

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Biologia Animal**



**Dissertação**

# **Citogenética Molecular dos Zigotos Humanos Monopronucleados**

**Ana Raquel Andrade Castro Azevedo**

**Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento**

**Orientação: Professor Doutor Mário Sousa**

**Co-orientação: Professora Doutora Solveig Thorsteinsdottir**

**2008**



*Aos meus queridos Pais;  
Por todo o amor, por todo o amparo, por tudo!*

## **Agradecimentos**

Após a realização deste trabalho, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que tornaram possível a sua concretização desde a fase de projecto, e a todas as pessoas que, não estando directamente envolvidas, sempre me apoiaram ao longo deste último ano, vivendo e sofrendo as minhas inquietações.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Mário Sousa, por me ter ajudado e orientado incansavelmente, por ter estado sempre disponível para me auxiliar a transpor os obstáculos que foram surgindo, por ter vivido intensamente as minhas preocupações e pelo nível de exigência e rigor que foi fundamental para a minha formação. Em segundo lugar, agradeço à minha co-orientadora Professora Doutora Solveig Thorsteinsdottir por ter estado sempre disponível para esclarecer as dúvidas que foram surgindo, mesmo a longa distância, com extrema simpatia.

Ao Professor Doutor Alberto Barros, agradeço profundamente, pois sem a sua colaboração este trabalho não teria sido possível de realizar; permitiu e sempre apoiou a componente laboratorial quer no Centro de Genética da Reprodução A. Barros, quer no Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

A todas as pessoas do Serviço de Genética, para além da disponibilidade que sempre mostraram em esclarecer as minhas dúvidas relativamente ao procedimento laboratorial, agradeço todo o apoio e carinho, especialmente à Dra Salomé Pereira (a sua delicadeza e simpatia), Dra Maria João Pinho (Jonitas, pelo apoio incondicional em tudo, inclusivé via sms!), Dra Lina Moreira (Linota, por ser a pessoa divertida que é, pelos bons momentos de risota), Dra Carolina Almeida (pela disponibilidade sempre demonstrada para ajudar), e às minhas colegas e amigas Ana Joana e Patrícia. Obrigada a todas por me terem recebido de braços abertos e por termos, apesar de tudo, passado bons momentos de convívio e alegria.

A todas as pessoas do Centro de Genética da Reprodução A. Barros agradeço o caloroso carinho que sempre mostaram, a disponibilidade e ajuda extremas e todo o apoio em momentos mais tristes deste último ano, especialmente à Dra Joaquina Silva, Dra Mariana Cunha e Dr. Paulo Viana (já estão perdoados por me acordarem quase todos os sábados às 8:30h!).

A todas as pessoas do laboratório de Biologia Celular do ICBAS, por nunca ter ouvido um “não” a um pedido, e por serem pessoas maravilhosas, com corações

“enormes” especialmente às técnicas Elsa e Ângela (quase a ter a sua bebé Raquel!), à Dra Rosália Sá, e às minhas queridas amigas Inês e Oriana (por me aturarem nos bons e maus momentos).

Aos meus queridos pais, obrigada por tudo o que têm feito por mim ao longo de todos estes anos, por serem o grande pilar da minha vida, por tudo aquilo que vivemos e sofremos juntos. Não encontro palavras para definir tudo aquilo que sinto! Amo-vos muito!

Aos meus avós, Graziela e Zé, por estarem sempre preocupados com o meu bem-estar, e à minha avó Aldina que partiu este ano, mas que certamente estará a velar por mim.

Ao Nuno, pela pessoa especial que é, por me ouvir e ajudar sempre nos meus “stresses” com os computadores, pelo enorme trabalho que teve com as minhas imagens, por ficar acordado até bastante tarde para me ajudar, pelos momentos de brincadeira e pelas longas conversas “para desanuviar”.

Aos meus queridos amigos, D. Maria José e Sr Manuel, por me acolherem na sua casa em Lisboa, acordarem cedo para me levarem à faculdade nos primeiros dias, e tratarem de mim como uma filha (tenho saudades dos serões frios com chazinho de limão!).

Aos meus queridos primos Lena, Zé, Mila e Carlos, por serem as “mães e pais” de Lisboa e do Porto. Sem vós tudo teria sido muito mais complicado. Obrigada por me apoiarem nos momentos difíceis e me fazerem entender que “o mundo não acaba amanhã”.

Aos meus amigos de sempre... Teresa (minha “mana” esclarecedora de dúvidas existenciais), Renata (por partilharmos dúvidas e pensamentos “profundos”), Sendi (amiga sempre, perto ou longe!), João (amigo e companheiro de “guerra”, sempre disponível para tirar 5 min para mim), Catarina (a melhor inquilina de sempre!), João Pedro e Nuno Filipe, pelos amigos maravilhosos que são e por todo o apoio incondicional, muitas vezes via telefone.

Ao Padre Mário, por ser simplesmente a pessoa maravilhosa que é, e por toda a força, na maioria das vezes “via internet”.

Aos meus queridos vizinhos do “Studio Residence - Antas”, especialmente ao Ricardo por ter aturado os meus ataques de pânico, à Vera e Sérgio (que me acolheram desde cedo de braços abertos), à Joana, Rui, Pedro, Bárbara, Marinho e Sr Víctor.

## Resumo

Após a fecundação, uma percentagem de 2-7% dos zigotos humanos são monopronucleados (1PN), ou seja, não apresentam uma constituição morfológica normal de dois pronúcleos e dois glóbulos polares (2PN2PB). As causas genéticas do aparecimento destes zigotos não se encontram bem esclarecidas, havendo somente dois estudos realizados em zigotos 1PN, nos quais as causas apontadas são a activação partenogenética, degeneração uniparental do genoma e cariogamia.

O objectivo deste trabalho foi tentar esclarecer qual a origem genética dos zigotos 1PN e os mecanismos celulares que ocorrem durante a sua formação. Para tal, fomos analisar 82 zigotos 1PN, 18 de ciclos de fertilização in vitro (IVF) e 64 de ciclos de microinjecção intracitoplasmática (ICSI), sob consentimento informado dos pacientes do Centro de Genética da Reprodução A. Barros (CGR). Os 82 zigotos e seus glóbulos polares foram analisados por hibridização in situ com fluorescência (FISH) para marcação dos cromossomas 18, 21, X e Y. Vinte e dois destes zigotos foram também analisados por Imunofluorescência (IF) com anticorpos para marcação das lamínas nucleares e histona H3 tri-metilada na lisina 9 (MeH3K9).

Os resultados observados indicam que nos zigotos 1PN estão presentes dois pronúcleos e não apenas um em 88% dos casos IVF e 42% dos casos ICSI. Os mecanismos de formação predominantes na ICSI são a não descondensação do espermatozóide (58%) e a ruptura prematura do invólucro nuclear (pPNBD) (42%) – mecanismo aqui descrito pela primeira vez e que consiste numa desagregação precoce das lamínas nucleares. Já na IVF, o mecanismo predominante foi a pPNBD (89%). Quanto à constituição cromossómica dos pronúcleos, 69.5% apresentaram uma constituição haplóide e 30.5% aneuplóide.

Foram observados mecanismos novos de formação destes zigotos: pPNBD quer feminino quer masculino e cariocinese, não se confirmando a activação partenogenética, degeneração uniparental do genoma e cariogamia, previamente descritos.

**Palavras-chave:** *Zigotos 1PN, FISH, Lamínas nucleares, Histona H3, ICSI, IVF*

## **Abstract**

After fertilization, 2-7% of the zygotes are unipronucleated (1PN), which means they do not display a normal morphological constitution of two pronuclei and two polar bodies (2PN2PB). The genetic causes of the appearing of these zygotes are not clear, and only two studies were done in 1PN zygotes, in which the reported causes are the parthenogenetic activation, uniparental genome degeneration and karyogamy.

The objective of this study was trying to clarify what is the genetic origin of 1PN and the cellular mechanisms which occurs during their formation. For that, we analyzed 82 1PN zygotes, 18 from in vitro fertilization (IVF) cycles and 64 from intracytoplasmic sperm injection (ICSI), under informed consent of the patients of the Centre for Reproductive Genetics A. Barros (CGR). The 82 zygotes and their polar bodies were analyzed by fluorescent in situ hybridization (FISH) to chromosomes 18, 21, X and Y. Twenty-two of these zygotes were analyzed by immunofluorescence (IF) too with nuclear lamins and histone H3 tri-methylated at lysine 9 antibodies.

The results show that in 1PN zygotes, two and not only one pronuclei are present in 88% of IVF cases and 42% of ICSI cases. The ICSI predominant mechanisms of the formation of zygotes 1PN are the sperm non-decondensation (58%) and the premature pronuclear envelope breakdown (pPNBD) (42%) – mechanism which is here first reported and that consists in a premature disassembly of nuclear lamins. In IVF, the predominant mechanism was the pPNBD (89%). In what concerns to the pronuclei chromosomal constitution, 69.5% were haploid and 30.5% were aneuploid.

We observed new mechanisms of the formation of these zygotes: female and male pPNBD and karyokinesis, and we do not confirm the oocyte parthenogenesis, uniparental genome degeneration and karyogamy, previously described.

**Keywords:** *1PN zygotes, FISH, Nuclear lamins, Histone H3, ICSI, IVF*

# Índice

Resumo e palavras-chave	6
Abstract and keywords	7
1 – Introdução	
1.1 – Ovogénese	10
1.2 – Espermatogénese	11
1.3 – Ovulação	13
1.4 – Fertilização	13
1.5 – Infertilidade	15
1.6 – Ciclo celular	19
1.7 – O Núcleo Celular	25
2 – Objectivos	
2.1 – Objectivo geral	33
3 – Materiais e Métodos	
3.1 – Pacientes	35
3.2 – Estimulação ovária	35
3.3 – Procedimento laboratorial (CGR)	36
3.4 – Divisão das amostras por grupos	37
3.5 – Fixação	38
3.6 – Hibridização in situ com fluorescência – FISH	39
3.7 – Imunofluorescência	40
3.8 – Tratamento Estatístico	41
4 – Resultados	
4.1 – Resultados da FISH	42
4.2 – Resultados da IF	50
5 – Discussão	57
6 – Considerações Finais	60
7 – Bibliografia	62
8 – Anexos	
8.1 – Anexo 1	II
8.2 – Anexo 2	VI
8.3 – Anexo 3	VII
8.4 – Anexo 4	VIII

8.5 – Anexo 5

IX

8.6 – Anexo 6

X

# 1 – Introdução

## 1.1 - Ovogénese

A ovogénese consiste na diferenciação do ovócito e é diferente da espermatogénese em vários aspectos. O gâmeta formado contém todo o material necessário para iniciar e manter o metabolismo e desenvolvimento embrionário. Como tal, além de formar um núcleo haplóide, também armazena enzimas citoplasmáticas, mRNA, organelos e substratos metabólicos.

As ovogónias (células precursoras dos ovócitos) proliferam por sucessivas mitoses entre o 2º e o 7º mês de gestação. Após o 7º mês de desenvolvimento fetal, o número de células germinais declina rapidamente. A maioria das ovogónias morre nesta altura enquanto as restantes entram na 1ª divisão meiótica originando ovócitos primários que se mantêm na profase da 1ª divisão meiótica até que a criança atinja a puberdade.

Quando a puberdade é atingida os ovócitos começam a sua maturação. Dos cerca de 2 milhões existentes na altura do nascimento, apenas cerca de 400 maturam durante a vida da mulher, enquanto que os outros acabam por degenerar [1].

No ovário, os folículos primordiais (compostos por um ovócito grande e esférico envolvido por uma camada de células foliculares e células do estroma que se vão desenvolvendo à volta) são os únicos presentes por altura do nascimento; irão iniciar a sua maturação mais tarde para folículos primários. Os folículos primários são constituídos por um ovócito grande, rodeado por duas ou mais camadas de células foliculares. Para que isto aconteça, os folículos primordiais sofrem um aumento do volume do ovócito, as células foliculares perdem a sua configuração de epitélio pavimentoso, tornando-se num epitélio cúbico, e proliferam para formar duas ou três camadas de células granulosas [2].

Por altura da puberdade, estes folículos começam a desenvolver-se rapidamente e em cada ciclo menstrual há um que matura. O ovócito dos folículos primários aumenta de tamanho e as células à volta proliferam, aumentando o diâmetro do folículo, começando a formar-se uma cavidade (antro) na massa de células granulosas, preenchida por um fluido (líquido folicular). O ovócito fica ligeiramente afastado do

centro com o aumento da cavidade antral, e os folículos passam a ser chamados de folículos secundários ou folículos antrais.

A maioria dos folículos que se desenvolve até folículos antrais vão degenerar e entrar em atresia. O resto continuará o seu processo de crescimento até à ovulação [2]

O ovócito dos folículos secundários não cresce mais, mas o número de células granulosas do folículo continua a aumentar, até se tornar num folículo maduro ou de Graaf, pronto a ser ovulado.

Antes da ovulação, o núcleo perde o invólucro nuclear, os cromossomas condensam e migram para uma posição debaixo do oolema, entrando em metafase I. Durante a metafase I, o fuso meiótico sofre uma rotação de 90°. Dá-se então o término da meiose I, com uma citocinese desigual [3].

Na meiose feminina, as duas células-filhas resultantes não são iguais em tamanho. Uma irá ser o grande ovócito e a outra o primeiro glóbulo polar (pequeno, com pouco citoplasma). O ovócito fica, de seguida, parado em metafase da segunda divisão meiótica e, se for fecundado, volta a dividir-se (meiose II) formando o segundo glóbulo polar [2].

