

CARACTERITZACIÓ A MICROSCOPIA DE RASTREIG D'EMBRIONS DE RATOLÍ MANIPULATS EXPERIMENTALMENT

C. Noguès, M. Ponsà, F. Vidal i J. Egozcue

Dpt. Biologia Cel·lular i Fisiologia. Institut de Biologia Fonamental "V. Villar Palasi". Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra (Barcelona)

Abstract

Scanning electron microscopy of experimentally manipulated mouse embryos.

Frozen and thawed mouse embryos and embryos derived from one isolate blastomere have been studied at scanning electron microscopy in order to observe if there are differences on zona pellucida and plasma membrane morphology.

We have studied frozen-thawed embryos at 2-cell stage and 4-cell stage with and without zona pellucida and embryos derived from one isolate blastomere at 1-cell stage, 2-cell stage and 4-cell stage. These embryos have been compared with normal embryos with and without zona pellucida at the same stage.

Key words: mouse embryos, scanning electron microscopy, frozen-thawed, blastomere, zona pellucida, plasma membrane.

Introducció

El treball que presentem està integrat dins d'un projecte més ampli que té com a finalitat aconseguir un banc d'embrions caracteritzats citogenèticament.

A partir d'embrions de ratolí en estadi de dos cèl·lules, s'elimina la zona pel·lúcida i es separen els dos blastòmers que componen l'embrió; un d'ells s'estudia citogenèticament per poder caracteritzar-lo, l'altre es deixa créixer fins l'estadi de dos o quatre cèl·lules. Un cop conegut el resultat de l'estudi citogenètic es congela l'embrió que s'havia deixat créixer i que prové d'un blastòmer idèntic a l'estudiat citogenèticament.

Aquest projecte consta de 4 apartats: a) posta a punt de la metodologia per l'aïllament de blastòmers i estudi de la viabilitat dels embrions derivats d'aquests blastòmers, b) estudi citogenètic de blastòmers aïllats, c) posta a punt de la tècnica de congelació-descongelació d'embrions sense zona pel·lúcida i d) estudi al microscopi electrònic de rastreig i al de transmissió de les possibles alteracions que els processos de manipulació poden produir en aquests embrions.

En aquest treball presentem l'estudi morfològic a microscòpia de rastreig dels embrions manipulats experimentalment: els que han sofert un procés de congelació i posterior descongelació, i també aquells que procedeixen d'un dels blastòmers aïllats a partir d'embrions en estadi de dos cèl·lules. La finalitat és observar si les manipulacions a que estan sotmesos aquests embrions afecten a les capes que envolten a l'embrió (tant a la zona pel·lúcida com a la membrana plasmàtica) i si és així de quina manera les afecte.

Estudis a nivell bioquímic (Johnson i col. 1988), mostren que el refredament dels oòcits provoca un enduriment de la zona pel·lúcida que té com a conseqüència una disminució de la fertilitat.



No son gaires els estudis fets a microscòpia electrònica en òcits i embrions que han sofert un procés de congelació. Whittingham i Anderson (1976) estudien embrions congelats en estadi de 8 cèl.lules i no observen cap canvi a nivell ultraestructural en la membrana.

Per altra banda no ens consten dades respecte a estudis ultraestructurals de blastomers aïllats ni dels embrions que en poden derivar.

## Material i mètodes

### Obtenció dels embrions:

Els embrions s'obtenen de ratolines de la soca B6CBF1 fecundades *in vivo*.

S'indueix una superovulació per tractaments hormonals estandard; 5 UI de l'hormona PMSG seguida al cap de 48 hores de 5 UI de l'hormona HCG, immediatament després es col.loquen les femelles amb els mascles i es deixen junts de 19 a 22 hores. El sacrifici de les femelles es fa per dislocació cervical i el moment depen de cada grup estudiat.

a) grup control: en aquest cas les femelles es sacrifiquen entre les 19 i les 22 hores després del suministre de la hormona HCG. Els embrions es recuperen de l'ampul.la en estadi d'una cèl.lula i es deixen en cultiu en  $M_2$  (medi de Whittingham (1971)), en condicions standard.

Si l'estudi es vol fer en aquest estadi, els embrions es passen per una solució de hialuronidasa al 0,1 % per tal d'eliminar-ne les cèl.lules del cumulus, seguidament es renten en medi de cultiu i finalment es fixen.

