

ULTRASTRUCTURA D'OÒCITS HUMANS POLIPENETRATS INSEMINATS «IN VITRO»

M. Boada^{1, 2}, M. Ponsà^{1, 3}, A. Veiga² i J. Egozcue^{1, 3}

¹ Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

² Servei de Reproducció Humana, Departament de Ginecologia i Obstetricia, Institut Dexeus, Barcelona.

³ Institut de Biologia Fonamental. V. Villar Palasí, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

RESUM

Sis oòcits humans polipenetrats procedents d'un programa de fertilització *in vitro* s'han fixat amb glutaraldehid al 2,5 % a les 16-20 hores postinseminació i tractats segons les tècniques convencionals de microscòpia electrònica. La recuperació dels oòcits s'ha realitzat per laparoscòpia.

Cada oòcit s'ha tallat per ultramicrotòmia de pol a pol, alternant talls semifins amb seccions ultrafines.

En aquest treball es descriuen les característiques ultraestructurals d'aquests oòcits, la presència d'estructures espermàtiques en el citoplasma, la distribució dels grànuls corticals, làmines anellades i altres orgànuls cel·lulars així com les característiques dels pronucleus, corpuscles polars i de la zona pel·lúcida.

RESUMEN

Seis ovocitos polipenetrados procedentes de un programa de fertilización *in vitro* se han fijado con glutaraldehido al 2,5 % a las 16-20 horas post-inseminación y tratado según las técnicas convencionales de microscopía electrónica.

La recuperación de los ovocitos se ha realizado mediante laparoscopia.

Cada ovocito se ha seccionado por completo por ultramicrotómia, alternando cortes semifinos con secciones ultrafinas.

En este trabajo se describen las características ultraestructurales de estos ovocitos, la presencia de estructuras espermáticas en el citoplasma, la distribución de los gránulos corticales, láminas anilladas y otros orgánulos celulares así como las características de los pronucleos, de los corpúsculos polares y de la zona pelúcida.

ABSTRACT

Six humans polyspermic oocytes rejected for embryo transfer have been fixed in 2,5 % glutaraldenid 16-20 hours after insemination and treated for ultrastructural observations at the transmission electron microscope.

Oocytes were obtained by laparoscopy from six patients who were participating in an IVF program at the Institute Dexeus of Barcelona.

Each specimen has been entirely sectioned from pole to pole, alternating semithin and ultrathin sections.

Ultrastructural characteristics are described showing the presence of sperm structures inside the cytoplasm of the oocyte, the distribution of cortical granules, annulate lamellae and other organelles as well as the characteristics of pronuclei, polar bodies and zona pellucida.

Key words: Human IVF, Polyspermic oocytes, Ultrastructure.

INTRODUCCIÓ

Una de les causes de fracàs en els programes de fertilització *in vitro* és la fecundació dels oòcits per part de més d'un espermatozoide. L'índex de polispermia respecte del total de fertilitzacions s'estima del 7 % (Veiga A., 1985). Les causes d'aquesta polipenetració cal atribuir-les principalment a les característiques del propi oòcit ja que simultàniament, en mostres obtingudes d'una mateixa laparoscòpia i inseminades amb el mateix semen, es produeixen fecundacions normals i fecundacions múltiples.

L'alliberament correcte del contingut dels grànuls corticals constitueix un blocatge contra la polispermia. El que no es produeixi la reacció cortical o bé que es produeixi de forma incorrecta pot ser degut a l'estat de maduració de l'oòcit.

L'interès de l'estudi ultraestructural d'aquests oòcits és doble. D'una banda, la caracterització de l'estructura interna dels oòcits polipenetrats i d'altra banda, l'interès clínic que tindria el poder determinar les causes de la polipenetració.

Els treballs sobre ultraestructura d'oòcits humans (Soupart et Strong, 1974) han començat a ser importants d'ençà que les tècniques de fertilització *in vitro* s'han començat a emprar habitualment per part dels clínics. La recent incorporació d'aquestes tècniques en el nostre país ha permès disposar del material necessari per l'estudi ultraestructural dels oòcits.

MATERIAL I MÈTODES

S'han estudiat sis oòcits procedents de sis pacients sotmeses a un programa de fertilització *in vitro* realitzat pel Servei de Reproducció Humana de l'Institut Dexeus de Barcelona.

