de los espermatozoides .

Estos estudios han reforzado una vez más que la diversidad de las características reproductivas de los roedores es aún mayor que lo que hasta ahora se había supuesto (cuadro comparativo 7). Esto no debería sorprendernos si consideramos al número de especies como una medida de la diversidad de un grupo zoológico, y si recordamos que este orden comprende a una cuarta parte de las especies de mamíferos vivientes. Pero sobre todo si consideramos también que los cricétidos sudamericanos comprenden a su vez a una cuarta parte de las especies de sigmodontinos.


Dr. Rafael Vitalo


Lic. T. Vides Lasso

Cuadro Comparativo #7
Comparación de datos reproductivos de diferentes especies de roedores

	<i>C.musculus</i>	<i>C.laucha</i>	<i>C.callidus</i>	Ratón*	Hamster	Rata*
Datos vitales						
Peso del adulto en (g)	25-30	17-22	40-50	25-30	150	250-400
longevidad típica (años)	1-2	1-2	1-2	1-2	2-3	2-3
edad de pubertad (días)	45-50	35-40	45	35	45-60	45-75
sist. de apareamiento ^a	M, H	M, H	M,H	M, C	M	M, H
gestación (días)	21	21	21	20	16	21-23
tamaño de camada	4-8	6-10	3-9	6-10	4-8	6-12
ciclo estral (días)	4	4	4 (?)	4-5	4	4-5
ovulación ^b	S	S	S	S	S	S
Superovulación						
PMSG-hCG	12-15	8-8	50-75	10-10	50-50	40-10
intervalo hormonas (hs)	48-50	48-50	72	48	52-56	40-50
recolección oocitos (hs)	14-15	14-15	16-18	18-20	18-21	18-20
supeovulación (rango)	12-45	12-40	12-51	30-40	40-50	13-15
Espermatozoides						
medio de capacitación	Talp	Talp		T6, M199	Talp	Tyrode
tiempo capacitación (hs)	1.5	1		1-2	2-3	5-6
mov. Hiperactivación	circular	circular		"X"	circular	-
Fecundación <i>in vivo</i>						
tapón vaginal	-	-	?	+	?	+

* datos tomados de Festing (1987).

^a Sistema de apareamiento necesario para mantener la colonia: M: par monogámico, H: harem (un macho-varias hembras, separadas después del parto), C: colonia (un macho y muchas hembras permanentemente apareados)

^b Ovulación: S:espontánea, I: inducida

Los datos vitales de *C. callidus* fueron tomados de Hodara et al (1984)

Capítulo 7

BIBLIOGRAFIA

Ahuja-Bowell. 1983. Probable asymmetry in the organization of components of the hamster zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility* 69: 49-55.

Alvarez AC, Storey BT. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of reproduction* 29:548-555.

Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Journal of Science Research* 4: 581-596.

Austin CR. 1952. The capacitation of mammalian sperm. *Nature* 170: 326.

Austin CR. 1960. Capacitation and the release of hyaluronidase from spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 3: 310-311.

Austin CR, Braden AWH. 1954. Induction and inhibition of the second polar division in the rat egg and subsequent fertilization. *Science* 7: 537-542.

Baker T. 1982. Oogenesis and ovulation. En: *Reproduction in mammals*. Austin and Short (Eds.), pp. 17-45. Cambridge University Press.

Barros C, Gonzalez J, Herrera E, Bustos-Obregon E. 1978. Fertilizing capacity of human spermatozoa evaluated by actual penetration of foreign eggs. *Contraception* 17:87-92.

Barros C, Jedlicki A, Bize I, Aguirre E. 1979. Relationship between the length of sperm preincubation and zona penetration in the golden hamster: a scanning electron microscopy study. *Gamete Research* 233: 268-269.

Barros C, Jedlicki A, Bize I, Aguirre E. 1984. Relationship between the lengths of sperm preincubation in the golden hamster: A scanning electron microscope study. *Gamete Research* 9:31-43.

Barros C, Crosby JA, Moreno RD. 1996. Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization. *Cell Biology International* 20: 33-39.

