

MADURACIÓ *IN VITRO* D'OOCITS DE MAMÍFER: EFECTE DE LA GONADOTROFINA CORIONICA HUMANA (HCG).

Josep M. Calafell i Josep Santaló.

Dept. Biologia Cel·lular i Fisiologia. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona.

Abstract.

In vitro maturation of mammalian oocytes: effect of the Human Chorionic Gonadotrophin.

Immature mouse oocytes were cultured *in vitro* in the presence of HCG (Human Chorionic Gonadotrophin). The possible effect of HCG on the genetical characteristics of the embryos obtained was evaluated.

Immature oocytes were obtained by puncturing the follicles and were cultured *in vitro* for 15-16 h, in medium containing HCG. Freshly ovulated oocytes were used as control group.

Comparing immature and control group, no changes in the fertilization rate poliploidy level and structural abnormalities were detected whilst hyperhaploidy of female origin were significantly increased.

Key words: oocyte *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, chromosome abnormalities.

Introducció.

En els programes de fertilització *in vitro* en humans els oòcits, extrets per laparoscopia, són immadurs i necessiten ésser pre-incubats *in vitro* per aconseguir la seva maduració meiótica i citoplasmàtica.

El procés maduratiu dels oòcits comporta un sèrie de canvis morfològics i genètics que es produeixen en el mateix ovari i finalitzen, normalment, moments abans de l'ovulació.

El fenomen més destacat del procés de maduració és la represa de la meiosi, la qual es trobava bloquejada a dictiotè, finalitzant a metafase II, on restarà fins la fertilització.

Existeixen dades sobre la influència de diferents paràmetres en l'eficiència de maduració *in vitro* d'oocits de diferents espècies, inclosa la humana. Aquests estudis inclouen modificacions en medis de cultiu (Nishimoto i cols.1982), efecte d'esteroids

com la progesterona i testosterona (Tyler i cols. 1980) i efecte de l'hormona luteinizant (LH) (Shalgi i cols. 1979).

Els oòcits immadurs de diferents espècies animals, inclosa la humana, són capaços de madurar *in vitro* de forma espontània i ésser fertilitzats. La taxa de fertilització d'aquests oòcits immadurs és però, lleugerament inferior quan es compara amb la dels oòcits recent ovulats (madurs). Sembla que la reduïda taxa de fertilització pot ésser deguda a una insuficient maduració citoplasmàtica causada per una pèrdua de les senyals hormonals presents normalment en la maduració *in vivo* (Prins G.S. i cols., 1987).

La influència hormonal en la maduració *in vitro*, fertilització i posterior desenvolupament embrionari s'ha establert en diferents treballs i per diferents espècies, on s'ha vist que l'addició de diferents gonadotrofines al medi de cultiu comporta un augment en la taxa de fertilització (Prins G.S. i cols. 1987; Shalgi i cols., 1979; Shroeder i cols., 1988).

Vista aquesta influència de les gonadotrofines en el procés de fertilització d'oòcits immadurs, hem centrat el nostre estudi en veure la possible influència de la gonadotrofina HCG (anàleg de la LH), sobre les característiques genètiques dels embrions obtinguts a partir d'oòcits madurats *in vitro* i en presència d'aquesta hormona.

Creiem que aquest és un punt important a tenir en compte de cara a la posterior transferència i futura viabilitat d'aquests embrions.

Material i Mètodes.

Animals i tractament superovulatori. S'utilitzen ratolins resultants del creuament entre les soques C57 B1/6J x CBA/Ca, obtenint una F₁ genèticament homogènia. S'indueix la superovulació de les femelles per tractament hormonal (Biggers, J.D. i cols. 1971). Utilitzem les hormones PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) i HCG (Human Chorionic Gonadotrophin) administrant-ne 5 u.i. en cada cas.

Medis de cultiu i manipulació. Per l'obtenció dels oòcits pre-ovulatoris s'utilitza el medi M₂ (Quinn i cols., 1982) que conté 4 mg/ml de BSA (Bovine Serum Albumine). Pel cultiu d'oòcits i embrions utilitzarem el medi M₁₆ de Whittingham (1971), que conté 4 mg de BSA. Per la capacitació dels espermatozoides medi T₆ (Quinn i cols. 1982), que conté 15 mg de BSA/ml. Els medis es posen en gotes en càpsules de Petri estèrils i recobertes amb oli de parafina. Per equilibrar els medis, les plaques es col·loquen a l'incubador a 37°C amb una atmosfera al 5% de CO₂ en aire durant 20 hores.

Obtenció dels gàmetes.

a) Espermatozoides. S'extreuen els epididims caudals d'un mascle i es col·loquen en 1 ml. de T₆ sense BSA. Els espermatozoides s'alliberen al medi i es deixen a l'incubador 20 min. per a que es dispersin. Passat aquest temps, es realitza una dilució 1:9 en 0.4 ml de T₆ amb BSA, obtenint una concentració de $1-2 \times 10^6$ esp./ml deixant-los a l'incubador durant 50 min. per que el màxim nombre d'espermatozoides assoleixi la seva capacitat.

b) Oòcits recent ovulats. A les 13-14 hores post-HCG, es sacrifiquen les femelles i s'extreuen les ampul·les que contenen d'uns 20 a 30 oòcits cada una.

c) Oòcits pre-ovulatoris. S'extreuen els ovaris de les femelles a les 5 hores post-HCG i es col·loquen en plaques de Petri estèrils que contenen medi M₂. Seguidament cada ovari es col·loca en un porta estèril amb una gota de medi M₂ procedint a l'extracció, per punció amb agulles estèrils, dels oòcits immadurs.