S'han seleccionat aquells oòcits que a les 16-20 hores d'haver-se inseminat *in vitro*, presentaven tres o més pronucleis.

Les pacients, dones amb obstrucció total o parcial de les trompes de Falopi han sigut tractades amb citrat de clomifè i HMG per induir el creixement fol·licular en un sol cicle i amb HCG per recolzar la funció lútea (McIntosh 1980, McBain 1983).

Els oòcits obtinguts es cultiven en Menezo B2 i s'inseminen *in vitro*. A les 16-20 hores post-inseminació, els oòcits s'alliberen mecànicament de les

cèl·lules fol·liculars que l'envolten. Els oòcits que presenten signes d'una correcta fecundació, segueixen 24 hores més a l'incubador a 37 °C i després són transferits de nou a la pacient via vaginal. Els que presenten tres o més pronuclis queden immediatament exclòs del programa i poden ser fixats.

El procés de preparació de les mostres per la seva posterior observació al microscopi electrònic de transmissió s'ha realitzat individualment, per cada oòcit.

S'han fixat en glutaraldehid al 2,5 % en buffer cacodilat, postfixat amb tetròxid d'osmi a l'1 % i deshidratat en una sèrie de banys d'alcohol i òxid de propilè en concentració creixent. La inclusió s'ha fet de forma progressiva en araldita Durcupan.

Cada un dels oòcits ha estat seccionat totalment alternant talls semifins d'una micra de gruixària amb seccions ultrafines de 70 a 90 nm. Els talls semifins s'han tenyit amb blau de touluidina a l'1 % i s'han observat al microscopi òptic. Les seccions ultrafines s'han tenyit amb acetat d'uranil a l'1 % i amb citrat de plom (tinció Reynold's) i s'han analitzat al microscopi electrònic de transmissió Hitachi HU-12A.

RESULTATS

Organització general

Tots els oòcits estudiats són oòcits polipenetrats. Això ens indica que el semen emprat per inseminar és en tots els casos un semen amb capacitat de fecundar *in vitro*. A diferència de la zona pel·lúcida de la majoria dels oòcits no fecundats, en aquests, adopta una forma flamígera amb els límits externs totalment irregulars.

És característic de tots els oòcits cultivats *in vitro*, que la zona pel·lúcida perdi densitat als electrons (Sathananthan A.H. i Trounson A.O., 1982). Així doncs, al microscopi electrònic no es pot estudiar amb massa exactitud la seva estructura. De l'anàlisi dels semifins a microscòpia òptica s'observa que tots els oòcits menys un, presenten la capa interna de la zona pel·lúcida més densa i amb més afinitat pel blau de touluidina.

La presència d'espermatozoides en la zona pel·lúcida és comú a tots ells. S'observen seccions de la regió cefàlica i de la cua dels espermatozoides tant a l'interior de la zona pel·lúcida com entremig de les cèl·lules fol·liculars del cúmulus oòphorus que queden adherides a l'oòcit.

Dos dels oòcits estudiats presenten una retracció parcial del citoplasma que comporta un augment de l'espai perivitel·lí en aquesta regió. La retracció del citoplasma es considera una característica dels oòcits atrèsics (Sundström et al., 1985).

Els corpuscles polars es troben en la majoria dels casos molt fragmentats «Figura 1». En els oòcits que presenten l'espai perivitel·lí engrandit, els corpuscles polars es troben en aquesta regió. Hem observat corpuscles

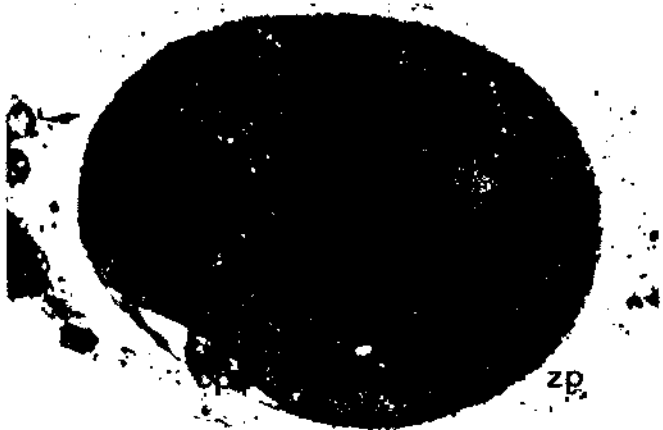


Figura 1. Semifi d'un oòcit polipenetrat en el qual s'observen dos dels tres pronuclis (pn) existents. Observeu la concentració d'òrgànuls citoplasmàtics al voltant dels pronuclis, l'absència de grànuls corticals i la fragmentació del corpuscle polar (cp) $\times 800$.

