

DESENVOLUPAMENT PREIMPLANTACIONAL D'EMBRIONS BESSONS DERIVATS DEL CULTIU "IN VITRO" DE BLASTÒMERS AÏLLATS

Agustina Coll, Francesca Vidal i Josep Egozcue

Dpt. Biologia Cel.lular i Fisiologia. Institut de Biologia Fonamental "Vicent Villar Palasí". Universitat Autònoma de Barcelona. Campus universitari. 08193 Bellaterra.

Abstract

Preimplantation development of twin embryos from "in vitro" cultured isolated blastomeres.

It is well established that cryopreservation and embryo transfer offer advantages in animal production and reproduction, However the advantages could be greater by the genetic characterization of the embryos prior to the transfer.

In the present study, blastomeres from two-cell mouse embryos are isolated and cultured "in vitro". The development and viability of the derived twin embryos are analyzed in comparison with control embryos.

Our results show that 71.8% of the cultured isolated blastomeres develop into normal blastocysts at expected time.

Key words: embryo splitting, mouse blastomeres, preimplantation diagnosis.

Introducció

En els últims anys s'han fet evidents els avantatges de la transferència i congelació d'embrions en producció i reproducció animal. No obstant, aquests s'incrementarien nota-

blement si, sense comprometre la viabilitat dels embrions, es pogués determinar el sexe, seleccionar aquells embrions que assegurassin un bon desenvolupament, detectar anomalies genètiques, etc..., en definitiva fer un control abans de la seva transferència a femelles receptores.

Malgrat haver-se proposat varis mètodes no invasius per efectuar un diagnòstic preimplantacional (veure per revisió: Edwards i Hollands, 1988; Shelton, 1988) en general són més eficients els mètodes invasius. Aquests últims es basen en l'obtenció d'una o més cèl.lules d'un embrió preimplantacional que poden ser processades per estudis citogenètics, d'hibridització "in situ" (West i col., 1988), d'anàlisis microenzimàtiques (Benson i Monk, 1988; Monk i col., 1988) o de DNA recombinant.

Tres són les metodologies bàsiques que poden utilitzar-se per obtenir cèl.lules d'embrions preimplantacionals: biòpsies de mórules o blastocists (Monk i col., 1988; Summers i col., 1988), bisecció de mórules o blastocists (Ozil, 1983; Nagashima, 1984) i l'aïllament de blastòmers (Epstein, 1978; Willadsen, 1979; Tsunoda i McLaren, 1983; Nijs i col., 1988).

En aquest treball, presentem una metodologia per aconseguir embrions bessons ($\frac{1}{2}$ embrions) a partir de l'aïllament i cultiu "in vitro" de blastòmers d'embrions de ratolí en estadi de dues cèl.lules. L'un es podria utilitzar per l'estudi citogenètic i l'altre es deixaria créixer fins l'estadi adient per a la congelació, oferint-nos la possibilitat d'escollir els embrions de major interès per a la seva transferència.

Material i mètodes

Els embrions s'obtenen de femelles de ratolí de la soca B6CBF₁. S'indueix una superovulació per injecció via intra-peritoneal de 5 u.i. de PMSG. 48h més tard es subministra la mateixa dosi d'HCG i s'aparellen amb mascles de la mateixa soca.

Entre les 44h-48h post HCG les femelles són sacrificades per dislocació cervical. S'extrauen els oviductes i es per fusionen per la fímbria obtenint embrions a 2 cèl.lules tardanes que es mantenen en gotes de medi de cultiu M₁₆ de Whittingham (1971) sota oli de parafina a 37°C i 5% de CO₂ fins a ésser processats.

S'elimina la zona pel.lúcida per incubació dels embrions en una solució de pronasa al 0.5% durant 5-10 min a 37°C.

L'aïllament de blastòmers s'aconsegueix col.locant els embrions a 2 cèl.lules sense zona en una gota de PBS lluire de Ca²⁺ i Mg²⁺ a temperatura ambient durant 5-15 min.

Els blastòmers obtinguts ($\frac{1}{2}$ embrió) es cultiven individualment en microgotes de M₁₆ en condicions estàndar.

Paral.lelament es mantenen en cultiu dos grups d'embrions control: embrions a 2 cèl.lules i embrions a 2 cèl.lules sense zona pel.lúcida.

