

## NUCLIS, EBONUCLIS I MICRONUCLIS

Montse Boada (1,2.), Montse Ponsà (2), Paz Maristany (1), P.N. Barri (1) i Josep Egozcue (2).

1.- Servei de Medicina de la Reproducció, Departament d'Obstetricia i Ginecologia, Institut Dexcus, Passeig Bonanova, 67, 08017 Barcelona.

2.- Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra.

### RESUM

L'estat en que es presenta el nucli dels gàmetes i embrions humans femenins varia segons l'estadi de maduració o desenvolupament en que es troben.

La presència d'un embolcall nuclear s'observa en els oócits immadurs en estat de vesícula germinal, en els oócits fertilitzats en estat de pronuclis i en el nucli dels blastomers que constitueixen els embrions en els primers estadis de desenvolupament. En aquest treball s'analitzen les característiques i distribució de les principals estructures nuclears (nucleol i heterocromatina) en els diferents estats. Hem observat la presència de fragments de membrana intranuclears i petits cossos ovals densos als electrons entre les

dues capes de la membrana nuclear en els pronuclis d'alguns oòcits. També hem observat la presència de vesícules citoplasmàtiques de gran tamany (pseudonuclis) que es poden confondre amb pronuclis en un dels casos. Destaquem la polarització de les estructures nuclears en els oòcits en estat de pronuclis i la manca d'aquesta en els nuclis i micronuclis dels embrions anormals.

#### SUMMARY

The appearance of genetic material in human oocyte and embryos, changes according to their stage of maturation and development. The presence of nuclear envelope can be observed in immature oocytes at germinal vesicle stage, in fertilized oocytes at pronuclear stage and also in the blastomeres of cleaved embryos.

Characteristics and distribution of the main nuclear structures (nucleoli and heterochromatin) in these stages of development are analyzed.

We observe the presence of intranuclear annulate lamellae and small oval bodies between the two leaflets of pronuclear envelope as well as some cytoplasmatic large vesicles that can be confused with pronuclei.

Polarization of nuclear structures in zygotes at pronuclear stage is remarkable. A lack of this polarization is observed in abnormal cleaved embryos.

## INTRODUCCIO

Al llarg del procés maduratiu, el nucli dels gàmetes humans femenins passa per diversos estats. El primer bloqueig de la meiosi es produeix a dictiotè abans del neixement. En aquesta etapa, el material genètic es troba englobat dins la membrana nuclear constituint la vesícula germinal (Dvorak i Tesarik, 1980). Aquest estat continuarà fins arribada la pubertat en que es reinicia la meiosi per influència hormonal de les gonadotropines. Es produeix el trencament de la membrana nuclear durant la fase preovulatoria de cada cicle, desapareixent el nucleol i fent-se visibles els cromosomes (Zamboni et al., 1972). Les etapes meiòtiques següents es produeixen ràpidament fins arribar a metafase de la segona divisió meiòtica en que es produeix un segon bloqueig del procés meiòtic. Aquest bloqueig serà definitiu sino es produeix la fecundació però si es produeix, s'induirà de nou la meiosi amb l'extrusió del segon corpuscle polar a anafase II (Lopata et al., 1980), i seguidament es formaran els pronuclis. La síntesi "de novo" de la membrana nuclear es realitza a partir de vesícules del reticle endoplasmàtic de l'oòcit (Soupart i Strong, 1975). Treballs recentment realitzats amb tècniques de microinjecció demostren que en l'especie humana, el temps necessari per la formació del pronuclis oscil·la entre 6 i 9 hores (Lanzerdorf et al., 1986, Lawsing et al., 1986).

Desde el punt de vista morfològic, la fertilització no es completa fins que s'ha produït la primera divisió embrionària i els genomes masculí i femení s'han juntat.

L'inici de la primera divisió embrionària comportarà un nou trencament de l'embocall nuclear reapareixent de nou en l'estat de dues cèl·lules. Errors en el comportament cromosòmic durant les primeres divisions embrionàries poden ser les responsables de l'aparició de blastomeres multinucleats (Sathananthan, 1984).

