

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



INDUCCION *in vitro* DE PARTENOGENESIS EN OVOCITOS
DE *Crassostrea gigas*

TESIS PROFESIONAL

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

MARIA GUADALUPE JUAREZ MARQUEZ

ENSENADA, B.C.

OCTUBRE DE 1990

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS

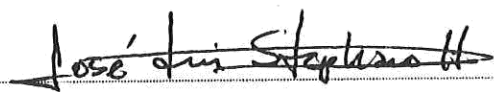
INDUCCION *in vitro* DE PARTENOGENESIS EN OVOCITOS DE
Crassostrea gigas.

T E S I S P R O F E S I O N A L

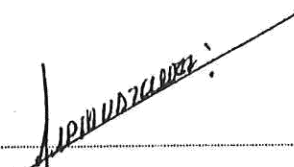
QUE PRESENTA

MARIA GUADALUPE JUAREZ MARQUEZ

APROBADO POR:


M.C. JOSE LUIS STEPHANO HORNEDO
Presidente del Jurado


Dra. MEREDITH GOULD CHAMBERS
Secretario


Biol. OLIVIA TAPIA VAZQUEZ
1^{er} VOCAL

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por todo el apoyo que me han brindado siempre.

A Meredith Gould y José Luis Stephano por la ayuda y facilidades que me brindaron, así como por su asesoría para realizar este trabajo.

A mi compañero Cain, a mis hijos Julián y Miguel por la paciencia y comprensión que tuvieron para conmigo durante todo este tiempo.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a que este trabajo pudiera realizarse en la forma en que se presenta.

A la U.A.B.C. y C.O.N.A.C. y I. por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo, bajo el programa 0133 de la Facultad de Ciencias.

RESUMEN

En el ostión (*Crassostrea gigas*) los ovocitos que son obtenidos por desove se encuentran en metafase I de meiosis, mientras que los obtenidos directamente de la gónada presentan vesícula germinal. En cualquiera de estas dos ocasiones los ovocitos pueden ser fertilizados y desarrollarse. El propósito de inducir partenogénesis fue con el fin de entender los mecanismos básicos del desarrollo y la utilidad que esto pueda tener en manipulaciones genéticas. En nuestros experimentos los ovocitos fueron extraídos directamente de la gónada. Para inducir la ruptura de la vesícula germinal se utilizó serotonina (2×10^{-5} M) llevándolos a metafase I. Se probaron varios métodos para que continuaran con la meiosis: agua de mar alcalina, alto calcio, ionoforo de calcio (A23187) y pronasa. Tanto el alto calcio como el A23187 no estimularon a los ovocitos, mientras que el agua alcalina solo logró que unos cuantos ovocitos formaran 1 cuerpo polar (55%). Con pronasa se lograron los mejores resultados para obtener 1 y 2 cuerpos polares (por ejemplo: con 0.3 mg/ml de pronasa en agua de mar durante 15 minutos dió como resultado típico 60-70% con 1 cuerpo polar y con 45 minutos de exposición a pronasa hasta 85% con 2 cuerpos polares). Sin embargo los ovocitos no segmentaron. Para inducir a la mitosis, en ovocitos previamente expuestos a pronasa, se probó agua de mar hipo- e hiperósmotica y agua pesada. El agua de mar de salinidad alterada no logró que los ovocitos continuaran con su desarrollo. El agua pesada dió resultados que indican que fueron activados para continuar con la mitosis (50% de D.O en agua de mar por 1 hora, mostró un 11% de segmentación normal y un 25% de segmentación anormal). Nuestros resultados indican que la utilización de pronasa es muy efectiva para la formación de 1 y 2 cuerpos polares y que se puede estimular con D.O para segmentarse. Sería necesario realizar más experimentos para determinar si los embriones partenogénéticos pueden desarrollarse.

ABSTRACT

In oyster (*Crassostrea gigas*), eggs obtained in natural spawnings are in metaphase I of the meiosis while those obtained directly from the gonad have intact germinal vesicles. Eggs obtained either way can be fertilized by sperm and will develop normally. This study of parthenogenesis induction was undertaken in order to understand basic mechanisms in development as well as for its possible utility for genetic manipulations. In our experiments eggs were obtained directly from the gonad. Germinal vesicle breakdown was induced with serotonin (2×10^{-5} M); the treated oocytes arrested in metaphase I. Several methods were tried to induce oocytes to continue with meiosis: a) alkaline seawater; b) high calcium; c) calcium ionophore (A23187) and d) pronase in seawater. Neither high calcium nor A23187 stimulated oocytes, and only a few oocytes (55%) attained first polar body formation with alkaline seawater. However, good results were obtained with pronase in seawater: treatment with 0.3 mg/ml for 15 minutes yielded 60-70% oocytes with the first polar body, and the same concentration for 45 minutes yielded up to 85% oocytes with the second polar body. However oocytes did not undergo cleavage. In order to induce mitosis in oocytes previously exposed to pronase, we tried hypo- and hyper-osmotic seawater as well as heavy water. Altered salinity did not produce satisfactory results, but heavy water did. When oocytes previously activated with pronase were exposed to 50% D.O in artificial seawater for 1 hour, 11% underwent normal cleavage. Our results show that pronase is very effective in stimulating first and second polar body formation, and that heavy water can then be used to stimulate cleavage. It is important to carry out more experiments in the future to determine how far the parthenogenetic embryos will develop.

C O N T E N I D O

	PAGINA
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	28
DISCUSIONES	55
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUCCION

Entre las especies de importancia alimenticia y comercial que se cultivan en el Estado de Baja California, se halla *Crassostrea gigas* (ostión japonés). El cultivo más importante en el Estado se encuentra localizado en Bahía Falsa (San Quintín, Baja California, México).

La ciencia tiene como finalidad responder a la gran variedad de preguntas que nos formulamos, y en el área de la biología reproductiva las más frecuentes se hallan relacionadas al proceso de la fecundación, esto es, el papel que desempeñan el ovocito y el espermatozoide en el desarrollo de un organismo.

Un proceso reproductivo muy particular es la partenogénesis, proceso mediante el cual uno de los gametos es capaz de desarrollarse hasta constituir un individuo, sin recurrir a la fertilización. De manera natural la partenogénesis se presenta en algunas especies, como algunos tremátodos, nemátodos y varios artrópodos (Wilson, 1928).

Los fenómenos de partenogénesis en la naturaleza han despertado el interés de activar artificialmente ovocitos y lograr organismos adultos sin la intervención del espermatozoide. Esto se ha logrado en equinodermos (Delage,

1912; citado por Wilson, 1928; Brandriff *et al.*, 1975), y anfibios (Loeb, 1918; citado por Wilson, 1928). Los trabajos en mamíferos han sido negativos (Surani *et al.*, 1987).

Aunque no existen reportes sobre la obtención de moluscos adultos partenogénéticos (Loeb, 1913; Jaffe, 1983, 1985), los resultados reportados por algunos autores muestran que por métodos químicos es posible la activación del desarrollo temprano en estos organismos (Loeb, 1913; Wilson, 1928; Jaffe, 1983, 1985).

Los ovocitos del molusco *Crassostrea gigas* son un material adecuado para realizar el estudio de partenogénesis artificial, por su abundancia y fácil manejo. En el ovario los ovocitos maduros de *Crassostrea gigas* se hallan en profase de meiosis (vesícula germinal). Al ser removidos mecánicamente y depositados en agua de mar, un porcentaje variable llegan a metafase I espontáneamente, quedando en esta etapa si no son fecundados por el espermatozoide para reiniciar la meiosis. Ovocitos en ambas etapas, profase y metafase I, pueden ser fecundados y responden con un desarrollo normal.

El presente trabajo tiene como finalidad probar varios tratamientos para estimular el reinicio de meiosis y la segmentación y así contribuir al conocimiento de la biología

de la reproducción del molusco *Crassostrea gigas*.

ANTECEDENTES

Los métodos utilizados para inducir partenogénesis hasta adultos en equinodermos y anfibios tienen factores en común. Primero un aumento de calcio intracelular el cual, parece ser la señal principal para el inicio del desarrollo (Jaffe, 1983, 1985). En anfibios se logró obtener adultos partenogénéticos con el pinchazo de una aguja en la presencia de calcio extracelular (Bataillon, 1910: citado por Loeb, 1913). Sin embargo dado que la concentración de calcio libre en los ovocitos es en el rango de 10^{-7} M (Jaffe, 1985) y la concentración extracelular es del orden de 10^{-3} M, el pequeño escape en la membrana del ovocito inducido por la aguja es suficiente para aumentar la concentración intracelular de calcio en el ovocito. Se ha visto que el aumento en calcio libre intracelular es necesario y suficiente para inducir la activación del desarrollo en ovocitos de ranas (Charbonneau y Grandin, 1989).

Un factor adicional que es necesario para el desarrollo completo es el centrosoma. Por razones que todavía se

desconocen, el centrosoma materno que queda en el ovocito después de la meiosis normalmente no se activa para organizar la mitosis y ésta requiere del centrosoma del espermatozoide. Para la partenogénesis en ranas la aguja usada para el pinchazo tuvo que ser contaminada con células de la sangre; estas contribuyeron con centrosomas para llevar a cabo la segmentación y el desarrollo normal. Sin el centrosoma los ovocitos activados por calcio no segmentan, y terminan por degenerarse (Cross, 1981).

En erizo también se ha determinado que un aumento del calcio intracelular es necesario para el inicio del desarrollo (Hamaguchi y Hiramoto, 1981). Además, como en ranas, es necesario proporcionar centrosomas activos a los ovocitos. En lugar de introducir centrosomas se puede inducir su formación por medio de un tratamiento con agua de mar hipertónica, esta favorece la formación de centrosomas activos a partir de los inactivos en el ovocito. El mecanismo es aún todavía desconocido.

En el método de Loeb (1913) utilizado en erizo, el aumento de calcio intracelular fue producido por un

tratamiento con ácido butírico, mientras Brandriff *et al.*, (1975), usaron ionoforo de calcio (A23187). Luego en ambos procedimientos se usó agua de mar hipertónica. Brandriff *et al.*, también lograron partenogénesis sustituyendo NH_4OH por A23187, aunque el ionoforo dió mejores resultados. El NH_4OH aumenta el pH intracelular, un cambio que normalmente ocurre después de la fecundación; y se ha observado en ovocitos de erizo que ambos el NH_4OH y el agua de mar hipertónica pueden producir un aumento de calcio intracelular (Zucker *et al.*, 1978).

En los estudios antes mencionados sobre erizo y rana lograron estimular el desarrollo completo hasta adultos por tratamientos químicos. Existen otros estudios en que se reporta la producción de larvas, o solamente los primeros eventos de la activación antes que la segmentación, por estímulos químicos. En la mayoría de estos estudios los estímulos fueron los mismos: agentes que aumentaron calcio intracelular (A23187, alto calcio extracelular, pinchazo u otro daño, etc.); NH_4OH ó NaOH (Tyler, 1941; Jaffe, 1985); y agua de mar hipo o hipertónica (Tyler, 1941).

Ahora consideremos los resultados con moluscos bivalvos. En muchos bivalvos los ovocitos son desovados en metafase I de meiosis y la activación consiste en la continuación de la meiosis con la formación de los dos cuerpos polares, seguida por segmentación (tipo 1; ejem. *Mytilus*, *Tivela* y *Cumingia*). En otros organismos los ovocitos están en profase I y la activación consiste en la ruptura de la vesícula germinal seguida por la formación de los dos cuerpos polares y la segmentación (tipo 2; ejem. *Spisula*). En *Crassostrea* (tipo 3), los ovocitos desovados están en metafase I y normalmente son fecundados en esta etapa, pero también es posible fecundar ovocitos en profase I removidos mecánicamente del ovario y estos desarrollan hasta adultos (Imai *et al.*, 1950).

Como se ve en la tabla 1, fue común la utilización de agentes que afectan al calcio intracelular como A23187 y CaCl_2 0.3 M. Se piensa que también el alto KCl trabaja por medio de calcio, esto en base a resultados con *Urechis*. En ovocitos de *Urechis* el potencial de reposo de membrana es dependiente de la concentración externa de potasio (normalmente 10 mM) y cuando se incrementa la concentración

de potasio en el agua de mar, tiende a ser más positivo el potencial de membrana llegando al umbral para abrir canales de calcio voltaje-dependiente (Jaffe *et al.*, 1979). La entrada de calcio a través de estos canales probablemente aumenta la concentración de calcio intracelular (Jaffe, 1985). Desafortunadamente no existe ningún trabajo con bivalvos en que halla sido medida la concentración de calcio intracelular durante la fecundación o la activación artificial.

Con respecto a los tratamientos con NH_4^+ se esperaría un aumento en el pH intracelular basado en resultados con ovocitos de otras especies (Shen, 1982). Sin embargo los efectos de NH_4^+ pueden ser multiples, por ejemplo en ovocitos de erizo no solo aumenta el pH sino también el calcio intracelular (Zucker *et al.*, 1978). Tampoco se han realizado estudios de pH intracelular durante la fecundación o activación artificial en bivalvos.

En *Crassostrea* nunca se ha reportado la obtención de larvas normales por medio de estímulos artificiales; el máximo desarrollo fue de larvas anormales producido por

NH₄OH en el estudio de Inaba (1936). La serotonina es útil para llevar a casi un 100% de ovocitos removidos del ovario a metafase I (Osanai, 1985; Osanai y Kuraishi, 1989; y resultados míos abajo) pero permanecen en esta etapa sin continuar su desarrollo. Con A23187, Osanai y Kuraishi (1988) reportaron 87% de ovocitos con ruptura de la vesícula germinal sin presentar los datos de controles sin A23187. En un estudio posterior Osanai y Kuraishi (1989) reportaron que el A23187 causó un bajo porcentaje de formación de cuerpos polares en ovocitos previamente estimulados a metafase I con serotonina. La combinación de A23187 con alto pH (9.3) aumentó el porcentaje de ovocitos con cuerpos polares (máximo 60%) pero los resultados fueron variables y no hubo segmentación. Por último Osanai y Kyojuka (1988) reportaron la inducción de cuerpos polares por la enzima proteolítica pronasa. También los porcentajes fueron variables y bajos (máximo 44%).