Barnett DK and Bavister BD. 1996. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular Reproduction and Development* 43: 105-133.

Bavister BD, Yanagimachi R, Teichman RJ. 1976. Capacitation of hamster spermatozoa with adrenal gland extracts. *Biology of Reproduction* 14: 219-221.

Bavister BD, Boatman DE, Liebfried L, Loose M, Vernon MW. 1983. Fertilization and cleavage of Rhesus monkey oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction* 28: 983-999.

Bedford JM. 1977. Sperm-egg interaction: The specificity of human spermatozoa. *Anatomical Record* 188: 477-488.

Bedford JM, Kim HH. 1993. Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, *in vivo*. *Human Reproduction* 8: 453-463.

Belton RJ, Foltz KR. 1995. Gamete and immune cell recognition revisited. *Bioessays* 17: 1075-1080.

Bender R, Surani MA, Kothary R, Li L, Furst DO, Christ B, Fundele R. 1995. Tissue specific loss of proliferative capacity of parthenogenetic cells in fetal mouse chimeras. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 204: 436-443.

Ben-Yosef D, Oron Y, Shalgi R. 1995. Low temperature and fertilization-induced Ca^{2+} changes in rat eggs. *Molecular Reproduction and Development* 42: 122-129.

Betteridge KJ. 1995. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology* 44: 1061-1098.

Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. 1988. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: a role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Developmental Biology* 128: 376-385.

Bos-Mikich A, Swann K, Ozil JP, MacCarthy A, Whittingham DG. 1993. Parthenogenic Activation of Mouse eggs by Strontium. *Journal of Reproduction and Fertility. Abstract Series. Number 11.*

Bos-Mikich A, Whittingham DG. 1995. Analysis of the chromosome complement of frozen-thawed mouse oocytes after parthenogenetic activation. *Molecular Reproduction and Development* 42:254-260.

Bos-Mikich A, Swann K, Whittingham DG. 1995. Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 41:84-90.

Busch M, Kravetz FO, Percich RE, Zuleta GA. 1984. Propuestas para un control ecológico de la fiebre hemorrágica argentina a través del manejo del hábitat. *Medicina* (44): 34-40.

Chan PJ, Hutz RJ, Dukelow WR. 1982. Nonhuman primate *in vitro* fertilization seasonability cumulus cells, cyclic nucleotides, ribonucleic acid and viability assays. *Fertility and Sterility* 38: 609-615.

Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. *Nature*: 168: 997-998.

Chang MC. 1984. The meaning of sperm capacitation. *Journal of Andrology* 5: 45-50.

Chang MC. 1957. Natural occurrence and artificial induction of parthenogenetic cleavage of ferret ova. *Anatomical records* 128: 187-199.

Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan ES and Barnes FL. 1993. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 34: 212-223.

Conaway CH. 1971. Ecological adaptation and Mammal Reproduction. *Biology of Reproduction* 4: 239-247.

Contreras JR ,Rossi MS. 1980. Comportamiento territorial y fidelidad en una población de roedores del centro de la Pcia de Mendoza. *Ecología* 5: 17-29.

Colledge WH, Carlton MBL, Udy GB, Evans MJ. 1994. Disruption of c-mos cuses parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370:65-67.

Crespo JA. 1966. Ecología de una comunidad de roedores silvestres en el partido de Rojas, Buenos Aires. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales. Ecología* 1: 79-134.

Crisp TM. 1992. Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis, ovulation or atresia. *Mutation Research* 296: 89-106.

Croteau S, Menezo Y, Benkhalifa M. 1995. Transforming growth factors-a and b-expression in fertilized and parthenogenetic preimplantation mouse embryos:RNA detection with fluorescent in situ hybridization. *Development, Growth and Differentiation* 37: 433-440.

Cuthbertson KSR, Whittingham DG and Cobbold PH. 1981. Free Ca²⁺ increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 294: 754-757.

Cuthbertson KSR. 1983. Parthenogenetic activation of mouse oocyte *in vitro* with ethanol and benzyl alcohol. *Journal of Experimental Zoology* 226: 311-314.

Cutrera R. 1989. El ciclo ovárico del ratón de campo, *Calomys musculus*. Tesis Doctoral. Universidad de San Luis.

