

Ultraestructura d'oòcits humans procedents de programes FIV

M. Boada<sup>1</sup>, M. Ponsà<sup>1,2</sup>, J. Egozcue<sup>1,2</sup>

1. Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
2. Institut de Biologia Fonamental "Vicent Villar Palasí", Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.

Abstract

Ultrastructural evaluation of human oocytes of IVF programs.

In this paper we describe ultrastructural characteristics of 12 human oocytes obtained by laparoscopy, cultured and inseminated in vitro. These oocytes were fixed for transmission electron microscopy after being rejected for transfer because they didn't show any fertilization characteristics.

Ultrastructural organization depends on culture time. Details of these changes are described below.

We describe morphological characteristics of human preovulatory oocytes, of a fragmented non fertilized oocyte and two fertilized oocytes; one in the pronuclear stage and the other with two polar bodies.

Introducció:

El treball que presentem és un estudi de la ultraestructura d'una sèrie d'oòcits humans que havent estat recuperats per tal de ser fecundats "in vitro", van ser exclosos del programa perquè quan es realitzà el control per veure si havien estat fecundats, no presentaven cap dels símptomes que ho indiquen (presència de dos corpuscles polars, presència de dos pronúclis o que l'oòcit ja estigui dividit).

La selecció d'aquests oòcits s'ha fet en funció de la causa d'infertilitat de les parelles en qüestió. S'han escollit els oòcits d'aquells casos en els que les raons per les quals no varen aconseguir ser fecundats in vitro, es suposen de tipus masculí.

Per aquest treball s'han emprat 12 oòcits obtinguts per laparoscopia, de vuit dones sotmeses a programes de fertilització in vitro a causa de problemes d'infertilitat en la parella. En la majoria dels casos, és un factor tubàric el responsable de la infertilitat però en altres, el diagnòstic és d'infertilitat sense causa. Es tracta doncs, d'oòcits que han estat inseminats però que per causes en principi desconegudes, no han aconseguit ser fecundats i per tant, han quedat exclosos del programa per el que havien sigut recuperats.



El procés que es segueix a partir que els oòcits són desestimats per part dels clínics, és el següent:

- Fixació dels oòcits amb glutaraldehid al 1%.
- Preinclusió de cada oòcit per separat, en agar al 2%. Aquest pas ens facilita la manipulació dels oòcits i ens permet processar cada un d'ells individualment.
- Postfixació amb tetròxid d'osmi al 1%.
- Deshidratació en un seguit de banys d'alcohol de concentració creixent.
- Tinció amb acetat d'uranil al 1%.
- Inclusió en araldita.
- Seccionament seriat de cada cèl.lula per ultramicrotomia intercalant talls semifins d'una micra de gruixària amb seccions ultrafines de 700 a 900 Å.
- Tinció dels semifins amb blau de touluidina i observació d'aquests al microscopi òptic.
- Tinció de les seccions ultrafines amb citrat de plom (tinció Reynold's i observació al microscopi electrònic de transmissió Hitachi HU-12A).

#### Resultats i discussió:

Els oòcits fixats en un període de temps superior als dos dies després de haver-se-li practicat la laparoscòpia a la pacient (taula I, casos 1,2,3,5,7), presenten una gran vacuolitza-  
ció del citoplasma. Això ens indica que aquestes cèl.lules han entrat en un procés degeneratiu irreversible.

Per altra banda, aquells oòcits que són fixats en els dos dies següents a la seva obtenció, no presenten símptomes de degeneració (taula I casos 4,6). Aquests oòcits són de forma esfèrica o lleugerament ovalada. Presenten una capa glicoproteica d'estructura granulofibril·lar que els envolta anomenada zona pel·lúcida molt important a l'hora de l'aproximació dels espermatozoides cap a la membrana citoplasmàtica dels oòcits ja que el contacte amb ella, és un factor determinant per la capacita-  
ció dels espermatozoides. Al voltant d'aquesta coberta, hi trobem en molts casos, espermatozoides, tant normals com anormals, que intenten atravesar-la.