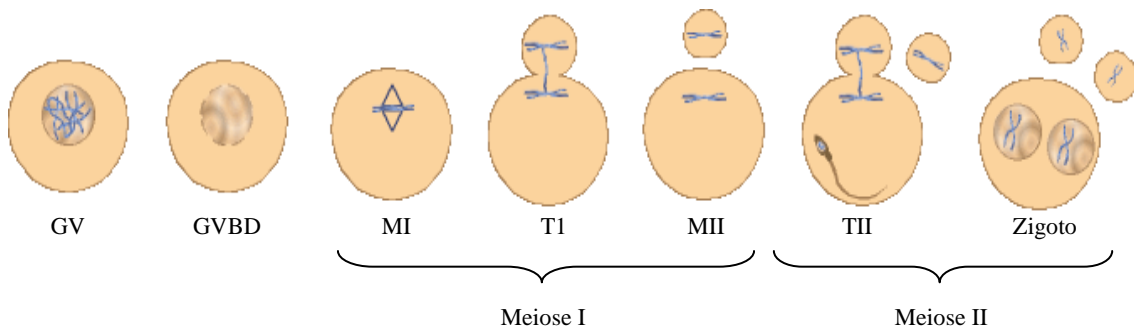


Fig.1 – Meiose Feminina (esquema representativo). Adaptado de [4], pág. 70, 71.

## 1.2 - Espermatogénese

À sequência de processos que levam à formação dos espermatozoides, dá-se o nome de espermatogénese. As células germinativas precursoras dos espermatozoides são as espermatogónias tipo A (células com núcleo ovóide, com dois nucléolos), que estão presentes junto à lâmina basal dos túbulos seminíferos. Numa primeira fase, sofrem várias divisões mitóticas dando origem às espermatogónias tipo B (células com núcleo mais arredondado e um único nucléolo localizado no centro) [1].

As células voltam a sofrer várias divisões mitóticas dando origem aos espermatócitos primários. Os espermatócitos primários vão entrar na profase da primeira divisão meiótica, que é longa, de aproximadamente 22 dias, e por este motivo podem ser encontrados espermatócitos em vários estádios da profase no epitélio dos túbulos seminíferos. A primeira divisão meiótica termina e cada célula resultante fica apenas com metade dos cromossomas, 23,X ou 23,Y.

As células resultantes são os espermatócitos secundários que vão terminar a 2ª divisão meiótica, para dar origem aos espermatídeos redondos. Os espermatídeos redondos vão depois sofrer várias alterações citológicas, originando os espermatozóides. Nas divisões das células germinativas masculinas, a comunicação entre células-filhas persiste, pela existência de pontes intercelulares, desde a fase de espermatogónia. Estas pontes permitem que haja uma sincronia no desenvolvimento das células ao longo do epitélio [2].

Os espermatídeos redondos sofrem grandes alterações citomorfológicas. A esta fase dá-se o nome de espermiogénese ou diferenciação, que se caracteriza principalmente pela perda de grande parte do citoplasma, reorganização dos organelos citoplasmáticos, condensação e alongamento do núcleo, crescimento do flagelo e formação da vesícula acrossómica [2].

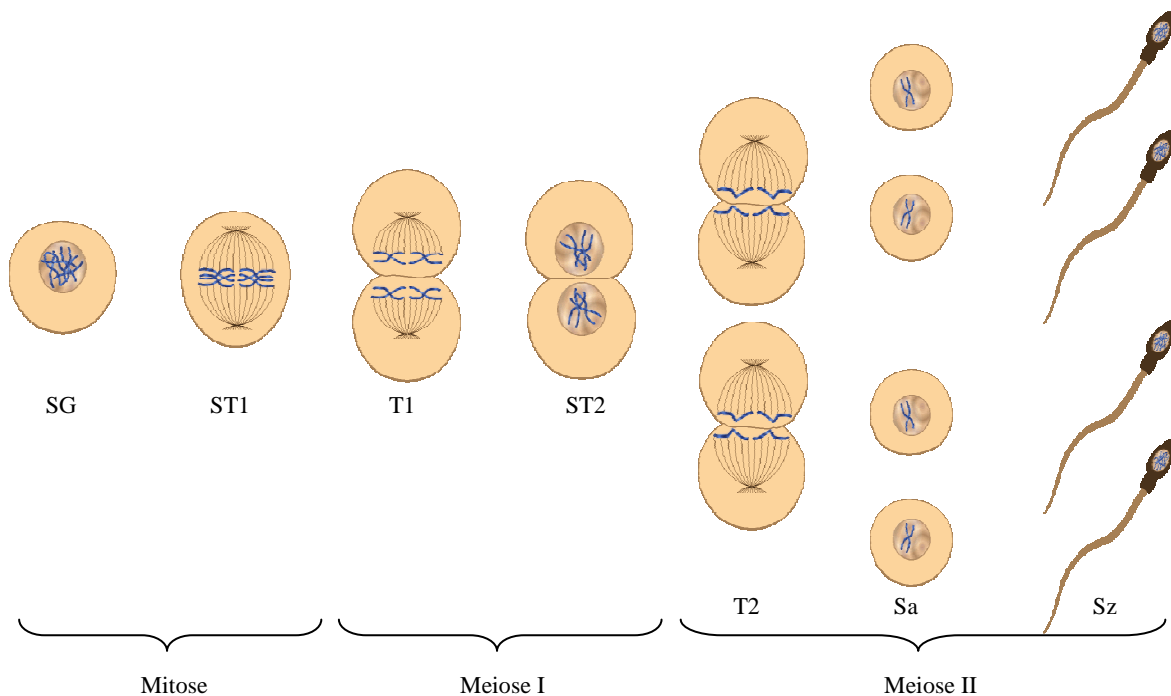


Fig.2 – Espermatogénese (esquema representativo). Adaptado de [4], pág. 70, 71.

### **1.3 - Ovulação**

Após a maturação nuclear e citoplasmática do folículo, dá-se a expulsão do ovócito do ovário por ruptura folicular. A zona do ovário onde o folículo maduro se encontra e onde irá ocorrer a ovulação fica sem aporte sanguíneo na teca interna e é por isso chamada de estigma ou mácula. O tecido conjuntivo e o epitélio da túnica albugínea sofrem descontinuidades e uma fina protuberância do estigma sai, formando-se uma vesícula. Esta vesícula rompe e o ovócito, rodeado por células do cumulus oophorus, é expulso do ovário conjuntamente com o fluído folicular [3].

O folículo maduro ocupa todo o ovário e projecta-se para fora cerca de 1cm ou mais. O fluído que circula por entre as células fica sob pressão, facilitando a saída do ovócito [2].

O oviducto, através de activação hormonal, fica também preparado para receber o ovócito, e enquanto a ovulação está a ocorrer, as fímbrias ficam muito próximas do ovário. As fímbrias projectam-se sobre a superfície do ovário e varrem a sua superfície criando correntes com o batimento dos seus cílios, incorporando o ovócito para o oviducto. É no oviducto que vai ocorrer a fertilização [3].

### **1.4 - Fertilização**

A fertilização é o processo durante o qual duas células sexuais (gâmetas masculino e feminino) se fundem para originar um ovo ou zigoto, célula diplóide, geneticamente distinta dos progenitores [1].

Nos humanos, como nos outros mamíferos, a fertilização acontece nas vias genitais femininas, sendo, portanto, interna.

Depois da formação dos espermatozóides nos túbulos seminíferos do testículo, estes vão ser conduzidos para o epidídimo. Aqui, por acção de algumas moléculas, os espermatozóides são nutridos, adquirem alguma mobilidade e sofrem algumas alterações membranares (maturação). Os espermatozóides vão ser posteriormente transportados para o canal deferente, através da contracção muscular da ejaculação, onde se juntam com as secreções das vesículas seminais e prostática. Este líquido é rico em nutrientes, actua como germicida e bloqueia receptores de superfície de modo a

impedir a reacção precoce dos espermatozóides. Ao entrar em contacto com a uretra, ocorre uma coagulação do líquido seminal para protecção dos espermatozóides.

Quando o sémen entra no canal vaginal, a temperatura de 37°C permite a sua liquefação e na ascensão ao colo uterino entra em contacto com o muco cervical, rico em glicoproteínas, que é uma barreira e primeira selecção contra células anormais, leucócitos e microrganismos, pelo que apenas os espermatozóides normais e progressivos rápidos conseguem prosseguir. Dentro do útero, a membrana dos espermatozóides é modificada por moléculas secretadas localmente, tornando-se lábil e sofrendo hiperactivação da motilidade do flagelo. A este acontecimento dá-se o nome de capacitação e só assim os espermatozóides conseguem migrar até aos oviductos (trompas de Falópio) [5].

É no primeiro terço distal das trompas que acontece a fusão entre espermatozóide e ovócito. O ovócito tem o seu material genético parado em metafase II da meiose e está rodeado por uma camada glicoproteica, a zona pelúcida. Aderentes a esta, existem milhares de pequenas células foliculares. No oviducto, a matriz extracelular (rica em ácido hialurónico) que rodeia as células foliculares difunde uma molécula que origina um gradiente quimiotáxico para orientar os espermatozóides em direcção ao ovócito [1].

Ao encontrarem o ovócito, os espermatozóides conseguem penetrar por entre as células foliculares e atingir a zona pelúcida através não só da motilidade, como também por digestão da matriz extracelular por acção de uma hialuronidase [5].

A zona pelúcida é composta por três glicoproteínas, designadas ZP1, ZP2 e ZP3 e glicosaminoglicanos (GAG). A ZP3 e os GAG ligam-se a receptores específicos da membrana do espermatozóide, induzindo a reacção acrossómica. Esta reacção envolve a exocitose da vesícula acrossómica do espermatozóide, que vai libertar enzimas hidrolíticas sobre a superfície da zona pelúcida. A ZP2 activa a pró-acrosina que, em conjunto com a hialuronidase, digere a zona pelúcida para permitir a penetração do espermatozóide até à membrana citoplasmática do ovócito (oolema). Quando em contacto com o oolema, os receptores transmembranares do espermatozóide presentes na região equatorial (integrinas) ligam-se a receptores correspondentes do ovócito (desintegrinas), provocando a activação do ovócito. Os níveis intracelulares de cálcio aumentam, o que faz com que as membranas das vesículas corticais se fundam com a membrana do ovócito, excitando o seu conteúdo. Esta onda de exocitose das vesículas corticais inicia-se junto da entrada do espermatozóide e percorre todo o ovócito. Neste

processo, o cálcio livre vai ligar-se a um receptor de membrana das vesículas corticais, ativando uma protease e abrindo canais iônicos na membrana, que irão conduzir à entrada de água para o interior das vesículas. A entrada de água obriga à expansão das vesículas corticais. São libertadas para o espaço perivitelino várias enzimas hidrolíticas, que degradam as glicoproteínas da zona pelúcida, e a ovoperoxidase que interliga entre si as moléculas da mesma. A modificação na zona pelúcida torna-a resistente a novas penetrações pelos espermatozóides, sendo portanto um bloqueio à polispermia [1].

O espermatozóide e todos os seus componentes são totalmente incorporados no ovócito com movimentos do citosqueleto do ovócito (zigoto).

As oscilações dos níveis de cálcio vão também proporcionar que o gâmeta feminino retome a meiose II, extrudando o segundo glóbulo polar e formando-se o pronúcleo feminino, cujo DNA começa de imediato a sua replicação.

Os componentes do espermatozóide sofrem evoluções distintas. As mitocôndrias degeneram, os componentes do flagelo são despolimerizados ou degradados e o núcleo sofre clivagem das ligações dissulfeto das protaminas que são substituídas por histonas de origem materna e estas promovem a descondensação do genoma paterno. O invólucro nuclear sofre desagregação e a cromatina descondensa, com exceção da região basal aonde o centríolo permanece ligado. Posteriormente, há desfosforilação das lamínas, que permite ao invólucro nuclear reformar-se – pronúcleo masculino. Os feixes de microtúbulos que vão sendo polimerizados pelo pronúcleo masculino (com tubulinas de origem ovocitária) irradiam pelo ooplasma e acabam por encontrar o pronúcleo feminino, aderindo ao seu invólucro. Com a polimerização de microtúbulos do lado do pronúcleo masculino e despolimerização do lado do pronúcleo feminino, o centríolo vai ficando numa posição central no zigoto, aproximando os dois pronúcleos. Após a desagregação dos invólucros nucleares os cromossomas misturam-se e inicia-se a primeira de muitas divisões mitóticas embrionárias [5].

## **1.5 - Infertilidade**

Após um ano de relações sexuais frequentes e desprotegidas de um casal sem ter ocorrido uma gravidez, é diagnosticada infertilidade. A infertilidade é o resultado de uma falha orgânica devida à disfunção dos órgãos reprodutores, dos gâmetas ou de

ambos. De acordo com estatísticas, existem cerca de 15-20% de casais inférteis em Portugal, semelhante à média europeia [6].

A infertilidade pode ser atribuída a algum problema quer no sistema reprodutor feminino, quer no masculino. Na maioria dos casos, a etiologia é distribuída equitativamente entre factores masculinos, disfunção do ovário e lesões tubárias. Em aproximadamente 1 em 4 casais, a causa é incerta e definida como “infertilidade inexplicável”. Para muitos casais, a infertilidade é multifactorial.

No que respeita ao homem, qualquer condição que resulte na diminuição da quantidade e/ou qualidade do esperma, pode levar a infertilidade. Problemas relacionados com a parte testicular, principalmente hipogonadismo primário, são as causas mais comuns. Causas menos comuns são as relacionadas com disfunção nas glândulas hipotálamo e hipófise (hipogonadismo secundário) e condições que afectam o transporte do esperma [7].

Os parâmetros e critérios (Tabela I) para avaliação da qualidade do esperma são estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [8] e para fazer esta avaliação é necessário analisar o volume do ejaculado, o pH, a viscosidade, a concentração, mobilidade dos espermatozóides, morfologia e tempo de liquefacção.