De Sutter P, Dozorteu D, Cieslak J, Wolf G, Verlinsky Y, Dyban A. 1992. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 9: 328-337.

Didion BA, Martin MJ and Markert CL. 1990. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 33:1165-1175.

Donoghue AM, Howard JG, Byers AP. 1992. Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization *in vitro* in the cheetah (*Acinomys jubatus*). *Biology of Reproduction* 46: 1047-1056.

Downs SM. 1993. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 39: 65-79.

Dunbar BS. 1983. Morphological, biochemical, and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida. En: *Mechanism and Control of Animal fertilization*. Hartmann JF (Ed.), New York, Academic Press, pp. 139-175.

Dunbar BS, O'Rand MG. 1991. A comparative overview of mammalian fertilization. New York, Plenum Press, pp. 97-114.

Dunbar BS, Avery S, Lee V, Prasard S, Schwahn D, Schowobel E, Skinner S, Wilkins B. 1994. The Mammalian Zona Pellucida: its Biochemistry, Immunochemistry, Molecular Biology, and Developmental Expression. *Reproduction, Fertility and Development* 6: 331-347.

Espinosa MB, Lasserre A, Piantanida M, Vitullo AD. 1997. Cytogenetics of vesper mice, *Calomys* (Sigmodontinae): a new karyotype from the Puna region and its

implication for chromosomal phylogeny. Cellular and Molecular Life Sciences 53: 583-586.

Eppig JJ, Schultz RM, O' Brien M, Chesnel F.1994. Relationship between the development programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Developmental Biology 164:1-9.

Feito R, Barros C. 1982. Ultrastructure of the head of *Ctenomys maulinus* spermatozoa with special reference to the nucleus. Gamete Research 5: 317-321.

Festing FW. 1987. Choice of an experimental animal and rodent genetics. Postimplantation Mammalian Embryos. Copp AJ and Cockroft DL (Eds.), IRL Press, pp. 205-219.

Fissore RA and Robl JM. 1992. Intracellular Ca^{2+} response of rabbit oocytes to electrical stimulation. Molecular Reproduction and Development. 32: 9-16.

Fissore RA and Robl JM. 1993. Calcium changes by sperm and by other agonists in rabbit eggs. Theriogenology 39: 218 .

Florman HM, Storey BT.1982. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. Developmental Biology 91: 121-130.

Fraser LR. 1995. Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction. Human Reproduction 10: 22-30.

Fulton BP and Whittingham DG. 1978. Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. Nature 273:149-151.

Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Iwazumi Y, Ohsaki K. 1992. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and CCB after *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development* 33: 357-362.

Gardenal CN, García BA, Sabattini MS, Blanco A. 1990. Protein polymorphism and genetic distance in South American cricetid rodents of the genus *Calomys*. *Genetica* 80: 175-180.

Graham CF. 1974. The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biological Reviews* 49: 399-422.

Gwatkin RBL, Williams. 1977. Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *Journal of Reproduction and fertility* (49):55-59.

Hartshorne GM, Sargent JL and Barlow DH. 1994. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles *in vitro* in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cAMP and hypoxanthine. *Human Reproduction* 9: 1003-1012.

Hershkovitz P. 1962. Evolution of neotropical cricetinae rodents (Muridae) with special reference to the Phyllotini group. *Fieldiana Zoology* 46: 1-525.

Henery CC, Kaufman MH. 1992 a. Cleavage rate of Haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Molecular Reproduction and Development* 31: 258-263.

Henery CC, Kaufman MH. 1992 b. Cleavage rate of diandric triploid mouse embryos during the preimplantation period. *Molecular Reproduction and development* 32: 251-258.

Henery CC, Kaufman MH. 1993 a. The cleavage rate of digenic triploid mouse embryos during the preimplantation period. *Molecular Reproduction and Development* 34: 272-279.

Henery CC, Kaufman MH. 1993 b. The incidence of aneuploidy after single pulse electroactivation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 34:299-307.

Hetherington CM. 1987. Mouse husbandry. En *Mammalian development: A practical approach*. Monk M (ed.), IRL Press, p.p: 1-12.