Si l'estudi es fa en l'estadi de 2 o 4 cèl.lules els embrions es fixen a les 24 o 48 hores de cultiu respectivament.

Finalment per fer l'estudi de la membrana plasmàtica, els embrions es deixen durant 15-20 minuts en una solució de pronasa al 0,5 % per tal d'eliminar la zona pel.lúcida abans de ser fixats.

b) grup "congelats": en aquest cas les femelles també es sacrifiquen entre les 19 i les 22 hores després del suministre de la hormona HCG. Els embrions també es recuperen de l'ampul.la en estadi d'una cèl.lula i es deixen en cultiu *in vitro* en medi  $M_2$  en condicions standard fins aconseguir l'estadi de dos cèl.lules on es congelen amb o sense zona pel.lúcida segons el mètode emprat al nostre laboratori (Rosès i col. 1989). En el moment de la descongelació es deixen en cultiu durant 4 hores per tal que es recuperin i finalment es fixen. Si l'estudi és a l'estadi de 4 cèl.lules els embrions es deixaràn en cultiu durant 24 hores mes per tal de permetre la divisió cel.lular.

c) grup "aïllats": en aquest cas el sacrifici de les femelles es fa a les 44-48 hores d'haver suministat l'hormona HCG. Els embrions es recuperen de l'oviducte en l'estadi de dos cèl.lul es. S'elimina la zona pel.lúcida pel mètode abans esmentat i es deixen els embrions en un medi sense calci ni magnesi a fi que els dos blastomers que formen l'embrió es separin. Un cop separats es mantenen en cultiu els blastomers aïllats per tal que es divideixin i arribin a l'estadi de 2 i 4 cèl.lules (Coll i col., 1989). Finalment es fixen a les 24 i 36 hores respectivament.



### Processat per l'observació al Microscopi de Rastreig

Els embrions obtinguts es fixen al menys durant 1 hora en una solució al 2,5 % de Glutaraldehyd en 0,1 M de tampò cacodilat. Es renten en aquest tampò i es postfixen durant 1 hora en una solució de tetròxid d'osmi al 1 %. Posteriorment es deshidraten en una concentració creixent d'etanol (al 30, 50, 70 i 100 %) i finalment en una concentració creixent d'acetat d'isoamil en etanol (al 25, 50, 75 i 100 %).

Acabada la deshidratació es realitza el punt crític en  $\text{CO}_2$  en una capsula de politene amb els dos extrems substituïts per una xarxa de placton de 37 nm. (Noguès i col. 1988), es col.loquen els embrions en un suport per microscòpia electrònica de rastreig i es realitza el metalitzat en or.

Les observacions s'han realitzat en un microscopi electrònic de rastreig Hitachi S-570 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### Resultats

#### - Grup control:

a) embrions en estadi d'una, dos i quatre cèl.lules amb zona pel.lúcida.

La zona pel.lúcida presenta una estructura de xarxa fibrosa amb nombrosos porus intercalats; aquesta estructura s'aplana quan es passa de l'estadi d'una cèl.lula a l'estadi de dos cèl.lules disminuint el diàmetre dels porus. Finalment sembla que a l'estadi de quatre cèl.lules aquesta estructura es perd per adoptar-ne una en forma de tel sense porus i que en determinades zones presenta una aparença arrugada. (Fig.1 (a,b,c))

b) embrions en estadi d'una, dos i quatre cèl.lules sense zona pel.lúcida.

La membrana plasmàtica està recoberta totalment de microvillis donant-li un aspecte esponjós. La distribució d'aquests microvillis es pot considerar homogènia excepte en la zona ocupada, o que havia estat ocupada, pel corpuscle polar que està pràcticament lliure de microvillis i la zona de contacte entre els blastòmers on aquests microvillis són més curts. (Fig.2 (a,b,c))

#### - Grup "congelats":

a) embrions en estadi de dos i quatre cèl.lules amb zona pel.lúcida.

L'estructura de la zona pel.lúcida és equivalent a la dels embrions del grup control; és de tipus fibrosa, bastant plana i amb nombrosos porus intercalats en l'estadi de dos cèl.lules i adopta l'estructura de tel amb algun porus intercalat en l'estadi de quatre cèl.lules. (Fig. 3 (a,b))

b) embrions en estadi de dos cèl.lules sense zona pel.lúcida.