Antes de conocer sus resultados nosotros usamos pronasa, encontrando un alto porcentaje de formación de cuerpos polares. Por eso decidimos encontrar las condiciones óptimas (concentración y tiempo de exposición) para la

activación con pronasa, y probar si después de la formación de cuerpos polares se podría estimular la segmentación con agua de mar hipertónica o agua de mar pesada, que también favorece la polimerización de microtúbulos entre otros efectos (Heidemann y Kirschner, 1975).

Adicionalmente se experimentó con A23187, alto calcio y NH_4^+ para probar si los resultados coincidían con los reportados por otros autores.

TABLA I. Resumen de trabajos sobre activación artificial en bivalvos.

Bivalvo	tipo ²	agente(s)	máximo desarrollo reportado	cita
<i>Cumingia</i>	1	calor seguido por A.M. ^c hipertónica con KCl	larvas (pocas)	Morris, 1917
		CaCl ₂ 0.3 M	segmentación (y muerte)	Hollingsworth, 1941
<i>Mytilus</i>	1	A23187 10 μ M	cuerpos polares	Dufresne-Dubé et al., 1983
		KCl 112 mM	cuerpos polares	Dufresne-Dubé et al., 1983
<i>Spisula</i>	2	KCl (> 30 mM)	cuerpos polares	Allen, 1953
		A23187 4 μ M	cuerpos polares	Schuetz, 1975
		NH ₄ OH pH 9.5	RVG ^b	Finkel y Wolf, 1980
		A.M. hipertónica con KCl	RVG	Longo, 1983
		serotonina 20 μ M	cuerpos polares	Hirai et al., 1988
<i>Barnes</i>	2	KCl 61 mM	RVG	Dubé y Guerrier, 1982a
		NH ₄ Cl 100 mM	RVG	Dubé y Guerrier, 1982b
<i>Tapes</i>	2	A23187 1-10 μ M	RVG	Osanai y Kuraishi, 1988
		serotonina 10 μ M	RVG hasta metafase I	Osanai y Kuraishi, 1988
<i>Crassostrea</i>	3	A.M. hipertónica con KCl o NaCl	cuerpos polares	Inaba, 1936
		A.M. diluida 50%	segmentación poca	Inaba, 1936
		NH ₄ OH .0036 M	algunas larvas	Inaba, 1936
		serotonina 1-10 μ M	RVG hasta metafase I	Osanai, 1985
		pronasa 1 mg/ml	cuerpos polares	Osanai y Kyojuka, 1988
		A23187 10 μ M, pH 8.3	RVG	Osanai y Kuraishi, 1988
		serotonina 10 μ M, seguido A23187 a pH 9.3	cuerpos polares	Osanai y Kuraishi, 1989

^a Se refiere a la etapa de meiosis en que normalmente son fecundados (ver texto).

^b RVG: ruptura de vesícula germinal.

^c A.M: agua de mar.

OBJETIVO

Implementar un método químico para inducir a la partenogénesis en ovocitos de *Crassostrea gigas* (ostión japonés).

- a) Obtener ruptura de vesícula germinal.
- b) Inducir a la formación de cuerpos polares.
- c) Lograr que se lleve a cabo la división en el ovocito.

MATERIAL Y METODOS

ORGANISMOS

Los ostiones (*Crassostrea gigas*) fueron colectados en Bahía Falsa, San Quintín, Baja California, se lavaron en agua de mar corriente con un cepillo y se depositaron en acuarios con agua de mar aerada y filtro biológico, con temperatura entre 14° y 17° C.

PREPARACION DE GAMETOS

Los gametos se obtuvieron directamente de la gónada por rompimiento del epitelio mediante la utilización de pinzas finas y extracción con pipeta Pasteur, depositandolos en agua de mar filtrada (Millipore 0.45 μm). Los ovocitos fueron filtrados con una malla de 120 μm y los espermatozoides con una de 60 μm . Procediendo a lavarse los ovocitos tres o cuatro veces con agua de mar filtrada. Las dos primeras lavadas fueron por asentamiento y resuspensión y la última por centrifugación (aproximadamente 500 x g durante 30 segundos). Los gametos fueron incubados durante los experimentos a la temperatura del cuarto (22°-24° C). Las concentraciones utilizadas de gametos fueron $3-5 \times 10^6$

espermatozoides/ml y 1300-2100 ovocitos/ml. Se trabajó con muestras de 5 ml en vasos de precipitado de 10 ml.

FIJACION Y TINCION

Las muestras fueron fijadas en solución de formaldehído al 7.5% en agua de mar. Para su observación se tiñeron con bisbenzamida (Hoechst 33258; Calbiochem) 25 μ g/ml en agua de mar, una gota de la muestra y una del colorante. El bisbenzamida es un colorante fluorescente que tiñe ADN y más específicamente regiones donde existen 3 ó más enlaces A-T (Comings, 1975; Müller & Gautier, 1975).

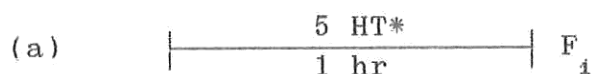
MICROSCOPIA Y FOTOGRAFIA.

Las muestras teñidas se observaron en microscopia de epifluorescencia (Olympus BH2-RFL; excitación 320-390 nm y emisión > 410 nm). Se cuantificó el número de ovocitos en cada una de las siguientes etapas: vesícula germinal, cromosomas detenidos en metafase I de meiosis, primer cuerpo polar, segundo cuerpo polar, formación de pronúcleos y segmentación. Se contó un mínimo de 100 ovocitos en cada una de las muestras. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Olympus OM-1 con un adaptador para microscópio,

usando película Kodak TMax 100 (blanco y negro) o Ektachrome 100 (transparencia de colores).

DISEÑO EXPERIMENTAL

1.- SEROTONINA. Una muestra de ovocitos se incubó en una solución de serotonina (5-HT; Sigma) 2×10^{-5} M por 1 hora, mientras que otra permaneció en agua de mar por el mismo espacio de tiempo, luego fueron fijadas (esquema 1a, F₁).



ESQUEMA 1A. * ó control sin serotonina.

Se realizaron experimentos para determinar si la serotonina actuaba de igual manera en ausencia de calcio, para esto se preparó agua de mar libre de calcio con 2 mM de EGTA (pH 8). El agua de mar artificial completa se preparó con 484 mM NaCl, 10 mM KCl, 27 mM MgCl₂, 29 mM MgSO₄, 10 mM de CaCl₂, 2.4 mM NaHCO₃, a pH 8, disolviendo las sales en la cantidad apropiada de agua (destilada). El agua de mar artificial libre de calcio se preparó suprimiendo el CaCl₂ del agua de mar artificial completa y añadiendo 2 mM de

EGTA. Se incubaron los ovocitos en agua de mar libre de calcio con y sin serotonina (esquema 1b) y en agua de mar completa con y sin serotonina (esquema 1c). Todas las muestras fueron fijadas 1:30 hora después de iniciarse el tratamiento.

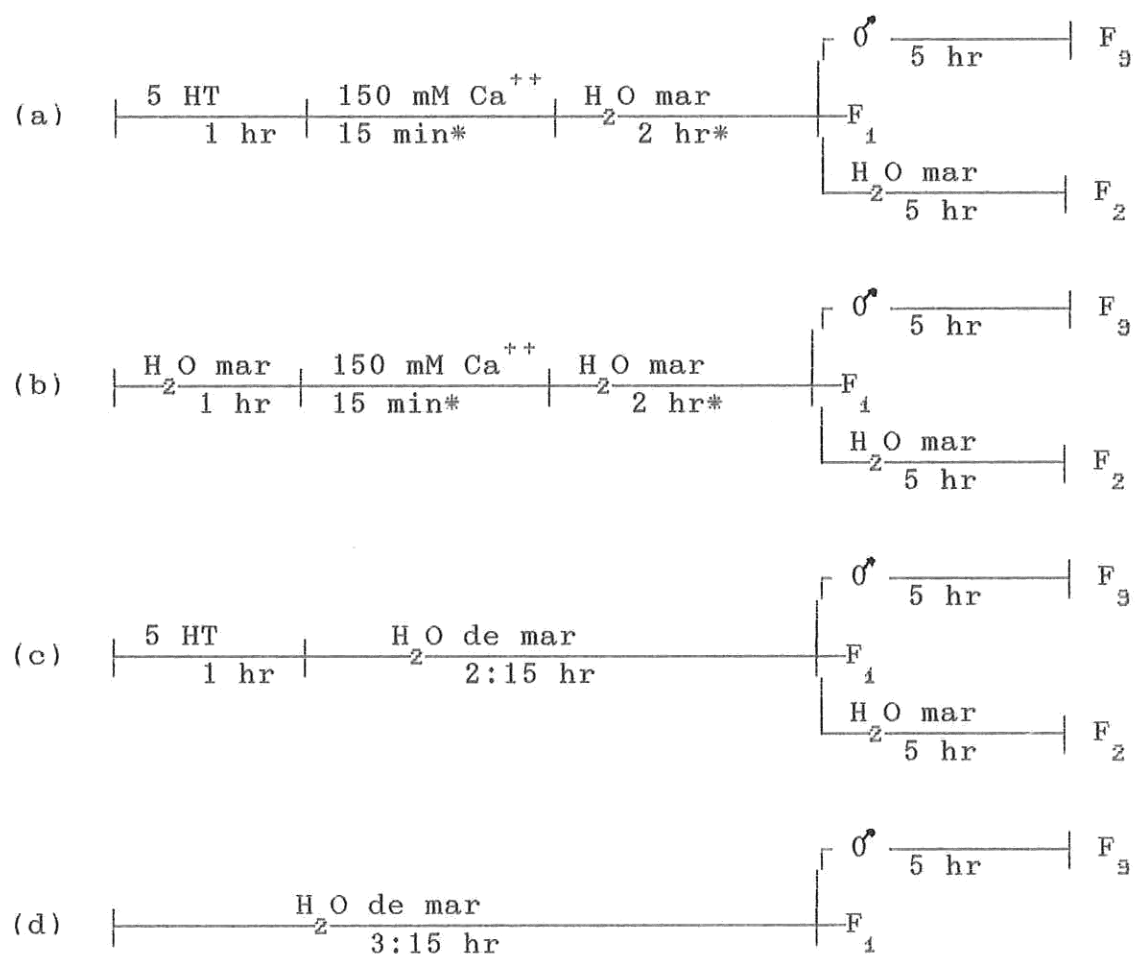
(b) $\left| \begin{array}{c} 0 \text{ Ca}^{++} + \text{EGTA} + 5\text{HT}^* \\ 1:30 \text{ hr} \end{array} \right| F_1$

(c) $\left| \begin{array}{c} 10 \text{ mM Ca}^{++} + 5\text{HT}^* \\ 1:30 \text{ hr} \end{array} \right| F_1$

ESQUEMA 1(b-c). * ó sin serotonina.

2.- ALTO CALCIO. En el primer experimento se probó el efecto de 150 mM de calcio con dos tiempos de exposición. Una muestra de ovocitos fue sometida primeramente a una solución de serotonina 2×10^{-5} M por 1 hora (esquema 2a), mientras que otra muestra permaneció en agua de mar sin serotonina por el mismo tiempo (esquema 2b). Después de lo cual ambas fueron lavados dos o tres veces y resuspendidos en la solución de alto calcio durante 15 y 30 minutos. A continuación se lavaron dos o tres veces con agua de mar y se incubó por 2 horas. Después la muestra se dividió en tres partes: una parte se fijó inmediatamente (F_1), otra permaneció 5 horas en agua de mar normal sin fertilizarse y

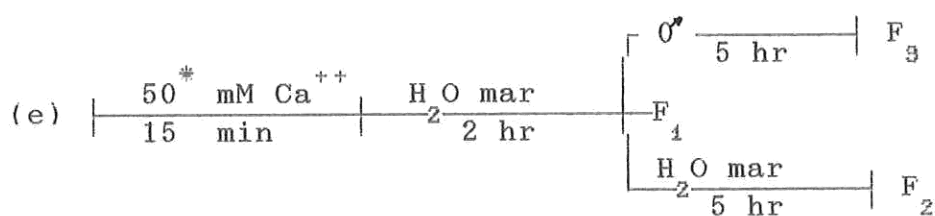
se fijó (F_2) y la tercera se fertilizó (σ) y se fijó después de 5 horas (F_3). También controles con serotonina sin calcio (esquema 2c) y sin serotonina y sin calcio (esquema 2d) fueron incubados. En todos los experimentos subsecuentes se llevó a cabo el control del esquema 2d.



ESQUEMA 2(a-d). * ó 30 min-1:45 hr.

Para el siguiente experimento se prepararon soluciones de agua de mar con 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM de Ca^{++} . Todas las soluciones se prepararon a partir de una solución

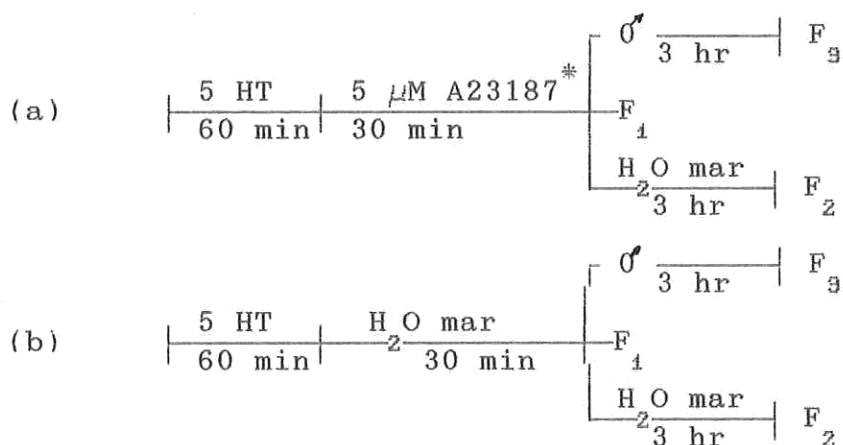
de CaCl_2 al 3 M. Se precisaron los volúmenes de CaCl_2 a utilizarse en cada una de las soluciones con la fórmula: $10 - X \text{ ml } (a) + X \text{ ml } (b) = 10 \text{ ml } (c)$, donde a =concentración de CaCl_2 3 M, b =concentración de CaCl_2 en el agua de mar normal (0.01 M) y c =concentración final de la solución. Las muestras fueron resuspendidas en las diferentes concentraciones de calcio por 15 minutos, luego cada una de las muestras fue lavada e incubada por 2 horas en agua de mar y dividida en 3 partes: F_1 fue inmediatamente fijada y F_9 fertilizada. Cinco horas más tarde F_2 y F_3 fueron fijadas (esquema 2e). Un control con calcio a 10 mM (esquema 2d, pero con 2:15 hr antes de F_1) fue llevado a cabo.