polars o fragments d'aquests, en tots els oòcits estudiats excepte en un. En un d'ells, el corpuscle presenta el material nuclear estructurat en forma de dos micronuclis que es troben ben delimitats per membrana doble. En un cas, a prop dels corpuscles i junt amb fragments dels corpuscles s'han pogut identificar restes del cos mig. S'han observat també microtúbuls que segurament havien format part del fus acromàtic.

La membrana citoplasmàtica presenta una menor densitat de microvillis que la que s'observa en els oòcits no fecundats, i és freqüent observar petites vesiculacions de la membrana. Segons Sathananthan i Trounson (1982), la vesiculació és conseqüència del temps de cultiu.

Orgànuls cel·lulars

Els orgànuls cel·lulars es concentren al voltant del pronuclis deixant a la perifèria, una regió desproveïda d'òrgànuls «Figura 1».

Mitocondris: Són els orgànuls més abundants. Tenen forma arrodonida i les crestes aplanades distribuïdes en alguns casos de forma concèntrica. La matriu mitocondrial és densa als electrons. Poden trobar-se al voltant de vacuoles formant uns complexos vesícula-mitocondris molt característics dels oòcits en vies de degeneració tal com hem pogut observar en estudis realitzats amb oòcits no fecundats en els que variava el temps de cultiu prefixació (Boada et al. 1985, Trounson i Sathananthan 1984). Alguns, els mitocondris es troben associats a perfils de reticle endoplasmàtic lliu, «Figura 2», i també a la membrana externa de la membrana nuclear

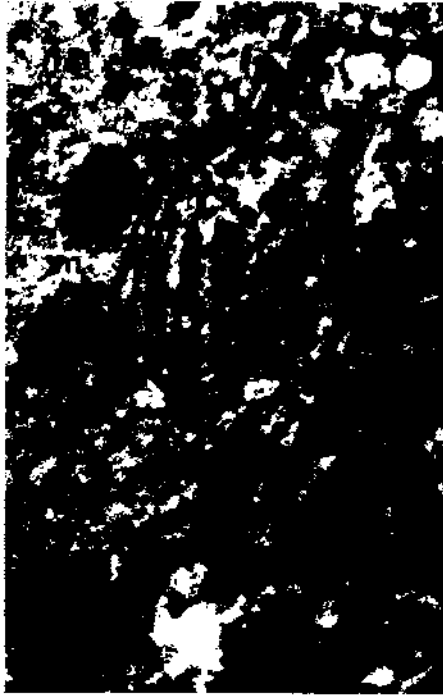


Figura 2. Perfils de reticle llís (rll) i mitocondris associats (m) \times 13300.

sobretot, en aquells oòcits que presenten dilatacions i petites evaginacions de la membrana externa (Lopata et al., 1980).

Esporàdicament s'observen alguns mitocondris amb inclusions poc denses als electrons en la matriu mitocondrial.

Reticle endoplasmàtic: És de tipus llís i es pot trobar de diferents formes. La forma més freqüent correspon a vesícules arrodonides que es troben repartides per tot el citoplasma «Figura 3». Per altra banda trobem també perfils de reticle endoplasmàtic llís més petits i més denses als electrons que les anteriors vesícules. Generalment, aquesta forma de reticle llís es troba agrupada en regions determinades del citoplasma. «Figura 2».

Rarament hem observat la forma tubular de reticle llís en aquests oòcits.

El reticle de tipus rugós no s'observa. Els ribosomes lliures són molt poc abundants.

Làmines anellades: Es troben formant paquets distribuïts per la regió del citoplasma més propera als pronuclis. Són sacs paral·lels amb porus semblants als de la membrana nuclear «Figura 3».

Complexos de Golgi: Es troben també repartits per tot el citoplasma sobretot a prop dels pronuclis. Están compostats per cisternes en aposició i petites vesícules.