Tant la distribució com la densitat de microvillis de la membrana plasmàtica d'aquests embrions es equivalent a la del grup control. (Fig.3 c)

#### - Grup "aïllats":

a) embrions en estadi d'una, dos i quatre cèl.lules procedents de mitg embrió.

Al igual que en els altres casos no hi ha diferències en quant a la distribució i densitat dels microvillis de la membrana plasmàtica. La diferència més notable entre aquests embrions i els embrions control és el tamany, doncs al provenir de mitg embrió, tenen reduït el seu tamany total. (Fig.4 (a,b,c))



### Conclusions

Al comparar la zona pel·lúcida dels embrions del grup "congelat" amb la dels embrions del grup control no s'ha observat cap diferència; els dos grups presenten característiques molt similars, encara que amb petites variacions individuals.

De la mateixa manera al comparar la membrana plasmàtica dels embrions del grup "congelat" amb la dels embrions del grup control, tampoc observem cap diferència relevant; tant el tipus de microvillis, com la distribució d'aquests és equivalent en els dos grups.

Finalment al comparar la membrana plasmàtica dels embrions del grup "aïllats" amb la dels embrions del grup control, no observem cap diferència; els dos tipus de membranes són equivalents, com també ho són els seus microvillis.

A partir d'aquestes dades, sembla que es pugui afirmar, que la manipulació que han sofert els embrions sotmesos a un programa de congelació-descongelació i els embrions derivats del aïllament d'un blastòmer, no efecta, al menys a nivell morfològic, ni a la zona pel·lúcida ni a la membrana plasmàtica.

### Bibliografia

COLL, A., VIDAL, F., EGOZCUE, J. (1989). Desenvolupament pleimplantacional d'embrions bessons derivats del cultiu in vitro de blastòmers aïllats. 1ª Jornada sobre Biologia de la Reproducció.

ROSES, M. J., SANTALO, J., CATALA, V. (1989). Efectes de la concentració de BSA en la supervivència d'embrions congelats. 1ª Jornada sobre Biologia de la Reproducció.

JOHNSON, M. H., PICKERING, S. J., GEORGE, M. A. (1988). The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. Hum. Reprod., 3, 383-387.

NOGUES, C., PONSÀ, M., VIDAL, F., EGOZCUE, J. (1988). Effects of agging on the zona pellucida surface of mouse oocytes. J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer, 4, 225-229

WHITTINGHAM, D. G. (1971). Culture of mouse ova. J. Reprod. Fertil., (supl.) 14, 7-21

WHITTINGHAM, D. G., ANDERSON, E. (1976). Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos. J. Reprod. Fertil., 48, 137-140

### Agraïments

Cal agraïr a la CIRIT (ajuts projectes recerca joves investigadors AR-88) i a la CICYT (projecte nº BT87/0021) els ajuts concedits.