Testes mais pormenorizados ao esperma como vitalidade, análises bioquímica e funcional dos espermatozóides, procura de auto-anticorpos e análises moleculares podem ser realizados quando a avaliação da mulher não revelar qualquer causa para infertilidade [8].

Tabela I: Valores de referência para avaliação da qualidade do esperma. Critérios definidos pela OMS.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores de referência</b>
Volume	Mais de 2ml
Concentração	Mais de 20 milhões por mililitro
Número total de espermatozóides	Mais de 40 milhões por ejaculado
Mobilidade	Mais de 50% rápidos e/ou mais de 25% progressivos rápidos
Morfologia	Mais de 14% de espermatozóides com morfologia normal

No que respeita à mulher, as causas de infertilidade incluem problemas na ovulação, lesões tubárias e factores uterinos ou cervicais [9, 10]. A endometriose tem sido também avaliada como uma causa independente de infertilidade [9-11]. As causas com origem em problemas de ovulação podem ser devidas a idade (diminuição do

número de folículos no ovário), problemas endócrinos, ovários poliquísticos, falha ovárica prematura e acção de toxinas exteriores; as causas com origem em problemas tubários podem ser devidas a historial de doença inflamatória pélvica e cirurgia, e as causas com origem em problemas uterinos/cervicais geralmente estão relacionadas com anomalias congénitas uterinas, fibróides, pólipos e pouca quantidade/qualidade de muco cervical devido a infecção ou também a exposição a agentes tóxicos ambientais [9-12].

A infertilidade pode ser primária ou secundária. Falamos em infertilidade primária quando as causas são endógenas (problemas hormonais ou anomalias cromossómicas) e em infertilidade secundária quando a causa é exógena, ou seja, quando se consegue relacionar com factores ambientais (hormonas e metais pesados dos alimentos, tóxicos industriais, tabaco, álcool e drogas).

### **1.5.1 - Fertilização in vitro (IVF)**

Quando a mulher apresenta disfunção ovulatória moderada a severa, obstrução tubária ou já teve falhas de gravidez após ciclos de inseminação intra-uterina (IIU), e o homem apresenta um défice ligeiro da qualidade do esperma, recorre-se à técnica de fertilização in vitro. Os folículos ováricos são aspirados do ovário por ecografia endovaginal, sendo posteriormente colocados numa placa de cultura os ovócitos e espermatozóides (fracção “swim-up”), estes numa concentração entre 50000 a 100000 (dependendo da morfologia) por mL. A colheita do esperma é feita por masturbação, seguida de lavagem e purificação dos espermatozóides. O esperma é colocado numa estufa a 37°C, durante 30 minutos para se liquefazer e posteriormente é purificado através de gradientes, por centrifugação em tubo, para remover microrganismos, leucócitos, células germinais imaturas e espermatozóides anómalos. Estas duas etapas “imitam” a função vaginal e a acção natural do muco cervical, respectivamente. Seguidamente, os espermatozóides purificados são cobertos por meio de cultura e incubados a 37°C; passada uma hora, os espermatozóides que migraram até à superfície (fracção “swim-up”) são recolhidos, correspondendo aos que apresentam melhor morfologia e mobilidade. É esta fracção que vai ser utilizada nos tratamentos.

A fecundação e o desenvolvimento embrionário ocorrem in vitro, numa incubadora.

### 1.5.2 - Injeção intracitoplasmática (ICSI)

As indicações clínicas gerais para a realização de uma ICSI são, para a mulher, ter realizado uma IVF sem fecundação, mais de duas IVF sem gravidez, baixo número de ovócitos ( $\leq 4$ ) depois de estimulação, imaturidade ovocitária e mais de 35 anos de idade. Relativamente ao homem, as indicações para realização de ICSI são: alteração moderada ou severa do esperma (segundo os parâmetros da OMS), azoospermia, ejaculação retrógrada, anejaculação e doentes seropositivos.

Também existem casos em que há indicação para realização de diagnóstico genético de pré implantação (PGD). Esses casos são: necessidade de haver uma selecção de sexo do embrião, devido a doenças relacionadas com os cromossomas sexuais (por ex. hemofilia), selecção de embriões não doentes em casos de doenças relacionadas com uma mutação num gene específico (paramiloidose familiar) anomalias numéricas e estruturais no cariótipo parental e estudo de aneuploidias no embrião quando já tenham ocorrido, na história do casal, abortamentos por causa desconhecida. Para a realização de PGD é necessário recorrer-se também à ICSI.

Os ovócitos são recolhidos como na IVF. Se não houver ovócitos maduros, estes são amadurecidos in vitro e microinjectados no dia seguinte. Depois de retiradas as células foliculares, os ovócitos são cultivados e posteriormente injecta-se um espermatozóide ou espermátideio em cada ovócito. Caso a paciente seja seropositiva, como não é possível detectar a presença de vírus nos ovócitos, esta tem que ter confirmação que nesse momento não tem carga viral no sangue que possa ser transmitida ao feto e que se encontra sem risco de morte precoce.

Quanto à preparação dos espermatozoides, é feita segundo estes critérios: para alteração moderada a severa do esperma, é realizada como na IVF. Se o paciente for seropositivo a recolha do sémen é feita por masturbação, seguida de lavagem e purificação dos espermatozoides e, de seguida, a amostra é dividida em duas; uma é criopreservada e a outra vai para análise molecular. Se esta análise demonstrar a inexistência de material genético vírico, então a amostra criopreservada poderá ser usada para a ICSI.

Quando existem problemas de ejaculação retrógrada, pode tentar-se retirar espermatozoides da urina; se não se conseguir ou se estes forem imóveis, pode realizar-se uma MESA (punção aspirativa do epidídimo) ou TESA (punção aspirativa do testículo). Em casos de anejaculação, o esperma pode ser obtido por vibração,

electroejaculação, por MESA ou TESA. Em casos de azoospermia obstrutiva, os espermatozoides são extraídos por MESA e se forem imóveis efectua-se extracção por TESA (dos espermatozoides ou de suas células precursoras). Em casos de azoospermia secretora, os espermatozoides ou suas células precursoras são obtidos por TESE.

O desenvolvimento embrionário ocorre in vitro numa incubadora como na IVF [6].

## **1.6 – Ciclo Celular e Formação dos Pronúcleos**

A entrada do espermatozoide (haplóide) no ovócito, cujo material genético se encontra parado em metafase II, desencadeia a conclusão da divisão meiótica do ovócito, com extrusão do segundo glóbulo polar e formação dos pronúcleos feminino e masculino sem ocorrer cariogamia. Contudo, encontra-se descrito que em 2-7% dos casos são encontrados zigotos com apenas um pronúcleo [13-20].

Depois da fertilização, a maioria dos ovócitos faz a extrusão do segundo glóbulo polar cerca de 3 horas após a penetração do espermatozoide. A formação dos pronúcleos tem início entre 3 a 10 horas após a fusão dos gametas (haf). O pronúcleo masculino aparece geralmente na parte central, enquanto que o feminino se forma no ooplasma adjacente ao segundo glóbulo polar [21].

A fase G1 (crescimento) dura aproximadamente 5 horas; a fase S (síntese de DNA) tem início entre as 8-14 haf e está completa, na maioria dos embriões, entre as 14 e 24 haf. A formação dos pronúcleos, na maioria dos casos, coincide com o início da fase S, o que nos indica que a síntese de DNA está relacionada com o desenvolvimento dos pronúcleos. A fase G2 pode iniciar-se 12 haf e a fase M tem uma duração relativamente constante (uma média de 3 horas), enquanto que a altura do desaparecimento dos pronúcleos varia consideravelmente (entre 21 a 31 haf), assim como a altura da primeira clivagem celular (entre as 25 e 33 haf) (Fig.3). Apesar de existirem intervalos de tempos tão variáveis entre os vários embriões, na maioria, a ruptura dos invólucros pronucleares e a primeira mitose acontecem entre 27 e 30 haf e entre 29 e 32 haf, respectivamente [21].

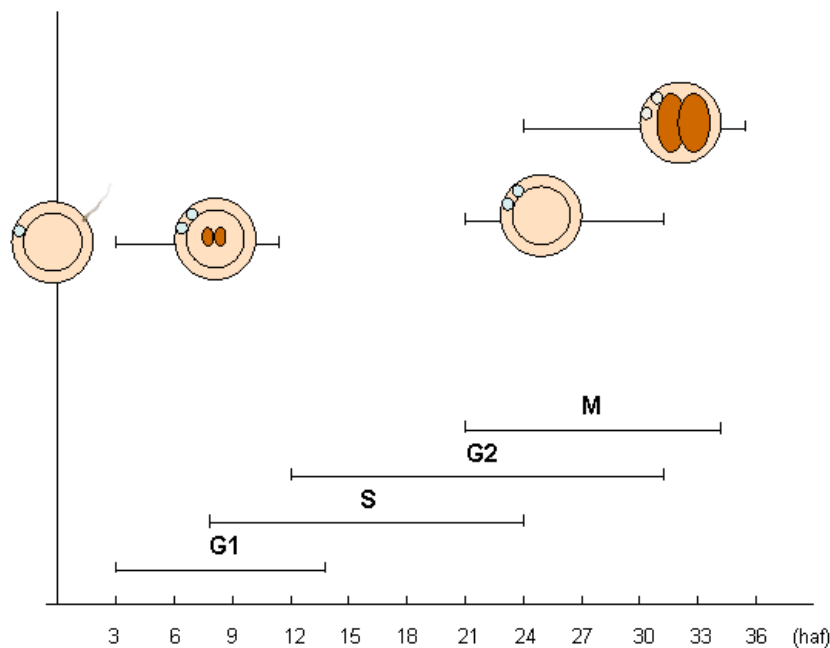


Fig.3 – Diagrama resumo dos intervalos de tempo dos acontecimentos durante o primeiro ciclo celular da embriogénese humana (adaptado de *Capmany et al, 1996*).

### 1.6.1 - O aparecimento de 1PN

Tendo em conta estes conhecimentos sobre o ciclo celular da embriogénese humana e da formação dos pronúcleos, surge a pergunta por que razão, por vezes, só há o aparecimento de um único pronúcleo (1PN). Para tentar esclarecer as razões do aparecimento de apenas um pronúcleo após a fertilização, foram feitos dois estudos em zigotos monopronucleados [14, 15] e quatro estudos em embriões derivados de zigotos monopronucleados [16-18, 22].

Nos estudos feitos em zigotos [14];[15] só foram estudados zigotos derivados de ciclos IVF, e as causas indicadas para o aparecimento de apenas um pronúcleo foram várias. As técnicas utilizadas para análise dos zigotos foram citogenética clássica e FISH (hibridização in situ com fluorescência) para os cromossomas sexuais, (Balakier et al., 1993) ou somente FISH para os cromossomas 13, 18, 21, X e Y (Levron et al., 1995). No estudo de *Levron et al.* (1995), os zigotos tinham todos um pronúcleo e dois glóbulos polares (1PN2PB) aquando da observação ao microscópio invertido, mas os glóbulos polares não foram analisados posteriormente. No estudo de *Balakier et al.* (1993), os zigotos apresentavam 1, 2 ou mais glóbulos polares e foram analisados por citogenética clássica.

Para os zigotos que revelaram um pronúcleo diplóide, foi apontada a cariogamia como causa [14, 15] ou, eventualmente, a ocorrência de um mecanismo de extrusão de um dos materiais genéticos (materno ou paterno) e a duplicação do outro [14]. Contudo, este último estudo [14] refere que os zigotos monopronucleados entram em mitose sensivelmente ao mesmo tempo que os que têm dois pronúcleos (20-27 haf), o que coloca algumas reticências quanto ao facto de existir endoduplicação num dos genomas e extrusão do outro, uma vez que a endoduplicação do DNA é um processo que demora muito mais tempo. A fertilização por espermatozóides diplóides também foi sugerida como sendo pouco provável, mas deve ter-se em conta que pode acontecer em casos raros [14].

Para os zigotos que revelaram um pronúcleo haplóide, foram apontadas como causas a ocorrência de activação partenogenética [14, 15], pois apresentavam cromossoma sexual feminino na sua constituição, ou não descondensação do espermatozóide (visível na análise por citogenética clássica) depois da penetração no ovócito [14].

É interessante que possa haver cariogamia nos humanos, tal como se observa noutros animais (p.ex. ouriço do mar) [1]. Quanto ao mecanismo de cariogamia que é proposto no estudo de *Levron et al.* (1995), foi referido que o local de penetração do espermatozóide em relação à metafase do ovócito pode influenciar a existência ou não de cariogamia; isto é, se o espermatozóide penetrar muito próximo da metafase, pode favorecer a formação de um só pronúcleo. Isto foi sugerido tendo em conta que observações em zigotos derivados de ICSI raramente mostravam zigotos monopronucleados diplóides [15]. Parece, portanto, mais aceitável a formação de um único invólucro pronuclear que englobe os genomas materno e paterno devido à aproximação destes, do que haver a formação de dois pronúcleos geograficamente mais separados, e os seus invólucros se fundirem mais tarde [15]. Os resultados destes estudos encontram-se na Tabela II.