Maduració *in vitro*. Els oòcits pre-ovulatoris es posen en el medi de cultiu M₁₆ amb Foetal Calf Serum al 10% més 0.05u.i./ml de HCG, on hi restaran de 15 a 16 hores madurant-se *in vitro*.

Fertilització. Els oòcits, bé madurats *in vitro* o recent ovulats, s'introdueixen en el medi que conté els espermatozoides capacitats per a la seva inseminació. A les 4 h es recullen els zigots en medi M₁₆ amb 10^{-7} M de Sulfat de Vinblastina i es col·loquen durant 12-14 h a l'incubador. En aquest model de FIV en ratolí, es segueix el mètode de cultiu d'embrions amb antimetòtic, de manera que es bloqueja la divisió embrionària abans de donar-se la singamia (Fraser & Maudlin 1979). D'aquesta forma es pot fer l'anàlisi cromosòmica d'ambdós pronuclis (masculí i femení) i determinar la freqüència de possibles anomalies cromosòmiques així com el seu origen patern o matern.

Estudis citogenètics. Les preparacions cromosòmiques es realitzen segons el mètode de Tarkowsky (1966) modificat. Es tenyeixen les preparacions amb colorant Leishman, i s'observen al microscopi òptic a 1000x. Els casos de major interès es fotografien per a estudiar-los més acuradament.

Anàlisi estadística. Per a la comparació entre el grup d'oòcits recent ovulats (control) i el de madurats *in vitro*, s'ha aplicat un test de χ^2 .

Resultats i Discussió.

Quant a la taxa de fertilització, veiem en la taula I que no existeix cap diferència significativa entre oòcits madurats *in vitro* en presència d'HCG (76.30%) i oòcits recent ovulats (78.22%).

Les dades obtingudes seguint el protocol abans esmentat, ens indiquen que la majoria dels oòcits madurats *in vitro* han aconseguit la seva maduració cromosòmica i citoplasmàtica ja que no s'han trobat embrions amb aspecte endorreduplicat ni tampoc cap descondensació prematura del pronucli masculí tal com indiquen dades obtingudes en la fecundació *in vitro* d'oòcits immadurs (Badenas i cols., en premsa)

	Maduració <i>in vitro</i>	Control
% Fertilització	(76.30)	(78.22)
Analitzats	346	507
Complements masculins		
analitzats	295	381
Complements femenins		
analitzats	267	335
Partenogenetics	75	40
Metafase II	60	146
Metafase I	1	1

Taula I: Característiques generals de la mostra d'embrions obtinguts per maduració *in vitro* en presència d'HCG i madurats *in vivo* (control).

Les anomalies cromosòmiques estudiades han estat aneuploidies, poliploidies i anomalies estructurals. Comparant ambdós grups d'oòcits, tant sols hem vist diferències significatives en les hiperhaploidies d'origen femení (4.12% en oòcits madurats *in vitro* davant un 1.49% en oòcits recent ovulats). Altres dades obtingudes amb oòcits madurats *in vitro* (Golbus i cols., 1981) apunten també cap un augment de hiperhaploidies.

Quant a la resta d'anomalies cromosòmiques no hi cap diferència significativa i tant sols assenyalar l'observació de fragmentacions cromosòmiques que no s'han observat en el grup control.

Finalment indicar que aquestes dades preliminars es veuran complementades amb estudis posteriors on es provaran diferents concentracions de Gonadotrofina Coriònica Humana així com l'efecte del Gonadotrofina Sèrica d'Euga Prenyada (PMSG).

També s'estudiarà la maduració *in vitro* d'oòcits de ratolí en absència d'ambdues gonadotrofines.

Bibliografia

- BADENAS, J. i cols. (1989) Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: A source of chromosome imbalance. Gamete Research (en premsa).
- BIGGERS, J.D. i cols. (1971). The culture of mouse embryos *in vitro*. A Daniel J.C. (Ed.) Methods in mammalian embryology pp 88-116, Freeman & Co. San Francisco.
- FRASER L.R. y MAUDLIN I. (1979). Analysis of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos fertilized *in vitro* and *in vivo*. Environmental Health Perspectives 31, 141-149.
- GOLBUS M.S. (1981). Chromosome aberrations and mammalian reproduction. Fertilization and embryonic development *in vitro*. A Mastroianni & Biggers (Eds.) Cap. 9, 258-274.
- NISHIMOTO, T. i cols. (1982). Sperm penetration *in vitro* of human oocytes matured in a chemically defined medium. J. Reprod. Fertil. 64, 115-119.
- PRINS G.S. i cols. (1987). Gonadotrophins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured *in vitro*. Fertility and Sterility vol 47, nº 6.
- QUINN, P. i cols. (1982). Effect of albumin on fertilization of mouse ova *in vitro*. Gamete Research 6, 305-313.
- SCHROEDER A.C. i cols. (1988). Factors affecting the developmental capacity of mouse oocytes undergoing maturation *in vitro*. *In vitro* fertilization and other assisted reproduction. En Jones & Schrader Eds. Part IV, 197-204.
- SHALGI, R i cols. (1979). The effect of LH on fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 55, 429-435.
- TARKOWSKY, A.K. (1966). An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 5, 394-400.
- TYLER, J.P.P. i cols (1980) Effect of steroids on oocyte maturation and atresia in mouse ovarian fragments *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 58, 203-212.
- WHITTINGHAM D.G. (1971). Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert., suppl. 14, 7-21.