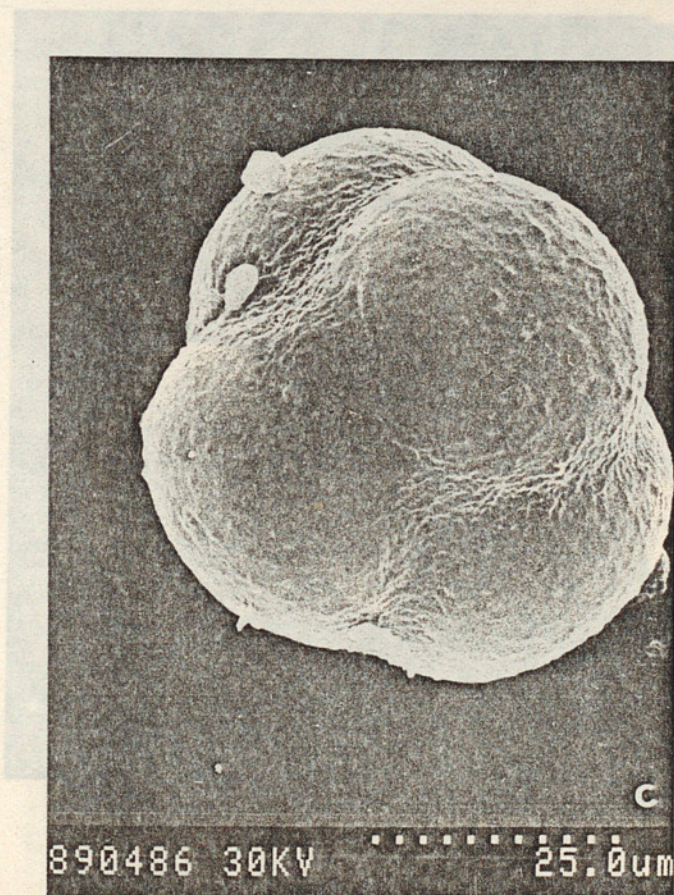
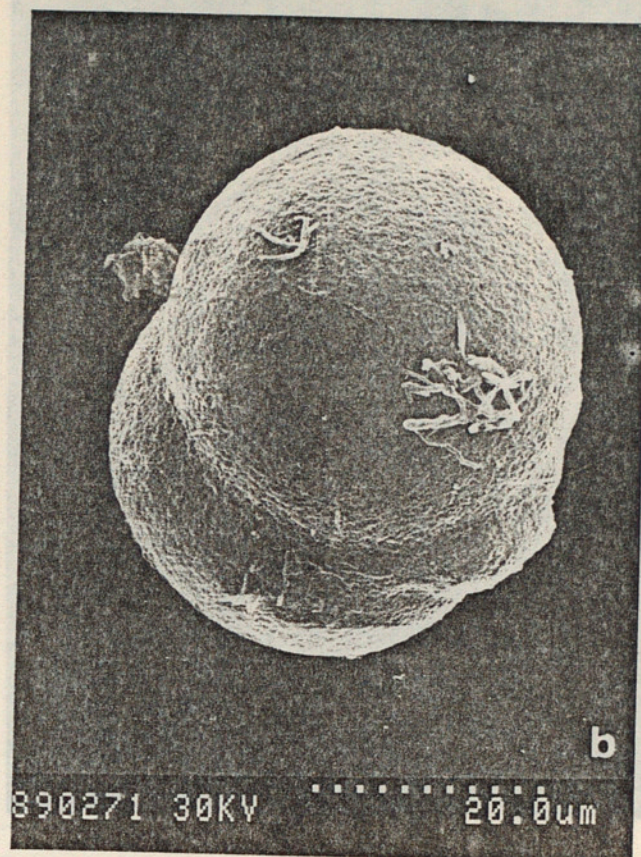
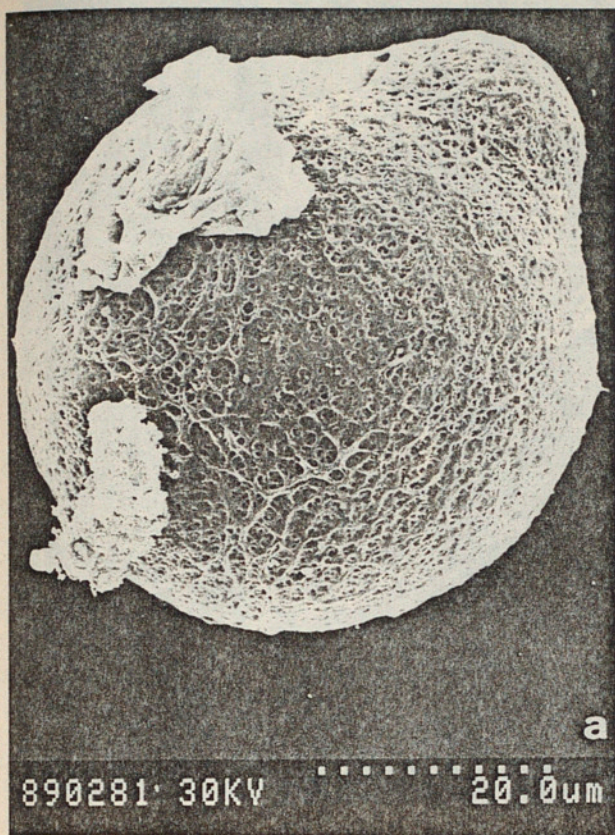


Fig. 1 Embrions control amb zona pel.lúcida en estadi d'una cèl.lula (a), dos cèl.lules (b) i quatre cèl.lules (c).