En aquest estudi s'analitzen i es comparen les característiques ultraestructurals de la vesícula germinal d'un oòcit immadur, les característiques dels pronuclis de 9 oócits fertilitzats (2 en estat de 2 pronuclis i 7 polipenetrats) i les característiques dels micronuclis de dos embrions multinucleats en estat de 4 cèl·lules.

#### MATERIAL I MÈTODES

S'han estudiat 12 oócits humans inseminats "in vitro" i desestimats per la transferència o congelació d'embrions per no haver estat fertilitzats o perquè la fertilització havia estat incorrecte. S'han escollit per aquest treball oócits en diferents estats però amb la característica comú de presentar el material genètic englobat dins l'embocall nuclear. Així doncs, es descriuen: 1 oòcit en estat de vesícula germinal, 2 oócits fertilitzats en estat de 2PN, 6 oócits polipenetrats en estat de 3PN i 1 en 4PN, i 2 oócits dividits amb blastomeres multinucleats. Els dos oócits en estat de 2PN van ser fixats al comprovar-se que malgrat havien estat correctament fertilitzats, el seu desenvolupament s'havia aturat sense continuar amb les divisions embrionàries en el temps esperat. Al contrari, els altres 9 oócits polipenetrats van ser fixats immediatament al identificar-se la polipenetració per evitar la seva divisió.

Les pacients han estat tractades amb Citrat de Clomifé i hMG per induir el creixement fol·licular i amb hCG per recolzar la funció lúteínica (Mcintosh et al., 1980). Els oòcits s'han recuperat via laparoscopia i han estat cultivats i inseminats "in vitro". A les 16-20 hores post-inseminació, s'han alliberat mecànicament de les cèl·lules fol·liculars que els envolten i s'han exclos del programa tots aquells que no presentaven els signes evidents d'una correcta fertilització (2 pronúclis + 2 corpuscles polars). La fixació d'aquest material s'ha realitzat amb glutaraldehid al 2,5% i tetròxid d'osmi al 1%. S'han deshidratat en una sèrie de banys d'alcohol i òxid de propilè en concentració creixent i s'ha inclòs cada oòcit per separat en araldita Durcupan.

Cada oòcit s'ha seccionat totalment alternant talls semifins d'una micra de gruixaria i seccions ultrafines de 70-90 nm. Els talls semifins s'han tenyit amb blau de toluidina al 1% i s'han observat al microscopi òptic. Les seccions ultrafines s'han tenyit amb acetat d'uranil al 1% i amb citrat de plom (Tinció Reynold's) i s'han analitzat al microscopi electrònic de transmissió Hitachi HU 12 A.

## RESULTATS

### Oòcit immadur en vesícula germinal

La forma del nucli es totalment esfèrica i el seu diàmetre aproximat es d'unes 20  $\mu\text{m}$ . En l'oòcit que nosaltres estudiem, la posició del nucli és perifèrica.

Observem una disminució d'organuls cel·lulars en la regió del citoplasma que queda entre el nucli i la membrana cel·lular (Fig.1). A l'altre banda del nucli s'observa una major concentració d'organuls identificable fins i tot a la lupa. La membrana nuclear és una doble membrana amb un espai perinuclear d'uns 15 a 20 nm. Es caracteritza per presentar nombrosos porus. Pràcticament no hi ha separació entre un i l'altre de manera que en un tall transversal, la membrana s'observa com una successió de petites circumferències que són els porus. A l'interior del nucli observem dos nucleols de mida reduïda i d'aspecte molt compacte. Són de forma rodona i estan situats a la perifèria del nucli envoltats per cromatina fibrilar. Altres agregats de cromatina s'observen també a la perifèria del nucli prop de la membrana nuclear. La resta del nucli no té estructures nuclears a excepció d'algun petit granul pericromàtic.