Tabela II: Resumo dos resultados dos estudos de *Balakier et al., 1993* e *Levron et al., 1995*

Estudo	Nº de zigotos	Técnica usada	Dia da análise	Resultados
<b>Balakier et al, (1993)</b>	19 zigotos IVF 7 - 1PN1PB 12- 1PN2PB	Citogenética clássica  e FISH (X e Y)	2 e 3	<b>7 zigotos 1PN1PB</b>  <b>4 haplóides</b> (57%) activação partenogenética ou não descondensação do espermatozóide  <b>3 diplóides</b> (43%) cariogamia ou extrusão de um dos genomas e duplicação do outro  <b>12 zigotos 1PN2PB</b>  <b>5 haplóides</b> (42%) activação partenogenética ou não descondensação do espermatozóide  <b>7 diplóides</b> (58%) cariogamia ou extrusão de um dos genomas e duplicação do outro
<b>Levron et al, (1995)</b>	16 zigotos IVF 1PN2PB	FISH (X,Y, 13, 18 e 21)	1	<b>10 haplóides</b> (63%) activação partenogenética  <b>6 diplóides</b> (38%) cariogamia

Outros estudos [16, 17] foram efectuados em blastómeros de embriões derivados de zigotos monopronucleados de IVF. Foi sugerida a existência de assincronia na formação dos pronúcleos, uma vez que em alguns dos zigotos, aos quais tinha sido observado um pronúcleo 16 haf, após uma segunda observação (4-6 horas depois) foram encontrados dois pronúcleos [16, 17]. Quanto à ploidia observada nos blastómeros, para os que eram haplóides foi sugerido que os zigotos tinham tido uma activação partenogenética; aos que eram diplóides, foi sugerido que os zigotos podiam resultar de activação partenogenética sem extrusão do segundo glóbulo polar ou terem sofrido duplicação precoce do DNA [16, 17] (Tabela III).

Tabela III: Resumo dos resultados dos estudos de *Staessen et al., 1993* e de *Munne et al., 1993*.

<b>Estudo</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Técnica usada</b>	<b>Dia da análise</b>	<b>Resultados</b>
<b>Staessen et al., (1993)</b>	41 embriões IVF	Citogenética clássica	2	<b>5 haplóides</b> (12%) activação partenogenética <b>33 diplóides</b> (81%) activação partenogenética sem extrusão do 2ºPB ou duplicação precoce do DNA; assincronia na formação dos pronúcleos <b>3 triplóides</b> (7%)
<b>Munne et al., (1993)</b>	21 embriões IVF	PCR e FISH (X e Y)	3	<b>9 haplóides</b> (43%) activação partenogenética <b>10 diplóides</b> (48%) activação partenogenética sem extrusão do 2ºPB ou duplicação precoce do DNA; assincronia na formação dos pronúcleos <b>2 triplóides</b> (10%)

Estudos referentes a análises às duas técnicas de fertilização in vitro (IVF e ICSI), revelaram a existência de diferenças entre o aparecimento de embriões diplóides e haplóides (derivados de zigotos monopronucleados) na comparação das duas técnicas. Observou-se uma maior percentagem de diploidia em IVF e uma maior percentagem de haploidia em ICSI, o que sugere que haja mais cariogamia nos pronúcleos dos zigotos resultantes de IVF do que nos de ICSI [18, 22].

Nestes estudos [18, 22], as causas indicadas para o aparecimento de blastómeros haplóides derivados de zigotos monopronucleados foram, para a ICSI, a não descondensação do espermatozóide, ou degeneração do genoma paterno, ou degeneração completa/extrusão do genoma materno após a fertilização (nos casos de haploidia 23, Y); nos casos de haploidia em IVF, é indicada como causa uma activação partenogenética inicial do ovócito [18] e, para o único caso que foi encontrado com uma constituição 23,Y, foi sugerida a extrusão de todo o material materno após a fertilização e o desenvolvimento apenas do genoma masculino [22]. No que respeita aos blastómeros diplóides, as causas indicadas para o seu aparecimento foram, para a ICSI, a ocorrência de assincronia na formação dos pronúcleos; já para a existência de

diploidia nos blastómeros de IVF, as causas apontadas foram a assincronia na formação dos pronúcleos e a cariogamia [18, 22] (Tabela IV).

Tabela IV: Resumo dos resultados dos estudos de Sultan et al., 1995; Staessen e Van Steirteghem, 1997.

<b>Estudo</b>	<b>Nº de embriões</b>	<b>Técnica usada</b>	<b>Dia da análise</b>	<b>Resultados</b>
<b>Sultan et al., (1995)</b>	42 embriões 21 ICSI 21 IVF	FISH (X, Y, 16 e 18)	3	<p><b>ICSI</b></p> <p><b>14 haplóides</b> (67%) não descondensação do espermatozóide, ou degeneração do genoma paterno, ou degeneração completa/extrusão do genoma materno após a fertilização</p> <p><b>6 diplóides</b> (28%) assincronia</p> <p><b>1 poliplóide</b> (5%)</p> <p><b>IVF</b></p> <p><b>3 haplóides</b> (14%) activação partenogenética</p> <p><b>15 diplóides</b> (71%) assincronia na formação dos pronúcleos ou cariogamia</p> <p><b>3 poliploides</b> (14%)</p>
<b>Staessen e Van Steirteghem, (1997)</b>	176 embriões 61 ICSI 115 IVF	FISH (X, Y e 18)	2 e 3	<p><b>ICSI</b></p> <p><b>19 haplóides</b> (31%) não descondensação do espermatozóide, ou degeneração do genoma paterno, ou degeneração completa/extrusão do genoma materno após a fertilização</p> <p><b>17 diplóides</b> (28%) cariogamia</p> <p><b>23 mosaicos</b> (38%)</p> <p><b>IVF</b></p> <p><b>15 haplóides</b> (13%) activação partenogenética</p> <p><b>56 diplóides</b> (49%) assincronia na formação dos pronúcleos ou cariogamia</p> <p><b>1 triplóide</b> (1%)</p> <p><b>43 mosaicos</b> (37%) activação partenogenética seguida de endoduplicação</p>

Quanto ao aparecimento de blastómeros com mosaicismo (haplóide/diplóide), tanto em IVF como em ICSI, as causas indicadas são a activação inicial do ovócito seguida de duplicação espontânea do DNA depois da primeira clivagem (para IVF), e extrusão/degeneração de um dos genomas (ficando só um dos materiais genéticos no zigoto) seguida de duplicação do DNA após a primeira clivagem (para ICSI) [18, 22].

No que respeita à análise laboratorial dos embriões, é referido, em [16, 20] que não é suficiente uma abordagem apenas com base nos cromossomas sexuais para se afirmar que um embrião é haplóide e não monossómico, ou triplóide e não trissómico, pelo que é importante haver uma análise a pelo menos dois pares de cromossomas autossómicos para se poder avaliar a ploidia.

Tanto a cromatina feminina como a masculina podem não vir a formar um pronúcleo [23]. Em ICSI, e em relação ao espermatozóide, podem haver várias razões para isto acontecer: o espermatozóide pode sair do ovócito, o espermatozóide pode não descondensar ou pode também descondensar apenas parcialmente e degenerar [23].

Os zigotos monopronucleados são, geralmente descartados em reprodução medicamente assistida. Contudo, existem relatos de zigotos monopronucleados que depois tiveram um desenvolvimento normal e que chegaram a originar gravidezes e nascimentos, tanto nos humanos [24] como em ratinhos [25]. E, também há relatos do desenvolvimento de uma linha celular estaminal humana (com cariótipo 46,XX) a partir de um zigoto monopronucleado [20, 26].

## **1.7 – O Núcleo Celular**

Para se tentar esclarecer um pouco mais acerca da formação dos pronúcleos nos zigotos, é importante ter-se presente a morfologia do núcleo celular, para a compreensão dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento dos pronúcleos (Fig.4).

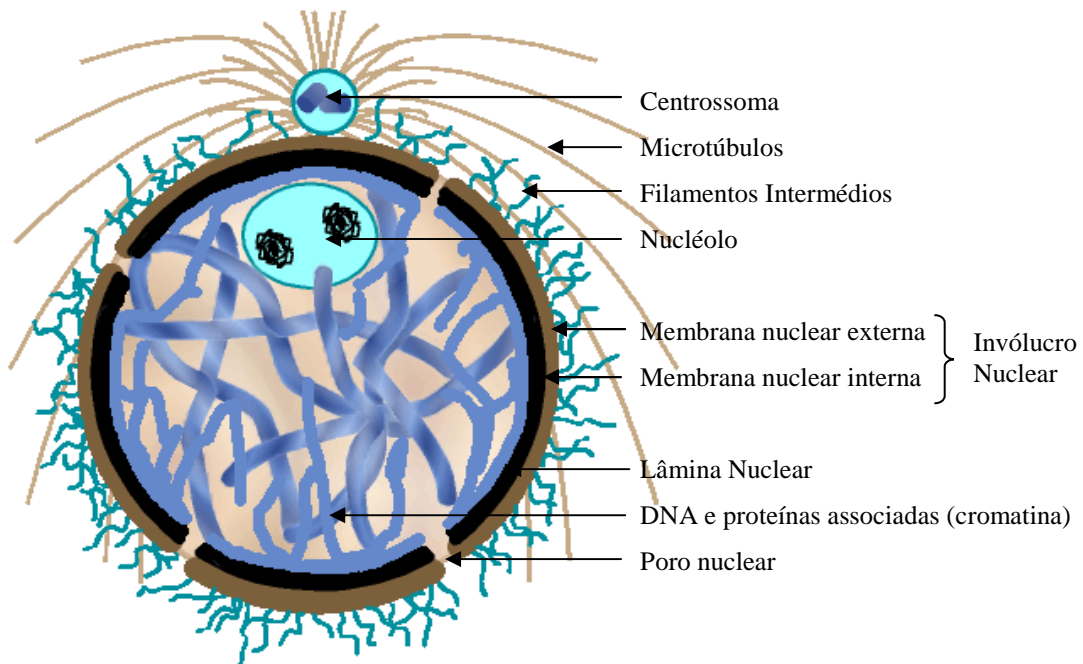


Fig.4 – Desenho esquemático do núcleo celular. Adaptado de [27]

Nas células eucariotas, o DNA encontra-se dentro do núcleo, que ocupa cerca de 10% do volume total da célula. O núcleo é delimitado por um invólucro nuclear, composto por duas membranas concêntricas (membrana nuclear interna e membrana nuclear externa), e estas membranas são interrompidas pelos poros nucleares, através dos quais se dá o transporte de moléculas de, e para, o citoplasma. O invólucro nuclear é suportado por duas redes de filamentos intermédios: uma, chamada lâmina nuclear, forma uma fina cápsula dentro do núcleo, sob a membrana nuclear interna, enquanto que a outra, menos organizada, se encontra do lado externo da membrana nuclear externa. Uma das funções do invólucro nuclear é a de protecção das longas e frágeis moléculas de DNA das forças mecânicas originadas pelos filamentos citoplasmáticos [27].

### 1.7.1 – As laminas na arquitectura nuclear

A lâmina nuclear é uma rede de subunidades proteicas interligadas, denominadas laminas. São homólogas dos filamentos intermédios, mas diferem em alguns aspectos: o seu domínio central é mais longo; possuem sinal de localização nuclear, organizam-se numa estrutura em forma de folha, bi-dimensional, que parece requerer a sua associação com outras proteínas; a rede que formam é dinâmica e rapidamente se desagrega no

início da mitose e reagrega no final desta. A desagregação e reagregação são mediadas pela fosforilação e desfosforilação de várias serinas.

Pensa-se que a lâmina nuclear dá forma e estabilidade ao invólucro nuclear, ao qual está ancorada por ligações quer aos complexos dos poros nucleares, quer à membrana nuclear interna. Como a cromatina interage directamente com a lâmina nuclear, esta promove uma ligação estrutural entre o DNA e o invólucro nuclear. Quando o núcleo desaparece durante a mitose, a lâmina nuclear despolimeriza, em parte como consequência da fosforilação das laminas no início da mitose; ao mesmo tempo os complexos dos poros nucleares desagregam-se nos seus vários componentes. A despolimerização da lâmina nuclear é provavelmente um pré-requisito para o invólucro nuclear se desagregar em pequenas vesículas, que vão ser dispersas pelo citosol. A reagregação da lâmina ocorre quando as laminas são desfosforiladas e, consequentemente, repolimerizam a superfície dos cromossomas. Uma vez reagregada, a lâmina permite a fusão das vesículas do invólucro nuclear, para reformar um invólucro à volta de cada cromossoma ou grupo de cromossomas. Durante este processo os complexos dos poros nucleares são também reagregados. Os cromossomas, então “fechados” nos invólucros, unem-se e as suas membranas fundem-se para formar um único invólucro nuclear que, activamente, reimporta todas as proteínas com sinais de localização nuclear, excluindo todas as outras proteínas da célula, exceptuando aquelas ligadas aos cromossomas [27].

Existem três genes *LMNA*, *LMNB1* e *LMNB2* que codificam sete isoformas das laminas. As laminas do tipo A (A, A $\Delta$ 10, C e C2) são derivadas do gene *LMNA*. Quanto às laminas do tipo B, as B1 são codificadas pelo gene *LMNB1* e as B2 e B3 são codificadas pelo gene *LMNB2* [28-34]. Todas as células dos vertebrados expressam pelo menos um tipo de lamina B, enquanto que as laminas A, A $\Delta$ 10 e C são reguladas pelo desenvolvimento e são expressas, primariamente, em células diferenciadas. As laminas C2 e B3 são expressas apenas nas células da linha germinal [35].

O domínio central das laminas consiste maioritariamente em repetições heptáticas, o que é característico de proteínas  $\alpha$ -helicoidais [29]. Estes domínios geram a interacção entre duas cadeias de laminas para formarem um dímero *coiled-coil*, (Fig.5) a unidade básica estrutural para a agregação das laminas. Associações laterais entre os domínios dos dímeros são essenciais para a agregação de estruturas maiores necessárias à polimerização das laminas [36].

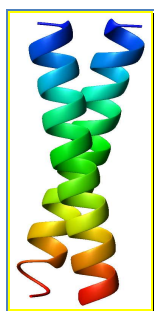


Fig.5 – Esquema de um Dímero *coiled-coil*.