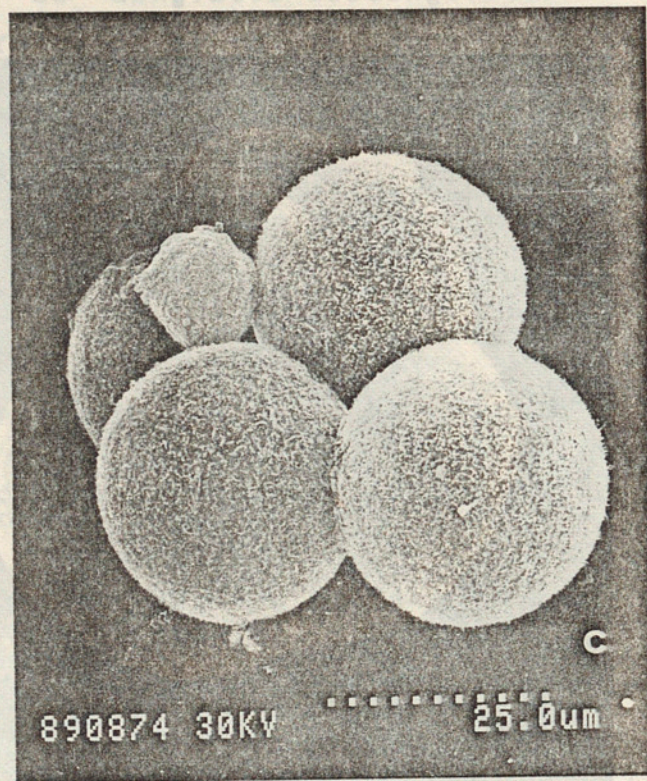
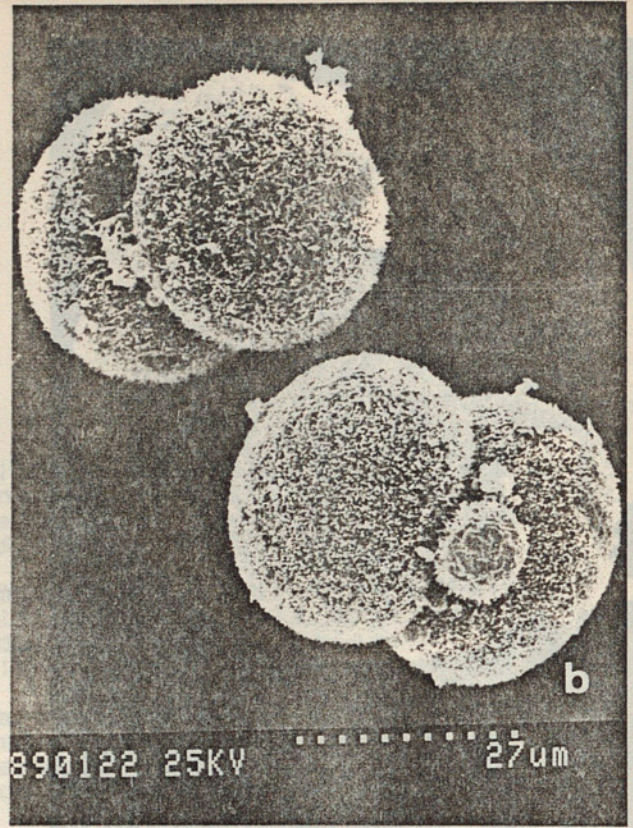
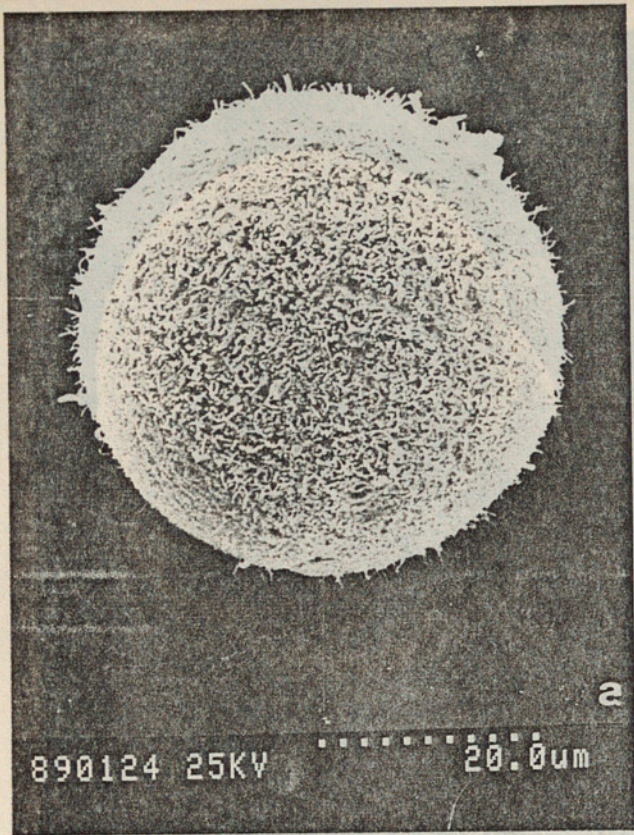