#### Oòcits fertilitzats en estat de pronúclis

En aquest apartat incloum 2 oòcits en estat de 2PN, 6 oòcits polipenetrats en estat de 3 PN i 1 oòcit amb 4 PN. Les característiques ultraestructurals dels pronúclis són les mateixes per tots ells sense observar-se diferències notables entre els oòcits monospermies i els polipenetrats.

El tamany dels pronúclis es en l'espècie humana d'unes 25-30 µm de diàmetre màxim no presentat-se diferències entre el pronúclis femení i el/s masculin/s. Per aquest motiu, i a diferència d'altres espècies com per exemple el ratolí, l'identificació d'aquests no es pot fer en base a la seva mida sino per la seva proximitat al corpuscle polar o a les restes de l'axonema de l'permertatozoide

(Soupart i Strong, 1975) encara que en els casos que hem estudiat no observem diferències.

La forma dels pronuclis es variable. Pot ser esfèrica o oval i en alguns casos es poden presentar petites invaginacions. La posició del pronuclis es també variable ja que desde la seva formació es produeix una migració que va de la perifèria cap al centre de l'òocit (Fig.2). Els organuls cel·lulars es troben repartits per tot el citoplasma fins i tot en les petites regions que queden entremig dels pronuclis. Observem la presència de paquets de làmines anellades citoplasmàtiques. En alguns casos, observem mitcondris associats a la membrana externa dels pronuclis. La membrana nuclear es doble i presenta alguns porus i discontinuïtats. En algunes regions la separació entre ambdues làmines s'aixampla per la presència de petits cossos ovals, densos als electrons, que es projecten cap al citoplasma. A l'interior dels pronuclis hi trobem heterocromatina, i nucleols i petits fragments de membrana intranuclear (Fig. 3).

Aquestes estructures estan disposades principalment, en la zona de cada pronucli que queda més pròxima als altres pronuclis. Així doncs, existeix una polarització de les estructures intranuclears cap a la regió on convergeixen els pronuclis (Fig.2). Els nucleols són ovals, densos als electrons i d'estructura compacta. El nombre màxim observat ha estat de quatre per pronucli. La heterocromatina es troba distribuïda en forma de petits grumolls principalment repartits per la perifèria dels pronuclis encara que també s'en poden trobar en les regions més internes d'aquests. Trobem també petits fragments de membrana intranuclears de naturalesa i estructura semblant a la membrana nuclear. Son fragments de tamany variable que presenten

porus iguals als de la membrana. En alguns casos, aquests fragments poden unir-se pels extrems donant lloc a petits cercles o figures diverses (Fig. 3). La similitut amb les làmines anellades citoplasmàtiques presents en els oócits en aquest estadi, ha fet que alguns autors els classifiquessin com làmines anellades intranuclears (Trounson i Sathananthan, 1984).

Els "pseudonuclis" són grans vesícules citoplasmàtiques delimitades per una membrana senzilla i sense cromatina ni nucleòls a l'interior. El seu contingut es poc dens als electrons i tenen l'aspecte com d'estar buides. S'anomenen "pseudonuclis" perquè pel seu aspecte morfològic a la lupa es podrien confondre amb pronuclis i perquè durant la migració dels pronuclis cap al centre de l'ooplasma, poden desplaçar-se conjuntament amb aquests (Van Blerkom et al., 1987). En el citoplasma d'aquest oócits hem observat la presència de vesícules d'aquests tipus encara que només en un cas, el tamany d'aquesta vesícula es comparable al d'un pronucli (Fig.4).

#### Embrions multinucleats

Dins d'aquest apartat s'inclouen dos embrions humans en estat de 4 cèl.lules. El nombre de nuclis que observem a l'interior de cada blastomer varia de zero a cinc (Fig. 5). La mida d'aquests nuclis es també variable. Mentres alguns d'ells són de mida similar als pronuclis, altres tenen un mida molt inferior per lo que s'anomenen micronuclis.