As laminas nucleares, como as suas partes equivalentes do citosqueleto são altamente resistentes à extracção sob condições que solubilizam a grande maioria das proteínas citoplasmáticas e nucleares. Como o núcleo mantém a sua forma e as laminas permanecem na periferia nuclear, permitiu defini-las como a estrutura responsável pela forma nuclear [37].

Durante a interfase, as laminas são continuamente sintetizadas e incorporadas na lâmina nuclear, o que sugere que as laminas continuam a polimerizar dentro do núcleo durante toda a interfase. Na fase G1, as laminas A e B são bem visíveis, formando um padrão denominado de “véu”, dada a intensa marcação fluorescente observada [38, 39]. Durante a replicação do DNA, parece ter que existir uma organização normal das laminas. Estudos feitos em células de *Xenopus* revelaram que quando o invólucro nuclear se reformava (*in vitro*), em células que não tinham laminas, o núcleo não replicava o seu DNA. Já quando se mutavam os genes que codificam as laminas nas suas terminações e se adicionavam a células com o invólucro nuclear organizado, provocavam descontinuidades na organização da lâmina nuclear e havia bloqueio da síntese de DNA [38].

As laminas nucleares são rapidamente desagregadas durante a transição entre profase/metáfase nas células dos vertebrados. Depois da mitose, as laminas são desfosforiladas e reagregadas. Esta reagregação ocorre aproximadamente ao mesmo tempo que a formação do invólucro nuclear [40]. Contudo, o papel das laminas em estádios iniciais da reagregação do invólucro nuclear tem sido uma questão contestada. Observações por imunofluorescência têm sido contraditórias no que respeita à altura em que os diferentes componentes do invólucro se associam com os cromossomas condensados. Em alguns casos, as laminas parecem reagregar-se aos cromossomas antes de estes estarem rodeados pelas membranas nucleares, e, em outros casos, as laminas

parecem reagregar-se somente depois das membranas nucleares e os poros estarem formados [39].

Não existem estudos sobre o que acontece exactamente às lamínas nucleares durante a formação dos pronúcleos no zigoto humano, mas, tendo em conta que o invólucro nuclear dos gâmetas tem que se desagregar para poder haver fusão do material genético, parece-nos que na formação dos pronúcleos, as lamínas devem ter um papel semelhante àquele que têm na reformação dos núcleos celulares após as mitoses.

### **1.7.2 – As Histonas**

As histonas são as principais proteínas estruturais dos cromossomas. Se os cromossomas dos eucariotas fosse composto apenas por DNA, simplesmente estendido, é difícil imaginar como se poderiam replicar e segregar para as células-filhas, sem se lesarem ou partirem. O DNA de todos os cromossomas está empacotado numa estrutura compacta com o auxílio de proteínas especializadas. Geralmente, as proteínas ligadas ao DNA são divididas em duas classes: histonas e não-histonas. Ao complexo de ambas com o DNA nuclear dá-se o nome de cromatina.

As histonas são moléculas relativamente pequenas, com uma grande proporção de aminoácidos electricamente positivos (lisina e arginina), o que favorece a sua estreita ligação com o DNA (que tem carga eléctrica negativa), qualquer que seja a sua sequência de nucleótidos [27].

Os cinco tipos de histonas podem dividir-se em dois grupos: as histonas nucleossómicas e as histonas H1. Juntamente com o DNA, formam o nucleossoma, a unidade básica da cromatina. As histonas H1 são moléculas maiores que as histonas nucleossómicas e menos conservadas na evolução (encontram-se à volta da partícula nuclear – *core*). As histonas nucleossómicas são de quatro tipos: H2A, H2B, H3 e H4, cada uma delas presente em duas cópias [41]. São as proteínas mais bem conservadas de todas as proteínas conhecidas (estas e as cadeias de DNA formam a partícula nuclear). Esta conservação na evolução sugere que as suas funções envolvem todos os seus aminoácidos. Por isso, uma mudança em qualquer posição é lesiva para a célula.

As histonas desempenham um papel crucial na condensação ordenada do DNA dentro do núcleo. O DNA das células não é todo dobrado da mesma forma, e a forma

como uma determinada região do genoma é condensada dentro da cromatina numa célula particular, parece influenciar a actividade dos genes que a região contém [27].

### 1.7.2.1 – Histona H3 e assimetria epigenética em zigotos

Em vários estudos feitos em zigotos de ratinho [42-47] foi observado que existiam diferenças na metilação das histonas H3 e H4 nos pronúcleos feminino e masculino. Na histona H3, cinco resíduos de lisina (K) podem ser metilados (K4, K9, K27, K36 e K79) e podem ser mono, di ou tri-metilados.

Sabe-se que as propriedades de determinada sequência de DNA nas células não são só determinadas pela própria sequência de nucleótidos, mas também por modificações epigenéticas. Nos zigotos de ratinho, o genoma paterno sofre alterações estruturais e epigenéticas: os cromossomas são descondensados, as protaminas substituídas por histonas e o DNA é rápida e activamente desmetilado.

Nos ratinhos, a fertilização do ovócito, causa alterações na organização dos genomas paterno e materno. Inicialmente parado em metafase II, o ovócito completa a meiose, extrudando o segundo glóbulo polar. O DNA densamente condensado do espermatozóide descondensa, as protaminas são substituídas por histonas e o DNA sofre desmetilação. Esta desmetilação ocorre assimetricamente no DNA paterno e afecta classes diferentes de sequências-cópia simples e repetitivas, mas não das regiões controlo dos genes “imprinted” [44].

A HP1 (*heterochromatin protein 1*) desempenha um papel central na formação e conservação da heterocromatina, ligando-se à Me(3)H3K9 (histona H3 tri-metilada na lisina 9). A HP1 tem três isoformas:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que surgem em alturas diferentes do ciclo celular. Imediatamente depois da fertilização, a proteína HP1 $\beta$  (*heterochromatin protein 1 beta*), que se encontra armazenada no citoplasma do ovócito, liga-se, preferencial e exclusivamente ao genoma materno. A HP1 $\beta$  é detectada no citoplasma do ovócito, mas não está ligada aos cromossomas femininos antes da fertilização. Depois da fertilização, a HP1 $\beta$  liga-se, inicialmente, aos centrómeros maternos, mas rapidamente se estende a todo o genoma materno, mais ou menos no período de 1-5 haf. O material genético paterno, por esta altura, não tem nem HP1 $\beta$ , nem meH3 (histona H3 metilada) ligadas [42]. A ausência deste factor heterocromático no genoma paterno é, consequentemente, significativa e consistente com o acontecimento de desmetilação

preferencial do DNA paterno, evento que ocorre 4 haf [42]. A HP1 $\gamma$  aparece por volta da fase S/G2 no zigoto, e a HP1 $\alpha$  não aparece antes do estadio de 4 células [46].

O rápido recrutamento da HP1 $\beta$  para as histonas metiladas da cromatina materna pode ter consequências importantes. Primeiro, protege o DNA materno da desmetilação, que só é observada no genoma paterno e também sugere que as interações entre meH3/HP1 podem estar ligadas a uma metilação *de novo* preferencial do DNA do genoma materno [42, 47]

Foi demonstrado que os zigotos de ratinho não possuem várias marcas de metilação nos resíduos de lisina das H3 e H4 no pronúcleo de origem paterna, estando presentes no pronúcleo de origem materna, o que indica um fenómeno de assimetria pronuclear [42-47]. Esta assimetria molecular inicialmente observada nos pronúcleos, vai começando a desaparecer a partir das 12 haf , até deixar de existir a partir do estadio de 2 células [42-47].

Sabendo-se desta assimetria molecular nos pronúcleos masculino e feminino em zigotos de ratinhos, um estudo foi realizado em zigotos humanos tripronucleados [48] para determinar a sua composição molecular e tentar perceber qual o mecanismo por trás da ocorrência de três pronúcleos. Os 19 zigotos provenientes de ciclos de IVF, mostraram todos ter um pronúcleo muito marcado e os outros dois com fraca marcação (após imunofluorescência), e dos zigotos provenientes de ciclos de ICSI (11), em 2 não houve diferenças, 4 obtiveram dois pronúcleos muito marcados e um com fraca marcação, e o restante zigoto apresentava um pronúcleo muito marcado e dois com fraca marcação. As conclusões retiradas do estudo foram que a desmetilação do material paterno começa logo após a fertilização, tanto nos ratinhos como nos humanos e que a replicação dependente da desmetilação dos cromossomas maternos também ocorre depois da primeira divisão mitótica nos embriões [48].

Recentemente, foi realizado um estudo em zigotos humanos monopronucleados [49] também para perceber se a assimetria epigenética estava presente em zigotos monopronucleados, e qual a diferença entre os derivados de ICSI e os de IVF (Tabela V). Foi realizada Imunofluorescência com um anticorpo para a Me(3)H3K9.

Tabela V: Resultados de [49].

<b>Técnica Fertilização</b>	<b>Nº de Zigotos</b>	<b>Conclusões</b>
IVF	45	39 (87%) – padrão de marcação não uniforme – origem bi-parental 2 (4%) – não houve marcação – pronúcleos de origem paterna 4 (9%) – padrão de marcação uniforme – pronúcleos de origem materna
ICSI	33	15 (45%) – padrão de marcação uniforme – pronúcleos de origem materna 8 (24%) - não houve marcação – pronúcleos de origem paterna 10 (30%) - padrão de marcação não uniforme – origem bi-parental

Este estudo demonstrou que existe também assimetria epigenética nos zigotos humanos 1PN. Os zigotos de IVF com pronúcleos que mostravam um padrão de marcação não uniforme (87%), eram de origem bi-parental, originados por cariogamia. Quanto aos que não apresentavam marcação (4%), foi sugerido que o mecanismo de formação de 1PN, seria a total extrusão do genoma materno para o segundo glóbulo polar, dando origem a pronúcleos só de origem paterna. Relativamente aos que apresentavam um padrão de marcação uniforme (origem materna) (9%), foi sugerida a não descondensação do espermatozóide ou, não fecundação do ovócito.

Relativamente aos zigotos de ICSI, para 45% sugeriram a não descondensação do espermatozóide como o mecanismo principal de formação de 1PN. Nos zigotos 1PN que apresentaram um padrão de marcação não uniforme (30%), foi sugerido como mecanismo a cariogamia, que, segundo os autores pode ocorrer apesar do espermatozóide ser injectado longe da placa metafásica. Para os zigotos que não apresentaram marcação no pronúcleo (24%), foi sugerido, tal como em IVF, a extrusão completa do genoma materno para o segundo glóbulo polar como mecanismo responsável pelo aparecimento de 1PN [49].

## **2 - Objectivos**

Como já foi referido, foram realizados estudos em zigotos monopronucleados provenientes apenas de ciclos de IVF [14, 15], e em embriões derivados de zigotos monopronucleados provenientes de ciclos de IVF [16, 17] e de IVF e ICSI [18, 22], para se tentar esclarecer qual a sua origem. Somente num destes estudos, os zigotos foram analisados no primeiro dia (Levron et al., 1995), recorrendo à FISH. Nos outros estudos foi utilizada a FISH, citogenética clássica e FISH em simultâneo, ou PCR e FISH. Os glóbulos polares não foram processados em qualquer destes estudos e também não foram analisados zigotos derivados de ciclos de ICSI. O número de zigotos analisados foi, também, relativamente pequeno (n=19 no estudo de Balakier et al., 1993, e n=16 no estudo de Levron et al., 1995) para se tirarem conclusões seguras. Quanto aos estudos que analisaram blastómeros de embriões derivados de zigotos monopronucleados, podem não reflectir bem os mecanismos iniciais, visto que, nas várias mitoses do embrião há erros de segregação que podem ocorrer e originar conclusões erradas.

### **2.1 – Objectivo geral**

Neste contexto, e para esclarecer a origem genética dos zigotos monopronucleados, estudamos apenas estes no dia 1, derivados de ciclos de ICSI (n=64) e IVF (n=18) conservando e analisando também os glóbulos polares.

#### **2.1.1 – Objectivos específicos**

Utilizando técnicas de citogenética molecular (hibridização in situ com sondas fluorescentes específicas para os cromossomas X, Y, 18 e 21 e imunoflorescência para as laminas nucleares e histona H3 trimetilada na lisina 9), fomos, nas amostras acima especificadas, analisar:

- qual a constituição cromossómica dos pronúcleos e dos glóbulos polares (FISH) para percebermos se a meiose se realizou correctamente e qual a ploidia do espermatozóide que fertilizou o ovócito;

- se existe diferença nos mecanismos de formação destes zigotos em ICSI e em IVF;
- se os pronúcleos são de origem materna ou paterna recorrendo à MeH3K9 (IF) visto que quando há apenas existência do cromossoma X, este pode ser materno ou paterno, e, recorrendo só a FISH não sabemos;
- se as laminas nucleares estão envolvidas na ruptura do invólucro dos pronúcleos, assim como estão na desagregação e reagregação dos invólucros nucleares na mitose;

### **2.1.2 – Objectivos sociais**

Com este estudo poder-se-á inferir se algumas patologias moleculares humanas poderão estar associadas ao aparecimento de zigotos monopronucleados e, indirectamente, analisar qual a possível utilização clínica destes, em casais sob tratamento para infertilidade.

### **3 - Materiais e Métodos**

#### **3.1 – Pacientes**

Um total de 82 zigotos humanos monopronucleados foram analisados após consentimento informado de casais (n=65), em ciclos de tratamentos de fertilização in vitro (IVF) e injeção intracitoplasmática (ICSI) no Centro de Genética da Reprodução Professor Alberto Barros (CGR), Porto.