Més externament i rodejant també a l'oòcit, es troben de forma natural, tot un conjunt de cèl.lules fol·liculars que formen la corona radiata i més ampliament, el cúmulus oöphorus.



Aquestes cèl.lules constitueixen la coberta oòcitaria més externa. En els oòcits que nosaltres hem estudiat, no és normal trobar-hi gaires cèl.lules fol·liculars al voltant, doncs, aquestes cèl.lules són en gran part eliminades mecànicament abans de la inseminació i posteriorment, durant tot el tractament per microscòpia electrònica, es van perdre les que queden.

La pròpia membrana citoplasmàtica de l'oòcit es considera també una coberta oòcitaria. Aquesta membrana presenta nombrosos microvillis que s'extenen cap a l'espai perivitellí que hi ha entre la membrana vitel·lina i la zona pellúcida. En aquest espai s'hi poden trobar també, fragments de materials citoplasmàtics així com restes del primer corpuscle polar que ja s'hagi començat a degradar.

En el citoplasma dels oòcits hi trobem en primer lloc els grànuls corticals (GC). Estan situats a la perifèria i apareixen molt densos als electrons (figura 1). La funció d'aquestes vesícules es la d'evitar la polispermia alliberant el seu contingut al espai perivitellí immediatament després que un espermatozoide aconseguixi fecundar a l'oòcit.

Repartides per tot el citoplasma i en nombre molt elevat es troben les mitocondries. Aquests orgànuls són els més abundants. Estan distribuïdes uniformement per tot el citoplasma formant petits grupets. En els oòcits degenerats, les mitocondries es disposen al voltant de les vesícules formant unes associacions molt típiques d'aquests oòcits.

Els altres orgànuls cel·lulars que observem en el citoplasma dels oòcits en estat preovulatori són molt menys nombrosos. S'observen algunes vesícules de Golgi, cisternes de reticle endoplasmàtic, algun lisosoma i inclusions diverses.

És curiós destacar que la baixa freqüència en que es troben aquests orgànuls és típica dels oòcits en estat preovulatori (Metafase de la segona divisió meiótica). L'oòcit del cas nº 4 no es troba en aquest estat sinó que és un oòcit fecundat en estat de pronuclis. Presenta un citoplasma ric en orgànuls: Golgi, reticle endoplasmàtic, mitocondries i lamines anellades. Aquestes últimes són unes cisternes disposades paral·lelament entre les quals s'hi troben múltiples porus semblants als de la membrana nuclear. Les lamines anellades no les observem en cap



