

ENUCLEACIÓ QUÍMICAMENT INDUÏDA D'OÒCITS DE RATOLÍ PER A L'APLICACIÓ EN PROTOCOLS DE TRANSFERÈNCIA NUCLEAR

Nuno Costa-Borges, Sheyla González, Josep Santaló, Elena Ibáñez*

Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra. elena.ibanez@uab.cat.

Resum

L'antimitòtic colcemid ha estat usat prèviament per a l'enucleació d'oòcits de ratolí i boví en protocols de transferència nuclear. En aquest estudi es pretén explorar, a part del colcemid (COLC), el potencial d'altres agents antimitòtics, com el nocodazole (NOC) i la vinblastina (VIN), per a l'enucleació induïda d'oòcits preactivats de ratolí de dues soques diferents (CD-1 i B6CBAF1). L'exposició a l'antimitòtic no va afectar les taxes d'activació dels oòcits, però els tractaments amb COLC o VIN van tenir un efecte inhibitori en les taxes d'extrusió del segon corpuscle polar (CP). Les taxes d'enucleació van ser significativament diferents segons la soca d'oòcits emprada, i les més elevades es van aconseguir en els oòcits CD-1 quan, després d'activats, es van tractar amb VIN (63,8 %) o NOC (41,9 %) durant 15 min, o amb COLC (66,1 %) durant 30 min i, tot seguit, es van cultivar en medi sense antimitòtic fins a les 2 h postactivació (p.a.). Prolongant el temps de cultiu en medi sense antimitòtic, el percentatge d'oòcits enucleats va disminuir significativament i de manera similar en tots els tractaments a les 6 h (20,3-34,9 %) i a les 20 h (10,2-16,1 %) p.a. Aquesta disminució podria ser deguda a la reintegració dels cromosomes a dins de l'oòcit després d'una extrusió incompleta del segon CP, o a la refusió del segon CP amb l'oòcit enucleat. Els resultats demostren que, a més del COLC, també la VIN i el NOC poden ser emprats amb èxit en la preparació d'oòcits enucleats de ratolí, però es recomana l'eliminació del segon CP a les 2 h p.a. per tal d'obtenir una enucleació irreversible de l'oòcit.

Paraules clau enucleació induïda, antimitòtics, oòcits.

Abstract

Colcemid has been previously used to prepare enucleated mouse and bovine oocytes for nuclear transfer procedures. This study was designed to explore the potential of other antimitotic drugs, nocodazole (NOC) and vinblastine (VIN), besides colcemid (COLC), to induce enucleation in two strains of pre-activated mouse oocytes (CD-1 and B6CBAF1). Exposure to the antimitotic did not affect rates of oocyte activation, but treatments with COLC or VIN had an inhibitory effect in second polar body (PB) extrusion. The rates of oocyte enucleation differed significantly in a strain-specific manner, and the highest results were achieved in CD-1 oocytes when they were pre-activated and treated with VIN (63.8 %) or NOC (41.9 %) for 15 min or with COLC (66.1 %) for 30min, and then cultured in drug-free medium for up to 2 h post-activation (p.a.). Further culture of oocytes after drug withdrawal resulted in a significant and similar decrease in enucleation rates for all treatments by 6 h (20.3-34.9 %) and 20 h p.a. (10.2-16.1 %). This decrease might be caused by the reintegration of the chromosomes into the oocyte after incomplete second PB extrusion, or by re-fusion of the second PB to the enucleated oocyte. Our results show that both VIN and NOC, in addition to COLC, can be successfully applied to produce enucleated mouse cytoplasts. However, removal of the second PB at 2 h p.a. is recommended in order to achieve an irreversible oocyte enucleation.

Key words induced enucleation, antimitotics, oocytes.

INTRODUCCIÓ

En l'última dècada, animals de diferents espècies de mamífer han estat clonats mitjançant la tècnica de transferència nuclear de cèl·lules somàtiques (SCNT), però les taxes d'èxit continuen essent molt

baixes (<5 %; Campbell *et al.*, 2005). L'enucleació de l'oòcit receptor és un pas determinant d'aquesta tècnica a causa de la importància de l'oòcit enucleat (citoplast) en la correcta reprogramació del nucli transferit i en el posterior desenvolupament de l'embrió reconstruït. En els protocols habituals de SCNT,

Taula 1 Comparació de les taxes d'enucleació total i parcial entre els oòcits de les soques B6CBAF-1 i CD-1.

