

METODOLOGIA PER A L'OBTENCIÓ D'EMBRIONS DE RATOLÍ A PARTIR DE LA FUSIÓ D'OÒCITS

F. Vidal^{1,2}, C. Nogués^{1,2}, M. Ponsà^{1,2} i J. Egozcue^{1,2}

¹ Departament de Biologia cel·lular i de Fisiologia.

² Institut de Biologia Fonamental Vicent Villar Palasí (UAB). 08193-Bellaterra (Barcelona).
Correspondència: Dr. F. Vidal. Departament de Biologia cel·lular i de Fisiologia. Facultat de Veterinària (UAB). 08193-Bellaterra (Barcelona).

RESUM

Aquest treball presenta una metodologia per a la fusió d'oòcits de ratolí mitjançant la utilització de virus Sendai inactivats.

Els oòcits lliures de zona pel·lúcida es mantenen en una suspensió de partícules víriques a 4 °C, els oòcits s'agrupen per parelles, i s'incuben a 37 °C per promoure la fusió de membranes.

Amb la metodologia descrita s'obté la fusió d'un 10% de parelles d'oòcits que completen la segona divisió meiótica i inicien el desenvolupament embrionari.

RESUMEN

Este trabajo presenta una metodología para la fusión de ovocitos de ratón mediante virus Sendai inactivados.

Los ovocitos desprovistos de zona pelúcida se mantienen en una suspensión de partículas víricas a 4 °C y, tras agrupar a los ovocitos por parejas, se incuban a 37 °C para promover la fusión de membranas.

Utilizando la metodología descrita se obtiene la fusión de un 10% de parejas de ovocitos, que finalizan la segunda división meiótica e inician el desarrollo embrionario.

ABSTRACT

Mouse oocytes are fused with inactivated Sendai viruses. Zona free oocytes are incubated in a suspension of inactivated viral particles at 4 °C; the oocytes get into contact and fusion is promoted by warming oocyte pairs at 37 °C.

Using the fusion technique described we demonstrate that 10% of mouse oocytes can be fused, complete the second meiotic division, and go through early embryonic development.

Key words: cell fusion, mouse embryos, oocyte fusion.

INTRODUCCIÓ

Des de la descripció per part d'Okada (1958, 1962) de tècniques per induir la fusió cel·lular, la producció d'híbrids cel·lulars (heterocarions i policarions) ha estat una metodologia àmpliament aplicada a la recerca en biologia cel·lular.

Les fusions cel·lulars han estat utilitzades, entre altres, per a l'estudi de les relacions nucli-citoplasma, per introduir material genètic d'una cèl·lula en una altra, per a estudis d'expressió gènica, en l'anàlisi del genoma somàtic (mapat gènic) i per explorar el genoma del cèl·lules no proliferants (vegeu la revisió de Ringertz & Savage, 1976).

Molt més recents són les aplicacions de les tècniques de fusió cel·lular per a la formació d'híbrids cel·lulars entre cèl·lules somàtiques i cèl·lules embrionàries, així com per a l'obtenció d'embrions a partir de blastòmers aïllats o per a la reconstrucció de zigots a partir de fragments cel·lulars obtinguts mitjançant micromanipulació (vegeu la revisió de Vassetzky & Sekirina, 1985). Malgrat que aquests darrers estudis són encara escassos, els resultats obtinguts fins aquest moment estan oferint noves dades sobre els mecanismes que controlen les primeres etapes del desenvolupament embrionari i pre-embriinari en mamífers.

En aquest sentit, Soupart (1982), i Gulyas i col. (1984) varen descriure que les metodologies bàsiques de fusió cel·lular podien ésser aplicades per aconseguir la fusió de dos oòcits, intentant reproduir el que té lloc en el moment de la fertilització des del punt de vista de fusió de membranes d'ambdós gàmetes i barreja de dos genomes haploides parentals per a la reconstrucció d'un genoma diploide.

Per les seves característiques, la fusió d'oòcits ofereix un disseny experimental força atractiu per a l'estudi dels diferents factors que poden intervenir en les primeres etapes del desenvolupament; en aquest treball, ens hem proposat optimitzar una metodologia que permeti l'obtenció d'embrions derivats de la fusió d'oòcits a fi d'intentar engegar el desenvolupament embrionari sense l'aportació específica del gàmeta masculí.

MATERIAL I MÈTODES

S'han emprat com a donadors de gàmetes ratolins de la F_1 resultants de l'entrecreament de dues soques endogàmiques, la C57B1/6J i la CBA/Ca.