Hirao Y, Hiraoka J. 1987. Surface architecture of sperm tail entry into the hamster oocyte. *Development Growth and Differentiation* 29:123-132.

Hodara V, Kajon AE, Quintans C, Montoro L, Merani MS. 1984. Parámetros métricos y reproductivos de *Calomys musculinus* (Thomas, 1913) y *Calomys callidus* (Thomas, 1916) (Rodentia-Cricetidae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*(13): 453-459.

Hodara VL, Espinosa MB, Merani MS, Quintans C (1989). *Calomys laucha* (Rodentia, Cricetidae): Growth and breeding in laboratory conditions. *Laboratory Animals* 23:340-344.

Hurst LD. 1992. Intragenomic conflict as an evolutionary force. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 248: 135-140.

Jedlicki A, Barros C. 1985. Scanning electron microscope study of *in vitro* penetration gamete interactions. *Gamete Research* 11: 121-131.

Johnson MK, Kuns ML, Mackenzie RB, Webb PA, Yunker CE. 1966. Isolation of Machupo virus from wild rodent "*Calomys callosus*". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 15: 103-106.

Johnson MK. 1975. Chronic infection of rodents by Machupo virus. *Science* 150: 1618-1619.

Kaufmann MH. 1983. Early mammalian development: Parthenogenetic studies. Developmental and Cell Biology Series. Cambridge University Press.

King WA, Sirard MA, Xu XP, Greve T, Leclerc P, Lambert RD, Jacques P. 1988. Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Gamete Research* 20: 265-274.

Kline D and Kline JT. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Developmental Biology* 149: 80-89.

Kline D. 1996. Activation of the mouse egg. *Theriogenology* 45: 81-90.

Kono T, Iwasaki S, Nakahara T. 1989. Parthenogenetic activation by electric stimulus of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 22: 569-577.

Kono T, Obata Y, Yosimuzu T, Nakahara T, Carroll J. 1996. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nature Genetics* 13: 91-94.

Laszendorf SE, Holmgren WJ, Johnson DE, Scobey MJ, Jeyndran RS. 1992. Hemizona assay for measuring zona binding in the lowland gorilla. *Molecular Reproduction and Development* 31: 264-267.

Laurincik J, Kopecny V and Hyttel P. 1995. Detailed analysis of pronucleus development in bovine zygotes *in vivo*: ultrastructure and cell cycle chronology. *Molecular Reproduction and Development* 43: 62-69.

Lord R, Vilches AM, Maiztegui JI, Hall EC, Soldini CA. 1971. Frequency of rodents in habitats near Pergamino, Argentina, as related to Junin virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (20): 338-342.

Lui CW, Mrsny RJ, Meizel S. 1979. Procedure for obtaining high percentages of viable *in vitro* capacitated hamster sperm. *Gamete Research* 2: 207-211.

Maddock MB, Dawson WD. 1974. Artificial insemination of deer-mice (*Peromyscus maniculatus*) with sperm from other rodent species. *Journal of Embriology and Experimental Morphology* 31: 621-634.

Maleszewski M, Yanagimachi R. 1995. Spontaneous and sperm-induced activation of oocytes in LT/Sv strain mice. *Development, Growth and Differentiation* 37:679-685.

Mann JR, Lovell-Badge RH. 1984. Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature* 310: 66-67.

Marcus GJ. 1990. Activation of cumulus-free mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 26:159-162.

Mares MA .1977. Water independence of South American non-desert rodent. *Journal of Mammalogy* 58: 653-656.

Maudlin I and Fraser LR. 1977. The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* 50: 275-280.

Mayes MA, Stogsdill PL and Prather RS. 1995. Parthenogenetic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition. *Biology of Reproduction* 53: 270-275.

Miyazaki S. 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium*. 12: 205-216.

Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, Mikoshiba K. 1992. Block of calcium wave and calcium oscillation by antibody to the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science* 257: 251-255.

Moretti ER, Basso B, Albesa I, Ersao AJ, Kravetz FO. 1980. Infección natural de *Calomys laucha* por *Tripasoma cruzi*. *Medicina* 40: 181-186.