ESQUEMA 2e. * ó 100, 150, 200, 250 y 300 mM de Ca^{++} .

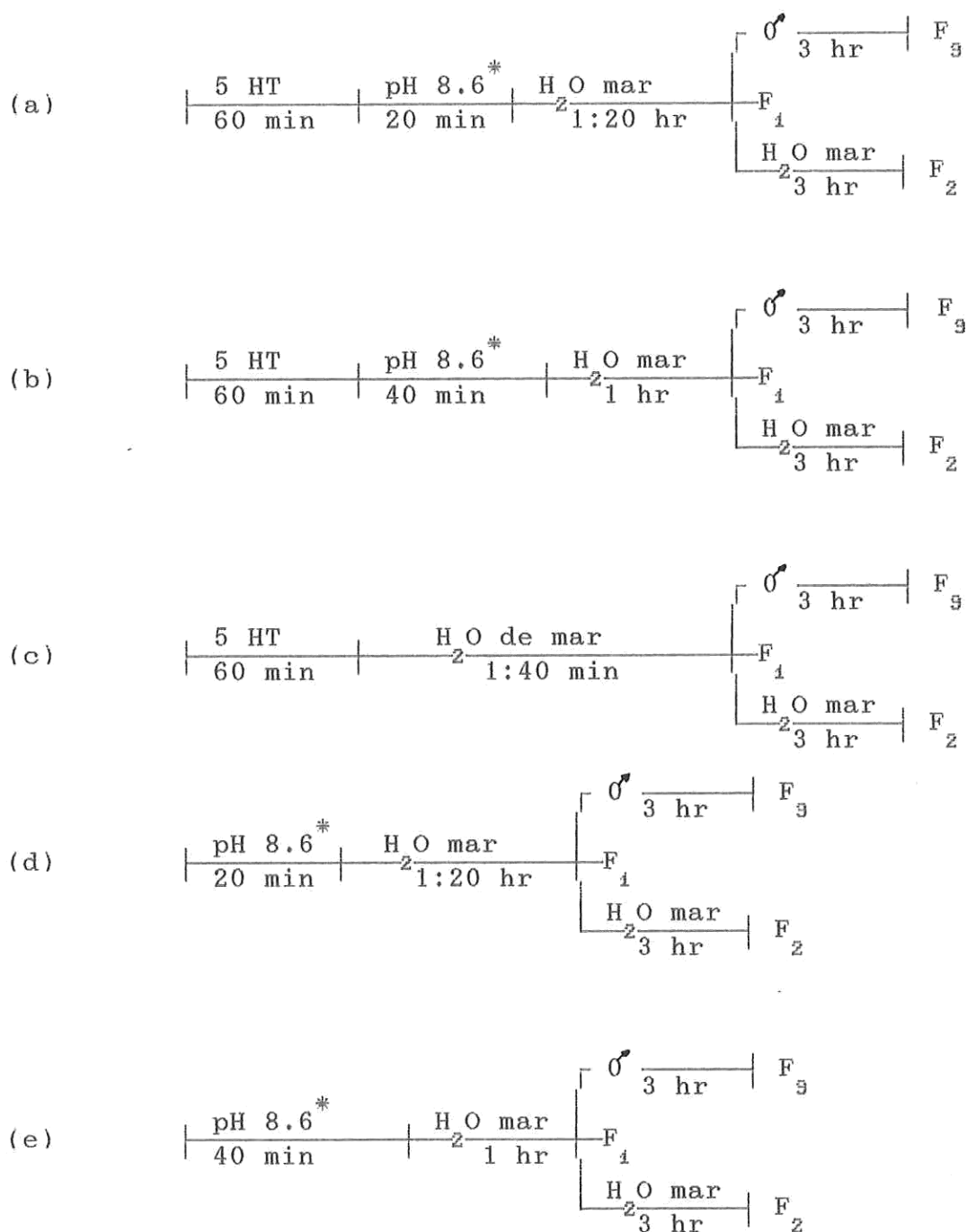
3.- IONOFORO de CALCIO (A23187). En el tratamiento con A23187 los ovocitos fueron previamente incubados en serotonina 2×10^{-5} M durante 60 minutos. Se lavaron y se resuspendieron en A23187 con dos diferentes concentraciones: 5 y 20 μM , así mismo, dos controles más fueron colocadas en

soluciones de dimetilsulfoxido (DMSO) al 0.1 y 0.4% (esquema 3a) y con serotonina sin DMSO y sin ionoforo (esquema 3b). Dado que el A23187 es hidrofóbico, la solución madre consistió en 5 mM de A23187 disuelto en DMSO. Por eso era necesario incluir muestras testigos con las mismas cantidades de DMSO solamente. El A23187 es introducido a la suspensión de ovocitos lentamente y con agitación continua para que, al encontrarse en agua, forme una suspensión de partículas finas que disuelven en las membranas lipídicas de los ovocitos. Las muestras permanecieron por 30 minutos en las soluciones, se lavaron y se dividieron en tres partes: una de las cuales fue fijada inmediatamente (F_1), otra permaneció 3 horas en agua de mar y luego fue fijada (F_2) y por último la tercera fue fertilizada y dejada en agua de mar 3 horas antes de fijarse (F_3).

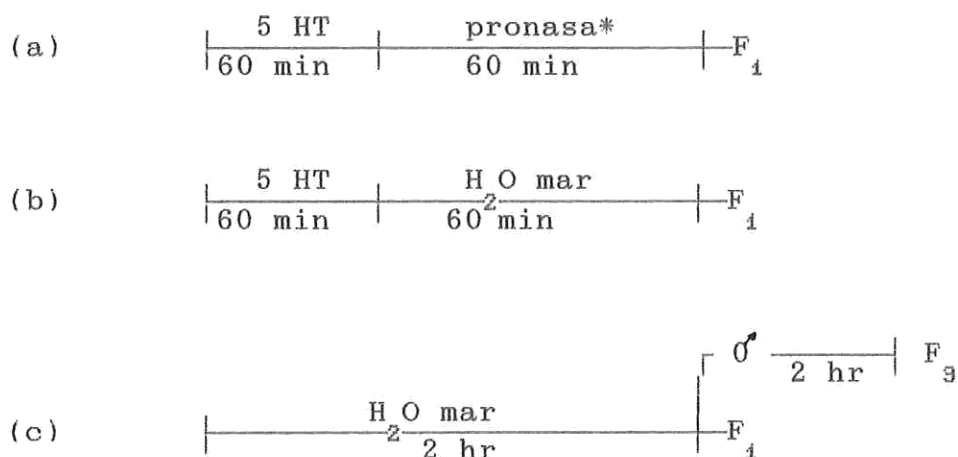


ESQUEMA 3(a-b). * ϕ 20 μ M A23187, ϕ 0.1 ϕ 0.4% de DMSO.

4.- AGUA DE MAR ALCALINA. Se preparó una solución con agua de mar a pH 8.6 y otra a pH 9.0, para ajustar el pH se utilizó NH_4OH al 0.1 N (el pH de agua de mar normal es 8). Una muestra de ovocitos fue tratada previamente con serotonina 2×10^{-5} M durante 60 minutos. Posteriormente fueron lavados y expuestos por 20 minutos (esquema 4a) ó 40 minutos (esquema 4b) a las soluciones con los dos diferentes valores de pH. Luego fueron lavados e incubados en agua de mar normal por 1:20 horas (esquema 4a) o 1 hora (esquema 4b). Después fueron divididos en tres partes: una se fijó inmediatamente (F_1), otra fue incubada 3 horas sin fertilizarse y luego fijada (F_2) y una más se fertilizó y se dejó 3 horas antes de fijarse (F_3). El control en agua de mar normal se ve en el esquema 4c. Otras muestras de ovocitos fueron tratadas sin incubación previa de serotonina (esquemas 4d y e).

ESQUEMA 4(a-e). * ϕ pH 9.0.

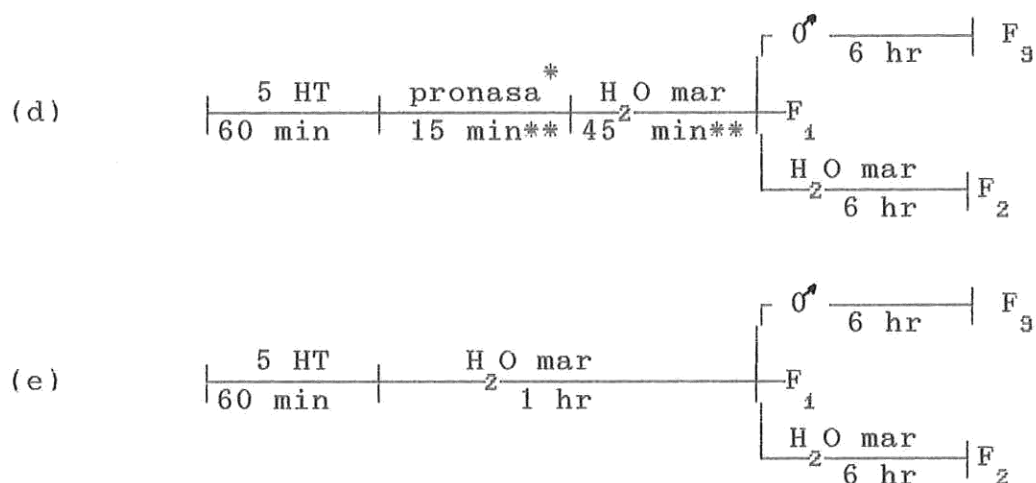
5.- PRONASA. Primero se probó varias concentraciones de pronasa. Los ovocitos ya lavados fueron depositados en una solución de serotonina 2×10^{-5} M en agua de mar durante 60 minutos. Se lavaron y se resuspendieron en soluciones de pronasa (Sigma, tipo XXV) a varias concentraciones: 0.3, 0.6, 1.2 y 1.8 mg/ml en agua de mar durante 60 minutos (esquema 5a). Luego la muestra fue lavada y fijada (F_1). Un control fue incubado en agua de mar sin pronasa (esquema 5b). Otro control sin serotonina y sin pronasa fue incubado en agua de mar por 2 horas, después una muestra fue fijada (esquema 5c, F_1) y otra fue fertilizada y fijada 2 horas más tarde (esquema 5c, F_3).



ESQUEMA 5(a-c). * 0.3, 0.6, 1.2 y 1.8 mg/ml.

En el siguiente experimento se probaron varios tiempos

de exposición con 0.3 y 0.6 mg/ml de pronasa. Los ovocitos fueron expuestos a serotonina 2×10^{-5} M durante 60 minutos, lavados y resuspendidos en soluciones de 0.3 y 0.6 mg/ml de pronasa por 15, 30, 45 y 60 minutos (esquema 5d). Al finalizar el tiempo de exposición a pronasa, las muestras fueron lavadas e incubadas en agua de mar por el tiempo necesario para que el tiempo total en pronasa y luego agua de mar complete 60 minutos (esquema 5d). Posteriormente la muestra fue dividida en tres partes: una parte fue fijada (F_1), otra permaneció sin fertilizarse en agua de mar por 6 horas y después fijada (F_2) y la tercera fue fertilizada y fijada después de 6 horas (F_3). Un control fue manejado de la misma manera sin pronasa (esquema 5e).



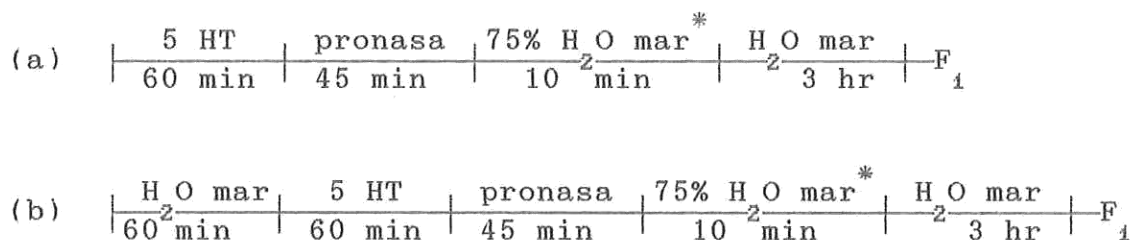
ESQUEMA 5(d-e). * 0.3 ó 0.6 mg/ml.

** 15-45, 30-30, 45-15 ó 60-0 min.

Una vez seleccionado el tiempo y la concentración óptima de pronasa se procedió a tratar de inducir la segmentación por los tratamientos siguientes.

6.- AGUA DE MAR HIPO- e HIPER-OSMOTICA. Se prepararon varias soluciones con agua de mar al 75, 100, 125, 150 y 175%. El agua de mar al 75% se preparó tomando 3 partes de agua de mar por 1 de agua destilada. El resto de las soluciones se prepararon en base a una solución madre de agua de mar dos veces concentrada (968 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 54 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 58 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 20 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ y 4.8 mM de NaHCO_3 a pH 8) y usando la fórmula $(V_i)(C_i) = (V_f)(C_f)$, donde i=inicial y f=final. Una muestra de ovocitos fue puesta, inmediatamente después de ser sacada de la gónada, en serotonina 2×10^{-5} M por 60 minutos (esquema 6a), mientras que otra muestra permaneció en agua de mar sin serotonina por el mismo tiempo y luego fue incubada en serotonina por 60 minutos (esquema 6b). Las dos muestras se lavaron y se resuspendieron en pronasa 0.6 mg/ml durante 45 minutos. Pasado este tiempo las muestras se lavaron y se colocaron en cada una de las soluciones de agua de mar al 75, 100, 125, 150 y 175% durante 10 minutos. A

continuación se lavaron e incubaron en agua de mar normal por 3 horas antes de fijarse (F_1).