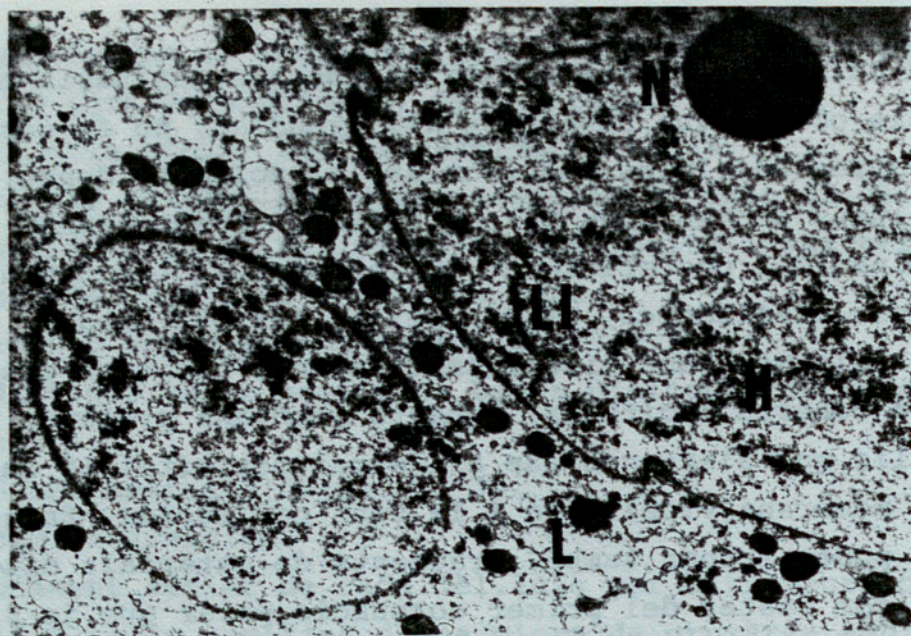


Fig. 1. Pronuclis del oòcit nº 4. S'observen dos nucleols (N) i fragments de làmines anellades intranuclears (LI) en el pronucli més gran. A tots dos s'hi pot observar heterocromatina (H). X11.000.

Taula I. Estat dels oòcits en relació al temps passat entre la laparoscopia i la fixació

Pacient nº	Nº d'oòcits/pacient	Temps de cultiu dels oòcits	Vacualització del citoplasma
1	2	4	++
2	2	5	++
3	1	5	+++
4	1	2	-
5	2	4	+++
6	1	2	-
7	2	3	+
8	1	2	+

dels oòcits en estat de metafase II sinó que només els observem quan l'estructura de nucli està definida. Fig. 1.

En estat de metafase II que és quan queda aturada la segona divisió meiótica femenina, el material nuclear no està envoltat per la membrana nuclear sinó que tot el nucli queda reduït a una zona pobre en orgànuls en la que s'hi troben els cromosomes.



En l'òocit del cas nº 4, el material nuclear si que es troba englobat dins de la membrana. La cromatina no està condensada en forma de cromosomes sinó que està dispersa. En un dels dos pronuclis, observem la presència de tres nuclèols d'estructura compacta i densos als electrons (Fig. 1). A la perifèria, tocant la membrana nuclear per la cara interna, hi ha una zona rica en heterocromatina (H). La membrana nuclear presenta gran quantitat de porus i discontinuitats en la capa més externa. En algunes d'aquestes discontinuitats s'observen uns petits cosos ovals conectats a la capa interna de la membrana nuclear que es projecten cap el citoplasma. En l'interior d'aquest pronucli, s'observen també fragments de làmines anellades intranuclears (LI). Fig. 1.

En l'espai perivitel·lí d'aquest òocit hi trobem 2 corpuscles polars. Un en perfecte estat i en el que s'hi observen cromosomes i l'altre en estat de lisi.

La ultraestructura dels corpuscles, en general, es molt semblant a la dels òocits i la única diferència entre ells és que el primer presenta grànuls corticals a la perifèria i que en el segon, la presència d'aquests es practicament nul·la. Fig. 2.

Un dels dos òocits del cas nº 2 presenta cromosomes en el seu interior i dos corpuscles polars en l'espai perivitel·lí. La presència de dos corpuscles polars junt amb l'observació de l'ultraestructura d'aquests i la del òocit ens indueix a pensar que podria tractar-se d'un òocit fecundat.

Un cas a part el constitueix un dels dos òocits de la pacient nº 7. (Taula II). Es tracta d'un òocit dividit però no de forma regular sinó molt desigual. El fet que s'observin grànuls corticals, que els fragments siguin tant diferents de mida i que només un d'ells, el més gros, presenti cromosomes, ens fa pensar que no es tracta d'un embrió sinó d'un òocit que s'ha fragmentat de forma degenerativa.



Taula II. Fase en que es troben els oòcits en funció del nº de corpuscles que presenten i de l'organització del material nuclear.