Les característiques principals de tots aquests nuclis són la seva pròpia disposició en l'espai i la distribució apolar de les



estructures nuclears internes. A diferència dels pronuclis del oòcit fertilitzats i polipenetrats descrits en l'apartat anterior, en aquests els nuclis no tenen perquè trobar-se agrupats.

Els nucleols, heterocromatina i làmines intranuclears es troben repartides per l'interior del nuclis encara que preferentment en posició perifèrica. En un dels dos casos, a més d'aquestes estructures hem observat la presència de vacuoles intranuclears a l'interior de quatre dels seus micronuclis. Un altre fet a destacar es la presència d'un nucli de forma lobulada en un d'aquests embrions. La forma dels altres nuclis es regular en tots ells.

#### DISCUSSIÓ

L'estudi ultraestructural del nucli i les seves estructures ens dona una valuosa informació sobre l'estat en que es troba l'oòcit i de l'activitat d'aquest. La petita mida dels nucleols observats en l'oòcit immadur així com el seu aspecte compacte i la posició perifèrica d'aquests ens indica que es tracta d'un oòcit a punt de patir el trencament de la vesícula germinal i iniciar el procés de maduració. En aquest oòcit, la síntesi de RNA es molt baixa i serà mínima. Quan els nucleols desapareguin del tot (Coimbra i Azevedo, 1984) l'elevat nombre de porus observat en la membrana nuclear d'aquest oòcit son indicatius d'un elevat intercanvi de material entre el nucli i el citoplasma. El fet de que quan trobem els pronuclis al centre de l'oòcit observem també una polarització de les estructures intranuclears cap a la zona de convergència, ens fa

pensar que deu existir una relació entre la polarització i la migració dels pronuclis.

La presència de petits cossos ovals entre les dues capes de la membrana dels pronuclis ens indica que en aquest estat existeix un transport adicional entre el nucli i el citoplasma. La naturalesa d'aquests cossos s'estima ribonucleoproteica. Wischnitzer (1960) ho interpreta com una forma de transferir material d'origen cromosomic del nucli cap al citoplasma. Nilsson-Sundström (1982) consideren que es material del nucleoplasma que podria correspondre a estadis incipients de la neoproducció de mitocondris.

La presència de fragments de membrana intranuclears s'ha interpretat a la literatura de diverses maneres. Podria ser que durant la formació de l'embocall dels pronuclis per fusió de fragments originats a partir del reticle endoplasmatic, alguns d'aquests fragments haguessin quedat atrapats a l'interior del nucli. La presència d'aquests fragments així com dels paquets de làmines anellades citoplasmàtiques està relacionada amb una elevada activitat anabòlica.

Respecte als embrions estudiats, la presència també de fragments de làmines anellades intranuclears i citoplasmàtiques ens indica que aquesta activitat sintetitzadora encara es manté.

La disposició irregular dels nuclis i les seves estructures en els blastomers multinuclears dels embrions estudiats, podria estar relacionada amb la divisió anormal d'aquests.

## R.E.F.E.R.E.N.C.I.E.S

- COIMBRA, A., AZEVEDO, C. (1984). Structure and evolution of the nucleolus during oogenesis. In : VAN BLERKOM J and MOTTA P.M. (eds). Ultrastructure of Reproduction, chap.11, pg. 127 - 139.
- DVORAK, M., TESARIK, J. (1980) : Ultrastructure of human ovarian follicles. In. MOTTA, P.N., HAFEZ Esc (Eds). Biology of the ovary. Chap.9, pg. 121-137.
- LANZENDORF, S., MALONEY, M., VEEK, L., SLUSSER, I., HODGEN, G., RESENWAKS, Z. (1988) . A preclinical evaluation of pronucleus formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. Fertil.Steril, 49,835-842.
- LAWSKING, A., TROUNSON, A., SATHANANTHAN, H, KOLA, I. (1988) . Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. Fertil.Steril, 48,637-642.
- LOPATA, A., SATHANANTHAN, A.H., MACBAIN, J.C., JOHNSTON, W.H., SPEIRS, A.L. (1980). The ultrastructure of the preovulatory human egg fertilized in vitro: Fertil.Steril. 33, 12-20.
- MCINTOSH, J., MATTHEWS, C.D., CROKER, J.M., BROOM, T.Y., COX, L.W. (1980) : Predicting the luteinizing hormone surge: relationship

between the duration of the follicular and luteal phases and the length of the human menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 36, 125-130.