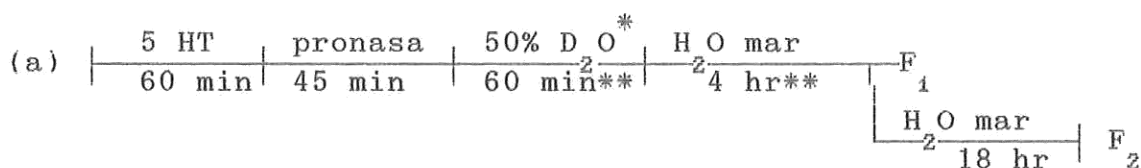


ESQUEMA 6(a-b). * ó 100, 125, 150 y 175%.

7.- AGUA PESADA (D_2O). Se preparó agua de mar artificial con 484 mM NaCl, 10 mM KCl, 27 mM $MgCl_2$, 29 mM $MgSO_4$, 10 mM $CaCl_2$, 2.4 mM $NaHCO_3$, a pH 8, disolviendo las sales en la mezcla apropiada de H_2O (agua destilada) y D_2O para tener agua pesada a concentraciones de: 10, 20, 30, 40 y 50%. Los ovocitos lavados fueron expuestos a una solución de serotonina 2×10^{-5} M durante 60 minutos, lavados y resuspendidos en pronasa 0.3 mg/ml por 45 minutos. Al salir de la pronasa fueron lavados y tratados con agua de mar al 0, 10, 20, 30, 40 y 50% de D_2O (esquema 7a).

Para cada una de las muestras se establecieron dos tiempos de exposición: 30 y 60 minutos. Transcurrido el

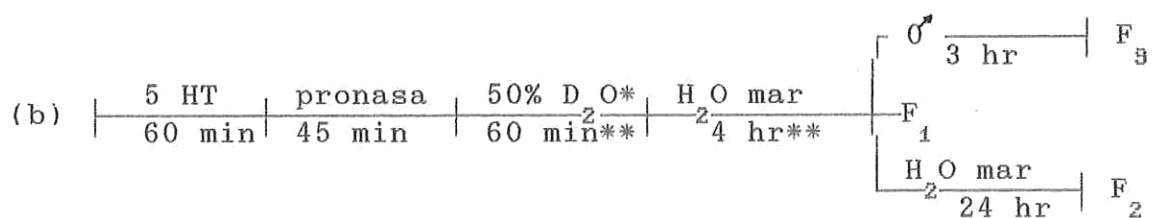
tiempo señalado las muestras se lavaron y permanecieron en agua de mar normal por 5 horas. Se dividieron las muestras en dos partes: una fue fijada inmediatamente (F_1) y la otra permaneció 18 horas en agua de mar antes de ser fijada (F_2). El control para los experimentos con agua pesada fue agua de mar artificial (esquema 7a, 0% de D_2O). Este lote de ovocitos es tratado en resultados como la Hembra A.



ESQUEMA 7a. * ó 0, 10, 20, 30 y 40% de D_2O .

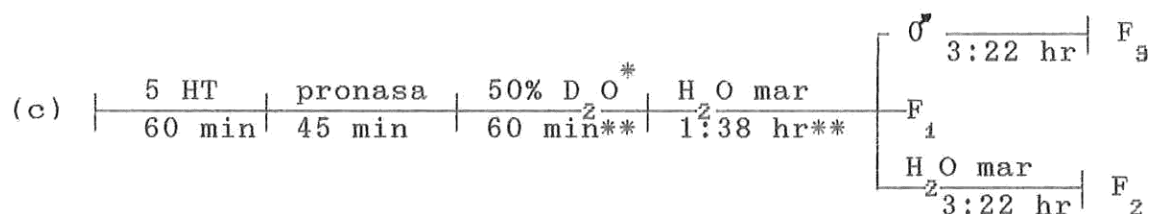
** ó 30 min-4:30 hr.

Con otro lote de ovocitos (Hembra B) se probó el mismo tratamiento anterior pero utilizando unicamente 50% de D_2O en agua de mar y los dos tiempos: 30 y 60 minutos. Las muestras fueron lavadas y permanecieron en agua de mar 5 horas, luego fueron divididas en tres partes: una fue fijada (F_1), otra permaneció 24 horas en agua de mar (F_2) y una tercera fue fertilizada y fijada 3 horas después (F_3) (esquema 7b). El control fue con agua de mar artificial (esquema 7b, 0% de D_2O).



ESQUEMA 7b. * ó 0%, ** ó 30 min-4:30 hr.

Dos lotes más de ovocitos (Hembras C y D) fueron tratados con agua pesada al 50 y 75% (esquema 7c). El control para agua pesada fue agua de mar artificial (esquema 7c, 0% de D O₂).



ESQUEMA 7c. * ó 0% y 75%.

** ó 45 min-1:53 hr y 30 min-2:08 hr.

RESULTADOS:

1.- SEROTONINA. Para inducir la ruptura de la vesícula germinal y llevar a metafase I a los ovocitos se utilizó serotonina 2×10^{-5} M (ver metodología, esquema 1a). La tabla 2 muestra los porcentajes de ovocitos en metafase I con y sin el tratamiento de serotonina.

Se observa que el efecto de la serotonina es muy constante, causando la ruptura de la vesícula germinal y el desarrollo hasta metafase I de meiosis en $\geq$ 86% de los ovocitos en los 17 lotes de ovocitos probados (ver tabla 2, figura 1a-b). En cambio el porcentaje de ovocitos que rompen la vesícula germinal espontáneamente (sin 5-HT) es muy variable y siempre menor. Las muestras tratadas con serotonina fueron fertilizadas, para descartar daño en los ovocitos, y lograron formar embriones normales (96-100%).

En los resultados de la tabla 3 se observa que la serotonina actúa de igual manera en agua de mar normal como en agua de mar libre de calcio. Así la inducción de metafase I por 5-HT no requiere de calcio extracelular.

% de ovocitos en metafase I	
sin 5-HT	con 5-HT
89	100
48	96
96	100
54	97
91	97
3	89
81	98
45	94
34	90
63	96
71	88
2	96
37	99
16	94
50	95
92	95
68	86

TABLA 2.- Efecto de serotonina 2×10^{-5} M sobre el porcentaje de ovocitos en metafase I, con 17 diferentes lotes de ovocitos. El control es agua de mar sin serotonina (ver metodología, esquema 1a).

% de ovocitos en metafase I			
con 5-HT		sin 5-HT	
10 mM calcio	0 mM calcio	10 mM calcio	0 mM calcio
88	89	71	54
94	92	16	8
95	91	50	59

TABLA 3.-Efecto del calcio extracelular en la actividad de la serotonina para llevar a los ovocitos a metafase I. Se presentaron porcentajes similares en ambos casos (con y sin calcio extracelular, la solución sin calcio contenía 2 mM de EGTA). Ver esquema 1b y c de la metodología.

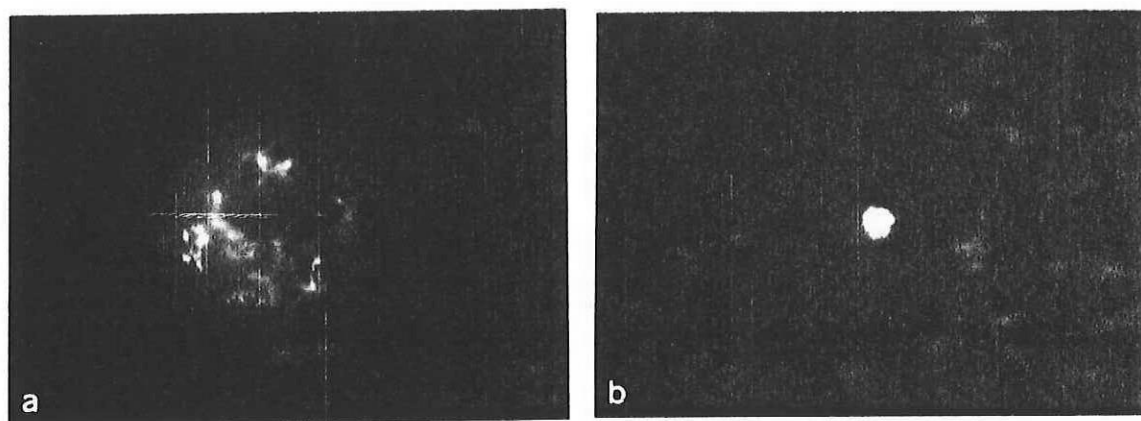


FIGURA 1a-b.- a) Ovocito con vesícula germinal. cromosomas teñidos con bisbenzamida un colorante fluorescente (Calbiochem, Hoechst 33258), observado con microscopia de fluorescencia. b) Ovocito en metafase I después del tratamiento con serotonina.

2.- ALTO CALCIO. El alto calcio no provoca segmentación ni la formación de cuerpos polares (tablas 4 y 5). En una muestra (ver tabla 4) hubo un 11% de segmentación en ovocitos expuestos a 150 mM de calcio por 15 minutos. Sin embargo esta respuesta no se repitió en otros dos experimentos (ver "repetición" tabla 4 y 150 en tabla 5).

Altas concentraciones de calcio, en ovocitos no expuestos a serotonina, provocaron un leve aumento en el porcentaje en metafase I (tabla 5), pero también causó la fragmentación de cromosomas y disminuyó el porcentaje de fertilización (tabla 5). Se concluyó que el alto calcio extracelular no es adecuado para inducir desarrollo en los ovocitos de ostión.

3.- IONOFORO de CALCIO (A23187). Al utilizar A23187 (ver metodología, esquema 3a-b) los ovocitos no mostraron signos de activación permaneciendo en metafase I en un porcentaje alto, similar al presentado en el control el cual mostró un 96% de ovocitos en metafase I (tabla 6).

Los controles fertilizados muestran que los ovocitos no

sin 5-HT % de ovocitos							
F ₁			F ₂			F ₃	
	metaf 1	1 c.p	seg	metaf 1	1 c.p	seg	Fert
(d) Control	34	0	0	-	-	-	84
(b) 15 min	59	0	2	34	0	11	83
30 min	49	0	2	50	3	1	80
Repetición							
(d) Control	-	-	-	65	0	0	83
(b) 15 min	-	-	-	57	0	0	75
con 5-HT % de ovocitos							
	metaf 1	1 c.p	seg	metaf 1	1 c.p	seg	Fert
(c) Control	90	0	0	-	-	-	97
(a) 15 min	91	0	1	88	1	0	89
30 min	88	0	3	90	1	2	89

TABLA 4.- Efecto de 150 mM de calcio con dos diferentes tiempos de exposición. Se muestran los diferentes porcentajes de ovocitos en metafase I, con 1 cuerpo polar y en segmentación fijados 2 horas (F₁) y 7 horas (F₂ y F₃) después del tratamiento con calcio. La muestra F₃ fue fertilizada para probar normalidad de los ovocitos. En F₁ y F₂ se omite el complemento hasta sumar 100% por tratarse de ovocitos con vesícula germinal. En base a los resultados se concluye que 150 mM de calcio no provocó segmentación excepto en una muestra con 11% , pero se repitió el mismo tratamiento con otro lote de ovocitos y el resultado fue 0% de segmentación (ver repetición, 15 min, F₂).

* Las letras en paréntesis se refieren a los esquemas 2a-d en la metodología.

sin 5-HT					% de ovocitos				
F ₁					F ₂				F ₃
	met I	1 cp	seg	gran	met I	1 cp	seg	gran	Fert
(d) Control	9	1	0	0	-	-	-	-	81
(e) 50 mM	12	0	0	0	5	0	0	7	32
100 mM	15	0	0	0	5	0	0	13	13
150	18	0	0	0	6	3	0	16	20
200	27	0	0	15	13	2	0	23	14
250	52	0	0	7	0	16	0	32	16
300	34	0	0	0	7	11	0	33	37

TABLA 5.- Ovocitos expuestos a varias concentraciones de calcio por 15 minutos. Ningún tratamiento dió como resultado segmentación, aunque el calcio produjo un leve aumento en el número de ovocitos que rompieron su vesícula germinal y llegaron a metafase I. También el calcio provocó la fragmentación de cromosomas, después de metafase I, formando unos gránulos (categoría gran). El hecho que el porcentaje de ovocitos fertilizados bajó en consecuencia del tratamiento con calcio (F_9) confirma que hubo daño.

* Las letras en paréntesis se refieren a los esquemas 2d y e en la metodología.

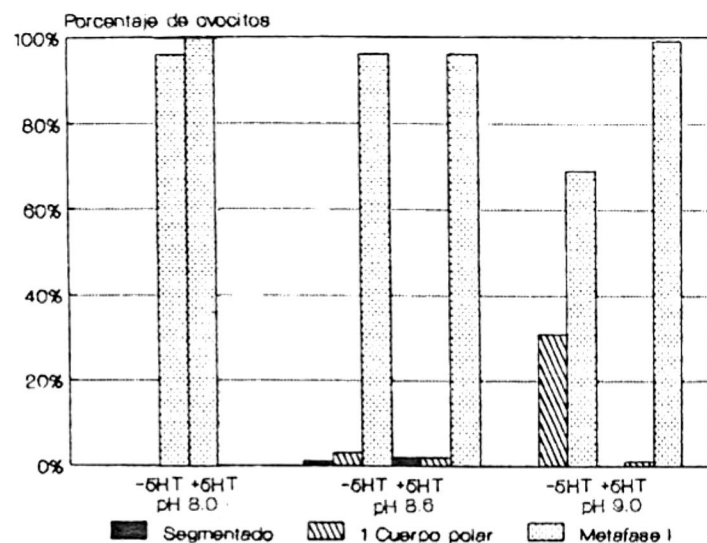
% DE OVOCITOS							
F ₁				F ₂			F ₃
	metaf I	1 c.p	seg	metaf I	1 c.p	seg	Fert
(a) 5 μ M A23187	97	1	2	96	0	3	81
0.1% DMSO	96	2	2	98	0	2	84
20 μ M A23187	95	0	4	94	0	3	85
0.4% DMSO	95	0	5	98	0	2	89
(b) Control	96	0	0	-	-	-	97

TABLA 6.- Efecto del ionoforo de calcio (A23187). Los ovocitos fueron previamente llevados a metafase I con serotonina. El A23187 no estimuló la formación de cuerpos polares ni la segmentación, aunque no daño a los ovocitos como se ve por su alto porcentaje de fertilización (F₃). Las letras en paréntesis se refieren a los esquemas 3a-b en la metodología.