Moore HD, Akhondi MA. 1996. *In vitro* maturation of mammalian spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 1: 54-60.

Moore T, Haig D. 1991. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in Genetics* 7: 45-49

Mrsny RJ, Waxman L, Meizel S. 1979. Taurine maintains and stimulates motility of hamster sperm during capacitation *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology* 210: 123-128.

Murdock WJ, Hansen TR, McPherson LA. 1993. A Review of Eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins* 46: 85-115.

Musser GG and Carleton MD. 1993. *Mammal Species of the World*. Musser GG, Carleton MD, Wilson DE, and Reeder DAM (Eds), Smithsonian Institution Press, Washington-London, pp. 697-698.

Nagai T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Gamete Research* 16:243-249.

Navara CS, Wu GJ, Simerly C, Schatte G. 1995. Mammalian model systems for exploring cytoskeletal dynamics during fertilization. *Current Topics in Developmental Biology* 31: 321-341.

Niwa K, Chang MG. 1975. Fertilization of rat eggs *in vitro* at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 43: 435-451.

O'Neill GT, Rolfe LR, Kaufman, MH. 1991. Developmental potential and chromosome constitution of strontium-induced mouse parthenogenones. *Molecular Reproduction and Development* 30:214-219 .

Onodera M and Tsunoda Y. 1989. Parthenogenetic activation of mouse and rabbit eggs by electric stimulation *in vitro*. *Gamete Research* 22: 277-283.

Otaegui PJ, Wilmut I. 1993. Effect of time of activation upon development of mouse embryos reconstituted by nuclear transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*. Abstract Series. Number 11.

Otaegui PJ, Wilmut I. 1993. Effect of time of activation upon development of mouse embryos reconstituted by nuclear transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*. Abstract Series. Number 11.

Owen R. 1849. *On Parthenogenesis, or the Successive production of procreating Individuals from a Single Ovum*. London: John van Voorst.

Ozil JP. 1990. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 109: 117-127.

Ozil JP, Modlinski JA. 1986. Effects of electric field on fusion rate and survival of 2-cell rabbit embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 96: 211-228.

Ozil JP and Swann K. 1995. Stimulation of repetitive calcium transients in mouse eggs. *Journal of Physiology* 483: 331-346.

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm with heparin. *Biology of Reproduction* 38: 1171-1188.

Pearson OP, Patton JL. 1976. Relationship among South American phyllotine rodents based on chromosome analysis. *Journal of Mammalogy* 57: 339-350.

Pérez-Zapata A., Vitullo AD and Reig OA. 1987. Karyotypic and sperm distinction of *Calomys hummelincki* from *Calomys laucha* (Rodentia-Cricetidae). *Acta Cientifica Venezolana* 38: 90-93.

Phillips DM. 1991. Electron Microscopy of Mammalian Fertilization. En: *Elements of Mammalian Fertilization*, Wassarman (Ed.), Florida, CRC Press, pp. 1249-1267.

Phillips DM, Shalgi R. 1980. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *Journal of Ultrastructural Research* 72: 1-12.

Pincus DM, Shapiro S. 1940. Further studies on the parthenogenetic activation of rabbits eggs. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 25: 557-559

Pinyopummin A, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. 1993 a. Effects of cumulus and exposure period to ethanol on *in vitro* development of mouse diploid parthenogenones. *Japanese Journal of Veterinary Research* 41: 81-87.

Pinyopummin A, Takahashi Y, Cheong HT, Hishinuma M, Kanagawa H. 1993 b. Effects of cumulus and exposure period to ethanol on *in vitro* development of mouse diploid parthenogenones. *Japanese Veterinary Medical Sciences* 56: 379-380.

Presicce GA, Yang X. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured *in vitro* for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. *Molecular Reproduction and Development* 37: 61-68.

Reig OA. 1965. Datos sobre la comunidad de pequeños mamíferos de la región costera del Partido de General Pueyrredón y los partidos limítrofes (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Physis* 25: 205-211.

Reig OA. 1981. Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de América del Sur. *Naturae* 1: 1-161.