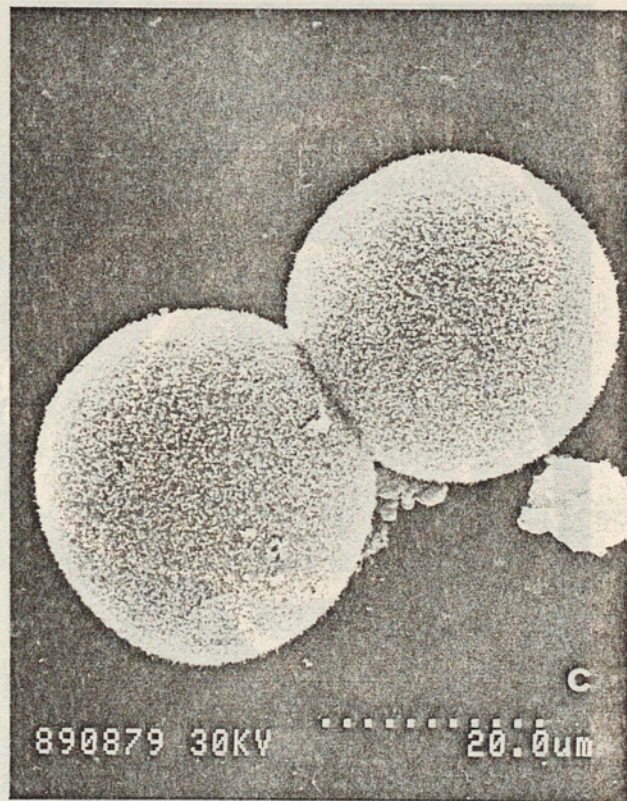
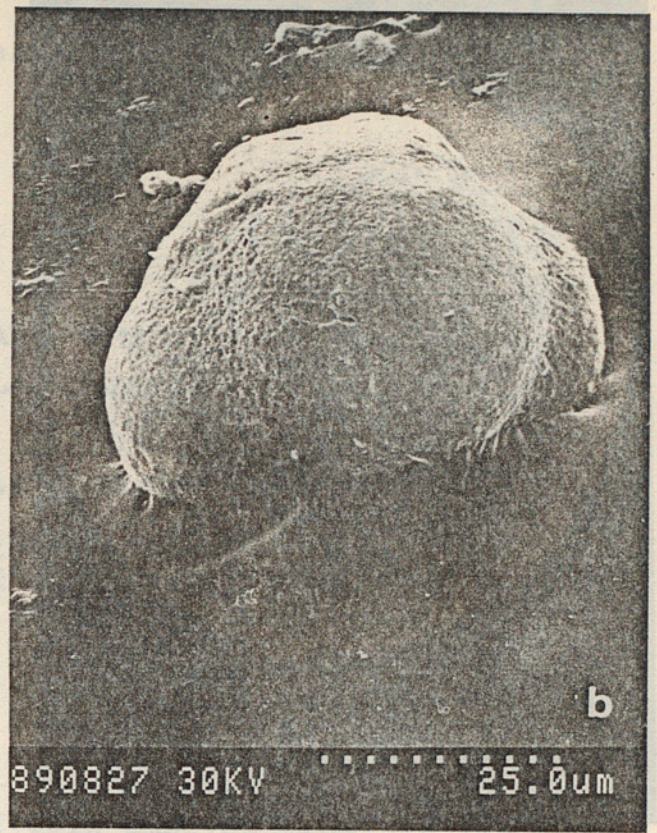
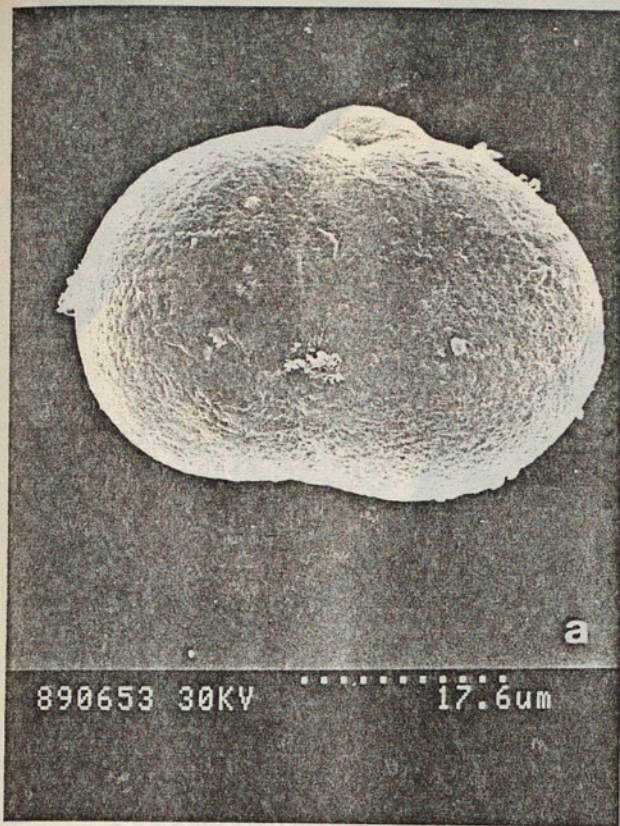