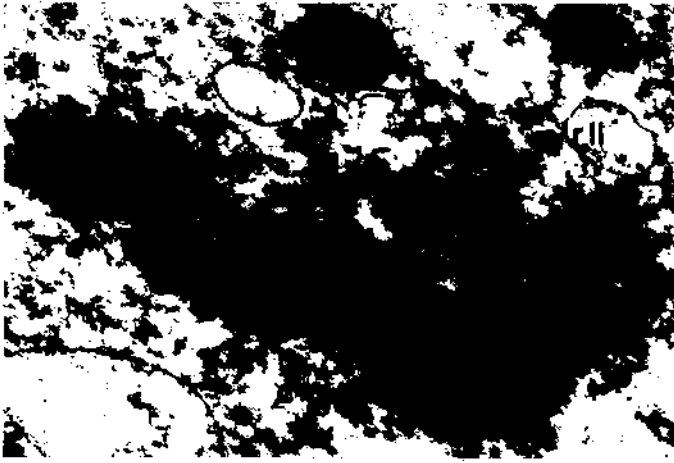


Figura 3. Detall d'un paquet de làmines anclades (la) citoplasmàtiques
× 24300.

Inclusions

Cossos multivesiculats:

Es troben ocasionalment. Tenen un contingut de tipus granular, alguns grànuls són d'aspecte semblant a les inclusions lipídiques.

Grànuls corticals:

La presència de grànuls corticals excepte en un dels oòcits analitzats, és pràcticament nul·la. Tan sols s'observen alguns grànuls corticals distribuïts per la perifèria de l'oòcit en cada secció. La seva situació és sempre just a sota l'oolema.

En un dels oòcits, el nombre de grànuls corticals per secció és superior al dels altres estudiats. Mentre que en la majoria es troben únicament de tres a set grànuls per tall en aquest, es troben de 17 a 19 grànuls corticals per tall distribuïts en petits grups perifèrics de 6 a 8 grànuls cada un. A més d'aquests petits grups, s'han observat a l'interior del citoplasma dos grans grups d'una cinquantena de grànuls associats situats en una regió de gran vesiculació. La disposició d'aquests grànuls no és únicament perifèrica sinó que la majoria d'ells es troben agrupats i disposats en regions més internes del citoplasma.

Microfibril·les:

La seva presència s'ha detectat únicament en l'oòcit que presenta una major retracció del citoplasma. El nombre en que es troben és molt



Figura 4. Semiff d'un oòcit polipenetrat en el qual s'observen nombrosos paquets de microfibril·les (mf). Observeu l'augment de l'espai perivitel·lí (epv) i la retracció del citoplasma allà on els paquets de microfibril·les són més abundants $\times 800$.

abundant i la seva distribució és preferentment a la zona del citoplasma retret. Es troben agrupades formant paquets de mida considerable «Figura 4».

Inclusions lipídiques:

Són poc freqüents.

Vacuoles gegants:

S'observen en tots ells encara que només en un dels casos, les dimensions d'aquestes vacuoles són tals que podrien arribar a confondre's a l'esteromicroscopi amb un pronucli. Per aquest motiu, aquestes vacuoles tenen especial importància des del punt de vista clínic.

Restes flagelars espermàtics

L'observació de restes del flagel de l'espermatozoide en l'interior del citoplasma de l'oòcit és una prova més de que s'ha produït la fecundació. La seva identificació només es pot fer al microscopi electrònic de transmissió ja que es necessita un mínim d'uns 10.000 augments per poder-los observar.

En tres dels oòcits estudiats s'ha detectat la presència de restes axonemàtics. En dos d'aquests oòcits, la situació d'aquestes estructures és molt propera als pronuclis. En un d'ells, es conserva a més a més de l'estructura 9+2 de microtúbuls, les 9 fibres denses correctament disposades al seu voltant «Figura 5a». En l'altre oòcit, s'observen per una banda l'estructura de microtúbuls que constitueixen l'axonema i al seu costat, 8 fibres denses «Figura 5b».

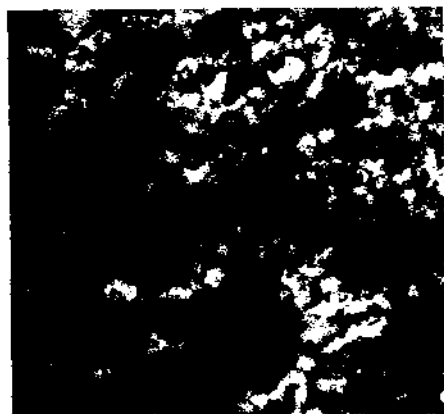


Figura 5a. Restes de l'estructura flagelar d'un espermatzoide (ef) en la proximitat de dos pronuclis. Es conserva l'estructura axonemàtica amb les nou fibres denses $\times 11700$.