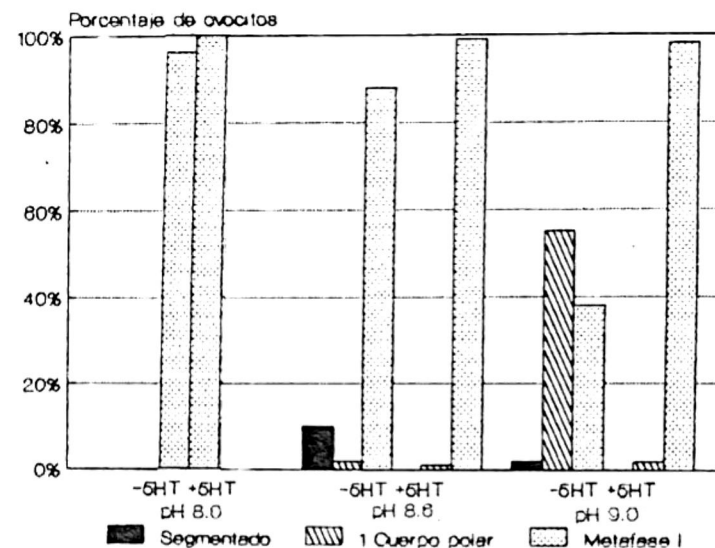
fueron dañados por el ionoforo ya que segmentaron. Se concluyó que el A23187 que supuestamente aumenta el calcio intracelular, tampoco induce el desarrollo en ovocitos de ostión.

4.- AGUA DE MAR ALCALINA. Se probó el efecto de agua de mar alcalina con ovocitos no expuestos a serotonina como también en ovocitos previamente madurados con serotonina (ver metodología, esquema 4a-e). En todas las condiciones (pH 8.6 y pH 9.0, 20 y 40 minutos de exposición) los ovocitos previamente expuestos a serotonina casi no respondieron, dando un máximo de 2% con un cuerpo polar (pH 9.0, 40 minutos, gráfica 1B).

Los ovocitos no expuestos a serotonina dieron mejores resultados: 31% con un cuerpo polar después de la incubación a pH 9.0 por 20 minutos (ver gráfica 1A), y 55% con un cuerpo polar después de ser incubados a pH 9.0 por 40 minutos (ver gráfica 1B). Además hubo un 10% de segmentación normal en la muestra expuesta a pH 8.6 por 40 minutos (gráfica 1B). Este experimento se repitió al final de la temporada con resultados negativos (quedando los



GRAFICA 1A.- Ovocitos expuestos a agua de mar alcalina (pH 8.6 y pH 9.0) por 20 minutos, con y sin tratamiento previo de serotonina (ver esquema 4a, c y d). Ovocitos no estimulados con serotonina expuestos a pH 9.0 respondieron mejor (31% con 1 cuerpo polar).



GRAFICA 1B.- Pertenece al experimento reportado en la gráfica anterior, pero con 40 minutos de exposición al agua de mar alcalina (esquema 4b, c y e). La mejor respuesta fue con el pH 8.6 en ovocitos no expuestos a serotonina (11% de segmentación normal). También había un alto porcentaje de 1 cuerpo polar en la muestra que fue expuesta a pH 9.0. anteriormente.

ovocitos en metafase I). Para descartar daño en los ovocitos las muestras fueron fertilizadas, desarrollando hasta embriones aparentemente normales (98-100%).

5.- PRONASA. En el primer experimento con pronasa, ovocitos previamente estimulados con serotonina para llegar a metafase I de meiosis fueron expuestos a diferentes concentraciones de pronasa durante 60 minutos (ver metodología, esquema 5a). Se encontró que muchos ovocitos tratados con 0.3 y 0.6 mg/ml de pronasa fueron activados, formando 1 ó 2 cuerpos polares, mientras que con las concentraciones de 1.2 y 1.8 mg/ml los ovocitos fueron destruidos (ver tabla 7).

En otro experimento realizado de la misma manera (sin 5-HT), se encontró un porcentaje más bajo de ovocitos con 1 y 2 cuerpos polares (38% con 0.6 mg/ml y 53% con 0.3 mg/ml de pronasa). Por esto se decidió tratar a los ovocitos con serotonina antes de la pronasa ya que respondieron mejor.

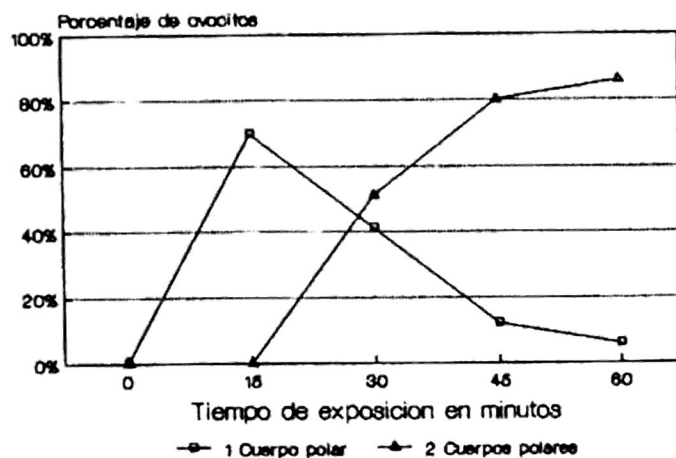
En los siguientes experimentos se trabajó con concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/ml con varios tiempos: 15,

con 5-HT'		% DE OVOCITOS		
F 1				
Concentración de pronasa	metafase I	1 c.p	2 c.p	destruidos
(a)Control	100	0	0	0
(b)0.3 mg/ml	3	18	73	4
0.6	5	20	61	6
1.2	5	11	26	44
1.8	0	4	17	65

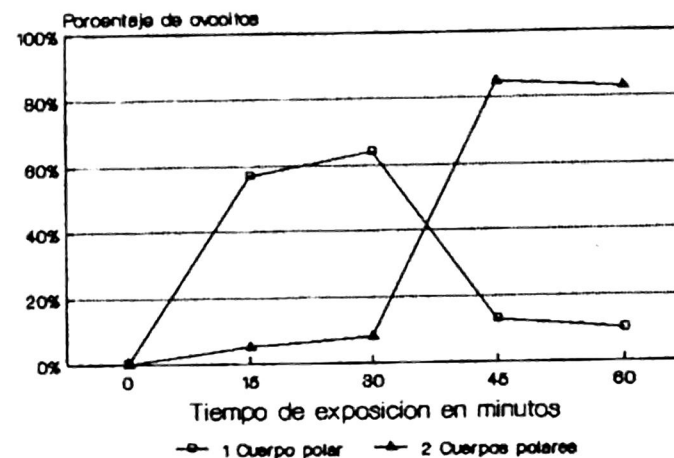
TABLA 7.- Efecto de cuatro diferentes concentraciones de pronasa, sobre el porcentaje de ovocitos en metafase I, con 1 y 2 cuerpos polares y destruidos. Las muestras fueron fijadas 1 hora después de comenzar el tratamiento con pronasa (ver esquema 5a y b, F₁). El complemento para sumar 100% corresponde a ovocitos agrupados en una categoría de dudosos.

30, 45 y 60 minutos, para cada concentración (ver metodología, esquema 5d-e). Los resultados muestran que el tiempo óptimo de exposición a pronasa para la obtención de 1 cuerpo polar es de 15 minutos, mientras que para 2 cuerpos polares es necesario 45 minutos (gráficas 2 y 3; figura 2a-d).

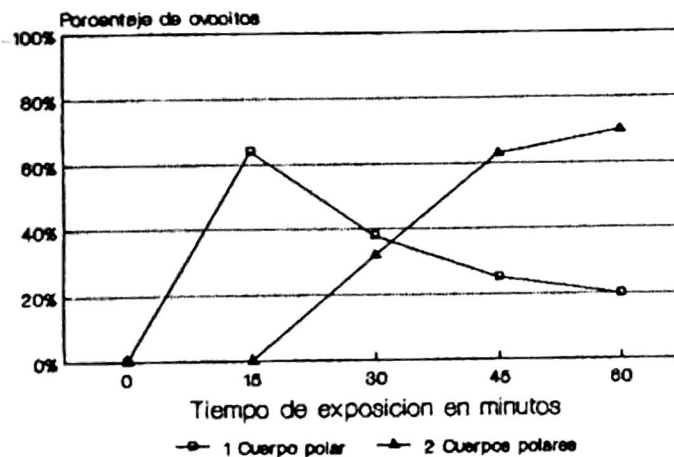
Algunas de las muestras que permanecieron resuspendidas en agua de mar, por espacio de 6 horas después del tratamiento con pronasa, mostraron un aumento en el porcentaje de cuerpos polares (tabla 8, líneas 2-4), mientras en otras muestras no hubo más desarrollo que en la muestra de 1 hr (tabla 8, línea 1). A veces, especialmente en ovocitos expuestos por más tiempo a pronasa, la capa vitelina se disolvió completamente y uno o ambos de los cuerpos polares cayeron. Esta disminución en el número de cuerpos polares se ve en los datos de la tabla 8, 7 horas con 0.3 mg/ml de pronasa a 45 y 60 minutos (línea 2) y con 0.6 mg/ml a 45 minutos (línea 4). Las muestras con el tratamiento de pronasa fueron fertilizadas presentando un desarrollo hasta embriones aparentemente normal (88-99%), con una pariencia muy semejante a la del control (figura



A

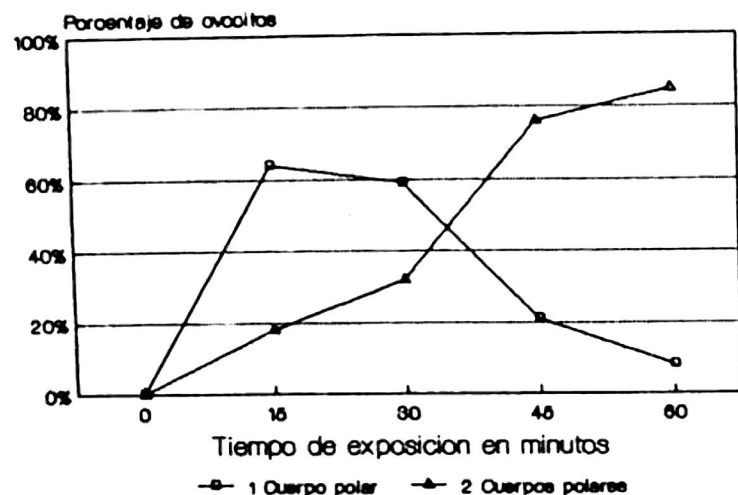


B

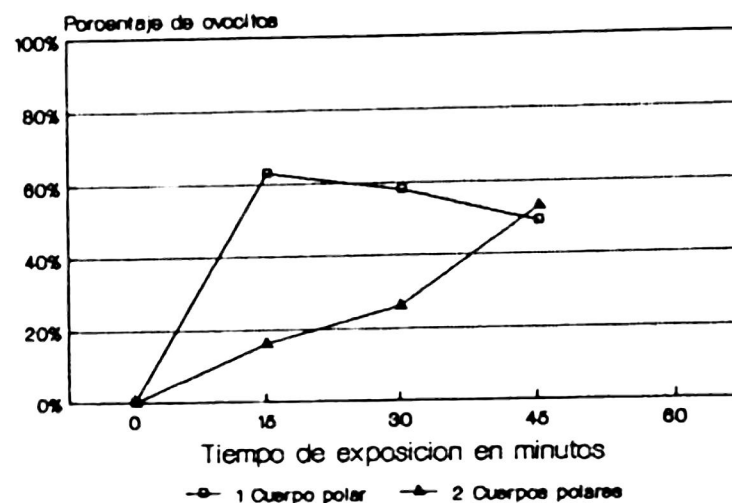


C

GRAFICA 2.- Efecto de 0.3 mg/ml pronasa en tres lotes de ovocitos. Se muestran los porcentajes de 1 y 2 cuerpos polares. En el tiempo 0 aparece el control no sometido a pronasa. Muestras fijadas 1 hora después del inicio del tratamiento con pronasa (ver esquema 5d y e, F_1 ; en metodología).



A



B

GRAFICA 3.- Efecto de 0.6 mg/ml de pronasa en dos lotes de ovocitos. Se observa un comportamiento similar a los experimentos de las gráficas anteriores. Estas muestras corresponden a los dos primeros lotes de ovocitos de la gráfica 2 (igual tiempo de fijación).