Els oòcits s'obtenen de femelles híbrides madures, tractades hormonalment per provocar una superovulació (injecció peritoneal de 5 I.U. de PMSG i, al cap de quaranta-vuit hores, de 5 I.U. de HCG) i sacrificades per dislocació cervical catorze hores després de l'administració de la segona hormona. Sota el microscopi estereoscòpic s'extrauen els oòcits dels oviductes, es dipositen en una solució d'hialuronidasa al 0,1% per alliberar-los de les cèl·lules del *cumulus oophorus* que els envolten i es mantenen en medi de cultiu de

Whittingham (1971) en condicions estàndard d'incubació (sota oli de parafina, 37 °C i en atmosfera del 5% de CO₂ en aire) fins el moment de la seva utilització.

Els oòcits són processats per grups de 15 o 20; en primer lloc es procedeix a l'eliminació de la zona pel·lúcida mitjançant el tractament amb una solució de pronasa al 0,5% durant deu a quinze minuts, a temperatura ambient. Un cop observada la digestió de la zona, es realitzen rentats successius en medi de cultiu a fi d'eliminar les restes de pronasa que podrien malmetre la membrana plasmàtica. Els oòcits lliures de zona es traslladen al medi fusionant, en el nostre cas una suspensió de virus Sendai inactivats amb β -propiolactona (Neff &

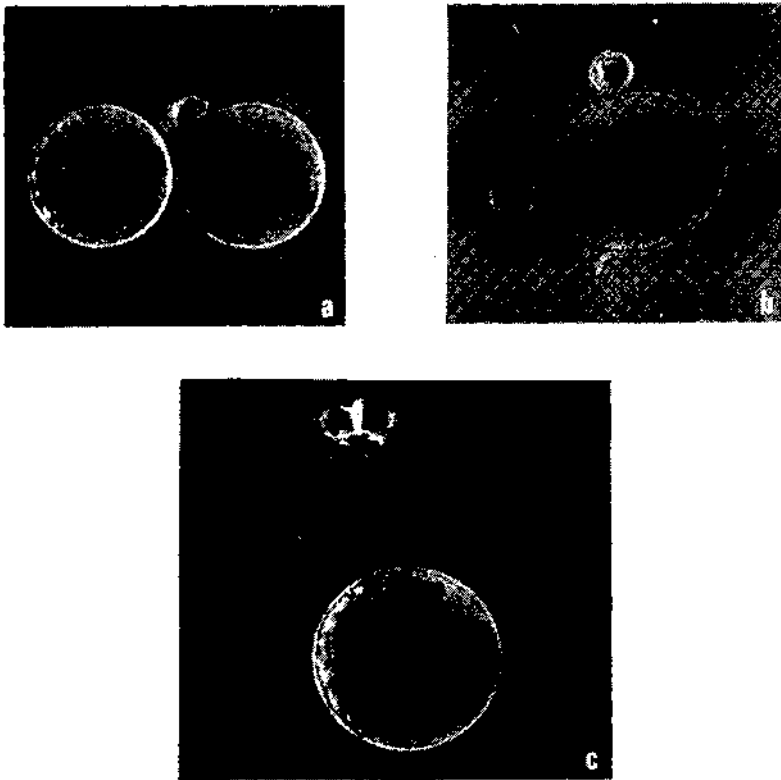


Figura 1. a) Parella d'oòcits en la suspensió de virus Sendai inactivats. L'oòcit de la dreta conserva encara el seu primer corpuscle. b) Zigot derivat de la fusió d'una parella d'oòcits en estadi d'una cèl·lula. Hi podem observar l'extrusió dels dos segons corpuscles polars. c) Zigot d'una cèl·lula; s'observa que en aquest cas els dos segons corpuscles s'han després de l'embrió.

Enders, 1968), i es mantenen en aquesta suspensió a 4 °C durant cinc a set minuts. Es procedeix a continuació a agrupar els oòcits per parelles, sempre treballant a 4 °C, i es mantenen en el medi fusionant durant un curt espai de temps a fi d'aconseguir un bon contacte entre membranes. Seguidament, i tenint molta cura de no separar durant la manipulació les parelles formades, aquestes són traslladades individualment a microgotets de medi de cultiu però sense albúmina sèrica bovina, i s'incuben a 37 °C per promoure la fusió de membranes.

En observar-se la fusió cel·lular, els productes obtinguts són recuperats, rentats en medi de cultiu per eliminar l'excés de virus que podria lisar les cèl·lules i deixats en cultiu en condicions estàndard d'incubació; la seva evolució es controla periòdicament.