Reig OA. 1982. Distribuição geográfica e historia evolutiva dos roedores muroideos Sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). *Brazilian Journal of Genetics* 2: 333-365.

Reig OA. 1984. Significado de los métodos citogenéticos para la distinción e interpretación de las especies, con especial referencia a los mamíferos. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales, Zoología* 13: 491-498.

Ribeiro RD. 1973. Novos reservatorios do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Biol* 33: 427-437.

Roldán ERS, Yanagimachi R. 1989. Cross fertilization between Syrian and Chinese Hamsters. *The Journal of Experimental Zoology* 250: 321-328.

Roldán ERS, Gomendio G, Vitullo AD. 1992. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: Female selection and sperm competition. *Biological Reviews* 67: 551-593.

Roldán ERS, Horiuchi T, Yanagimachi R. 1987. Superovulation in immature and mature chinese hamsters. *Gamete Research* 16: 281-290.

Roldán ERS, Vitullo AD, Merani MS, von Lawzewitsch I. 1985. Cross fertilization *in vivo* and *in vitro* between three species of vesper mice, *Calomys* (Rodentia, Cricetidae). *Journal of Experimental Zoology* 233: 433-442.

Sabattini MS, González de los Ríos LE, Díaz G, Vega VR. 1977. Infección natural y experimental de roedores del virus Junín. *Medicina* 37: 149-161.

Saling PM. 1989. Development of the ability to bind zonae pellucidae during epididymal maturation. *Biology of Reproduction* 26: 429-436.

Schultz RM, Kopf GS. 1995. Molecular basis of Mammalian Egg Activation. En *Current topics in Developmental Biology*. Pedersen RA and Scatten GP (Eds.) Academic Press, pp.21-62.

Shiina Y, Kaneda K, Tanaka K, Hiroi M, Doi K. 1993. Role of the extracellular calcium on the intracellular changes in fertilized and activated mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 97:143-150.

Slavik T, Fulka J. 1992. *In vivo* fertilization of intact sheep and cattle oocytes with goat spermatozoa. *Theriogenology* 38: 721-726.

Slavik T, Pavlok A, Fulka J. 1990. Penetration of intact bovine ova with ram sperm *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 25: 345-347.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. 1975. The control of the progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat prolactin, gonadotrophin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.

Snell WJ, White JM. 1996. The Molecules of Mammalian Fertilization. *Cell* 85:629-637.

Steppan S. 1993. Phylogenetic relationship among the Phyllotini (Rodentia-Sigmodontinae) using morphological characters. *Journal of Mammalian Evolution* 1: 187-213.

Stevens LC, Varnum DS. 1974. The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Developmental Biology* 37: 369-380.

Storey BT. 1995. Interactions between gametes leading to fertilization: The sperm's eye view. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 927-942.

Surani MAH, Barton SC. 1983. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222: 1034-1036

Surani MAH, Barton SC, Norris ML. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548-550.

Surani MAH, Barton SC, Norris ML. 1986 a. Nuclear transplantation in the mouse: Heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell* 45: 127-136.

Surani MAH, Reik W, Norris ML, Barton SC. 1986 b. Influence of germline modifications of homologous chromosomes on mouse development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 97 (Suppl.): 123-136.

Surani MAH, Kothary R, Allen ND, Singh PB, Fundele R, Fergusson-Smith AC, Barton SC. 1990. Genome imprinting and development in the mouse. *Development* 110 (Suppl.): 89-98.

Swann K. 1996. Soluble sperm factor and Ca^{2+} release in eggs at fertilization. *Reviews of Reproduction*. 1: 33-39.

Swann K, Ozil JP. 1994. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *International Review of Cytology* 152: 183-222.

Szollosi MS, Borsuk E, Szollosi D. 1994. Relationship between sperm nucleus remodelling and cell cycle progression of fragments of mouse parthenogenotes. *Molecular Reproduction and Development* 37:146-156.

Taylor CW, Marshall CD. 1992. Calcium and inositol 1,4,5-triphosphate receptors: A complex relationship. *Trends in Biochemical Sciences* 17:403-407.