#### **3.2 – Estimulação ovárica**

As mulheres foram hiperestimuladas hormonalmente de modo controlado segundo critérios descritos [50, 51]. Para o protocolo agonista à hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), acetato de buserelina (0.6 mg/d, sc; Suprefact: Hoechst, Frankfurt, Germany) foi iniciado a meio da fase lútea do ciclo anterior. Após a diminuição da libertação de hormona pela hipófise, a dose foi reduzida para 0.4 mg/d, e combinada com FSH (rFSH; Gonal F: Serono, Geneve, Switzerland; Puregon: Organon, Oss, The Netherlands) e foi administrada até o folículo maior atingir um diâmetro médio de 18 mm, ou, dois ou mais folículos atingirem o diâmetro de 17 mm. O protocolo flexível de múltiplas doses antagonistas às GnRH, rFSH, foi iniciado no 2º ou 3º dia do ciclo menstrual (com ou sem pré-tratamento contraceptivo oral). Os antagonistas das GnRH, cetrotlix (Cetrotide: Serono) ou ganirelix (Orgalutran: Organon), 0.25 mg/d, sc, foram administrados diariamente, iniciados quando o folículo maior tinha atingido um diâmetro de 12 mm e até este atingir um diâmetro médio de 18 mm, ou, dois ou mais folículos atingirem o diâmetro de 17 mm. Para ambos os protocolos, a dose inicial de rFSH foi escolhida de acordo com as características das mulheres, não se observando diferenças entre o grupo de pacientes que foram submetidas ao protocolo agonista às GnRH do grupo de pacientes que foram submetidas ao protocolo antagonista.

As doses iniciais de rFSH variaram entre 100-185 IU, 200-250 IU e 300-450 IU. Independentemente do protocolo ao qual foram submetidas, doses iniciais mais elevadas de rFSH (a que algumas pacientes foram submetidas), estavam associadas ao aumento

da idade da mulher, FSH basal, índice de massa corporal e número de tentativas, e com o decréscimo do volume ovárico e número total de folículos antrais. Para ambos os protocolos, hCG urinária (5,000-10,000 IU, im; Pregnyl: Organon) foi administrada 35 h antes da recolha dos folículos ováricos grandes por aspiração folicular guiada por ultra-sonda, usando meio de lavagem (Medicult, Copenhagen, Denmark) [52-54].

### **3.3 – Procedimento laboratorial (CGR)**

#### **3.3.1 - Preparação do sémen para IVF e ICSI**

O sémen foi colocado numa estufa a 37°C (5% CO<sub>2</sub> em ar humidificado) durante 30 minutos para promover a liquefacção do líquido seminal. As amostras foram, de seguida, sujeitas a centrifugação (20 min, 1200 rpm, RT) por gradientes (Suprasperm System, Medicult), para remover microrganismos, leucócitos, células germinais imaturas e espermatozóides anómalos. Finalmente, os espermatozóides mais móveis e morfológicamente normais foram purificados por swim-up. Para este efeito, o pellet foi recoberto com 0.5-1 ml de sperm preparation medium (SPM) ou G-MOPS (Medicult) e incubado durante 1 h. Os espermatozóides que migraram até à superfície (fracção “swim-up”) foram recolhidos e utilizados para as técnicas de fertilização assistida [54, 55].

#### **3.3.2 - Preparação dos complexos cumulus-ovócito**

Depois de recolhidos, os folículos foram cultivados em meio de fertilização in vitro, IVF (Medicult), durante 2-4 horas para maturação extracorporal final.

#### **3.3.3 – Microinjecção**

Nos casos sujeitos a microinjecção, os folículos foram incubados durante 30 segundos em 80 IU de solução de hialuronidase (In Vitro Hyadase, Medicult) para dissociação das células foliculares (digestão da matriz extracelular rica em ácido hialurónico). As células foliculares foram depois mecanicamente removidas em SPM

com pipetas de desnudação (0.134-0.145 mm; Swemed, Frolunda, Sweden). Os ovócitos isolados foram então cultivados em meio IVF durante 1-2 h a 37°C numa atmosfera humidificada de 6% CO<sub>2</sub> e 6% O<sub>2</sub> em N<sub>2</sub>, para recobro da manipulação. Para a microinjecção (ICSI), os espermatozoides foram seleccionados segundo critérios morfológicos estritos [8] num microscópio invertido Nikon com micromanipuladores Narishige (Nikon, Tokio, Japan) e micropipetas (4-5 µm; Swemed, Frolunda, Sweden). Os ovócitos foram injectados em meio SPM ou G-MOPS (Medicult), pelo método de deslocação do ooplasma [56-59]. Os ovócitos injectados foram cultivados em meio ISM1 (Medicult).

### **3.3.4 - Fecundação in vitro**

Os folículos foram distribuídos por placas de cultura de 4 poços de 1 ml (Nunc™, Rochester, NY, USA). Cerca de 4 folículos foram colocados em cada poço, contendo 500 µl de meio ISM1, aos quais foram adicionados cerca de 50000-100000 espermatozoides por mililitro.

### **3.3.5 - Classificação dos Zigotos**

Os ovócitos foram observados e classificados 14-18 h após fertilização assistida. Os zigotos com um pronúcleo e dois glóbulos polares (1PN2PB), ou um pronúcleo e um glóbulo polar (1PN1PB) foram seleccionados para o presente estudo por não apresentarem sinais normais de fecundação (2PN2PB). Antes de serem processados, uma segunda observação foi efectuada passadas 2-3 h para confirmar a existência de apenas um pronúcleo.

## **3.4 - Divisão das amostras por grupos**

Os 82 zigotos monopronucleados foram divididos em 2 grupos: 60 foram analisados por hibridização in situ com fluorescência (FISH) e 22 por imunofluorescência (IF).

Dos 60 seleccionados para a FISH, 48 eram provenientes de ciclos de ICSI e 12 de ciclos de IVF. Nos casos de ICSI foram analisados 42 com 1PN2PB e 6 com 1PN1PB e nos casos de IVF foram analisados 11 com 1PN2PB e 1 com 1PN1PB.

Dos 22 seleccionados para IF, 16 eram provenientes de ciclos de ICSI e 6 de ciclos de IVF. Nos casos de ICSI foram analisados 14 com 1PN2PB e 2 com 1PN1PB e nos casos de IVF foram analisados 5 com 1PN2PB e 1 com 1PN1PB.

### **3.5 - Fixação**

Os zigotos foram transferidos para uma caixa de Petri com uma gota (400µl) de 1% citrato de sódio (Sigma, St Louis, USA) onde permaneceram durante 10 minutos para permitir a sua turgescência. Depois foram transferidos com uma micropipeta num volume de 2.5µl para lâminas revestidas com poli-L-lisina (Menzel-Glazer<sup>®</sup>, Braunschweig, Germany). A poli-L-lisina confere uma carga positiva à lâmina, o que vai facilitar a aderência do DNA (com carga eléctrica exterior negativa) a esta.

O volume de citrato de sódio nas lâminas foi retirado cuidadosamente para se proceder à fixação com fixador Carnoy (3:1 v/v Metanol: Ácido acético - Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany). O fixador foi adicionado em 5 gotas de 10µl da seguinte forma: a primeira gota adicionada a cerca de 5 cm de altura da lâmina e as seguintes diminuindo cerca de 1 cm das anteriores [60]. Com esta fixação os pronúcleos e os glóbulos polares ficam separados geograficamente na lâmina facilitando a sua posterior análise.

As lâminas foram lavadas em PBS (Sigma, St Louis, USA) e água destilada durante 4 minutos cada e desidratadas em etanol (Panreac, Barcelona, Spain) a 70, 96 e 100% durante 1 minuto em cada.

As lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente.

#### **3.5.1 - Tratamento com pepsina**

Antes da hibridização in situ com fluorescência as amostras foram submetidas a um tratamento numa solução de pepsina (100µg/ml; Sigma, St Louis, USA) para remover restos de citoplasma para a penetração das sondas ser eficaz.

As amostras ficaram na solução de pepsina durante 20 minutos em banho maria a 37°C.

Depois deste tratamento as amostras foram lavadas em água destilada e PBS e fixadas numa solução de 1% de paraformaldeído (37% formalina; Sigma, St Louis, USA) em PBS a 4°C durante 10 minutos [54].

### **3.6 - Hibridização in situ com fluorescência - FISH**

Para a realização da FISH seguiu-se um protocolo previamente publicado [61].

Procedeu-se a mais uma lavagem das amostras em PBS e água destilada e à sua desidratação em etanol a 70, 96 e 100% (1 minuto em cada solução).

As lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente.

Foi preparada uma mistura de sondas (Vysis<sup>®</sup>, Dês Plaines, IL, USA) com marcação fluorescente de acordo com protocolo da marca (7µl de tampão de hibridização Lsi, 1µl de CEP18 espectro azul, 1µl de Lsi espectro vermelho, 1µl de CEPX espectro verde, 0.5µl de YSATIII espectro vermelho e 0.5µl de YSATIII espectro verde). Um volume de 3µl desta mistura foi adicionado a cada amostra.

As amostras foram colocadas numa placa de aquecimento (HYBrite<sup>™</sup>, Vysis<sup>®</sup>, CA, USA) a 75°C durante 4 minutos para desnaturação do DNA e seguidamente colocadas numa câmara húmida e escura numa estufa a 37°C para ocorrer a hibridização, entre 4 horas a *overnight*.

Após a hibridização, as amostras foram lavadas em soluções de 60% de formamida (Fluka, Seelze, Germany) a 42°C, 2xSSC (saline sodium citrate) (Invitrogen<sup>™</sup>, Paisley, UK) a 42°C e em 4xSSC em 0.05% Tween-20 (Sigma, St Louis, USA) a temperatura ambiente e com agitação. Cada lavagem foi feita em copo para lâminas e durante 3 minutos [62]. O modo de preparação das soluções encontra-se no Anexo 1.

Depois de lavadas em PBS e água destilada e desidratadas de novo em etanol a 70, 96 e 100%, as lâminas foram montadas em lamela com uma gota (aproximadamente 10µl) de meio Vectashield (Vector) contendo 1.5µl de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para visualização do DNA em microscópio de epifluorescência (AxioImager Z1, Carl Zeiss Inc., New York, USA).

### 3.7 - Imunofluorescência

Os zigotos foram lavados numa gota (400µl) de PBS a 37°C [47], numa caixa de Petri, fazendo “up and down” com a micropipeta. Depois foram transferidos para lâminas de poli-L-lisina (um por lâmina) e 2µl de tampão de lise citoplasmática foi adicionado. Mais tampão foi sendo adicionado cuidadosamente até à lise celular. As lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente [54].

Seguidamente, as amostras foram submetidas a um tratamento com uma solução de pepsina em água destilada a 37°C, em banho maria, durante 20 minutos [54]. Depois deste tratamento foram lavadas em água destilada e PBS durante 15 segundos em cada, e não se deixaram secar.

Uma gota de Metanol (Merck®, Darmstadt, Germany), a -20°C (200µl), foi colocada sobre cada amostra para fixação do material e passados 10 minutos a gota foi decantada e as amostras lavadas duas vezes, durante 2 minutos cada, em PBS a 4°C.

Para permeabilização do material foi usada uma solução de 0,5% de Triton X-100 (Sigma, St Louis, USA) em PBS durante 15 minutos e, seguidamente, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, durante 5 minutos cada, a temperatura ambiente.

Para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo, foi utilizada uma solução de 1% de BSA em PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente (200µl foram adicionados a cada lâmina).

Seguidamente, uma mistura de 2 anticorpos primários, foi adicionada a cada amostra (200µl): *rabbit polyclonal to Histone H3, tri methylated at lysine 9* (ab8898, Abcam, Cambridge, UK) e *mouse monoclonal to pan Lamin* (ab20740, Abcam, Cambridge, UK) diluídos em 1% BSA em PBST em diluições de 1:500 e 1:50 respectivamente. As amostras foram deixadas a incubar numa câmara húmida, a 4°C *overnight*.

No dia seguinte, a mistura de anticorpos foi decantada das lâminas e estas lavadas 3 vezes em PBS durante 5 minutos, e seguidamente, incubadas com a mistura de anticorpos secundários (200µl): *goat polyclonal to rabbit IgG – H&L* conjugado com Cy5 (ab6564, Abcam, Cambridge, UK) e *goat anti-mouse IgG1* - conjugado com FITC (sc-2078, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluídos em 1% de BSA em PBST em diluições de 1:600 e 1:100 respectivamente. As amostras foram deixadas a

incubar numa câmara húmida e escura durante uma hora a temperatura ambiente (protocolo modificado de [63]). O modo de preparação das soluções encontra-se no Anexo 1.

As lâminas foram lavadas novamente (3 vezes em PBS durante 5 minutos), e sem se deixarem secar foram montadas em lamela de vidro com uma gota de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield, Burlingame, CA, USA).

As amostras foram observadas num microscópio de epifluorescência e foram tiradas fotografias digitais com o programa AxioVision® (Carl Zeiss Inc., New York, USA). Após esta observação, estas mesmas amostras foram submetidas a FISH, seguindo o procedimento acima mencionado, e observadas de novo ao microscópio.

### **3.8 – Tratamento Estatístico**

O tratamento estatístico foi feito com recurso ao teste exacto de Fisher (two-sided), com um nível de significância de  $p < 0.05$ , utilizando o programa SPSS® versão 16 para Windows®.

## 4 – Resultados

### 4.1 – Resultados da FISH

Para análise só por FISH, foram seleccionados 60 zigotos.

Os 12 zigotos de ciclos IVF processados, foram provenientes de um total de 11 casais. A média de idades das mulheres foi de 35 anos, variando entre os 30 e 40 anos. A média de idades dos homens foi de 38 anos, variando entre os 32 e 42 anos. Os dados das fichas clínicas destes pacientes encontram-se na tabela do Anexo 2.