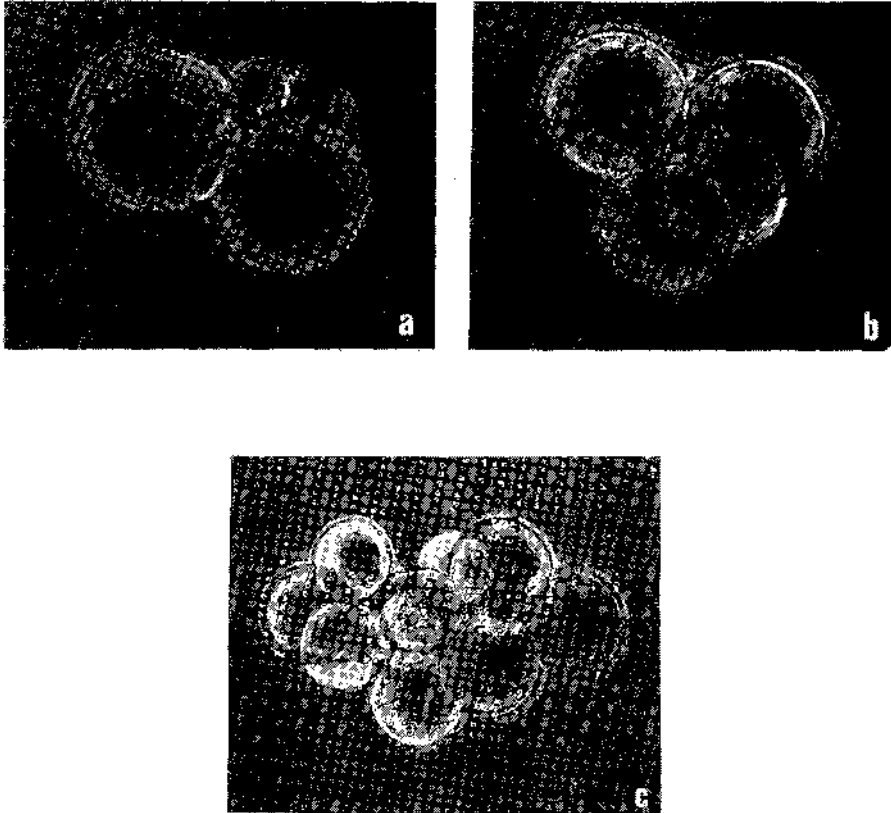


Figura 2. a) Zigot en l'estadi de dues cèl·lules. Restes dels dos segons corpuscles es mantenen en contacte amb l'embrió. b) Zigot en estadi de quatre cèl·lules. c) Zigot en estadi de 10 cèl·lules.

RESULTATS

Seguint la metodologia descrita i utilitzant una suspensió de virus Sendai inactivats a una concentració que mantingui l'equilibri entre l'efecte fusogènic i lisogènic de les partícules víriques (4.000 HAU-40.000 HAU, depenent del lot), s'obté la fusió d'un 10% de parelles d'oòcits. La fusió cel·lular té lloc entre trenta minuts i dues hores després de romandre les parelles a 37 °C i en resulta una sola cèl·lula. La figura 1 mostra el procés de fusió d'una parella d'oòcits.

Si de la fusió ha resultat l'activació dels oòcits, al voltant de les dues o tres hores de cultiu observem l'extrusió de dos segons corpuscles polars (un de cada oòcit) (Fig. 1c) i al cap de vint a vint-i-quatre hores es dona la primera divisió embrionària (Fig. 2a). Entre les quaranta a quaranta-vuit hores s'acompleix la segona divisió que donarà lloc a embrions en l'estadi de quatre cèl·lules (Fig. 2b). Un 40% dels embrions derivats de la fusió d'oòcits han arribat a dues cèl·lules i el 30% s'han dividit fins a quatre cèl·lules. A causa de l'absència de zona pel·lúcida els blastòmers adopten fàcilment disposicions en cadena (Fig. 3).

Fins aquest moment tan sols hem aconseguit un embrió que hagi assolit l'estadi de 10 cèl·lules (Fig. 2c) sense que, més endavant, hagi progressat.

DISCUSSIÓ

La metodologia descrita en aquest treball consisteix en l'aplicació de les tècniques de fusió cel·lular per a la fusió d'oòcits de ratolí.

La presència de dos segons corpuscles polars després de la fusió indica la finalització de la meiosi en tots dos oòcits, quedant per tant restablert l'equilibri genètic diploide amb la barreja de dos genomes haploides. La primera i la

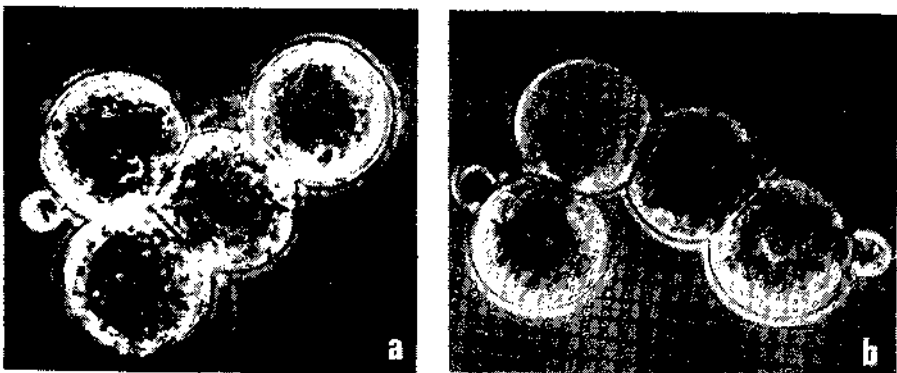


Figura 3. a) i b) Zigots en estadi de quatre cèl·lules, presentant els seus blastòmers en disposició lineal.

segona divisió embrionària s'observen dins dels intervals fisiològics normals i, excepte per la mida i l'absència de zona pel·lúcida, els blastòmers estudiats en aquests estadis no difereixen morfològicament dels derivats d'una fecundació.