Cada 12 hores es fa un control de creixement de tots els embrions i s'avalua la seva viabilitat basant-nos en criteris morfològics. Considerem que tenen un desenvolupament normal aquells embrions que a les 12 hores de cultiu han experimentat com a mínim una divisió, a les 48 hores han compactat i a les 60 hores de cultiu ja han cavitat.

Resultats

Seguint la metodologia descrita el 78.4% dels blastòmers aïllats obtinguts d'embrions a 2 cèl.lules ($\frac{1}{2}$ embrions) superen el procés de manipulació i poden ser sembrats (Taula I).

Respecte al desenvolupament in vitro dels $\frac{1}{2}$ embrions, els resultats obtinguts són els següents (Taula II): al voltant de les 9h de cultiu la majoria de $\frac{1}{2}$ embrions presenten 2 cèl.lules i a les 24h de cultiu un 96.9% han arribat com a mínim a aquest estadi.

Els $\frac{1}{2}$ embrions compacten a 4 cèl.lules i s'observa que l'inici de compactació és independent de la disposició dels blastòmers (en "flor", lineals, en "U", en "T"...). A les 24h de cultiu ja es detecten $\frac{1}{2}$ embrions que inicien la comcompactació i a les 48h de cultiu un 89.3% han compactat o estan en estadis més avançats.

Al voltant de les 60h de cultiu el 75.5% dels $\frac{1}{2}$ embrions han cavitat. D'aquests, un 71.8% són blastòcits d'una mida més petita que la dels embrions control però de morfologia normal i un 3.7% presenten un aspecte anòmal, alguns d'ells amb 2 cavitats blastocèliques. Després d'aquest període de cultiu encara es troben embrions en estat de mòrula que classifiquem com a retardats (10.6%) i un 13.9% dels embrions han degenerat (Taula III).

Per altra banda, els resultats preliminars obtinguts fent un control de creixement dels dos blastòmers derivats del mateix embrió indiquen que en un 71.4% dels cassos els dos blastòmers aïllats arriben a l'estadi de blastocist.

Pel que fa al cultiu in vitro dels embrions control observem que el 100% dels embrions amb i sense zona pel.lúcida arriben a 4 cèl.lules després de, com a mínim, 24 hores de cultiu. A les 48 hores els embrions que han assolit l'estadi de 8 cèl.lules i han compactat són un 94.6% pels embrions amb zona i un 92.9% pels embrions sense zona. A les 60 hores de cultiu el 80.4% d'embrions amb zona pel.lúcida i

el 78.5% dels embrions sense zona han cavitat.

A partir de les 72 hores de cultiu els embrions sense zona pel·lúcida i els embrions derivats de blastòmers aïllats que havien cavitat presenten un aspecte disgregat. Observem que els embrions progressivament es descompacten, els blastòmers apareixen molt vaquolitzats i finalment les cèl·lules es separen.

Discusió

La metodologia descrita en aquest treball permet l'aïllament de blastòmers bessons provinents d'embrions de ratolí en estadi de dues cèl·lules i el seu cultiu individual fins assolir l'estadi de blastocist.

Els resultats obtinguts mostren que els embrions derivats dels blastòmers aïllats caviten en intervals de temps equivalents als dels embrions control. El procés de compactació no es veu afectat per la manca de zona ni per la reducció del nombre de cèl·lules a la meitat i és independent de la disposició espacial dels blastòmers. L'inici de formació de la cavitat blastocèlica tampoc depèn de la presència de zona pel·lúcida ni del nombre de cèl·lules, dades que concorden amb Smith i McLaren (1977) que proposen que el temps de formació del blastocel dependria del nombre de replicacions del DNA i/o de la proporció nucli-citoplasma.

La viabilitat dels $\frac{1}{2}$ embrions que arriben a blastocist es veu disminuïda en un 9% respecte als embrions control, aquests resultats són comparables als d'altres treballs fets en aquesta línia en diferents espècies de mamífers (Willadsen, 1979; Tsunoda i McLaren, 1983; Allen i Pashen, 1984; Tojo i col. 1985; Nijs i col. 1988).

Els blastocists obtinguts són d'una mida més petita que els embrions control i semblen presentar una proporció menor de massa cel·lular interna (MCI) i una proporció més gran de trofoectoderm quan es comparen amb els embrions control, coincidint amb observacions fetes per Rands (1986)

en $\frac{1}{2}$ embrions postimplantacionals, on troba que la proporció de teixits derivats de la MCI respecte als teixits derivats del trofoectoderm és significativament més petita que en controls.

