

Evaluación del efecto de la remoción de la zona pelúcida de los oocitos sobre el desarrollo de embriones murinos obtenidos por fertilización in vitro

Jesús A Berdugo^{1,2}, DMV, MSc; Rosa A Sierra¹, BS. Andrés F Giraldo³, Est..

¹Programa de Reproducción. Corporación BIOGENESIS ² Profesor Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, ³ Facultad de Medicina .
Universidad de Antioquia. AA 1226, Medellín, Colombia
jberdugo@quimbaya.udea.edu.co*

(Recibido: 10 de octubre, 2002; aceptado: 15 mayo, 2003)

Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto de la remoción de la zona pelúcida de oocitos sobre el desarrollo embrionario murino in vitro, y el potencial uso de este procedimiento en programas de reproducción asistida humana, se superovularon 84 ratonas. A los oocitos obtenidos se les removió la zona pelúcida mediante el uso de una solución de pH 2, posteriormente inseminados con diferentes concentraciones de espermatozoides; los embriones obtenidos cultivados in vitro hasta estadios preimplantatorios fueron transferidos a hembras pseudogestantes. Luego del tratamiento con la solución ácida se recuperaron 56% de los oocitos con una viabilidad del 83.6%, los oocitos fueron fertilizados normalmente en proporciones dependientes de la concentración de espermatozoides utilizada variando desde 25 hasta 66.6%, estos se desarrollaron hasta estadios preimplantatorios en un 45%, siendo esta proporción inferior comparada con los controles.. No se obtuvieron gestaciones de los embriones transferidos. Se demuestra que la remoción de la zona pelúcida es una técnica sencilla y viable, cuya única condición es la rapidez en su realización; es necesario usar bajas concentraciones de espermatozoides para incrementar la proporción de fertilizaciones normales. Se confirman resultados de otros autores sobre la factibilidad de obtener embriones mediante la remoción de la zona pelúcida, aún en el humano. Queda por establecer el mínimo de espermatozoides necesarios para obtener la mayor proporción de fertilizaciones normales y explicar las razones del bajo desarrollo de los embriones obtenidos.

Palabras clave: desarrollo, manipulación, óvulos, ratones.

Introducción

La falla reproductiva, entendida como la incapacidad para concebir, gestar y parir un individuo, es un fenómeno que ocurre en una proporción determinada en cada especie, siendo ésta en el ser humano una de las más altas. El manejo de los aspectos biológicos y genéticos son los que definen las conductas a seguir para su tratamiento y son precisamente, el desconocimiento de los primeros y la imposibilidad de cuantificar los segundos, los que hacen su manejo complicado.

Desde 1964 se conoce que se pueden obtener ratones nacidos vivos removiendo la zona pelúcida de los oocitos (15) lo que permitió posteriormente desarrollar los siguientes métodos de micromanipulación gamética: la disección parcial de la zona (PZD) (3), la introducción de los espermatozoides en el espacio perivitelino (SUZI) (1) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide en el oocito (ICSI) (4). Recientemente se ha informado de individuos nacidos vivos provenientes de la inyección de precursores espermáticos dentro de los oocitos (ROSNI) (6).

Existe controversia con la forma de evaluar la calidad genética de los gametos usados en los procedimientos.

En los programas de fertilización in vitro humana y animal se ha observado que la cantidad de espermatozoides necesaria para fertilizar un oocito puede variar hasta en un orden de magnitud, sin que aumente significativamente la frecuencia de oocitos polispermicos, lo que sugiere que existe otro mecanismo de bloqueo de la polispermia en la membrana plasmática del oocito (9). Si se remueven todas las membranas del oocito y se controla la concentración espermática podría darse la fertilización normal y obtener embriones susceptibles de ser transferidos.

En el presente trabajo se utilizó el modelo murino para evaluar el efecto de la remoción de las barreras que tiene el espermatozoide para poder fertilizar el oocito sobre el desarrollo de los embriones producidos in vitro. Se discute el uso potencial de esta metodología como una alternativa al ICSI.