Tarkowski AK. 1975. Induced parthenogenesis in the mouse. *Symposium of the Society of Developmental Biology* 33: 107-129.

Tesarik J, Drahorad J, Testart J, Mendoza C. 1990. Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. *Development* 110: 391- 440.

Thomas O. 1984. On a collection of Muridae from central Peru. *Proceeding of the Society of London* 1884: 447-458.

Thibault C. 1949. L 'oeuf des mammifères et les premiers stades de développement. *Physiology of Reproduction* 7-49.

Tsunoda Y, Yasui T, Okubo Y, Nakamura K, Sugie T. 1987. *Theriogenology* 28:615-623.

Uto N, Yoshimatsu N, Lopata A, Yanagimachi R. 1988. The zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *Biology of Reproduction* 248: 113-120.

Villafañe G. 1981. Reproducción y crecimiento de "*Calomys musculinus murillus*" (Thomas, 1916). *Historia Natural* 1: 237-256.

Vitullo AD, Ozil JP. 1992. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev. Biology* 151: 128-136.

Vitullo AD, Roldán ERS, Merani MS. 1988. On the Morphology of spermatozoa of tuco-tucos, *Ctenomys* (Rodentia-Ctenomyidae): New data and its implications for the evolution of the genus. *Journal of Zoology (London)* 215: 675-683.

Vitullo AD, Espinosa MB, Merani MS. 1990. Cytogenetics of vesper mice, *Calomys* (Rodentia, Cricetidae): Robertsonian variation between *Calomys callidus* and *Calomys venustus*. *Z. Saugetierkunden* 55: 99-105.

Wakayama T, Ogura A, Matsubara Y, Kurohmaru M, Hayashi Y, Yanagimachi. 1996. Penetration of field vole spermatozoa of mouse and hamster zona pellucida without acrosome reaction. *Journal of Reproduction and Fertility* 107: 97-102.

Wakayama T, Suto J, Matsubara Y, Imamura K, Fukuta K, Toyoda Y, Kurohmaru M, Hayashi Y. 1995. *In vitro* fertilization and embryo development of Japanese field voles (*Microtus montebelli*). *Journal of Reproduction and Fertility* 104: 63-68.

Wassarman PM. 1994. The mammalian Ovum. En *The Physiology of Reproduction*. Knobil E and Neil J (Eds.), Raven Press, New York, pp. 69-102.

Wassarman PM, Mortillo S. 1991. Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *International Review of Cytology* 130: 85-110.

Wassarman P, Chengyu L, Litscher ES. 1996. Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *Journal of Cell Science* 109: 2001-2004.

Weissenbacher M, Damonte EB. 1983. Fiebre hemorrágica argentina. *Adelantos Microbiológicos y Enfermedades Infecciosas* 2: 119-171.

Whitten WK. 1971. Parthenogenesis: does it occur spontaneously in mice? *Science* 171: 406-407.

Whittaker M. 1996. Control of Meiotic arrest. *Reviews of Reproduction* 1: 127-135.

Whittingham DG. 1980. Parthenogenesis in mammals. Oxford Reviews of Reproductive Biology. Vol. 2, pp. 205-231.

Wolf DP, Vanderoort CA, Meyer-Haas GR, Zelinski-Wooten MB, Hesse DL, Baugham WL, Stouffer RL. 1989. *In vitro* fertilization and embryo transfer in the *Rhesus* monkey. Biology of Reproduction 41: 335-346.

Yanagimachi R. 1969 a. *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. Journal of Reproduction and Fertility 18: 275-286.

Yanagimachi R. 1969 b. *In vitro* acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. Journal of Experimental Zoology 170: 269-280.

Yanagimachi R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. Journal of Reproduction and Fertility 23: 193-196.

Yanagimachi R. 1984. Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Research 10: 187-232.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. En: The Physiology of Reproduction. Knobil E and Neil J (Eds.), Raven Press, pp. 89-317.

Yang X, Jiang S, Kovacs A, Foote RH. 1992. Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. Biology of Reproduction 47: 636-643.

Yoshimatsu N, Yanagimachi R. 1988. Effects of cations and other components on the zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. Development Growth and Differentiation 30: 651-659.