Pacient nº	Estat de la cromatina	Nº de corpuscles observats	Fase
1	cromosomes	1	Metafase II
	cromosomes	1	Metafase II
2	cromosomes	1	Metafase II
	cromosomes	2	Final 2a div. meiotica
3	cromosomes	1	Metafase II
4	no condensada	2	Pronuclis
5	cromosomes	1	Metafase II
	cromosomes	1	Metafase II
6	cromosomes	1	Metafase II
7	cromosomes	1	Fragmentat
	cromosomes	1	Metafase II
8	cromosomes	1	Metafase II

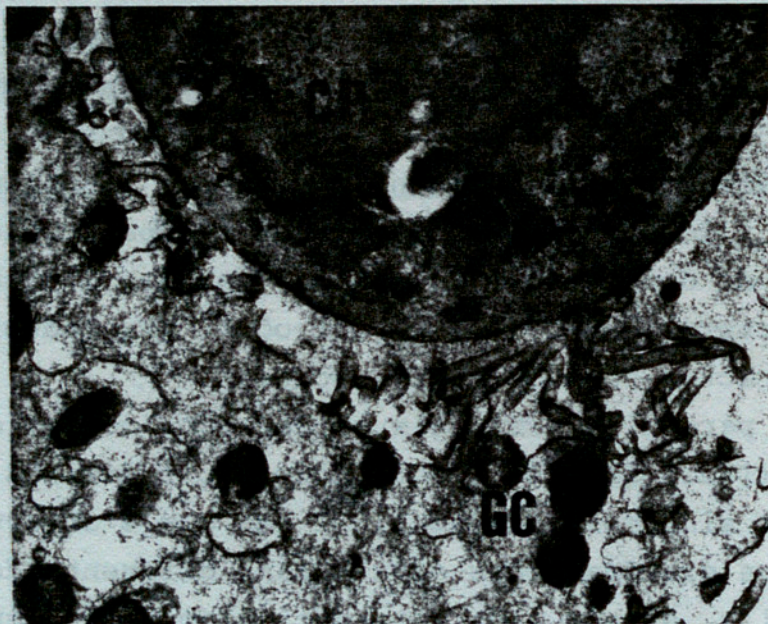


Fig. 2. Corpuscle polar (CP) de l'oòcit nº 6. S'observen grànuls corticals (GC) tant a la perifèria de l'oòcit com en el corpuscle polar. X20.000.



### Agraïments

Agraim la col.laboració dels membres de la unitat de fecundació in vitro de l'Institut Dexeus de Barcelona sense la qual no s'hauria pogut dur a terme aquest treball.

La realització del treball s'ha efectuat en èl Servei de Microscòpia Electrònica i en el Departament de Biologia Cel.lular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### Bibliografia

CROZET N., DUMONT M. (1984). The site of the Acrosome Reaction during in vivo penetration of the sheep oocyte. Gamete Research 10: 97-105.

GODDUM-ROSSE P. et al. (1984). In vivo fertilization in the rat. Observation on Living Eggs. Fertility and Sterility 42: 285-292.

SATHANANTHAN A.H., TROUNSON A.O. (1982). Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. Gamete Research 6: 225-234.

SATHANANTHAN A.H., TROUNSON A.O. (1982). Ultrastructural observations on Cortical granules in human follicular oocytes cultured in vitro. Gamete Research 5: 191-198.

TESARIK J. et al. (1984). Human Nonovulatory oocyte-cumulus complexes: Ultrastructure, Macromolecular Synthesis and Developmental Potential. Gamete Research 9: 153-165.

TROUNSON A., SATHANANTHAN A.H. (1984). The Application of Electron Microscopy in the evaluation of two-to four-cell Embryos cultured in vitro for Embryo transfer. Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer 3: 153-165.

The neurosecretive regulation of vitellogenin synthesis and ovulation in three copepods remains unknown.

Key words: Intestinal spherocrystals; Calcium storage; Vitellogenesis; Copepod.

### Introducció

La formació de les plaquetes vitel·línes depèn, en la major part de les espècies estudiades, de la vitel·logenina, proteïna que es forma en el fetge dels vertebrats, i en els invertebrats és sintetitzada en diversos òrgans, encara que en molts d'ells l'origen de la proteïna roman desconegut així com la seva neuroregulació.