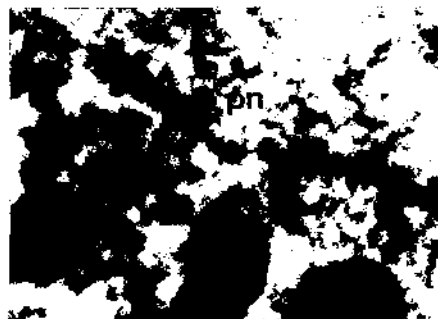


Figura 5b. Estructures flagelars (ef): filament axial i vuit fibres denses desorganitzades al costat $\times 21400$.

La situació dels restes axonemàtics en el tercer oòcit, és diferent a la dels anteriors, en aquest cas, s'ha trobat just a la perifèria de l'oòcit i només s'observen els microtúbuls de l'axonema. Les fibres denses no es detecten.

Pronuclis

Són de forma arrodonida o oval i es troben en tots els casos molt propers. No presenten diferències notables de mida. La seva situació varia des de posicions més perifèriques fins al centre mateix del propi oòcit. Les estructures nuclears diferenciades es troben polaritzades cap a l'eix al voltant del qual es situen els pronuclis, deixant la resta dels pronuclis lliure d'aquestes estructures «Figura 6».

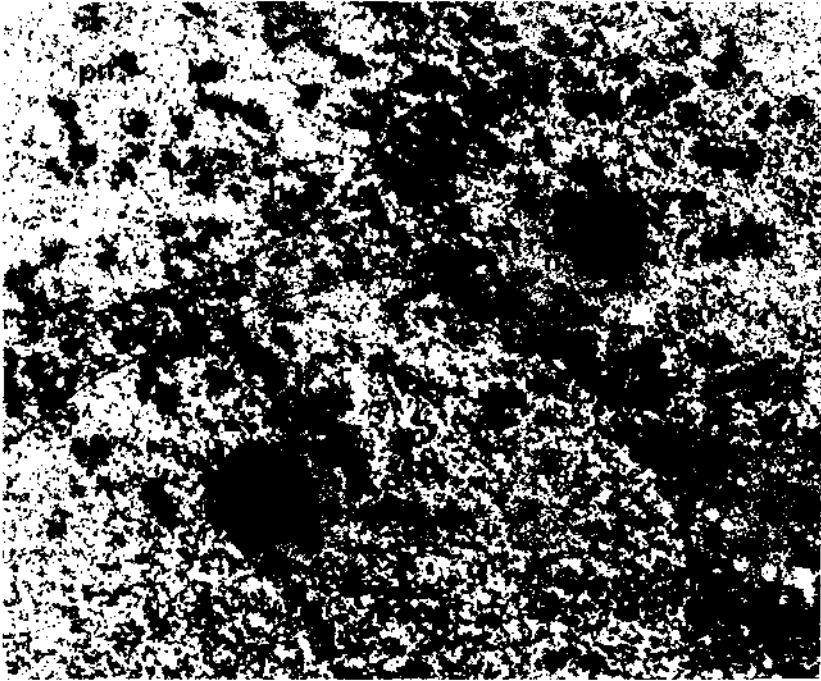


Figura 6. Detall de tres pronucleis (pn). Presència de nucleols (n), heterocromatina (h) i fragments de làmines intranuclears (li) polaritzats cap al eix al voltant del qual es situen els pronucleis $\times 5700$.