Materiales y métodos

Obtención de oocitos

Para este proyecto se estableció una colonia de ratones de la cepa C57BL/6J (adquiridos en el Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia). Los oocitos fueron obtenidos por superovulación de ratonas de 8 semanas de edad mediante la inyección intraperitoneal de 5UI de gonotropina sérica de yegua preñada (Intervet, Hunieen, Holanda), seguida de una inyección intraperitoneal 48 horas más tarde de 5UI de gonadotropina coriónica humana (Schering, Franingham, MA). Las ratonas se sacrificaron por dislocación cervical, los oviductos se transfirieron asépticamente a medio de cultivo, las masas con oocitos se removieron del oviducto mediante punción directa y se llevaron a una solución de hialuronidasa al 3% (Gibco, Grand Island CA) en medio de cultivo Human Tubal Fluid (HTF) (Irvine Scienfic, Santa Ana CA). Una vez los oocitos estuvieron libres de células del cúmulus fueron incubados por 8min/ 37°C/ 5% CO₂ antes de ser utilizados en los diferentes experimentos; se registró la presencia del primer cuerpo polar.

Todos los procedimientos con animales fueron realizados de acuerdo con las normas existentes para el sacrificio humanizado de animales.

Obtención de espermatozoides

Los espermatozoides fueron obtenidos de ratones machos fértiles de 8 semanas de edad de la cepa Suiza. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se realizó una incisión media ventral, se expusieron los epidídimos que fueron transferidos a cajas de 4 pozos (Grand Island, NY) con 1 ml de HTF. Con la ayuda de agujas se maceraron los epidídimos y se dejaron en incubación por 30min/ 37°C/5% CO₂. Una vez incubados se evaluó la movilidad y la concentración espermática.

Remoción de la zona pelúcida

Se tomaron grupos de 5 oocitos que fueron transferidos a gotas de solución ácida Tyrodes pH 2.0 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), se observó bajo el estereoscopio la remoción de la zona pelúcida. Posteriormente los oocitos se lavaron tres veces con HTF y se dividieron en dos grupos: partenogénesis e inseminación. Se estimó la proporción de oocitos recuperados después de la remoción de la zona pelúcida y se evaluó la viabilidad de los mismos mediante la técnica de exclusión del azul tripano. Para el caso de la partenogénesis fueron dejados en cultivo por 48 horas en HTF y se evaluó la activación y el desarrollo del oocito.

Fertilización

Se colocaron 10 oocitos desnudos en microgotas de 50 ul, fueron inseminados con diferentes concentraciones espermáticas: 1.000, 10.000 y 100.000 espermatozoides móviles/ml; como control se utilizó la concentración de 1.000.000 esp/ml. La fertilización fue evaluada mediante la observación de los pronúcleos al microscopio de fluorescencia utilizando el colorante de Hoescht; se consideró fertilización normal aquella que presentaba dos pronúcleos, el clivaje fue evaluado a las 18 horas postinseminación (hpi). Los oocitos fueron transferidos a gotas de medio de cultivo (HTF) fresco y se observó su desarrollo cada 24 horas hasta las 96 hpi, momento en el que se esperaba obtener mórulas o blastocistos susceptibles de ser transferidos.

Transferencia

Para la transferencia de los embriones se utilizó la técnica descrita por Berdugo *et al* (2).

El método consiste en anestésiar a la ratona con una mezcla de Xilazine (Hoescht, Bogotá) y Ketamina (Intervet), depilar la región dorsal y hacer una pequeña incisión media dorsal hasta llegar a la cavidad abdominal, exponer el útero al espacio exterior mediante tracción. Una vez extraído, se inyectan los embriones en la luz del cuerno uterino, se reintroduce

el útero en la cavidad abdominal y se coloca un punto en la piel.

Los datos fueron analizados mediante la realización de comparaciones entre grupos con el fin de evaluar la existencia de diferencias significativas mediante la utilización de la prueba t de Student.

Resultados

Obtención de oocitos

Se utilizaron 84 ratonas de las que se obtuvo un promedio de 19 oocitos por ratona: 73.5% maduros, 16.8% inmaduros y 9.61% degenerados.