Si bé s'han obtingut $\frac{1}{2}$ embrions cavitats amb morfologies anòmals (3.7%) no s'han observat vesícules trofoblàstiques a diferència d'altres treballs (Tarkowski i Wróblewska, 1967; Tojo i col., 1985; Nijs i col., 1988) i d'acord amb Matte (1987). L'obtenció d'embrions anòmals podria ser deguda a la formació de mòrules amb pocs o sense blastòmers apolars inclosos dins d'un microambient intercel·lular (Tarkowski i Wroblewska, 1967). Dues són les causes que produirien mòrules d'aquestes característiques: la manca de zona pel·lúcida i el reduït nombre de cèl·lules. El fet que no s'hagin observat blastocists anòmals del desenvolupament d'embrions complets sense zona i que els resultats d'altres treballs amb $\frac{1}{2}$ embrions amb zona pel·lúcida (Tojo i col., 1985; Nijs i col., 1988) no redueixi la proporció d'embrions anòmals, ens fa pensar que l'obtenció d'aquests embrions seria deguda a la reducció del nombre de cèl·lules en el moment de la cavitació tal com proposa Rossant (1976).

A partir de les 72h de cultiu els embrions control s'expandeixen i finalment surten de la zona pel·lúcida mentre que els embrions sense zona, tant els controls com els $\frac{1}{2}$ embrions, descompacten i presenten blastòmers molt vaquolitjats; finalment les cèl·lules acaben per separar-se. S'ha demostrat (Wassarman, 1987) que el trencament de la zona pel·lúcida s'aconsegueix gràcies a una proteïnasa de característiques semblants a la tripsina anomenada stripsina. Deduïm que davant la manca de zona a digerir la stripsina podria provocar la disgregació del blastocist doncs la morfologia que en aquest període presenten els embrions sense zona és semblant a la descrita per Braude i col. (1983) quan fa créixer els embrions amb medis que inhibeixen la compactació. Tsunoda i McLaren (1983) i Moonk (1988) mostren que s'obtenen nascuts vius de la transferència a úter

d'embrions sense zona pel·lúcida en estadi de mòrula o de blastocist, per tant el microambient uterí deu compensar l'efecte de la stripsina.

Per confirmar la viabilitat d'aquests $\frac{1}{2}$ embrions hem programat la seva transferència a femelles adoptives. Segons els nostres resultats la transferència s'ha de dur a terme abans de que es produeixi el procés de disgregació observat a les 72h de cultiu i en estadis prou avançats per evitar que els embrions s'enganxin a les parets de l'úter a causa de la manca de zona pel·lúcida (Modlinski, 1970), és a dir, en estadis de mòrula o blastocist primerenc.

Agraïments

Cal agrair a la CICYT (projecte BT87-0021) l'ajut concedit.

Bibliografia

- ALLEN, W.R., i PASHEN, R.L. (1984) Production of monozygotic horse twins by embryo micromanipulation. J. Reprod. Fert., 71, 607-613.
- BENSON, C., i MONK, M. (1988) Microassay for adenosine deaminase, the enzyme lacking in some forms of immunodeficiency in mouse preimplantation embryos. Hum. Reprod., 3: 8, 1004-1009.
- BRAUDE, P.R., JOHNSON, M.H., BOLTON, V.N. i PRAAT, H.P.M. (1983) Cleavage and differentiation of the early embryo. Dins: In vitro Fertilization and Embryo Transfer (Crossignani and Rubin, eds.). Academic Press Inc. (London) Ltd.
- EPSTEIN, C.J. (1978) Both X chromosomes function before visible X chromosome inactivation in female mouse embryos. Nature, 274, 500-503.
- EDWARDS, R.G., i HOLLANDS, P. (1988) New advances in human embryology implications of the preimplantation diagnosis of genetic disease. Hum. Reprod., 3:4, 549-556