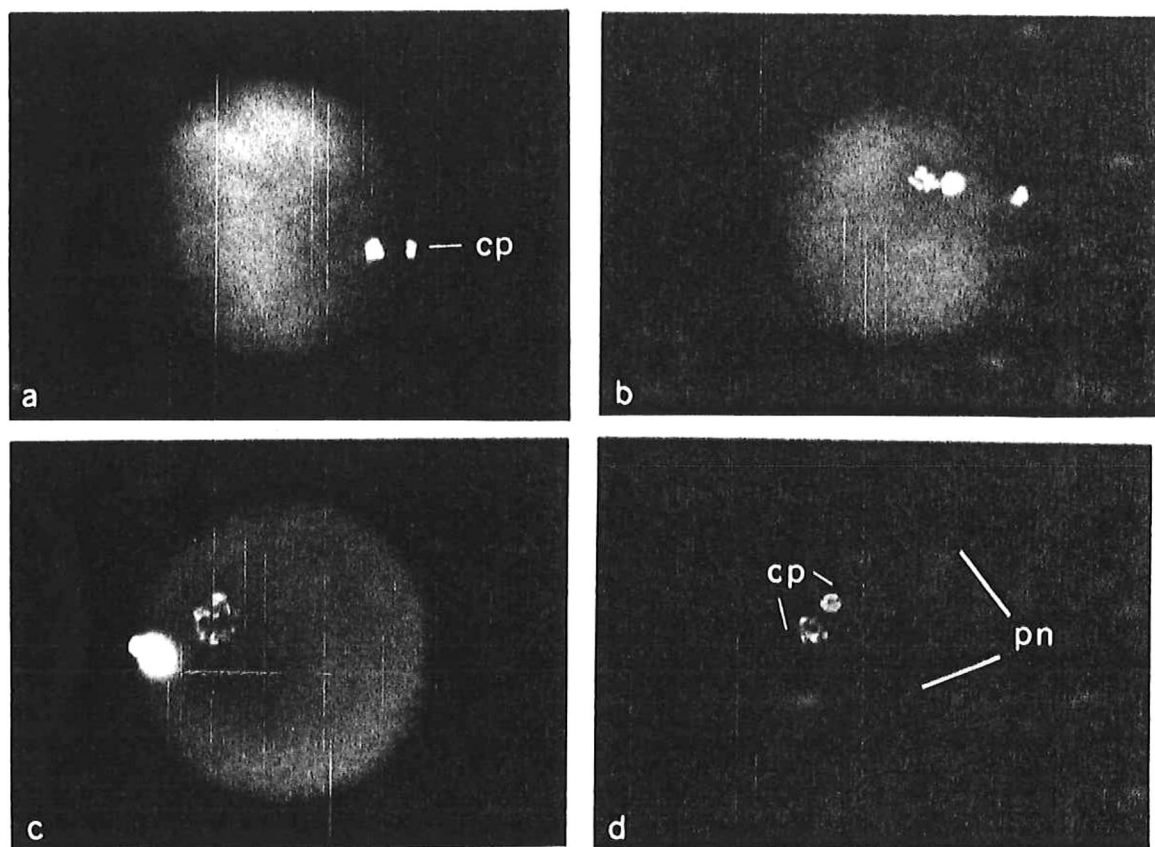


FIGURA 2a-d.- Ovocitos tratados con pronasa 0.3 mg/ml, durante 45 minutos (previa serotonina), todas los ovocitos fueron fijados al tiempo F_1 (ver esquema 5d). a) Ovocito con 1 cuerpo polar. b) Ovocito con 2 cuerpos polares, con cromosomas femeninos condensados. c) Ovocito con 2 cuerpos polares, los cromosomas femeninos se hallan descondensando. d) Ovocito con 2 cuerpos polares tratado con 0.6 mg/ml, el pronúcleo femenino aparece descondensado (cp=cuerpo polar; pn=pronúcleo femenino).

% de ovocitos. CONCENTRACION 0.3 mg/ml (ver gráfica 2A, B y C)						
TIEMPO	F ₁			F ₂		
	metaf 1	1 c.p	2 c.p	metaf 1	1 c.p	2 c.p
1.-Control	100	0	0	-	-	-
15 min	30	70	0	29	71	0
30	8	41	51	17	32	51
45	8	12	80	3	10	87
60	7	6	86	0	17	83
2.-Control	97	0	0	-	-	-
15 min	14	57	5	0	47	53
30	5	64	8	0	40	58
45	1	13	85	0	38	62
60	0	10	83	0	50	50
3.-Control	100	0	0	-	-	-
15 min	36	64	0	19	81	0
30	6	38	32	4	50	40
45	3	25	63	1	28	68
60	0	20	70	1	17	51
% de ovocitos. CONCENTRACION 0.6 mg/ml (ver gráfica 3B)						
4.-Control	97	0	0	-	-	-
15 min	21	63	16	0	50	50
30	16	58	26	1	48	50
45	4	49	44	0	24	40

TABLA 8.- Efecto del tiempo de incubación después del tratamiento con pronasa, sobre el porcentaje de metafase 1, 1 y 2 cuerpos polares. Las muestras F₁ fueron fijada 1 hora y las muestras F₂ 7 horas después del inicio del tratamiento con pronasa. Se omite el complemento hasta sumar 100% por tratarse de una categoría de destruidos.

3a-b).

Se llevaron a cabo 10 experimentos adicionales, al final de la temporada, con 0.3, 0.45 y 0.6 mg/ml de pronasa con tiempo de exposición de 45 minutos y mostraron altos porcentajes de formación de 1 ó 2 cuerpos polares pero en proporciones variables (60-88%, tabla 9). En conclusión se puede decir que la pronasa dió resultados muy constantes estimulando a los ovocitos para formar 1 ó 2 cuerpos polares pero después la mayoría quedaron con cromosomas condensados (figura 2b) y no formaron pronúcleos ni segmentaron.

6.- AGUA DE MAR HIPO- e HIPER-OSMOTICA. Los resultados muestran que las soluciones hipo- e hiperosmóticas no inducen segmentación en ovocitos previamente activados con pronasa (tabla 10). Además se observa una inhibición en la formación de cuerpos polares con respecto al control (tabla 10). Posiblemente el método tendría más éxito si se varía el tiempo entre el tratamiento con pronasa y el tratamiento con agua de mar de salinidad alterada.

7.- AGUA DE MAR PESADA (D_2O). En este experimento se

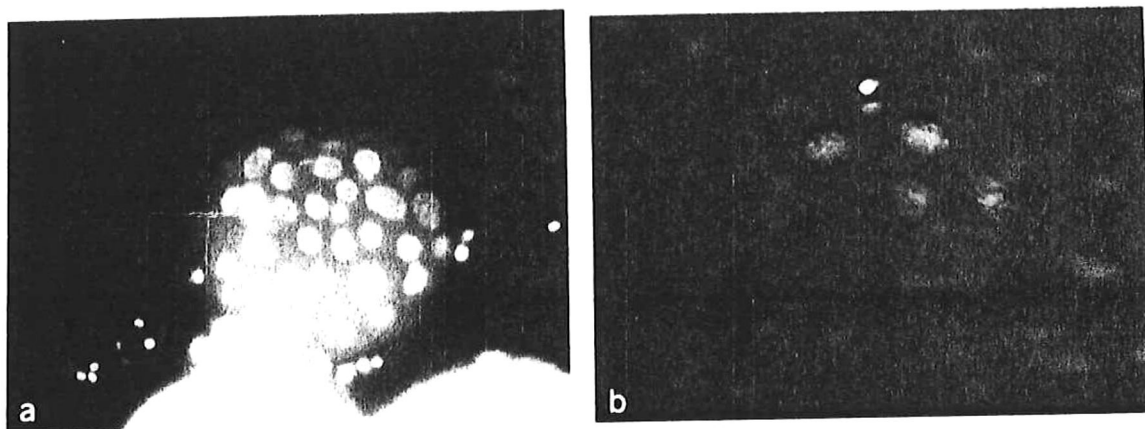


FIGURA 3a-b.- a) Ovocito tratado con 0.3 mg/ml de pronasa y fertilizado, fijado 6 hrs después (ver esquema 5d. F₃). Se observan blástulas normales. b) Ovocito sin tratamiento y fertilizado (control).

con 5-HT		% de ovocitos	
F ₁			
Concentración de pronasa	Metafase I	1 c.polar	2 c.polares
0-Controles	89-100	0	0
0.3 mg/ml	15	73	10
0.3	6	51	27
0.3	2	32	50
0.3	8	19	55
0.3	0	29	48
0.3	0	33	27
0.45	0	31	36
0.45	4	42	46
0.6	11	72	10
0.6	4	42	43

TABLA 9.- Experimentos adicionales de fin de temporada. Porcentaje de ovocitos en metafase I, con 1 y 2 cuerpos polares. Los ovocitos fueron expuestos a pronasa por 45 minutos lavados y fijados a los 60 minutos (ver esquema 5d y e, en metodología). Aunque las proporciones de ovocitos con 1 y 2 cuerpos polares fueron variables, siempre hubo un porcentaje alto.

(a) con 5-HT inmediatamente				
% de ovocitos				
	Metafase I	1 c.p	2 c.p	Segm
75%	63	34	3	0
Control	0	84	0	0
125%	24	56	8	0
150%	19	57	9	0
175%	11	52	10	0
(b) con 5-HT despues de 1 hr				
	Metafase I	1 c.p	2 c.p	Segm
75%	45	38	17	0
Control	*	-	-	-
125%	*	-	-	-
150%	29	39	13	0
175%	30	41	14	0

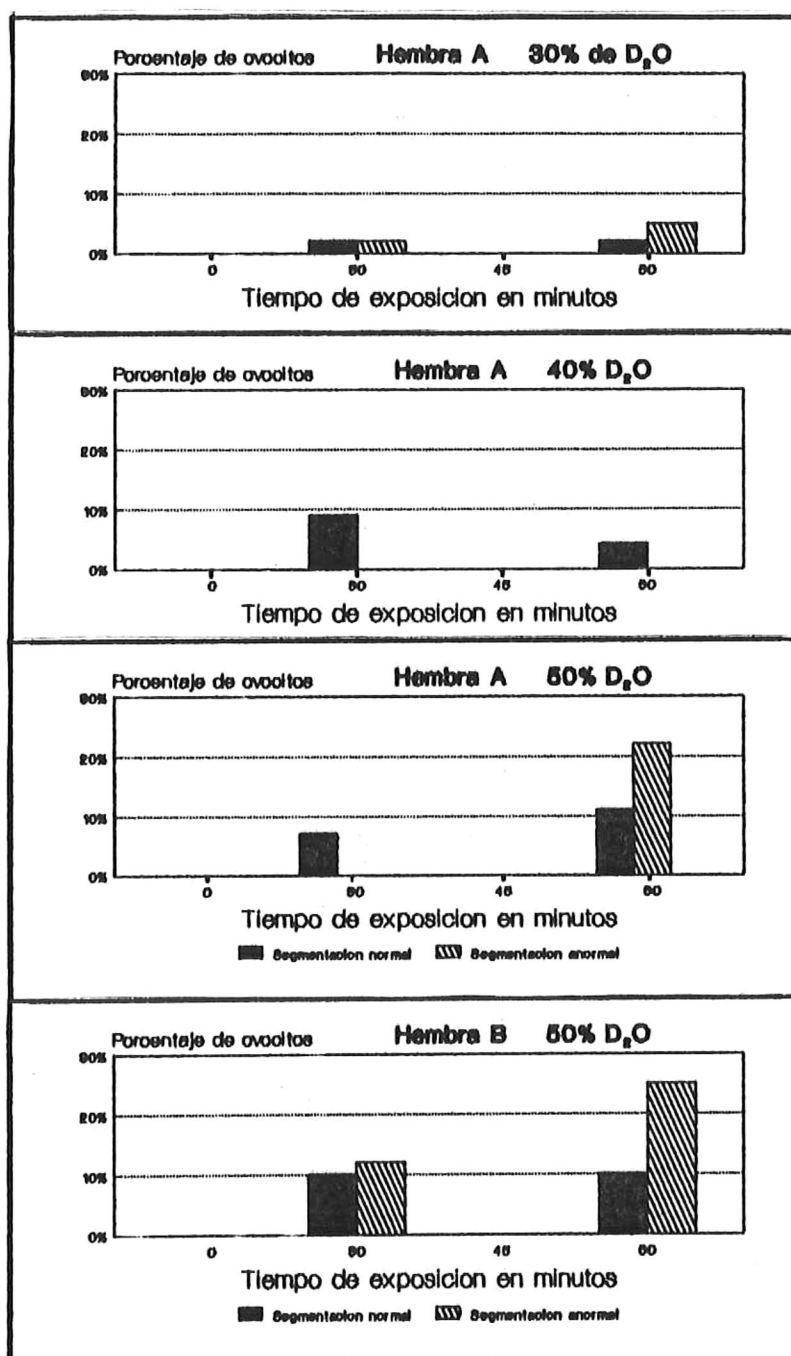
TABLA 10.- Muestras de ovocitos expuestos a varias concentraciones de agua de mar (hipo- e hiperosmótica) después del tratamiento con pronasa.

* Muestras destruidas. El control en la primera línea presentó un 16% de ovocitos con cromosomas fragmentados en el citoplasma. Las letras en los paréntesis se refieren a los tratamientos en esquema 6a y b (ver métodos).

utilizó agua pesada para estimular segmentación en ovocitos previamente expuestos a pronasa. Se utilizaron diferentes concentraciones de D_2O en agua de mar desde 0, 10, 20, 30, 40 hasta 50% con dos diferentes tiempos de exposición (30 y 60 minutos), para un mismo lote de ovocitos (ver metodología esquema 7a). Se repitió el experimento con 50% de D_2O (esquema 7b). Las concentraciones con 0% (control) y 10% de D_2O no presentaron ningún porcentaje de segmentación, mientras que en 20% de D_2O para ambos tiempos solo 1-2% del porcentaje de ovocitos presentaron segmentación.

Las concentraciones que presentaron porcentajes de segmentación mayores que 2% fueron 30, 40 y 50% como se muestra en la gráfica 4, en donde el tiempo 0 representa aquella muestra donde los ovocitos no fueron expuestos al agua pesada y no mostraron signos de segmentación. En la gráfica se aprecia que la concentración donde mayor porcentaje de segmentación se presentó fue de 50% de D_2O en agua de mar (gráfica 4). La apariencia de los embriones se ve en la figura 4a-d.

Luego se probaron 50 y 75% de D_2O en agua de mar con



GRAFICA 4.- Porcentaje de ovocitos con segmentación normal y anormal, con dos tiempos de exposición (30 y 60 minutos) a tres diferentes concentraciones de agua pesada 30, 40 y 50% en agua de mar. Previamente expuestos a 5-HT y pronasa 0.3 mg/ml durante 45 min. El tiempo 0 representa el control con respecto al agua pesada, donde no se presentó ningún porcentaje de ovocitos segmentados. Se trata de dos diferentes lotes de ovocitos (hembra A, esquema 7a-b; hembra B, esquema 7c-d, F).