NILSSON, B.O., SUNGSTROIM, P. (1992) : Ultrastructure of in vitro developed human embryos. In: E.S.E Hafez and K.Semm (eds). *In vitro fertilization and embryo transfer* pg. 249-261.

SATHANANTHAN, H. (1984). Ultrastructural morphology of fertilization and early cleavage in the human. In: A Trounson IC. Wood (Eds). *In vitro fertilization and embryo transfer*, pg. 131-158.

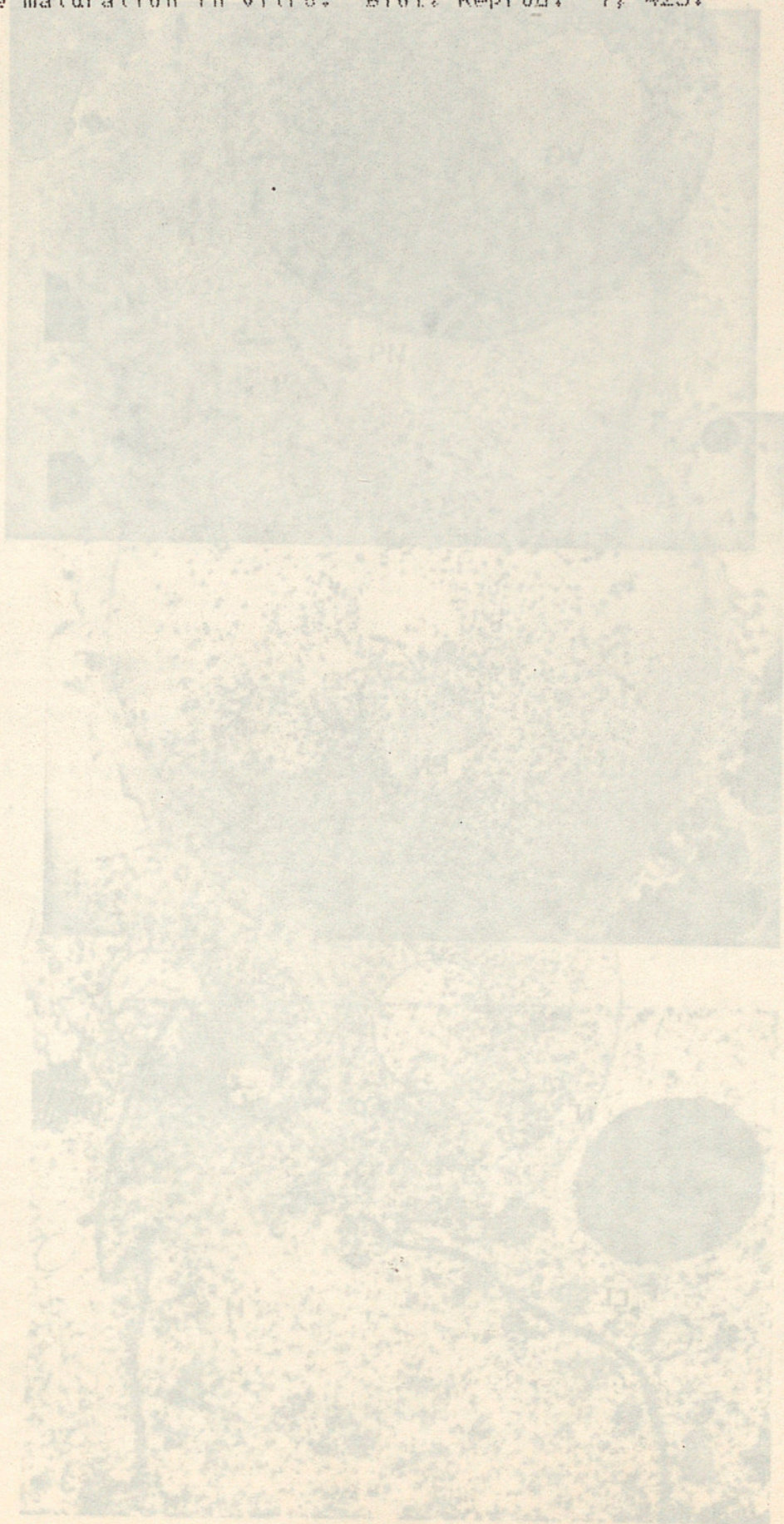
SOUPART, P., STRONG, P.A. (1975) . Ultrastructural observations on polyspermic penetration of zona pellucida-free human oocytes inseminated in vitro. *Fertil. and Steril.* 26, 523-537.