- MATTE, C., DOGGENWEILER, C.F. i IZQUIERDO, L. (1987) Development of mouse embryos following the destruction of blastomeres. Arch. Biol. Med. Exp., 30, 295-303.
- MODLINSKI, J.A. (1970) The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. J. Embryol. Exp. Morph., 23:3, 539-547.
- MONK, M. i HANDYSIDE, A. (1988) Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. J. Reprod. Fert., 82, 365-368.
- MONK, M., MUGGLETON-HARRIS, A.L., RAWLING, E., i WHITTINGHAM, D.G. (1988) Preimplantation diagnosis of HPRT-deficient male and carrier female mouse embryos by trophoctoderm biopsy. Hum. Reprod., 3:3, 377-381.
- NAGASHIMA, H., MATSUI, K., i SAWASAKI, T. (1984) Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. J. Reprod. Fert., 70, 357-462.
- NIJS, M., CAMUS, M., i VAN STEIRTEGHEM, A.C. (1988) Evaluation of different biopsy methods of blastomeres from 2-cell mouse embryos. Hum. Reprod., 3:8, 999-1003.
- OZIL, J.P. (1983) Production of identical twins by bisection of blastocyst in the cow. J. Reprod. Fert., 69, 463-468.
- RANDS, G.F. (1986) Size regulation in the mouse embryo. II the development of half embryos. J. Embryol. Exp. Morph., 98, 209-217.
- ROSSANT, J. (1976) Postimplantation development of blastomeres isolated from 4 and 8 cells mouse eggs. J. Embryol. Exp. Morph., 36, 283-290.
- SHELTON, J.N. (1988) Embryo Manipulation in Research and Animal Production. Aust. J. Biol. Sci., 41, 117-132.
- SMITH, R., i McLAREN, A. (1977) Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. J. Embryol. Exp. Morph., 41, 79-92.

- SUMMERS, P.M., KAMPBELL, J.M. i MILLER, M.W. (1988) Normal in vivo development of marmoset monkey embryos after trophoderm biopsy. Hum. Reprod., 3:3, 389-393.
- TARKOWSKI, A.K. i WROBLEWSKA, J. (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cells stage. J. Embryol. Exp. Morphol., 18, 155-180.
- TOJO, H., OGITA, Z. i MOMOSE, Y. (1985) Comparison of the in vitro development of mouse single blastomeres with and without the zona pellucida. Experientia, 41, 108-109.
- TSUNODA, Y., i McLAREN, A. (1983) Effect of various procedures on the viability of mouse embryos containing half the normal number of blastomeres. J. Reprod. Fert., 69, 315-322.
- WASSARMAN, P.M. (1987) The zona pellucida: A coat of Many Colors. Bio Essays, 6:4, 161-166.
- WEST, J.D., GOSDEN, J.R., ANGELL, R.R., WEST, K.M., GLASIER, A. F., THATCHER, S.S. i BAIRD, D.T. (1988) Sexing whole human pre-embryos by in-situ hybridization with a Y chromosome specific DNA probe. Hum. Reprod., 3:8, 1010-1019.
- WHITTINGHAM, D.G. (1971) Culture of Mouse Ova. J. Reprod. Fert. (suppl.), 14, 7-21.
- WILLADSEN, S.M. (1979) A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, 277, 298-300.

Taula I. Eficiència de la metodologia de l'aïllament de blastòmers

Núm. d'embrions inicials a 2 cèl.	192	
Núm. d'embrions a 2 cèl. sense ZP	188	
Núm. de blastòmers aïllats i sembrats	301	(78.4%)
Estadi de desenvolupament a les 60h de cultiu		
Núm. blastocists normals	216	(71.76%)
Núm. blastocists anòmals	11	
Núm. retardats	32	
Núm. degenerats	42	

Taula II. Desenvolupament "in vitro" dels embrions estudiats

	Hores de cultiu		
	24h	48h	60h
Embrions sembrats a 2 cèl. amb ZP	100% a 4 cèl.	94.6% a 8 comp.	80.4% cav.
Embrions sembrats a 2 cèl. sense ZP	100% a 4 cèl.	92.9% a 8 comp.	78.5% cav.
$\frac{1}{2}$ embrions	96.9% a 2 cèl.	89.3% a 4 comp.	71.8% cav.

comp: compactats; cav: cavitats

Taula III. Estadi de desenvolupament "in vitro" a les 60h de cultiu

	Embrions control		Mitjos embrions
	amb ZP	sense ZP	
Cavitats	80.4%	78.5%	75.5%
normals	80.4%	78.5%	71.8%
anòmals	0%	0%	3.7%
Retardats	10.7%	14.3%	10.6%
Degenerats	8.9%	7.2%	13.9%