El percentatge de fusions obtingudes seguint el nostre protocol és inferior al descrit mitjançant la utilització de PEG com a agent fusionant per Gulyas i col. (1984). No obstant en aquest mètode es necessita l'aglutinació prèvia dels oòcits amb fitohemaglutinina i l'activació amb etanol de les parelles, ja que la fusió de les membranes dels oòcits amb PEG no ofereix per si sola l'estímul suficient per engegar el desenvolupament embrionari. Tenint en compte que el tractament amb etanol provoca l'activació partenogenètica dels oòcits en una mitjana del 90% (Kaufman, 1982), es qüestiona si amb la utilització de PEG l'inici del desenvolupament embrionari és conseqüència de l'estímul resultant de la fusió de membranes o bé de l'activació partenogenètica.

Al contrari, amb la utilització de virus Sendai inactivats, l'aglutinació dels oòcits s'acompleix mitjançant els mateixos virus i, pel que en podem deduir fins ara, l'estímul de fusió o la naturalesa de les modificacions induïdes durant la fusió són suficients per engegar el desenvolupament embrionari.

Fins aquest moment, el nombre d'embrions que superen l'estadi de quatre cèl·lules és encara molt baix. El motiu l'associem principalment a la disgregació dels blastòmers o als pocs contactes cèl·lula-cèl·lula que resulten de l'absència de zona pel·lúcida, que actua com a «contenedor» dels embrions. Tan sols quan es presentin disposicions similars a les observades a la figura 2b, en les quals es mantenen els contactes entre els blastòmers, podrà continuar el creixement de l'embrió. No obstant, a mesura que augmenta el nombre de cèl·lules en l'embrió es fa més difícil mantenir-ne el contacte i, per tant, la compactació és difícil d'assolir.

Dels nostres resultats podem deduir que els productes derivats de la fusió de dos oòcits poden iniciar el desenvolupament embrionari i assolir estadis pre-implantacionals primerencs. Considerem que l'estudi d'aquests embrions pot aportar dades importants respecte de molts dels interrogants del desenvolupament embrionari que encara romanen per resoldre (paper de l'espermatozoide, manca de partenogènesi completa en mamífers, etc.).

En aquest sentit, ens proposem dur a terme l'estudi ultraestructural dels embrions obtinguts, així com optimitzar els mètodes de cultiu a fi d'aconseguir embrions en estadis més avançats i intentar-ne la reimplantació.

Agraïments

Cal agrair a la CIRIT de la Generalitat de Catalunya i a la Fundació F. Roviralta els ajuts de viatges concedits i, al M.R.C. Experimental Embryology and Teratology Unit de la Gran Bretanya, la seva amabilitat en subministrar-nos els virus Sendai inactivats.

Bibliografia

GULYAS, B.J., WOOD, M. & WHITTINGHAM, D.G. (1984). Fusion of oocytes and development of oocyte fusion products in the mouse. *Dev. Biol.*, 101: 246-250.

- KAUFMAN, M.H. (1982). The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 71: 139-154.
- NEFF, J.M. & ENDERS, J.F. (1968). Polio virus replication and cytopathogenicity in monolayer hamster cell cultures fused with beta propiolactone-inactivated Sendai virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127: 260-267.
- OKADA, Y. (1958). The fusion of Ehrlich's tumor cells caused by HVJ virus in vitro. *Biken's J.*, 1: 103-110.
- (1962). Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumour cells I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell Res.*, 26: 98-107.
- RINGERTZ, N.R. & SAVAGE, R.E. (1976). *Cell Hybrids*. (Academic Press).
- SOUPART, P. (1982). Initiation of mouse embryonic development by oocyte fusion. Dins: *In vitro fertilization and Embryo transfer*. (E.S.E. Hafez and K. Semm, eds.), M.T.P. Press Limited, Falcon House, Lancaster, England, pp. 51-63.
- VASSETZKY, S.G. & SEKIRINA, G.G. (1985). Induced fusion of female gametes and embryonic cells. *Cell Diff.*, 16: 77-82.
- WHITTINGHAM, D.G. (1971). Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. (Supl.)*, 14: 7-21.