Como se puede observar en la tabla 1, se les removió la zona pelúcida a 132 oocitos de los cuales se recuperaron 74 (56%), con un rango por repetición que varió del 30 al 100%. En 7 de las nueve repeticiones el porcentaje de recuperación fue mayor del 60%. Posterior a la exposición al medio ácido, 46 de 55 oocitos no tomaron el colorante azul tripano (83.6%), comparado con 62 de 70 (88.6%) de los controles a los que no se les había removido la zona pelúcida; estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 1. Efecto de la remoción de la zona pelúcida sobre la recuperación y viabilidad de los oocitos

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Oocitos manipulados | 132 |
| Oocitos recuperados | 74 (56%) |
| Rango de recuperación | 30 a 100% |
| Viabilidad post tratamiento | 83.6% |

Partenogénesis. El porcentaje de oocitos que se activaron espontáneamente 24 horas después de la remoción de la zona pelúcida fue de 20.6% (12/58) comparada con 16.7% en el grupo sin remoción (8/48), estas diferencias no fueron significativas. Al evaluar la activación a las 48 horas, 10 de los 12 del grupo tratado habían continuado su clivaje a 2 o 4 células, mientras que en el grupo control los 8 continuaron su división y dos más se activaron tardíamente. (véase Tabla 2).

Fertilización

Los oocitos desnudos inseminados con diferentes concentraciones espermáticas: 1.000, 10.000 y 100.000 espermatozoides/ml, mostraron una tasa de fertilización normal (monospermica) de 25%, 52.9% y 66.6% respectivamente, comparada con 59.1% de los

controles, inseminados con 1.000.000 de espermatozoides.

Tabla 2. Activación de los oocitos posterior a la remoción de la zona pelúcida

| Oocitos | Activados a las 24 horas | Desarrollo a las 48 horas |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| Sin zona pelúcida | | |
| Tratados con pH ácido | 20.6% (12/58) | 83.3% (10/12) |
| Control | | |
| Con zona pelúcida. | 16.6% (8/48) | 100% (8/8) |
| Sin tratamiento | | |

La tasa global de desarrollo de los embriones fertilizados obtenida de las diferentes concentraciones utilizadas fue del 45% en los oocitos a los que se les removió la zona pelúcida, comparada con 75% de los controles. En todas las concentraciones se pudieron obtener mórulas y blastocistos; se transfirieron 15 mórulas o blastocistos a ratonas pseudogestantes pero no se obtuvo gestación.

Los resultados de fertilización y desarrollo discriminados de acuerdo con las diferentes concentraciones espermáticas son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Fertilización normal y clivaje de oocitos murinos sin zona pelúcida a diferentes concentraciones espermáticas.

| Concentración Espermática | No de oocitos | Fertilización % | Clivaje % | Mórulas y blastocistos |
|---------------------------|---------------|-------------------|-----------|------------------------|
| 1.000/ml | 62 | 25 ^a | 37 | 4/62 (6.4%) |
| 10.000/ml | 72 | 52.9 ^b | 44 | 7/72 (9.7%) |
| 100.000/ml | 94 | 66.6 ^b | 51 | 10/94 (10.6%) |
| 1.000.000/ml | 142 | 59.1 ^b | 45 | 14/142 (9.8%) |
| Sin espermatozoides | 48 | | 25 | 0/48 (0%) |

^{a y b} diferente estadísticamente, (p<0.05)
ml = mililitro

Discusión

La técnica de remoción de la zona pelúcida mediante la utilización de solución ácida de Tyrodes es fácil, rápida y segura, su única condición es la rapidez con la que se debe realizar la manipulación. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la remoción de la zona pelúcida para la obtención de embriones es una técnica factible y que no afecta la

proporción de oocitos partenogénicos por el uso de la solución ácida que además es inocua para los oocitos; después de adquirir la destreza para realizar el procedimiento bajo estereomicroscopio, la proporción de oocitos recuperados posterior al tratamiento con solución ácida fue alta, más del 60% con una viabilidad del 83.6%. En este estudio el número y la calidad de los oocitos obtenidos fue similar al reportado en la literatura (17) y se observó además que es posible obtener embriones de estadios preimplantatorios a partir de oocitos maduros a los que se les ha removido la zona pelúcida.

Los resultados aquí presentados confirman que la zona pelúcida no es un componente esencial del desarrollo embrionario pues su remoción no impidió que los embriones progresaran hasta estados preimplantatorios. Hallazgos similares han sido informados en humanos, en los que se ha demostrado la obtención de gestaciones más allá de la semana 35, en procedimientos en los que se había removido la zona pelúcida (5). Además, la falta de zona pelúcida no es un impedimento para la realización del ICSI; Ding *et al* (5) informaron que inyectaron espermatozoides dentro de oocitos a los que se les había removido la zona, obteniendo crecimiento *in vitro* hasta el estado de blastocisto.