Nos zigotos 1PN2PB (11), obtivemos 1 com apenas um pronúcleo visível (9%) e sem espermatozóide (caso 23495). Este pronúcleo era haplóide com dissomia do cromossoma 21 (18,2121,X). Nos restantes zigotos (10), 1 (9%) apresentava um pronúcleo (sem marcação) e um espermatozóide por descondensar (caso 25646), e nos outros 9 (82%) foram encontrados dois pronúcleos após a FISH (Tabela VI).

No único zigoto com 1PN1PB foram encontrados 2 pronúcleos, 1 com constituição diplóide (1818,2121,XX) e o outro com constituição haplóide (X,18,21) (Tabela VII).

Tabela VI: Resultados após a FISH dos zigotos com 1PN2PB de IVF (n=11). Constituição cromossómica dos pronúcleos e glóbulos polares.

Caso	PB1	PB2	PNf	Ia	Ib	E	M	PNm	D <sup>r</sup>	D <sup>o</sup>	Ia	Ib	E	M
23495	-	-	haplóide com dissomia 21 18,2121,X	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25646	1818,X*	18,2121,X	+ sem marcação	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
24853	-	-	diplóide 1818,2121,XX	-	+	-	-	diplóide 1818,2121,XX	-	-	-	+	-	-
20543	18,2121,X	18,21,X	diplóide com monossomia X 1818,2121,X	-	-	+	-	haplóide com dissomia X 18,21,XX	-	-	+	-	-	-
24060	18,2121,XXX	18,XX	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	-	-	-	+	-
25097	1818,2121,XX	18,X	diplóide com monossomia X 1818,2121,X	-	-	+	-	haplóide com dissomia 21 18,2121,X	-	-	-	+	-	-
25454	18*,21,X	18,X	diplóide 1818,2121,XX	-	-	+	-	haplóide 18,21,Y	-	-	-	-	+	-
25541.1	1818,2121,X	18,21,X	haplóide 18,21*,X	-	+	-	-	haplóide 18,21,Y	-	-	-	-	+	-
25541.2	1818,21,X*	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21*,X	-	-	-	-	+	-
25677	-	-	diplóide 1818,2121,XX	+	-	-	-	haplóide 18,21*,X	-	-	+	-	-	-
9802	-	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	diplóide 1818,2121,XY	-	-	+	-	-	-

Legenda: **PB1** – 1º glóbulo polar; **PB2** – 2º glóbulo polar; **PNf** – pronúcleo feminino; **PNm** – pronúcleo masculino; **D<sup>r</sup>** - espermatozóide não descondensado; **D<sup>o</sup>** - espermatozóide a descondensar já com cromossomas marcados; **I<sup>a</sup>** (intermédio a) – pronúcleo com cromatina mais condensada ; **I<sup>b</sup>** (intermédio b) - pronúcleo com cromatina pouco condensada; **E** – pronúcleo com cromatina muito expandida; **M** – metafase; (+) – presente; (-) – ausente; (\*) - duas cromátides visíveis

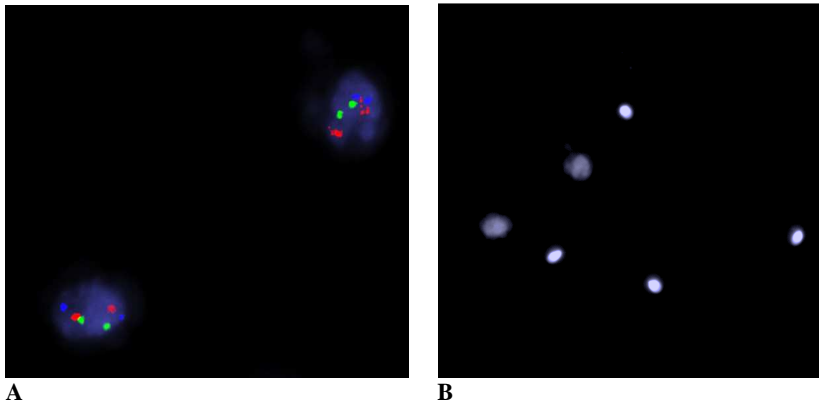


Fig.6 – Caso 24853. A – Pronúcleos (Amp. x1000); B – Imagem total

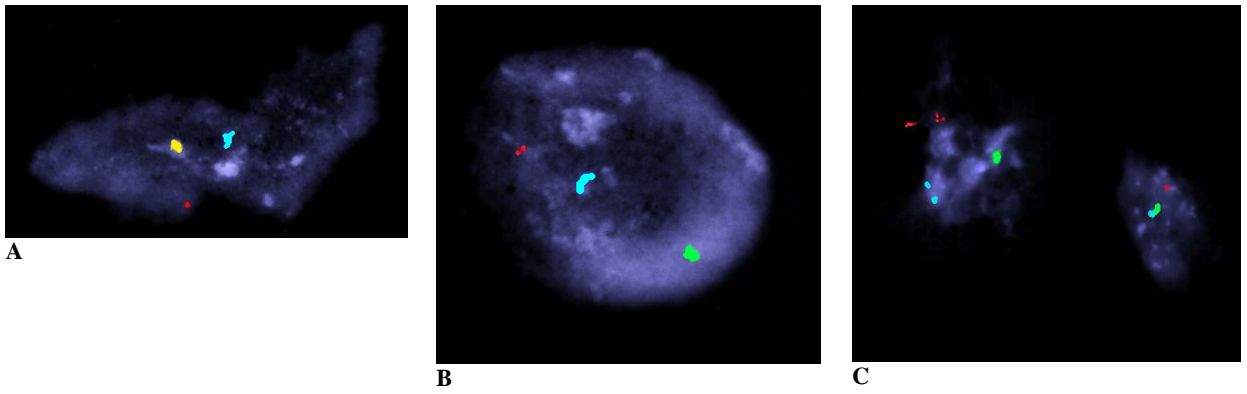


Fig.7 – Caso 25541.1. A – Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo feminino; C - Glóbulos polares (Amp. x1000).

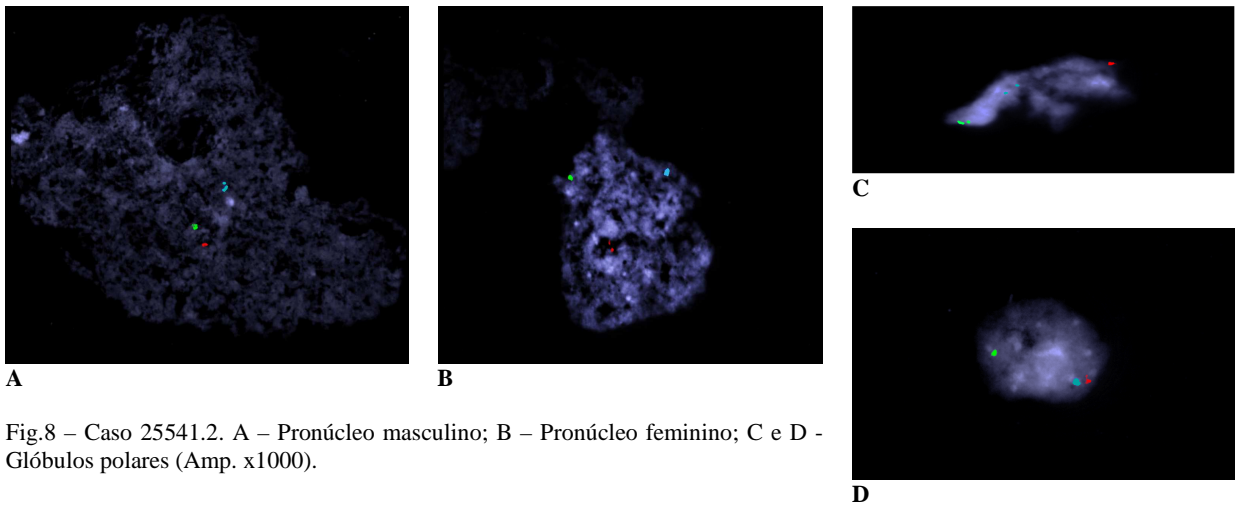


Fig.8 – Caso 25541.2. A – Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo feminino; C e D - Glóbulos polares (Amp. x1000).

Tabela VII: Resultados após a FISH do zigoto com 1PN1PB de IVF (n=1). Constituição cromossômica dos pronúcleos e glóbulo polar

Caso	PB1	PNf	Ia	Ib	E	M	PNm	D'	D''	Ia	Ib	E	M
23844	-	diploide 1818,2121,XX	+	-	-	-	Haplóide 18*,21*,X*	-	-	+	-	-	-

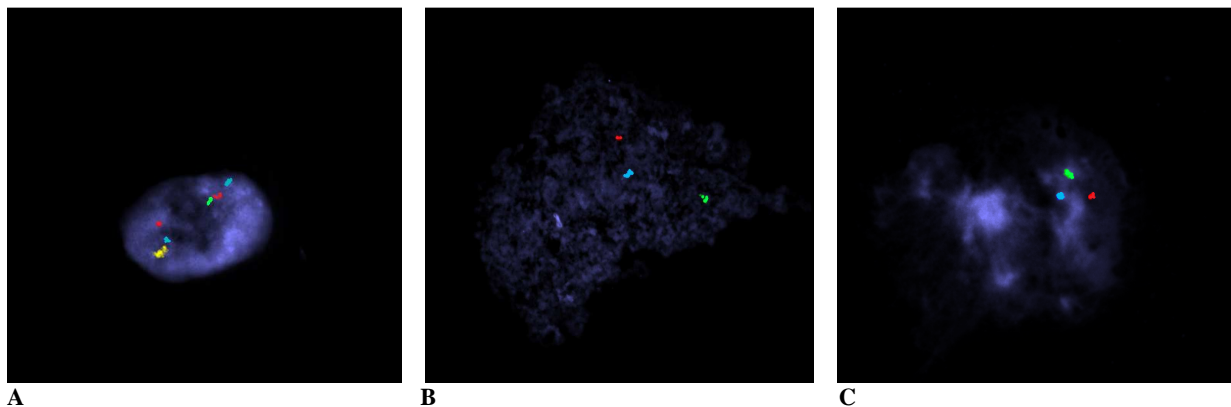


Fig.9 – Caso 9802. A – Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo feminino; C – 2° PB (Amp. x1000).

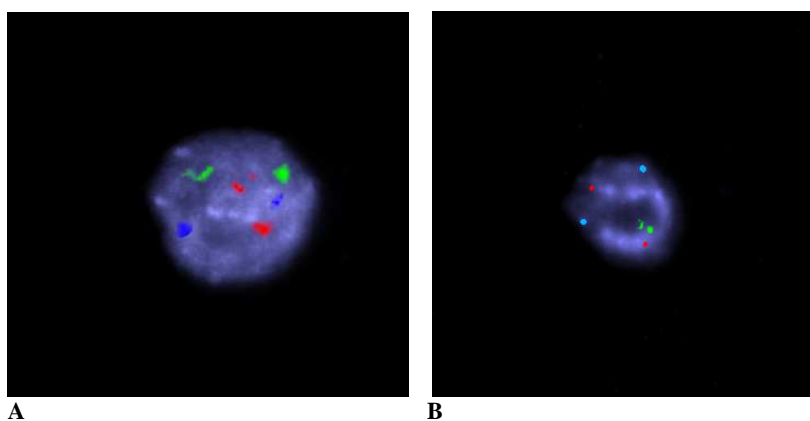


Fig.10 – Caso 23844. A – Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo feminino (Amp. x1000).

Os 48 zigotos de ciclos ICSI processados, foram provenientes de um total de 33 casais. A média de idades das mulheres foi de 33 anos, variando entre os 20 e 40 anos. A média de idades dos homens foi de 35 anos, variando entre os 28 e 48 anos. Os dados das fichas clínicas destes pacientes encontram-se na tabela do Anexo 3.

Nos zigotos 1PN2PB (42), foram encontrados 16 (38%) com um pronúcleo feminino e espermatozóide ainda condensado, 12 (28.6%) com um pronúcleo feminino e espermatozóide a iniciar a descondensação (já com cromossomas marcados) e 14 (33.3%) com dois pronúcleos. Dos 16 zigotos em que o espermatozóide se encontrava ainda condensado, 2 (13%) não tiveram marcação dos cromossomas no pronúcleo

feminino, e os restantes 14 (88%) eram haplóides. Dos 12 zigotos cujo espermatozóide estava a iniciar descondensação e já tinha cromossomas marcados, todos apresentavam haploidia no pronúcleo feminino. Dos 14 zigotos com dois pronúcleos, 2 (14.3%) apresentavam diploidia nos pronúcleos femininos (casos 25346 e 26976.2) e os pronúcleos masculinos eram haplóides (18,21,X e 18,Y), 1 (7.1%) apresentava diploidia no pronúcleo masculino e o pronúcleo feminino era haplóide (caso 19623), 1 (7.1%) tinha o pronúcleo masculino aneuplóide (X) (caso 25577), e os restantes 10 (71.4%) apresentavam haploidia tanto no pronúcleo feminino como no masculino (Tabela VIII).

Quanto aos zigotos 1PN1PB (6), 2 (33%) tinham o espermatozóide ainda condensado (casos 24161 e 26461), 1 (17%) apresentava o espermatozóide no início da descondensação, com cromossomas já marcados (caso 26684.1), e os restantes 3 (50%) apresentavam os dois pronúcleos bem visíveis. Todos tinham o pronúcleo feminino com constituição diplóide, excepto 1 (17%) que tinha uma constituição caótica (caso 26461). Quanto aos pronúcleos masculinos, todos eram haplóides (Tabela IX).