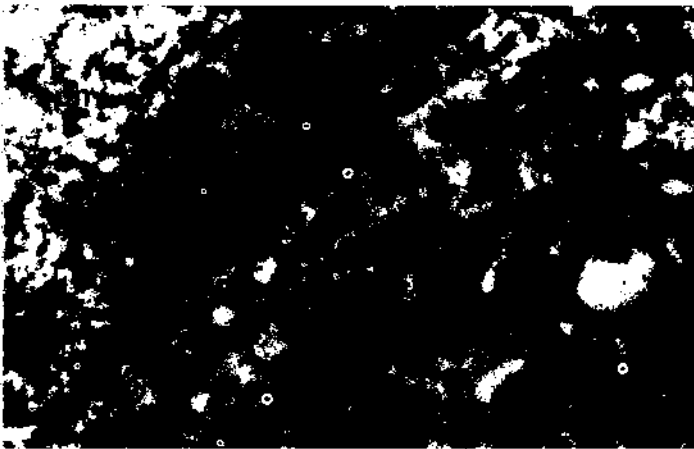


Figura 7. Detall de la membrana nuclear (mn) en el qual s'observen dos cossos ovals (co) en l'espai entre ambdues capes de la membrana nuclear $\times 22000$.

Membrana nuclear:

És doble i presenta múltiples porus i discontinuïtats. La membrana externa es troba a vegades separada de la interna. En l'espai entre ambdues membranes, hi trobem petits cossos ovals que es projecten cap al citoplasma. Aquests cossos presenten membrana pròpia que els delimita i són densos als electrons «Figura 7».

Nuclèols:

Són ovals, densos als electrons i d'estructura compacta. «Figura 6». Es troben en nombre variable. El nombre màxim trobat és de 4 nuclèols en un mateix pronucli.

Heterocromatina:

Es troba distribuïda formant petits grumolls «Figura 6».

Làmines intranuclears:

En tots els oòcits trobem a l'interior dels pronuclis, fragments de làmines anellades intranuclears de naturalesa i estructura semblant a les de la membrana nuclear «Figures 6 i 7». Els fragments són de mida variable.

DISCUSSIÓ

En cinc dels sis oòcits estudiats, es pot assegurar que la migració dels grànuls corticals cap a la perifèria que té lloc durant la maduració dels oòcits, s'ha dut a terme ja que no es troben grànuls corticals a l'interior del citoplasma. També es pot afirmar que l'alliberament del contingut dels grànuls corticals a l'espai perivitel·lí s'ha produït doncs el nombre de grànuls observats a la perifèria és molt escàs i no és comparable al dels oòcits no fecundats estudiats per nosaltres (dades no publicades). El fet que aquests oòcits presentin una major densitat de la zona pel·lúcida a la part més interna, podria ser una conseqüència de la reacció cortical ja que en els oòcits no fecundats no s'observa. El que no es pot determinar amb les dades observades, és si la reacció cortical en aquests oòcits, s'ha produït abans o després de la polipenetració, ni si el contingut enzimàtic dels grànuls corticals és correcte o no.

La presència d'estructures flagelars en el citoplasma de l'oòcit demostra que la fecundació s'ha produït, no obstant, el que no s'hagin detectat en 3 dels oòcits no és indicatiu del fet contrari ja que degut a les seves dimensions en relació amb les de l'oòcit, són difícils de localitzar.

Segons Soupart i Strong (1975), els primers orgànuls de la cua del espermatzoide en desaparèixer són els mitocondris que es desintegren ràpidament. Posteriorment, les nou fibres denses externes de la peça mitja

perden la seva relació espacial amb el complexe axial i finalment, queda tan sols l'axonema que persisteix molt més temps que els altres components del flagel. En cap dels tres oòcits en els que s'han observat restes del flagel, s'observen els mitocondris del condrioma. En un cas observem l'axonema amb les nou fibres denses al voltant. En el cas mostrat a la figura 5b, observem l'axonema i vuit fibres denses al costat que no es pot assegurar si corresponen a l'axonema del costat amb el que ja ha perdut tota relació, o bé si pertany a un altre filament axial no detectable en aquest mateix plà.

Respecte als corpuscles polars, el criteri que s'utilitza per diferenciar el primer corpuscle polar del segon és l'estat en què es troba el material nuclear i la presència o absència de grànuls corticals. El primer corpuscle polar s'identifica per la presència de grànuls corticals i la condensació de la cromatina en forma de cromosomes. El segon corpuscle polar no presenta grànuls corticals i té nucli definit. (Soupart i Strong, 1974). En els oòcits estudiats es fa difícil la identificació dels corpuscles doncs, es troben fragmentats i en mal estat de conservació «Figura 1». Alguns fragments s'han pogut identificar com pertanyents al primer corpuscle polar per la presència de grànuls corticals. Tantmateix, la identificació per l'estat de la cromatina es fa difícil ja que la majoria dels corpuscles observats presenten grumolls de cromatina que difícilment poden ser identificats com una dotació completa de cromosomes o com un nucli estructurat.