Tractament	Soca	n	OÒCITS		
			NO ENUCLEATS % (n)	PARCIALMENT ENUCLEATS % (n)	ENUCLEATS % (n)
CONTROL	B6CBAF1	56	91,1 % (51) ^a	5,3 % (3) ^a	3,6 % (2) ^a
	CD-1	51	98 % (50) ^a	0 % (0) ^a	2 % (1) ^a
COLC 30'	B6CBAF1	62	59,7 % (37) ^a	29 % (18) ^a	11,3 % (7) ^a
	CD-1	56	33,9 % (19) ^b	19,7 % (11) ^a	46,4 % (26) ^b
NOC 15'	B6CBAF1	61	86,8 % (53) ^a	4,9 % (3) ^a	8,2 % (5) ^a
	CD-1	62	58,1 % (36) ^b	4,8 % (3) ^a	37,1 % (23) ^b
VIN 15'	B6CBAF1	55	69,1 % (38) ^a	21,8 % (12) ^a	9,1 % (5) ^a
	CD-1	58	36,2 % (21) ^b	15,5 % (9) ^a	48,3 % (28) ^b

Taula 2 Comparació de les taxes d'extrusió del segon corpuscle polar (2 CP) entre els oòcits de les soques B6CBAF-1 i CD-1 a les 2 h postactivació.

Tractament	Soca	n	OÒCITS	
			SENSE 2 CP o PARCIALMENT EXTRUÏT % (n)	AMB 2 CP COMPLETAMENT EXTRUÏT % (n)
CONTROL	B6CBAF1	56	16,1 % (9)	83,9 % (47) ^a
	CD-1	51	3,9 % (2)	96,1 % (49) ^a
COLC 30'	B6CBAF1	62	37,1 % (23)	62,9 % (39) ^a
	CD-1	56	28,5 % (16)	71,5 % (40) ^a
NOC 15'	B6CBAF1	61	11,5 % (7)	88,5 % (54) ^a
	CD-1	62	6,4 % (4)	93,6 % (58) ^a
VIN 15'	B6CBAF1	55	45,4 % (25)	54,6 % (30) ^a
	CD-1	58	20,7 % (12)	79,3 % (46) ^b

^{a,b} Els superíndexs indiquen diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) entre les dues soques de ratolí per a cadascun dels tractaments.

s'utilitzen oòcits en metafase II per a la preparació dels citoplasts, que són enucleats aspirant la placa metafàsica mitjançant tècniques de micromanipulació (enucleació mecànica). Malgrat que aquest és un mètode molt eficient pel que fa a les taxes d'enucleació, tècnicament és un procediment invasiu i traumàtic per a l'oòcit. A més, l'enucleació no tan sols comporta l'eliminació dels cromosomes de l'oòcit, sinó també del fus meiótic i d'una porció significativa de volum citoplasmàtic on hi ha factors moleculars importants per a la posterior activació de l'oòcit reconstruït i per als primers estadis del desenvolupament embrionari (Wakayama i Yanagimachi, 1998). D'altra banda, tot i que el fus meiótic es pot intuir en el citoplasma dels oòcits d'algunes soques de ratolí amb sistemes òptics de Nomarski o Hoffman

(Wakayama *et al.*, 1998), pel que fa als oòcits de la majoria d'espècies d'interès ramader és necessari tenyir-los amb Hoechst 33342 i irradiar-los amb llum ultraviolada (UV) per a localitzar la cromatina abans de dur a terme l'enucleació. La irradiació UV, malgrat que és breu, pot comprometre també la capacitat de desenvolupament d'aquests oòcits enucleats mecànicament (Smith, 1993).

Amb l'objectiu de millorar i simplificar el protocol d'enucleació dels oòcits, s'han desenvolupat diverses alternatives (revisat en Fulka *et al.*, 2004 i Li *et al.*, 2004). Una de les més atractives és l'enucleació químicament induïda, basada en el tractament d'oòcits prèviament activats amb agents antimitoètics. Com a resultat d'aquest tractament la progressió meiótica normal de l'oòcit es veu alterada, i tota la

cromatina és expulsada en el segon corpuscle polar (CP), i això dona lloc a un òocit enucleat, amb una pèrdua mínima de citoplasma i sense necessitat d'aplicar tècniques de micromanipulació (Ibáñez *et al.*, 2003). L'eficiència d'aquest tractament ha estat demostrada amb l'obtenció de ratolins clonats a partir de la reconstrucció per transferència nuclear de citoplasts preparats mitjançant enucleació químicament induïda fent servir l'antimitòtic colcemid (Baguisi i Overström, 2000; Gasparrini *et al.*, 2003).