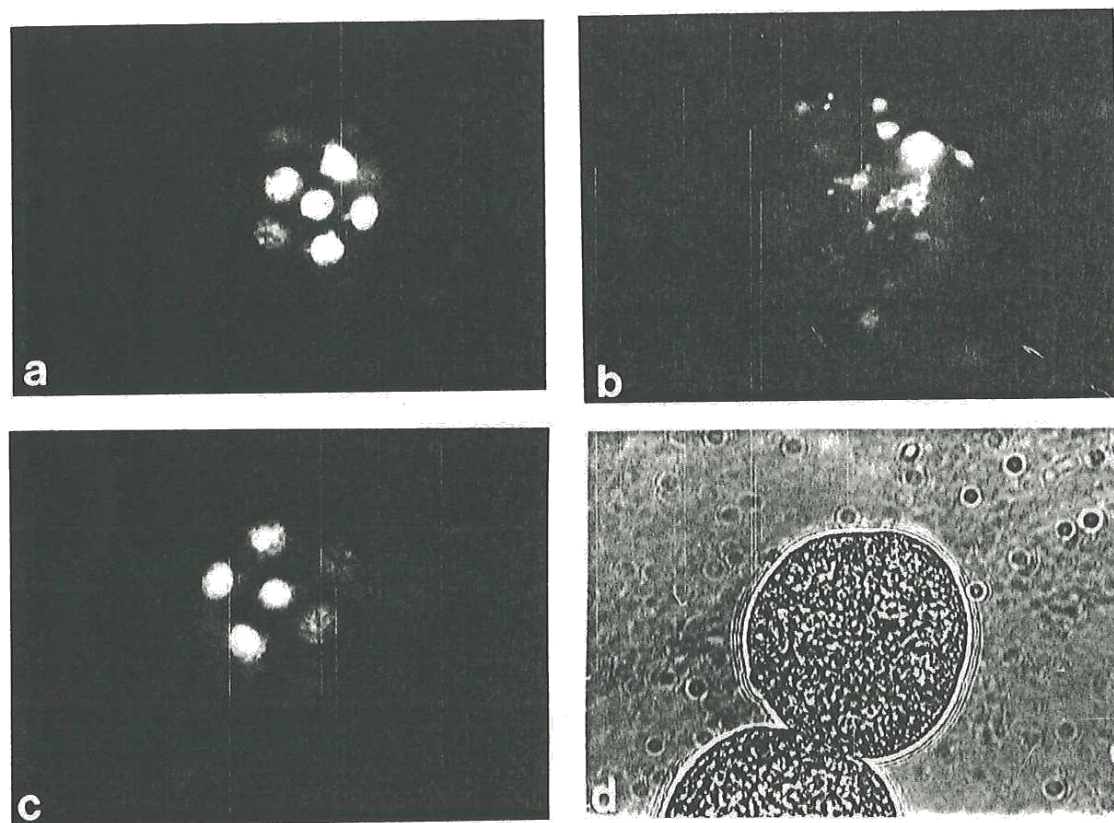
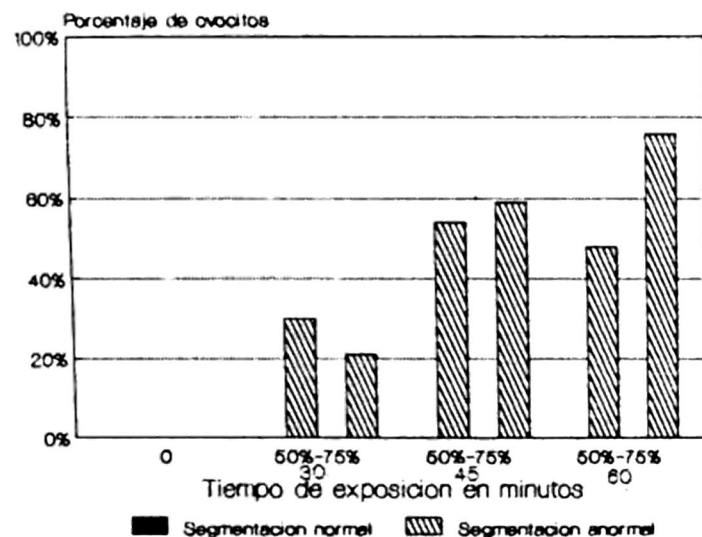


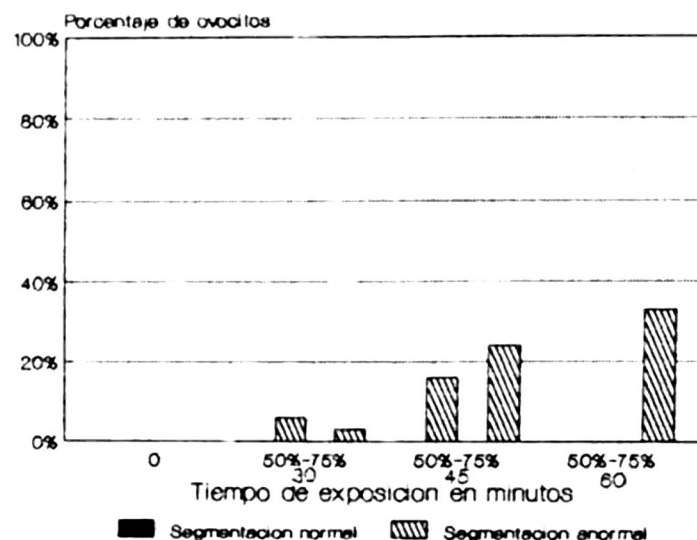
FIGURA 4a-d.- Ovocitos tratados con D_2O al 50% durante 60 minutos (previo tratamiento con serotonina y pronasa). a) Embrión con varios núcleos, segmentación normal (tiempo de fijación F_1 , ver esquema 7a). b) Embrión con segmentación anormal. c) Embrión fijado en F_1 , en esquema 7a. d) Mismo embrión anterior visto con contraste de fase.

tres diferentes tiempos: 30, 45 y 60 minutos, para ambas soluciones (ver metodología, esquema 7c). Se trabajó con dos lotes diferentes de ovocitos (Hembras C y D). Se aprecia en los resultados (gráficas 5 y 6) que en ninguno de los dos lotes de ovocitos se presentó segmentación normal. Mientras aumenta la concentración de D_2O , así como el tiempo de exposición, aumenta el porcentaje de segmentación anormal (figura 5).



GRAFICA 5.- Porcentaje de ovocitos con segmentación normal y anormal, con tres tiempos de exposición (30, 45 y 60 minutos) a dos diferentes concentraciones de agua pesada 50 y 75% en agua de mar. El tiempo 0 representa el control con respecto al agua pesada, donde no se presentó ningún porcentaje de ovocitos segmentados. No se presentó segmentación normal (hembra C, esquemas 7e y f, F).

1



GRAFICA 6.- Segundo lote de ovocitos tratados como en la gráfica anterior. Porcentaje de ovocitos con segmentación normal y anormal (hembra D).

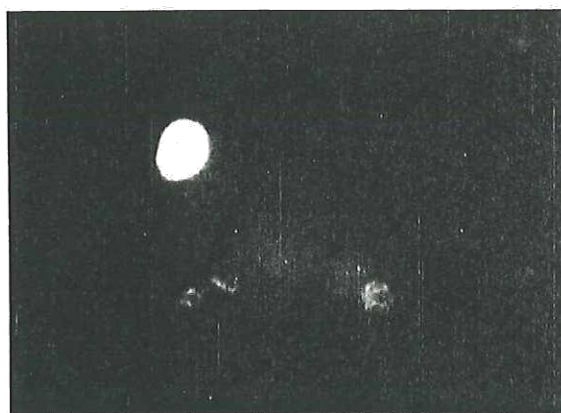


FIGURA 5.- Ovocito tratado con 75% de H_2O_2 durante 30 minutos
(previa serotonina y pronasa), muestra segmentación anormal.

DISCUSION

RUPTURA DE VESICULA GERMINAL

En el presente trabajo se encontró que la serotonina es un buen agente para inducir la maduración de los ovocitos hasta metafase I de meiosis, dando un rendimiento alto y constante de ovocitos que pueden ser fertilizados con desarrollo hasta larvas.

Osanai (1985) reportó la ruptura de vesícula germinal con 1 μ M de serotonina aunque el porcentaje de ovocitos que llegaron a metafase I fue variable y a veces baja (15-100%). En trabajos posteriores Osanai y Kuraishi (1988), y Osanai y Kyojuka (1988) utilizaron una concentración de 10 μ M de 5-HT para RVG (ruptura de vesícula germinal), sin embargo no reportaron datos sobre los porcentajes de ovocitos en metafase I obtenidos y no los fertilizaron. En nuestro trabajo se utilizó 20 μ M de serotonina, encontrando $\geq$ 86% de los ovocitos en metafase I en todos los lotes (17) probados (ver tabla 2), y se fertilizó encontrando desarrollo normal.

También se investigo si la presencia de calcio

extracelular es necesario para la RVG inducida por serotonina. En los bivalvos, *Barnea* y *Spisula* se ha observado que hay una captación de calcio extracelular cuando son estimulados por espermatozoides o agentes artificiales. Se ha demostrado que la RVG, inducida por estos agentes, no ocurre cuando el agua de mar no contiene calcio (Dubé, 1988; Dubé y Guerrier, 1982b). Se concluye que la captación de calcio extracelular es necesaria para la activación en estas especies.

Mientras que, en ostión se encontró que el calcio extracelular no es necesario para la RVG inducida por serotonina (ver tabla 3). Además, el porcentaje de ovocitos que rompieron sus vesículas espontáneamente en los controles sin serotonina, fue muy similar en agua de mar con calcio y sin calcio (tabla 3).

Osanai y Kuraishi (1988), también encontraron que el porcentaje de RVG inducido por $10 \mu\text{M}$ de 5-HT fue igual en agua de mar libre de calcio y magnesio a pH 6 que en agua de mar completa a pH 6 (55 y 50% respectivamente), pero no presentaron resultados al pH fisiológico.

Estos resultados nos muestran que la captación de calcio extracelular no es necesaria para estimular la RVG y llegar a metafase I en ostión. Si estos eventos son estimulados por un aumento en la concentración de calcio intracelular, el calcio vendría de fuentes intracelulares.

FORMACION DE CUERPOS POLARES

Ovocitos expuestos a alto calcio extracelular (50-200 mM) tampoco formaron cuerpos polares (ver tablas 4 y 5). Con las concentraciones más altas de calcio extracelular hubo un bajo porcentaje con 1 cuerpo polar, pero se observaron señales de daño en las muestras (fragmentación de cromosomas, ver tabla 5). En experimentos con alto calcio sin 5HT, el porcentaje de ovocitos con RVG que llegaron a metafase I fue ligeramente más alto que en los controles en agua de mar normal (tabla 5), pero no se sabe si fue una respuesta fisiológica o por daño.

El ionoforo A23187 a 5 y 20 μ M no indujo la formación de cuerpos polares en ovocitos en metafase I (tratados anteriormente con 5-HT, tabla 6). En contraste, Osanai y Kuraishi (1989), reportaron que el A23187 (10 μ M) provocó la

formación de cuerpos polares en un 2-39% de ovocitos previamente tratados con 10 μ M de 5-HT. Se desconoce la razón para la discrepancia de resultados, aunque puede ser porque los ovocitos con los que realizaron sus experimentos presentaron mayor disponibilidad de formar cuerpos polares espontáneamente (hasta 12%). En ninguna de las muestras del presente trabajo hubo formación espontánea de cuerpos polares. Se concluyó que ni el A23187 ni el alto calcio extracelular son adecuados para estimular el desarrollo en ovocitos de ostión.

En cambio el A23187 estimuló en un 100% el desarrollo de metafase I a cuerpos polares en *Mytilus* (Dufresne-Dubé et al., 1983) y el RVG y la formación de cuerpos polares en *Spisula* (Schuetz, 1975) (ver tabla 1). Normalmente el A23187 ocasiona un aumento en calcio intracelular (Ridgway et al., 1977), pero sin medir calcio intracelular no se puede concluir porque no estimuló a los ovocitos en ostión. Se puede pensar que no aumentó el calcio intracelular o bien que otro factor en adición al aumento en calcio intracelular fue necesario para activar a los ovocitos.

El agua de mar alcalina (pH 9) no estimuló la formación de cuerpos polares en ovocitos previamente tratados con 5-HT (gráfica 1). Sin embargo, aplicada a ovocitos sin 5-HT el agua de mar alcalina causó la formación de 1 cuerpo polar en un 31% y en un 55% de los ovocitos, en dos experimentos (gráfica 1).

Osanai y Kuraishi (1989) también experimentaron con agua de mar alcalina. Ajustaron el pH a 9.3 con NaOH, aunque se ha demostrado que el NH_4^+ es más efectivo para aumentar el pH intracelular en varias células (Shen, 1982). En todos sus experimentos con agua de mar alcalina utilizaron ovocitos en metafase I (inducido con 5-HT). El porcentaje de ovocitos que formaron cuerpos polares (no precisaron el número de ellos) fue variable de 1 a 69%. En los controles a pH 8.3 de 0-11% formaron cuerpos polares, así algunos lotes tuvieron la disponibilidad de formar cuerpos polares espontáneamente. En tres lotes de ovocitos que presentaron 4-22% con cuerpos polares en agua de mar alcalina, se presentó un 31-61% de ovocitos con cuerpos polares cuando el ionoforo A23187 ($10\mu\text{M}$) estuvo presente, sugiriendo que la combinación de estos dos agentes fue más efectiva que la

acción de uno solo.