En un dels oòcits no s'ha trobat cap corpuscle polar ni fragments d'aquests. Això junt amb la presència d'un elevat nombre de grànuls corticals tant a l'interior com a la perifèria i el fet que és l'únic que presenta 4 pronuclis i que en ell no s'han trobat restes espermàtics, són motius suficients per considerar-lo per separat. La presència de petits grups de grànuls corticals interns fa pensar en una deficiència en la migració dels grànuls cap a zones perifèriques del citoplasma durant la maduració d'aquest oòcit. Segons Zamboni i Smith (1972), la formació dels grànuls corticals es faria a partir dels complexos de Golgi situats a la perifèria de l'oòcit. La distribució que nosaltres trobem no encaixaria amb aquest origen. Caldria interpretar-ho com una distribució anormal dels complexos de Golgi o com una agrupació dels grànuls corticals un cop formats, cap a l'interior del citoplasma.

L'existència de quatre pronuclis podria interpretar-se com la polipenetració per part de tres espermatozoides de forma que un dels pronuclis seria el femení i els altres tres, els masculins. De tota manera, no es pot descartar que l'origen dels pronuclis sigui de tipus femení com a conseqüència de la no extrussió dels corpuscles polars ja que no trobem restes ni dels corpuscles ni de la cua del espermatozoide. En quant a la identificació de l'origen masculí o femení dels pronuclis, el tamany tant semblant de tots ells no permet establir cap diferència. D'altra banda, el criteri d'identificació en funció de la seva proximitat amb el segon corpuscle polar o amb els restes de la cua del espermatozoide (Soupart i Strong, 1975), tampoc el podem aplicar en aquest cas.

Agraïments

Agraïm al personal tècnic del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona i a la Dra. Mercè Durfort, Catedràtica de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona, l'ajut rebut en la realització d'aquest treball.

Bibliografia

- BOADA, M., PONSÀ, M. i EGOZCUE, J. 1985. Ultraestructura d'òcits humans procedents de programes FIV. *Biol. del Desenvol* 3: 187-193.
- DVOŘÁK, M., TESÁŘÍK, J., KOPEČNÝ, V. 1984. Ultrastructure of human fertilization. A: Van Blerkón J. and Motta P.M. eds. *Ultrastructure of Reproduction*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
- LOPATA, A., SATHANANTHAN, A.H., MC BAIN, J., JOHNSTON, W.I., SPEIRS, A.L. 1980. The ultrastructure of the preovulatory human egg fertilized *in vitro*. *Fertil and Steril* 33, 1: 12-20.
- MC BAIN, J. 1983. *III World Congress on IVF*. Viena.
- MCINFOSH, J., MATTHEWS, C.D., CRAKER, J.M., BROOM, T.J., 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 and Steril* 34: 125-130.
- 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 Res* 6:225-234.
- SOUPART, P., P.H.D., STRONG, P.A., M.A. 1974. Ultrastructural observations on human oocytes fertilized *in vitro*. *Fertil and Steril* 25, 1: 11-44.
- SOUPART, P., P.H.D., STRONG, P.A., M.A. 1975. Ultrastructural observations on polyspermic penetration of zona pellucida-free human oocytes inseminated *in vitro*. *Fertil and Steril* 26, 6: 523-537.
- SUNDSTRÖM, P., NILSSON, B.O., LIEDHOLM, P., LARSSON, E. 1985. Ultrastructural characteristics of human oocytes fixed at follicular puncture or after culture. *J of IVF and ET* 2, 4: 195-206.
- TROUNSON, A., SATHANANTHAN, A.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 ET* 1, 3: 153-165.
- VEIGA, A., CALDERÓN, G., MARISTANY, P., BARRI, P.N. 1985. Polispermia en fertilización *in vitro*. *Progr Obstet y Ginecol* 28, 4: 261-265.
- YUAN, L.C., GULYAS, B.J. 1981. An improved method for processing single cells for electron microscopy utilizing agarose. *Anat Rec* 201: 273-281.
- ZAMBONI, L. 1972. Comparative studies on the ultrastructure of mammalian oocytes. A: Biggers, J.D. and Shueitz, A.W. eds. *Oogenesis*. University Park Press, Baltimore. London.