L'objectiu principal d'aquest treball és explorar, a part del colcemid, el potencial d'altres agents antimítotics com el nocodazole i la vinblastina per a induir l'enucleació d'òocits de ratolí. Tenint en compte els treballs previs realitzats amb el colcemid, en què s'observava un clar efecte del fons genètic de l'òocit en les taxes d'enucleació (Ibáñez *et al.*, 2003), aquest estudi s'ha dut a terme utilitzant òocits de dues soques diferents de ratolins (CD-1 i B6CBAF1).

MATERIAL I MÈTODES

Els procediments experimentals descrits han estat aprovats per la Comissió d'Ètica en l'Experimenta-

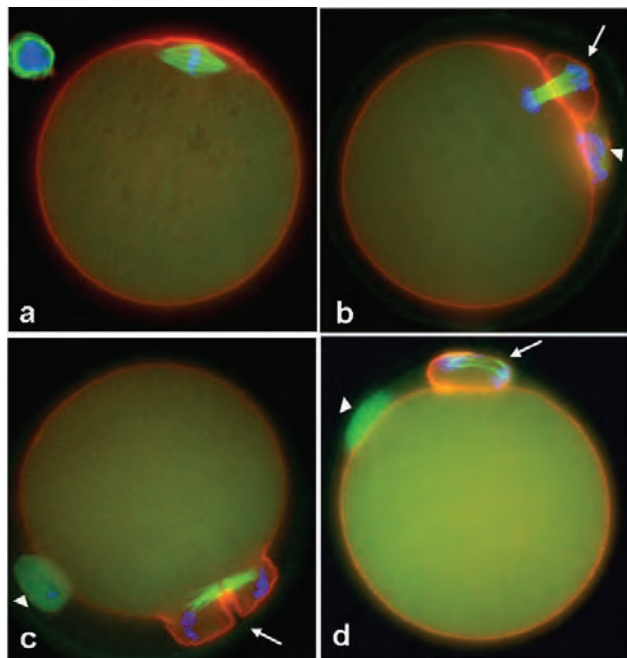


Figura 1 Òocits de ratolí de la soca CD-1. a) Òocit control en metafase II, no activat ni tractat amb antimítotíc. b) Òocit activat control, no tractat amb antimítotíc, fixat a les 2 h p.a. i que presenta un segon CP completament expulsat. c) Òocit tractat amb antimítotíc i parcialment enucleat, amb un doble segon CP no expulsat completament. d) Òocit tractat amb antimítotíc i enucleat, amb una extrusió completa del segon CP. Els caps de les fletxes indiquen el primer CP, i les fletxes el segon CP.

ció Animal i Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Obtenció dels òocits

Els òocits es van obtenir de femelles de ratolí (6-12 setmanes d'edat) de la soca no consanguínia CD-1 i de la soca híbrida B6CBAF1 (C57BL/6JxCBA/J). Les femelles van ser superovulades mitjançant la injecció intraperitoneal de 5 UI de PMSG seguida de 5 UI d'hCG 48 h més tard. Els òocits en metafase II es van recuperar de l'oviducte a les 16 h post-hCG i, després d'un breu tractament amb hialuronidasa (156 U/ml) i dos rentats en medi mKSOM-H (Biggers *et al.*, 2000), es van processar tal com es descriu a continuació.

Activació partenogenètica dels òocits i tractament antimítotíc

Els òocits es van activar en etanol 7 % durant 5 min. Immediatament després, els òocits de ratolí de la soca CD-1 es van tractar amb colcemid (COLC; 0,4 µg/ml), nocodazole (NOC; 0,3 µg/ml) o vinblastina (VIN; 0,1 µg/ml) durant 15, 30 o 60 min a 37° C i 5 % de CO₂ en medi de cultiu KSOM (Biggers *et al.*, 2000) sense calci i amb 10 mM de clorur d'estronci. Finalitzat el temps de tractament, els òocits es van rentar i es van cultivar en el medi amb estronci sense antimítotíc fins a les 2 h postactivació (p.a.) i, en cas dels millors tractaments, fins a les 6 h o 20 h p.a. (es considera com temps 0 p.a. el moment en què els òocits s'exposen a l'etanol).

Els òocits B6CBAF1 es van sotmetre únicament als tractaments que van resultar més efectius en la soca CD-1 pel que respecta a les taxes d'enucleació a les 2 h p.a.: COLC (0,4 µg/ml) durant 30 min; NOC (0,3 µg/ml) i VIN (0,1 µg/ml) durant 15 min.