Fig. 2 Embrions control sense zona pel.lúcida en estadi d'una cèl.lula (a), dos cèl.lules (b) i quatre cel.lules (c).





tro" cultured isolated blastocysts.

It is well established that the transfer of a single embryo, however, does not ensure a high genetic share transfer.

In the present study, embryos are analyzed and viability is compared in comparison. Our results show that blastocysts develop

Key words: embryo transfer, zona pellucida, blastocyst, cryopreservation.

### Introducció

En els últims anys s'han fet evidents els avantatges de la

Fig. 3 Embrions sotmesos a un procés de congelació-descongelació en estadi de: (a) dos cèl.lules amb zona pel.lúcida, (b) quatre cèl.lules amb zona pel.lúcida i (c) dos cèl.lules sense zona pel.lúcida.



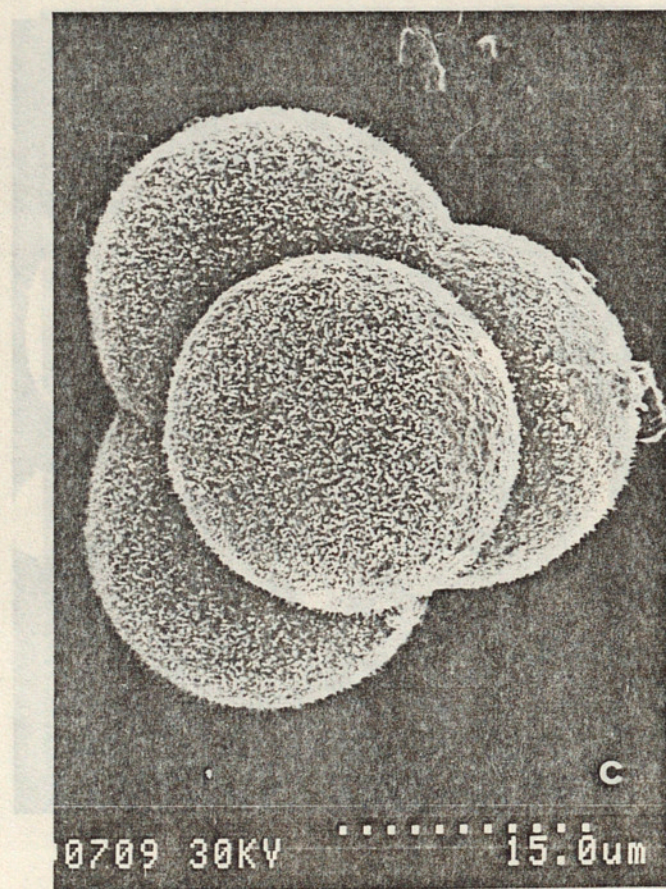
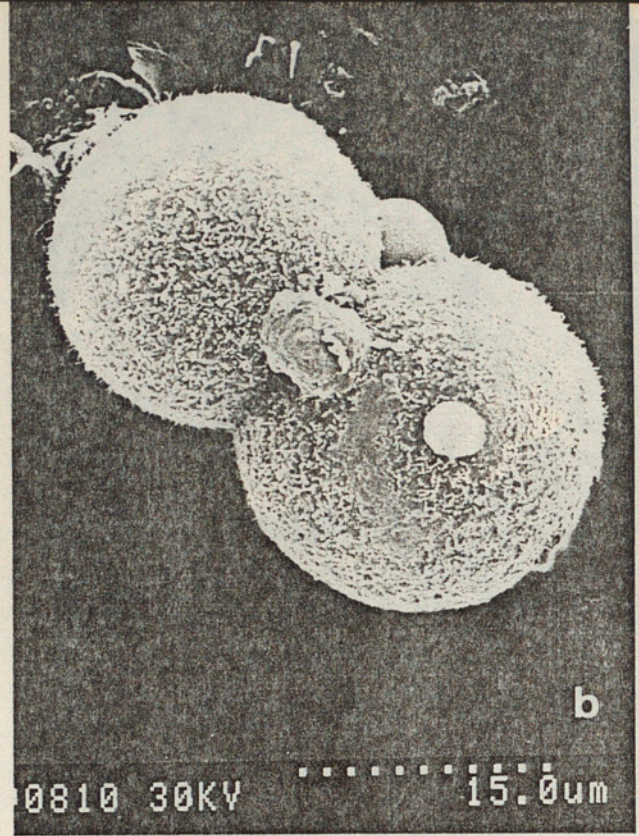
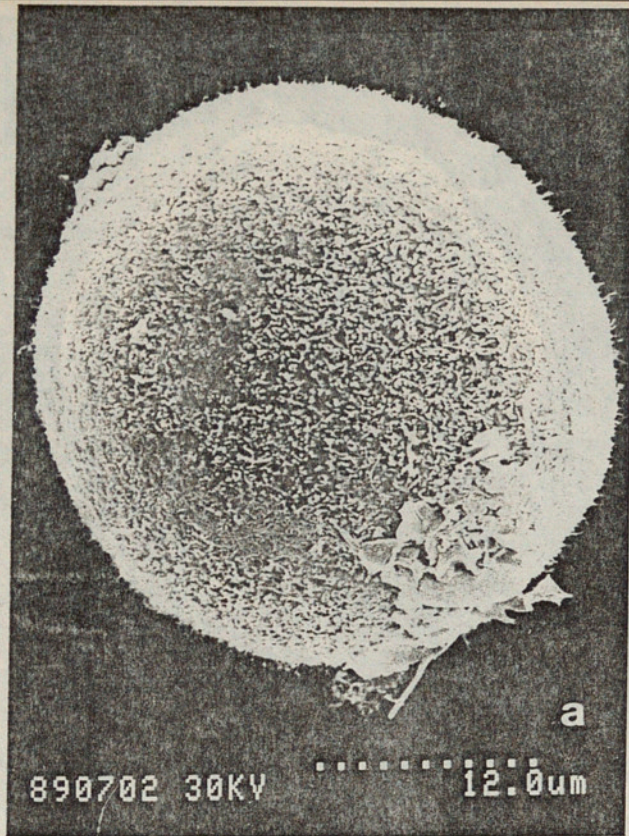


Fig. 4 Embrions derivats d'un blastòmer aïllat en estadi d'una cèl.lula (a), dos cèl.lules (b), i quatre cèl.lules (c).