Ya que la zona pelúcida no es fundamental en el desarrollo embrionario, su papel principal estaría en el evento de la fertilización y aunque se encuentran fertilizaciones monospermicas después de su remoción, hay que aclarar su real papel en todo este proceso. La no existencia de una zona pelúcida obliga a pensar en explicaciones de por qué se dan fertilizaciones monospermicas aún cuando miles de espermatozoides se pongan en contacto con el oocito. Una de ellas, y la que más se acerca a lo que piensa este grupo de investigación, es que por azar el número de espermatozoides que realizan la reacción acrosómica sea tan bajo que asegure fertilizaciones normales. Solamente espermatozoides que tengan el acrosoma intacto pueden reaccionar con la zona pelúcida o espontáneamente (10); en consecuencia, las condiciones *in vitro* pueden inducir la reacción acrosómica, que normalmente lo hace la zona pelúcida. De los resultados de este trabajo se puede inferir que la zona pelúcida favorece el proceso de fertilización normal pero su ausencia no la impide.

La remoción de la zona pelúcida puede ser beneficiosa en diferentes formas: en los programas humanos, su remoción en el día 3 antes de la transferencia, incrementa las tasas de gestación en

aquellos pacientes con pobre pronóstico reproductivo (7,13) y la remoción de la zona en esta época de precompactación del embrión no tiene efectos sobre el desarrollo. Neganova (16) informó que la adhesión existente en los embriones murinos de dos células proveía suficiente E cadherina para inducir la normal distribución del citoesqueleto y las mitocondrias facilitando el desarrollo embrionario. Cohen *et al*, Elebaut *et al*, y Obruca *et al*, citados por Mansour, *et al* (13) han informado que se incrementan las probabilidades de embarazo cuando se rompe la zona pelúcida y se facilita el proceso implantatorio bien sea mediante la PZD, implantación asistida o la utilización de láser. Es importante anotar que desde 1997 se han reportado nacidos vivos humanos obtenidos por transferencia de blastocistos sin zona pelúcida (18)

Al remover la zona pelúcida, queda expuesta la membrana plasmática del oocito. En mamíferos se ha postulado que esta membrana puede tener un papel importante como bloqueador de la polispermia. En conejos (11) se ha observado que pueden presentarse fertilizaciones monospermicas aún inyectando varios espermatozoides al espacio perivitelino; en ratones y ratas la inseminación de oocitos sin zona pelúcida usualmente resulta en fertilización monospermica. En el humano, Levron y col. (14) introdujeron 5 a 6 espermatozoides en el espacio perivitelino de 10 oocitos obteniendo fertilización sólo en 1 (10%); 65 horas más tarde cuando estaba en estadio de 8 células, lo transfirieron y se obtuvo una gestación .

El uso de bajas concentraciones de espermatozoides podría favorecer la fertilización ya que evita la exposición de los oocitos a los radicales libres producidos por los espermatozoides colocados en exceso en los sistemas convencionales de fertilización *in vitro*. Estos radicales, inducen un endurecimiento de la zona pelúcida y tienen efectos deletéreos sobre el ADN espermático (12). Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo permiten sugerir que para una fertilización natural, esto es que el espermatozoide penetre por sí mismo el oocito, es necesario que en el medio de cultivo exista un número mínimo de espermatozoides que aún no se conoce. En este estudio, la inseminación de los oocitos con 1.000 espermatozoides/ml fue menor, con una diferencia estadísticamente significativa cuando se compara con el porcentaje de fertilización con 10.000 o 100.000 esp/ml (25% vs 52%). Es necesario evaluar la menor concentración necesaria para obtener fertilización normal.

El desarrollo de los oocitos fertilizados hasta el estado de mórula y blastocisto en el grupo de oocitos

a los que se les removió la zona pelúcida, fue baja comparada con los controles u otros reportes en la literatura en donde se manipularon los oocitos (8). Queda por evaluar algún efecto deletéreo desconocido sobre el desarrollo embrionario por la remoción de la zona pelúcida.

Estudios posteriores permitirán hacer los ajustes relacionados con la cantidad de espermatozoides y las condiciones de laboratorio para obtener fertilizaciones normales como rutina y evaluar el estatus genético de los embriones obtenidos.

Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia, Centro de Investigaciones Médicas, Proyecto código 99-24.

Summary

Evaluation of the effect of zona pellucida removal over the development of murine embryos obtained using in vitro fertilization.

With the aim of evaluate the effect of zona pellucida removal over the development of murine embryos in vitro and the potential use of these technique in human assisted reproduction programs, 84 mice females were superovulated. The zona pellucida was removed using an acidic solution pH 2, fertilized with different sperm concentrations and the embryos obtained were cultured to preimplantary stages before to be transferred to pseudpregnant females. 56% of the manipulated oocytes were recovered after the acidic treatment with a viability of 83.6%, normal fertilization were obtained in a range from 25 to 66.6 % with dependency of the sperm concentration and 45% of them reach preimplantary stages; this value is lower than the controls. No pregnancies resulted from the transfer of the embryos. The results obtained demonstrated the feasibility of the technique, but it still needs to be speed up in the manipulation procedure; it is necessary to use low sperm concentrations to obtain normal fertilization. Our results agree with others about the feasibility to obtain preimplantary embryos after zona pellucida removal in humans and mice. It is necessary to determine the minimum number of sperm needed to maximize normal fertilization and investigate the reason of low development rates of the embryos obtained.

Key words: *development, manipulation, mice, oocytes.*

Referencias

1. Alikani M, Adler A, Reing, A., Cohen J. Subzonal sperm insertion and the frequency of gamete fusion. *J. Assisted Reproduction and Genetics* 1992; 9:97-102.
2. Berdugo J, Bueno J. Manual para la obtención de oocitos, embriones murinos. *Manual de Laboratorio* . 2002. 34p
3. Cohen J, Malter H, Wright G. Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pelucida penetration is anticipated. *Hum. Reprod.* 1989; 4: 435-42.
4. Cohen J, Adler A, Alikani M. Micro surgical fertilization procedures: Absence of stringent criteria for patient selection. *J. Asist. Reprod. Genetics* 1992; 9: 197-201.
5. Ding J, Rana N, Dmowski W. Case Report: Intracitoplasmatic sperm injection into zona free human oocytes results in normal fertilization and blastocyst development. *Hum. Reprod.* 1999; 14:476-78.
6. Fishel S, Aslam I, Tesarik J. Spermatid conception : a stage too early, or a time too soon. *Hum. Reprod.* 1996; 11(7) : 1371 – 75.
7. Fong C, Bongso A, Ng S. Ongoing normal pregnancies after transfer of zona free blastocysts implications for embryo transfer. *Hum. Reprod.* 1997; 12:557 –60.
8. Fong C, Bongso A, Ng S. Blastocyst pregnancy after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving in vitro fertilization and understanding implantation. *Hum. Reprod.* 1998; 15:1372- 76.
9. Kelly S. Studies on the developmental potential of 4 and 8 cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.* 1977; 200 : 365 –76.

10. Laws-King A, Trounson A, Santhanathan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoa under the zona pellucida. *Fert. Steril* 1987; 48:637-41.
11. Levron J, Lightman A, Stein D, Brandes J, Itskovitz-Eldor J. Pregnancy after subzonal insertion of subzonal cryopreserved spermatozoa from a patient with testicular seminoma. *Fert. Steril.* 1992; 58(4):839-40
12. Lundin K, Handson Ch, Hamberguer L. Are new microfertilization techniques associated with an increased genetic risk to the offspring. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1998; 77:792 -98
13. Mansour RT, Rhodes CA, Aboulghar MA, Seruor GI, Kamal A. Transfer of zona free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Hum. Reprod.* 2000; 15:1061-64.
14. Menezo Y, Barak Y. Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of maternal age. *J. Reprod. Fert.* 1997; 22: 234-41
15. Mintz B. Formation of genetically mosaic mouse embryos, and early development of lethal (t12/t12)-normal mosaics. *J. Exp. Zool* 1964;157:273 -92.
16. Naganova I, Sekirine Y, Echlenlaub-Ritter U. Surface expression of E-cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from two cell block by aggregation. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6:454-64.
17. Pavlok A, McLaren A. The role of cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1979; 29:91-96.
18. Stanger, J. D., Stevenson, K, Lakmaker, A., Woolcott, R. Pregnancy following fertilization of zona-free, coronal cell intact human ova. *Hum. Reprod.* 2001; 16:164-67.