Fixació dels òocits i anàlisi per immunofluorescència

Els òocits es van fixar a les 2, 6 o 20 h p.a. mitjançant la incubació durant 30 min a 37° C en *microtubule stabilizing buffer* (MTSB-XF) (Messinger i Albertini, 1991), i van ser guardats a 4° C en *blocking solution* (Wickramasinghe i Albertini, 1992). Posteriorment els òocits es van sotmetre a un protocol de triple tinció per a la detecció simultània dels microtúbuls, els microfilaments i la cromatina per microscòpia de fluorescència (Costa-Borges *et al.*, 2006). L'observació i anàlisi dels òocits es va dur a terme en un microscopi d'epifluorescència equipat amb filtres específics i un sistema de captura d'imatges.

Anàlisi estadística

Tots els tractaments es van repetir almenys tres vegades i es van analitzar aproximadament 50 oòcits per grup. Els resultats obtinguts es van analitzar mitjançant el test de *chi-quadrat* (χ^2) o el test exacte de Fisher. Valors de $P < 0,05$ es van considerar estadísticament significatius.

RESULTATS

Els oòcits que tenien la totalitat de la cromatina a dins del segon CP es van classificar com a enucleats o parcialment enucleats, en funció de si l'extrusió del segon CP era completa o incompleta, respectivament (figura 1). Les taxes més altes d'enucleació es van obtenir per als oòcits preactivats de la soca CD-1 que es van tractar amb VIN (63,6 %) o NOC (41,9 %) durant 15 min o amb COLC (66,1 %) durant 30 min i, tot seguit, es van cultivar en medi sense antimetabòlic fins a les 2 h p.a. (figura 2), el temps necessari perquè els oòcits de ratolí expulsin el segon CP (Ibáñez *et al.*, 2005). El percentatge total d'oòcits enucleats respecte al total d'oòcits activats en aquesta soca va resultar significativament superior al que es va obtenir en els oòcits B6CBAF1 per als mateixos tractaments (taula 1). El tractament amb els antimetabòlics no va afectar les taxes d'activació dels oòcits de cap de les dues soques (91,8-100 % CD-1 i 89,9-96,8 % B6CBAF1), però, en canvi, un percentatge significatiu dels oòcits tractats amb COLC (28,5 % i 37,1 %) o amb VIN (20,7 % i 45,4 %) no va mostrar una extrusió completa del segon CP. Aquest efecte no es va observar ni en el

grup control (3,9 % i 16,1 %) ni en el de NOC (6,4 % i 11,6 %) (taula 2).

En allargar el temps de cultiu dels oòcits CD-1 en medi sense antimetabòlic fins a les 6 o les 20 h p.a. les taxes d'enucleació van disminuir significativament i de manera similar per a tots els grups (20,3-37,7 % a les 6 h p.a. i 10,2-16,1 % a les 20 h p.a.), en comparació amb les obtingudes per als mateixos tractaments a les 2 h p.a. (figura 2). Gairebé cap dels oòcits analitzats en aquests grups presentava un segon CP parcialment extruït.

DISCUSSIÓ

En els treballs previs amb colcemid en oòcits de ratolí i de vaca, s'havia demostrat que l'eficiència de la tècnica d'enucleació induïda depenia del temps d'exposició dels oòcits a l'antimetabòlic i del moment en què s'inicia el tractament després de l'activació (Ibáñez *et al.*, 2003; Fischer-Russell *et al.*, 2005). En ratolí, els millors resultats es van obtenir quan els tractaments s'iniciaven immediatament després de l'activació. També es va concloure que la progressió meiòtica dels oòcits activats no és interrompuda pel tractament amb colcemid, però les taxes d'enucleació són limitades per l'efecte inhibitori d'aquest en l'extrusió completa del segon CP (Ibáñez *et al.*, 2003). En aquest treball demostrem com, a part del colcemid, també la vinblastina sembla tenir un efecte inhibitori en l'extrusió completa del segon CP en oòcits de ratolí. Malgrat tot, aquests dos antimetabòlics, juntament amb el nocodazole, poden ser aplicats amb èxit en la preparació de citoplasts enucleats de ratolí. L'eficiència dels tractaments emprats depèn

Figura 2 Comparació de les taxes d'enucleació respecte al total d'oòcits CD-1 activats entre els diferents tractaments antimetabòlics a les 2 h, 6 h i 20 h postactivació. Les diferents lletres en la part superior de les columnes indiquen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre tractaments pel que respecta al total d'oòcits enucleats.