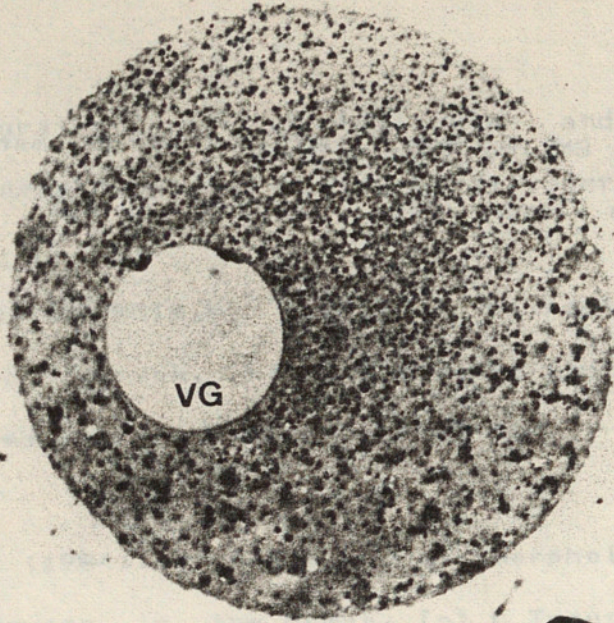
TROUNSON, A., SATHANANTHAN, H. (1984). The application of electron microscopy in the evaluation of two to four-cell human embryos cultured in vitro for embryo transfer. *J. of IVF and E.T.* 1, 153-165.

VAN BLEKOM, I, BELL, H., HENRY, G. (1987). The occurrence, recognition and developmental fate of pseudomultipronuclear eggs after in vitro fertilization of human oocytes. *Human Reprod.*, 2, 217-225.

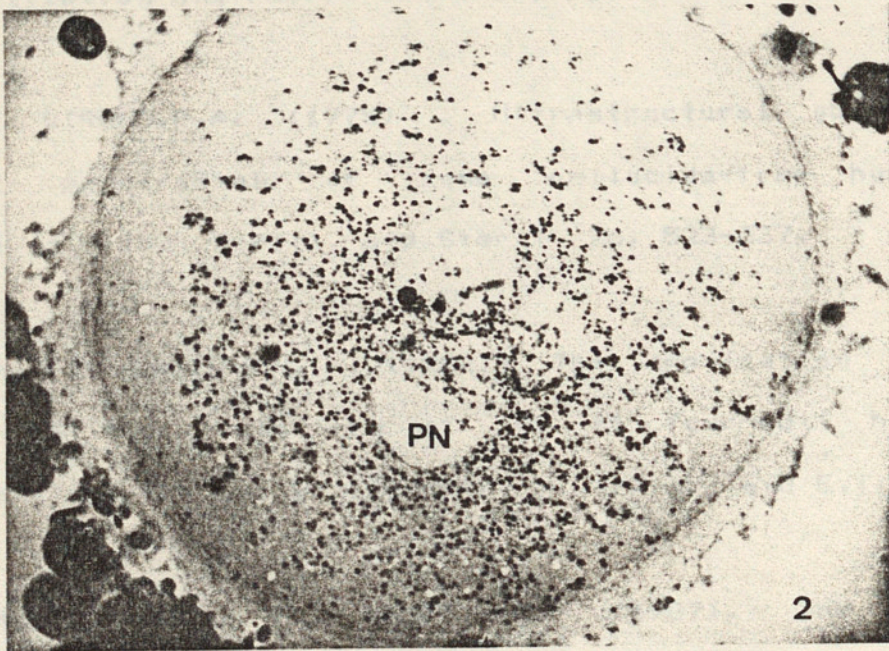
WISCHNITZER, S. (1960). Ultrastructure of the nucleus. *Intern. Rev. Cytol.*, 10, 152-157.