El diseño racional de estrategias para activar ovocitos y la interpretación de los resultados obtenidos con agentes que modifican calcio y pH se tornan difíciles por la falta de información sobre los verdaderos cambios en concentraciones intracelulares de iones durante la activación por 5-HT y la fertilización normal. Hasta la fecha no hay reportes, excepto una mención preliminar con *Barnea* (Brassard *et al.*, 1988), sobre mediciones de niveles de calcio y pH intracelular durante la activación en ovocitos de ostión.

El agente que nos dió mejor resultado en estimular la formación de cuerpos polares fue la enzima proteolítica no-específica pronasa. Se utilizó pronasa tipo XXV de Sigma a concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/ml en agua de mar aplicadas a ovocitos en metafase I (previo tratamiento con serotonina). Además, variando el tiempo de exposición a pronasa se podía favorecer la formación de solamente 1 cuerpo polar (15 min) o bien la formación de 2 cuerpos polares (45 min, tabla 7). De los datos de las tablas 7-9,

se obtiene un promedio de $83 \pm 11\%$ (SD, n= 16 muestras) de ovocitos formando 1 ó 2 cuerpos polares en respuesta a la pronasa. Aún con ovocitos del fin de la temporada $78 \pm 9\%$ (n= 10 muestras) formaron 1 ó 2 cuerpos polares (tabla 9). Este alto y constante rendimiento contrasta con los rendimientos variables y más bajos de los tratamientos descritos anteriormente (alto calcio, A23187, alto pH).

Osanai y Kyojuka (1988), reportaron que pronasa causa RVG y la formación de cuerpos polares sin segmentación en *Crassostrea gigas*. Los porcentajes con cuerpos polares (no especifican cuantos) después de 2:30 horas de incubación continua con la enzima, fueron 10.6% con 1 mg/ml de pronasa, 8.6% con 0.5 mg/ml, 17.9% con 0.25 mg/ml, 17.8% con 0.125 mg/ml y 0.8% con 0.063 mg/ml, un rendimiento mucho más bajo que el reportado en el presente trabajo.

Se desconoce el mecanismo de acción de la pronasa. Una posibilidad es que la enzima altere la conformación de "receptores" en la membrana plasmática imitando el efecto del espermatozoide. Otra posibilidad es que actúa dentro del ovocito, degradando inhibidores o liberando activadores. Por

ejemplo se ha establecido en *Xenopus* que un inhibidor llamado factor citoestático (CSF) es el responsable de mantener a los ovocitos arrestados en metafase II antes de la fecundación (Masui y Markert, 1971). Después de la fecundación o activación artificial hay un aumento en el interior de la célula de una proteasa que destruye el CSF (Sagata *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989). Sería interesante determinar si el mismo CSF mantiene a los ovocitos de ostión en metafase I antes de la fecundación. También es interesante señalar que los ovocitos tratados con pronasa fueron fertilizados y presentaron segmentación aparentemente normal, lo cual descarta la posibilidad de daño. Esta observación indica que a pesar de estar activados los ovocitos no tuvieron un bloqueo a la polispermia, o bien que si tuvieron pero las moléculas superficiales responsables del bloqueo fueron destruidas por la pronasa.

SEGMENTACION

Antes de la realización del presente trabajo, únicamente Inaba (1936) reportó la obtención de segmentación por tratamiento químico en ostión, aunque los porcentajes fueron variables y bajos (máximo 34% pero en general mucho

menor). Utilizó agua de mar alcalina con la adición de NH_4OH . Reportó la concentración de NH_4OH usada pero no el pH. Usando las mismas proporciones que Inaba (1936) encontramos un pH de 9.3.

En el presente trabajo se encontró que en un experimento con agua de mar a pH 8.6 sin serotonina hubo un 10% de ovocitos con segmentación (gráfica 1B). En la repetición del mismo experimento, al final de la temporada, no se obtuvo segmentación.

Se concluyó que agua de mar alcalina no fue adecuado para inducir segmentación en ostión. Además, en el estudio de Inaba (1936) todas las larvas que obtuvo fueron anormales.

Otro tratamiento que ha sido utilizado para inducir segmentación en erizo es agua de mar hipertónica (ver Antecedentes). Mientras que en el presente trabajo este tratamiento no fue efectivo (tabla 10). Por eso se decidió probar con agua pesada, que ha sido utilizada para la inducción de asteres múltiples (un aster es igual a un

centrosoma con radiaciones de microtúbulos) en ovocitos de erizo (Schatten, 1982) y para estimular la polimerización de microtúbulos en ovocitos de *Xenopus* (Heidemann y Kirschner, 1975).

Estudios fisicoquímicos con agua pesada indican que uno de sus efectos es aumentar la fuerza de enlaces hidrofóbicos promoviendo así la estabilidad de macromoléculas (Hanstein *et al.*, 1974). Este efecto puede explicar la polimerización de tubulina en agua pesada pero no se comprende todos los cambios que puede causar en una célula. Cuando ovocitos de ostión previamente tratados con serotonina y pronasa fueron tratados con agua pesada al 50% en agua de mar se logró un 11% de embriones con segmentación (ver figura 4 y gráfica 4).

El siguiente paso sería llevar a cabo experimentos para tratar de aumentar el porcentaje de segmentación normal y al mismo tiempo llevar a los embriones partenogenéticos hasta adultos.

CONCLUSION

La serotonina al 2×10^{-5} M en agua de mar durante 1 hora, induce la ruptura de la vesícula germinal en ovocitos de ostión llevándolos a metafase I, en altos porcentajes.

La utilización de alto calcio extracelular (50-200 mM) activa la formación de 1 cuerpo polar en muy bajos porcentajes, y en altas concentraciones propicia daño en los ovocitos.

El ionoforo A23187 (5 y 20 μ M) no induce a la formación de cuerpos polares en ovocitos en metafase I, ni a la segmentación.

El agua de mar alcalina (pH 9.0), sin tratamiento previo de serotonina, estimula la formación de 1 cuerpo polar en porcentajes bajos y variables.

La pronasa a concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/ml en agua de mar durante 15 minutos, previo tratamiento con serotonina, activa consistentemente la formación de 1

cuerpo polar en altos porcentajes, y con 45 minutos de exposición la formación de 2 cuerpos polares, pero no la segmentación.

En ovocitos tratados con serotonina y pronasa tanto el agua de mar hipotónica (75%) como la hipertónica (125-175%) no inducen a la segmentación.

En ovocitos, previamente tratados con serotonina y pronasa, el agua pesada al 50% en agua de mar durante 60 minutos induce la segmentación en porcentajes del 10-11%.

BIBLIOGRAFIA :

- Allen, R. D., 1953. Fertilization and Artificial Activation in the Eggs of the Surf-Clam, *Spisula solidissima*. Biol. Bull. 105 (2): 213-239.
- Brandriff, B., R. T. Hinegardner, and R. Steinhardt, 1975. Development and Life Cycle of the Parthenogenetically Activated Sea Urchin Embryo. J. Exptl. Zool. 192: 13-24.
- Brassard, M., H. Duclohier, M. Moreau and P. Guerrier, 1988. Intracellular pH Change Does not Appear as a Prerequisite for Triggering Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) Oocytes. Gamete Research. 20: 43-52.
- Charbonneau, M., and N. Grandin, 1989. The Eggs of *Xenopus laevis*: a Model System for Studying Cell Activation. Cell Differ. Develop. 28: 71-94.
- Comings, D. E., 1975. Mechanisms of Chromosome Banding, VIII. Hoechst 33258-DNA Interaction. Chromosoma (Berl.) 52: 229-243.
- Cross, N. L., 1981. Initiation of the Activation Potential by an Increase in Intracellular Calcium in Eggs of

- the Frog, *Rana pipiens*. Dev. Biol. 85: 380-384.
- Dubé, F., 1988. The Relationships Between Early Ionic Events, the Pattern of Protein Synthesis, and Oocyte Activation in the Surf Clam, *Spisula solidissima*. Dev. Biol. 126: 233-241.
- Dubé, F., and P. Guerrier, 1982a. Acid Release during Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) Oocyte. Develop., Growth and Differ. 24 (2): 163-171.
- Dubé, F., and P. Guerrier, 1982b. Activation of *Barnea candida* (Mollusca, Pelecypoda) Oocyte by Sperm or KCl, but Not by NH_4Cl , Requires a Calcium Influx. Dev. Biol. 92: 408-417.
- Dufresne-Dubé, L., F. Dubé, P. Guerrier, and P. Couillard, 1983. Absence of a Complete Block to Polyspermy After Fertilization of *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Pelecypoda) Oocytes. Dev. Biol. 97: 27-33.
- Finkel, T., and D. P. Wolf, 1980. Membrane Potential, pH and the Activation of Surf Clam Oocytes. Gamete Research. 3: 299-304.
- Hamaguchi, Y., and Y. Hiramoto, 1981. Activation of Sea Urchin Eggs by Microinjection of Calcium Buffers. Exptl. Cell Research. 134: 171-179.

- Hanstein, W. G., K. A. Davis, and Y. Hatafi, 1974. Solvent Isotope Effects on the Structure and Function of Mitochondrial Membranes in Aqueous Media. Arch. Biochem. and Biophys. 163: 482-490.
- Heidemann, S. R., and M. W. Kirschner, 1985. Aster Formation in Eggs of *Xenopus laevis*. J. Cell Biol. 67: 105-117.
- Hirai, S., T. Kishimoto, A. L. Kadam, H. Kanatani, and Koide, S. S., 1988. Induction of Spawning and Oocyte Maturation by 5-Hydroxytryptamine in the Surf Clam. J. Exptl. Zool. 245: 318-321.
- Hollingsworth, J., 1941. Activation of *Cumingia* and *Arbacia* Eggs by Bivalent Cations. Biol. Bull. 81: 261-276.
- Imai, T., Hatanaka, M., Sato, R., Sakai, S. and Yuki, r., 1950. Artificial breeding of oyster in tanks. Tohoku J. Agric. Res., 1: 69-86.
- Inaba, F., 1936. Studies on the Artificial Parthenogenesis of *Ostrea gigas* Thunberg. J. Sci. Hiroshima University, Ser. B. Div. 1, 5: 1-46.
- Jaffe, L. A., M. Gould-Somero, and L. Holland, 1979. Ionic Mechanism of the Fertilization Potential of the Marine Worm, *Urechis caupo* (Echiura). J. Gen.

- Physiol. 73: 469-492.
- Jaffe, L. F., 1983. Sources of Calcium in Egg Activation: A Review and Hypothesis. Dev. Biol. 99 (2): 265-276.
- Jaffe, L. F., 1985. The Role of Calcium Explosions, Waves, and Pulses in Activating Eggs. BIOLOGY OF FERTILIZATION. Eds. C. B. Metz and A. Monroy. Vol. 3. Academic Press, Inc., New York, NY, pp 128-165.
- Loeb, J., 1913. ARTIFICIAL PARTHENOGENESIS AND FERTILIZATION. The Univ. of Chicago Press, Chicago, pp. 1-16.
- Longo, J. F., 1976. Ultrastructural Aspects of Fertilization in Spiralian Eggs. American Zoologist. 16 (3): 375-394.
- Masui, Y., and C. L. Markert, 1971. Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior During Meiotic Maturation of Frog Oocytes. J. Exptl. Zool. 177: 129-146.
- Morris, M., 1917. A Cytological Study of Artificial Parthenogenesis in *Cumingia*. J. Exptl. Zool. 22: 1-51.
- Müller, W. & F. Gautier, 1975. Interactions of Hetero-aromatic Compounds with Nucleic Acids: A;T-specific Non-intercalating DNA ligands. Eur. J.

- Biochem. 54: 385-394.
- Osanai, K., 1985. *In vitro* Induction of Germinal Vesicle Breakdown in Oyster Oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18 (1): 1-19.
- Osanai, K., and R. Kuraishi, 1988. Response of Oocytes to Meiosis-inducing Agents in Pelecypods. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18 (2): 45-56.
- Osanai, K., and R. Kuraishi, 1989. Artificial Induction of Meiosis Resumption from the First Metaphase in Oyster Oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18 (3): 90-101.
- Osanai, K., and Kyojuka, K., 1988. Pronase P Induces the Resumption of Meiosis in Oyster Oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18 (2): 37-43.
- Ridgway, E. B., J. C. Gilkey and L. F. Jaffe, 1977. Free Calcium Increases Explosively in Activating Medaka Eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 623-627.
- Sagata, N., N. Watanabe, G. F. Vande Woude, & Y. Ikawa, 1989. The *c-mos* Proto-oncogene Product is a Cytostatic Factor Responsible for Meiotic Arrest in Vertebrate Eggs. Nature. 342: 512-518.
- Schatten, G., 1982. Motility during Fertilization.

- International Review of Cytology. 79: 59-163.
- Schuetz, A. W., 1975. Induction of Nuclear Breakdown and Meiosis in *Spisula solidissima* Oocytes by Calcium Ionophore. J. Exptl. Zool. 191: 433-440.
- Shen, S. S., 1982. The Effect of External Ions on pH_i in Sea Urchin Eggs. INTRACELLULAR pH: ITS MEASUREMENT, REGULATION, AND UTILIZATION IN CELLULAR FUNCTIONS. Alan R. Liss, Inc. New York, NY, pp 269-282.
- Surani, M. A. H., S. C. Barton & M. L. Norris, 1987. Mammalian Embryos Need Male and Female Pronuclei for Normal Growth. Biology of Reproduction. 19 (3): 1-9.
- Tyler, A., 1941. Artificial Parthenogenesis. Biol. Rev. Cambridge Philosoph. Soc. 16: 291-336.
- Watanabe, N., G. F. Vande Woude, Y. Ikawa & N. Sagata, 1989. Specific Proteolysis of the c-mos Proto-oncogene Product by Calpain on Fertilization of *Xenopus* Eggs. Nature. 342: 505-511.
- Wilson, E. B., 1928. THE CELL IN DEVELOPMENT AND HEREDITY. 3rd ed. The MacMillan Co., New York, NY, pp 467-487.
- Zucker, R. S., R. A. Steinhardt, and M. M. Winkler, 1978. Intracellular Calcium Release and the Mechanism of Parthenogenetic Activation of the Sea Urchin Eggs.

Dev. Biol. 65 (2): 285-295.