de la soca d'oòcits utilitzada, tal i com s'havia demostrat prèviament amb el colcemid (Ibáñez *et al.*, 2003). Les taxes màximes d'enucleació obtingudes a les 2 h p.a. per a la soca CD-1 (66,1 %-41,9 %) van ser estadísticament superiors a les obtingudes per a la soca B6CBAF1 i força superiors a les màximes descrites en estudis previs amb el colcemid per a oòcits de ratolí de la soca no consanguínia CF-1 (20 %; Ibáñez *et al.*, 2003). La disminució significativa en el nombre d'oòcits CD-1 enucleats a les 6 i 20 h p.a. en comparació amb les 2 h p.a. podria ser deguda a una possible reintegració dels cromosomes en l'oòcit després d'una extrusió incompleta del segon CP, o a la refusió del segon CP amb l'oòcit enucleat durant el període d'incubació dels oòcits en el medi sense antimitòtic. Per aquest motiu, es recomana l'eliminació mecànica del segon CP a les 2 h p.a. per tal d'asolir l'enucleació irreversible dels oòcits.

Per finalitzar, cal apuntar que la competència dels citoplasts preparats amb aquest mètode no es pot assegurar fins al moment que aquests siguin reconstruïts per transferència nuclear i puguin garantir el correcte desenvolupament de l'embrió clonat. De tota manera, el naixement de ratolins clonats a partir de la reconstrucció per SCNT d'oòcits enucleats químicament amb colcemid (Baguisi i Overström, 2000; Gasparini *et al.*, 2003) demostra que el tractament dels oòcits receptors amb aquest agent antimitòtic no és incompatible amb la seva viabilitat.

AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen a Jonatan Lucas i a Marc Puigcerver el suport tècnic. Aquest treball ha estat finançat pels projectes MEC BIO 2006-11792; DGR 2004-XT00054 i 2005-SGR00437, i també parcialment per la *Fundação para a Ciência e Tecnologia* de Portugal (SFRH/BD/31263/2006).

BIBLIOGRAFIA

- BAGUISI, A.; OVERSTRÖM E. W. (2000). «Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals». *Theriogenology*, 54: 209.
- BIGGERS, J.; MCGUINNIS L. K.; RAFFIN, M. (2000). «Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free KSOM». *Biol. Reprod.*, 63: 281-293.
- CAMPBELL, K. H.; ALBERIO, R.; CHOI, I. [*et al.*] (2005). «Cloning: eight years after Dolly». *Reprod. Domest. Anim.*, 40: 256-268.
- COSTA-BORGES, N.; SANTALÓ, J.; IBÁÑEZ, E. (2006). «Preparación de citoplastos receptores para transferencia nuclear mediante enucleación química de ovocitos». *Rev. Iberoam. Fertil. Reprod. Hum.*, 23(3): 163-172.
- FISCHER-RUSSELL, D.; IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F. [*et al.*] (2005). «Activated bovine cytoplasts prepared by demecolcine-induced enucleation support development of nuclear transfer embryos in vitro». *Mol. Reprod. Dev.*, 72: 161-170.
- FULKA, J. JR.; LOI, P.; FULKA, H.; PTAK, G. [*et al.*] (2004). «Nucleus transfer in mammals: noninvasive approaches for the preparation of cytoplasts». *Trends Biotechnol.*, 22: 279-283.
- GASPARRINI, B.; GAO, S.; AINSLIE, A. [*et al.*] (2003). «Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation». *Biol. Reprod.*, 68: 1259-1266.
- IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2003). «Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell cycle egress.; kinetics of cortical cytoskeletal interactions.; and second polar body extrusion». *Biol. Reprod.*, 68: 1249-1258.
- IBÁÑEZ, E.; ALBERTINI, D. F.; OVERSTRÖM, E. W. (2005). «Effect of genetic background and activating stimulus on the timing of meiotic cell cycle progression in parthenogenetically activated mouse oocytes». *Reproduction*, 129: 27-38.
- LI, G. P.; WHITE, K. L.; BUNCH, T. D. (2004). «Review of enucleation methods and procedures used in animal cloning: state of the art». *Cloning Stem Cells*, 6: 5-13.
- MESSINGER, S. M.; ALBERTINI, D. F. (1991). «Centrosome and microtubule dynamics during meiotic maturation of the mouse oocyte». *J. Cell Sci.*, 100: 289-298.
- SMITH, L. C. (1993). «Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro». *J. Reprod. Fertil.*, 99: 39-44.
- WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. (1998). «Fertilisability and developmental ability of mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm». *Zygote*, 6: 341-346.
- WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M. [*et al.*] (1998). «Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei». *Nature*, 394: 369-374.
- WICKRAMASINGHE, D.; ALBERTINI, D. F. (1992). «Centrosome phosphorylation and the developmental expression of meiotic competence in mouse oocytes». *Dev. Biol.*, 152: 62-74.