ZAMBONI, L., THOMPSON R.S., SMITH, D.M. (1972) : Fine morphology of human oocyte maturation in vitro. *Biol. Reprod.* 7, 425.

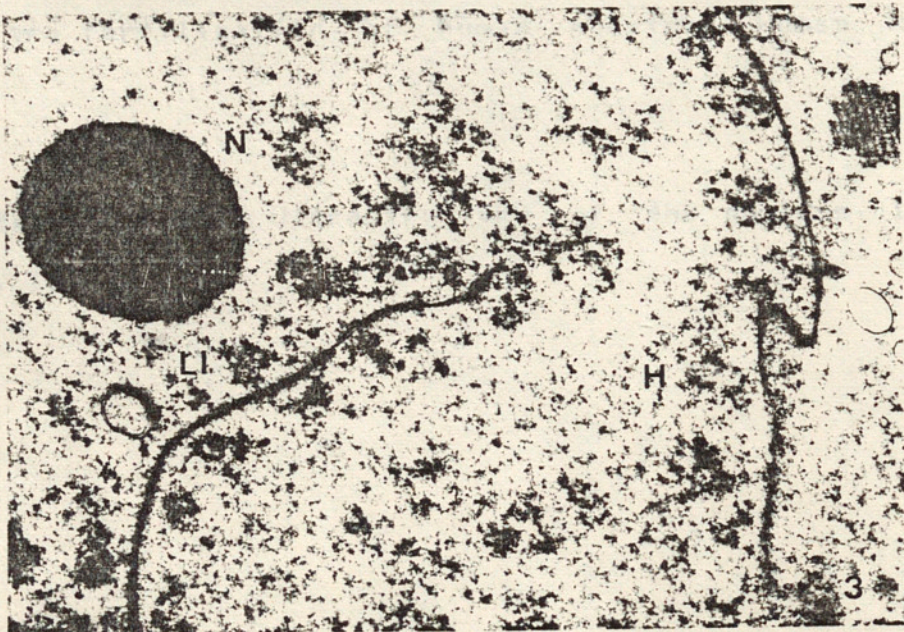




1

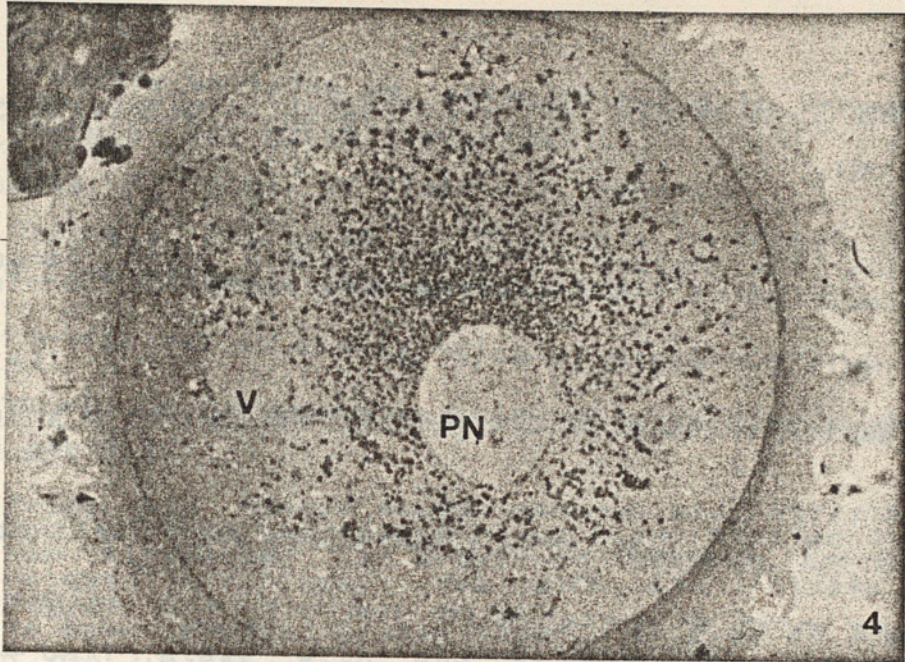


2

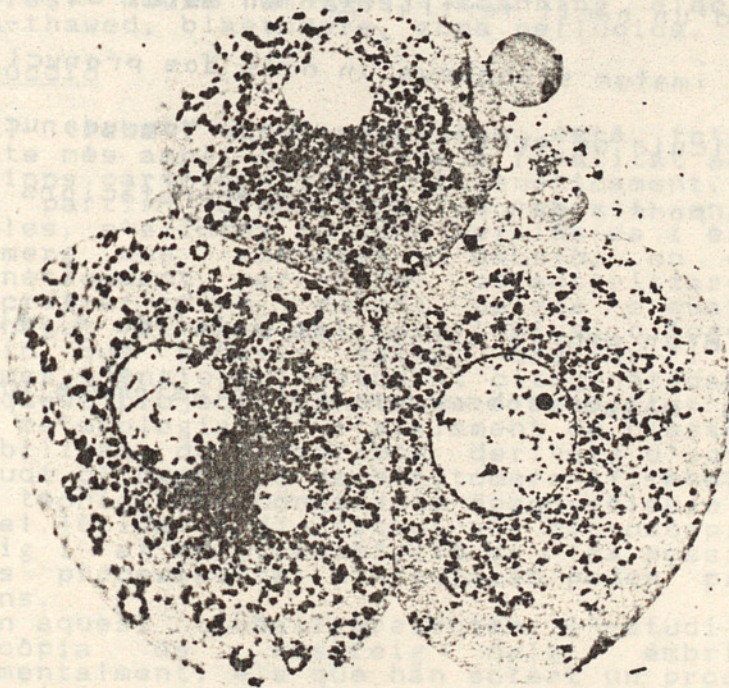


3

CELS DE FIGURA



4



5

## PEUS DE FIGURA

- Fig. 1 : Semifi d'un oòcit immadur en estat de vesícula germinal (VG).
- Fig. 2 : Semifi d'un oòcit polipenetrat en estat de 3 pronuclis (PN). Destaquem la polarització de les estructures nuclears cap a la regió on convergeixen els pronuclis.
- Fig. 3 : Detall ultraestructural del nucli d'un oòcit fertilitzat en estat de 2 pronuclis. Nucleol (N), lamines intranuclears (LI), heterocromatina (H) (10.700 x).
- Fig. 4 : Semifi d'un oòcit fertilitzat en estat de 2 PN. En aquesta imatge s'observa un dels dos pronuclis (PN) i una vesícula de gran tamany (U) o "pseudonucli" que a la lupa podria donar lloc a interpretacions errònies.
- Fig. 5 : Semifi d'un embrió anormal en estat de 4 cèl.lules. En aquesta imatge s'observen tres blastomeres un d'ells amb dos nuclis.