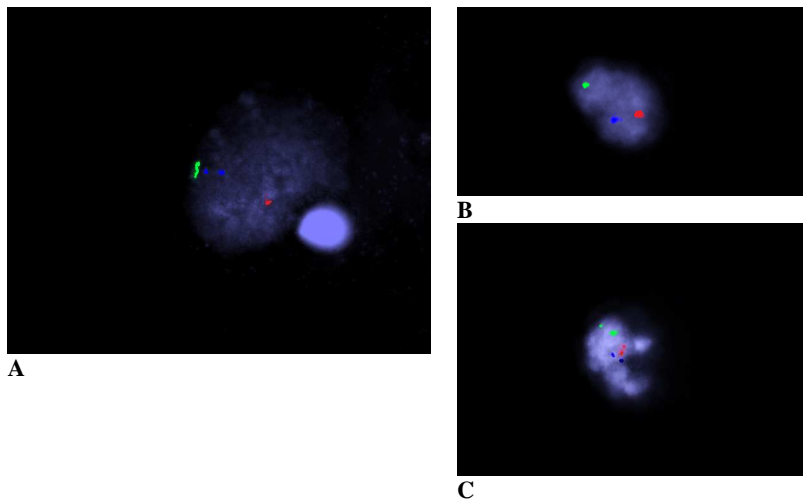


Fig.11 – Caso 24914.1. A – Pronúcleo feminino e espermatozóide condensado; B e C – Glóbulos Polares (Amp. x1000).

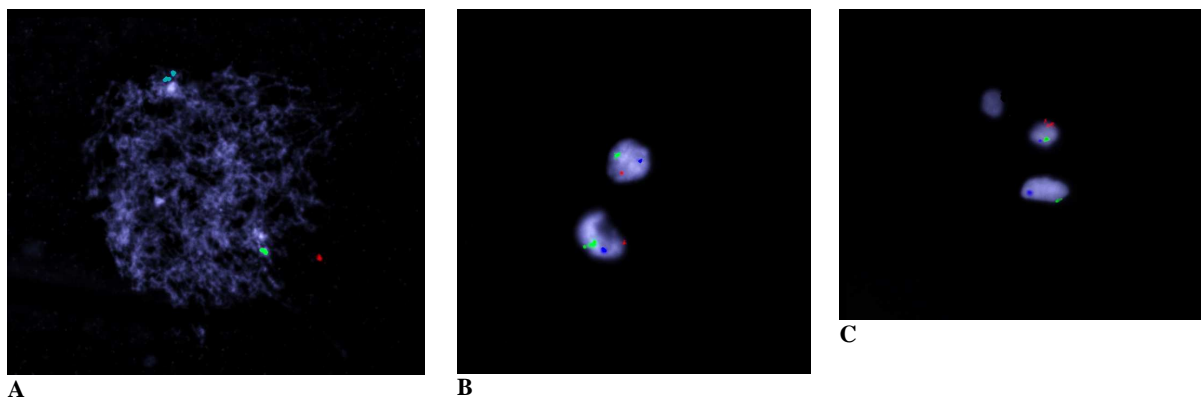


Fig.12 – Caso 26233. A – Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo masculino e 2º PB; C – 1º PB (Amp. x1000).

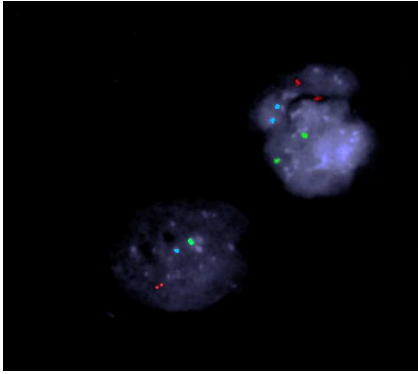


Fig.13 – Caso 25346 – Pronúcleos masculino e feminino (Amp. x1000).

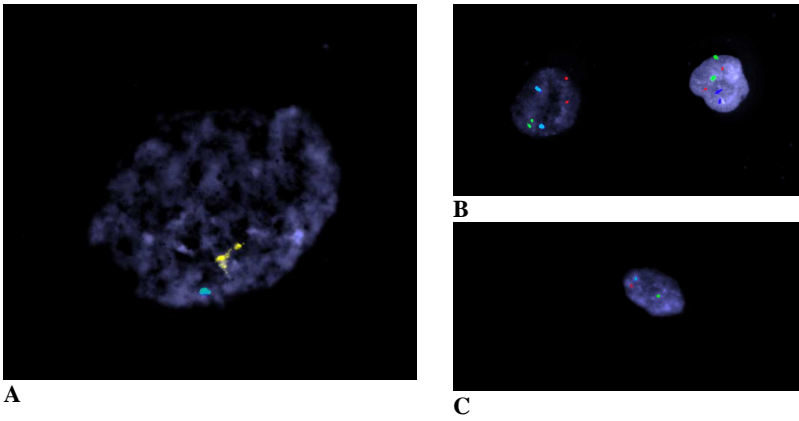


Fig.14 – Caso 26976.2. A - Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo feminino e 1° PB (Amp. x1000).

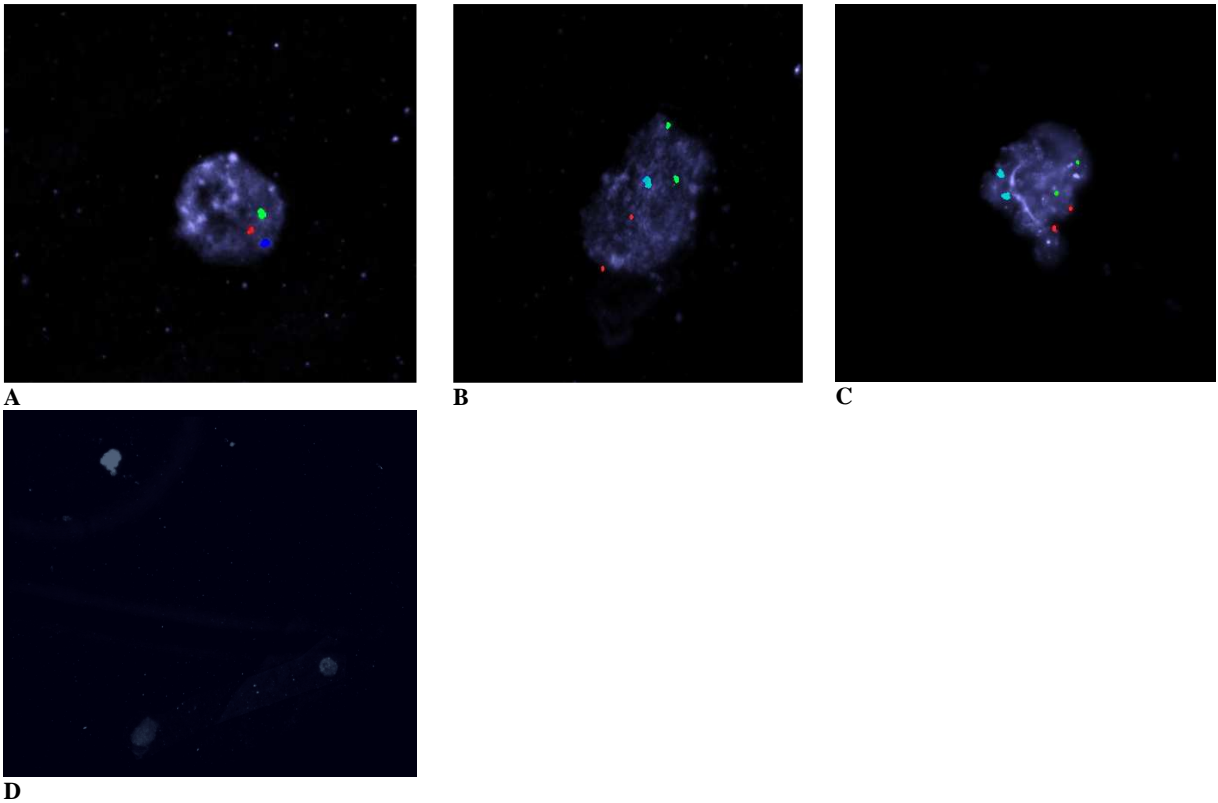
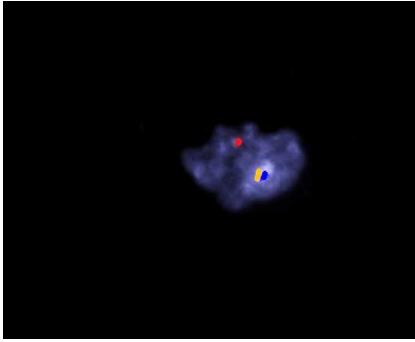
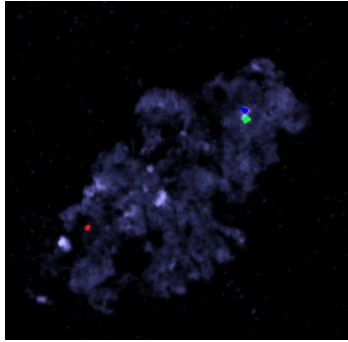


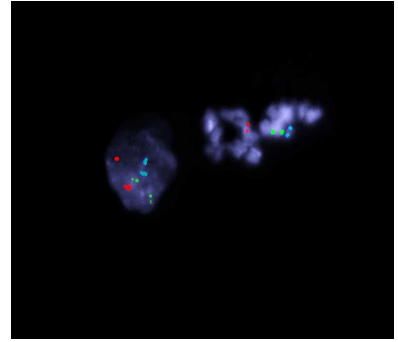
Fig.15 – Caso 24262. A - Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo feminino; C - 1° PB (Amp. x1000); D - Imagem total.



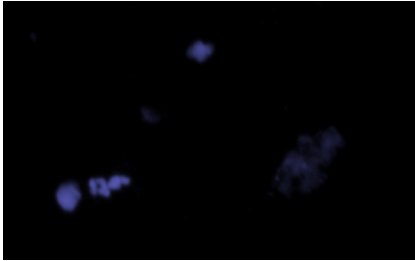
A



B



C



D

Fig.16 – Caso 24857.1. A - Pronúcleo masculino; B – Pronúcleo feminino; C – Glóbulos polares (Amp. x1000); D - Imagem total.

Tabela VIII: Resultados após a FISH dos zigotos com 1PN2PB de ICSI (n=42). Constituição cromossômica dos pronúcleos e glóbulos polares.

Caso	PB1	PB2	PNf	Ia	Ib	E	M	PNm	D'	D°	Ia	Ib	E	M
24654	1818,2121,XX	-	+ sem marcação	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
25960.3	1818,2121,XX	18,21*,X	+ sem marcação	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
12652	18*,21,X*	18,21*,X	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
12677.1	18,21,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
17047	18,21*	18,21,X	haplóide 18,21,X	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
19575	18,21,X	18*,21*,X*	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
21554	18,21,XX	18,21,X	haplóide 18*,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
24914.1	18*,21,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
24914.2	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
25047	1818,2121,X*	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
25265	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
25704	1818,21,XX	18*,21,X	haplóide 21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
25960.1	18,21,X*	dividido	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
26113	1818,21*,X*	21,X	haplóide 18,X	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
26137	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
26619	1818,2121,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
19943	1818,21*,X*	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	-	-
24161	18,21,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,XX	-	+	-	-	-	-
24857.2	18*,21,X*	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	haplóide 18,21,Y	-	+	-	-	-	-
25573	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,Y	-	+	-	-	-	-
25784	dividido 1818,21,X 1818,2121,XX	1818,2121,XX	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,XX	-	+	-	-	-	-
25785	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,Y	-	+	-	-	-	-
26233	fragmentado 1818,2121,XXX	18,21,X	haplóide 18*,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	-	-
15260	18,21*,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	-	-
22240.2	18,21,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	-	-
25315.3	18,21*,X*	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	-	-
22240.1	18,21,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,Y	-	+	-	-	-	-
22240.3	18*,21*,X*	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,Y	-	+	-	-	-	-
25346	-	-	diplóide 1818,2121,XX	+	-	-	-	haplóide 18,21*,X	-	-	-	+	-	-
26976.2	1818,2121,XX	18,21,X	diplóide 1818,2121,X*	-	+	-	-	haplóide 18,Y	-	-	-	-	+	-
19623	18,21,X	dividido 18,21,X 18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	diplóide 18*,2121,XX	-	-	-	+	-	-
25577	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	aneuplóide X	-	-	-	+	-	-
12677.2	18*,21*,X	-	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	-
12677.3	1818,2121,X	18,X	haplóide 18,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	-
24262	1818,21*,X*	-	haplóide 18,21*,X*	-	+	-	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	-
24895	18,21,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	-
25315.1	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	-
25315.2	18,21,X	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	-
25960.2	dividido 18,2121,X* 18,21,X	1818,2121,XX	haplóide 18,21,X	+	-	-	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	-
23793	1818,2121,XX*	18,21,X	haplóide 18,X	-	-	-	+	haplóide 18,Y	-	-	+	-	-	-
24857.1	1818,2121,X*X*	18*,21*,X*	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,Y	-	-	+	-	-	-
26976.1	1818,21,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	haplóide 18,21,Y	-	-	+	-	-	-

Tabela IX: Resultados após a FISH dos zigotos com 1PN1PB de ICSI (n=6). Constituição cromossômica dos pronúcleos e glóbulos polares.

Caso	PB1	PNf	Ia	Ib	E	M	PNm	D'	D''	Ia	Ib	E	M
24161	18,21,X	diplóide com monossomia 21 1818,21,XX	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
26461	1818,2121,XX	Caótico (muitos sinais)	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
26684.1	18*,2121,XX	diplóide com monossomia 18 18,2121,XX*	+	-	-	-	haplóide 18,21,Y	-	+	-	-	-	-
25960	18*,21,X	diplóide 1818,2121,XX	-	+	-	-	haplóide 18,21	-	-	-	+	-	-
26684.2	1818,2121,X	diplóide 1818,2121,XX	-	+	-	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	-
26684.3	18,21,X	diplóide 1818,2121*,XX	+	-	-	-	haplóide 18,21,X	-	-	-	-	-	+

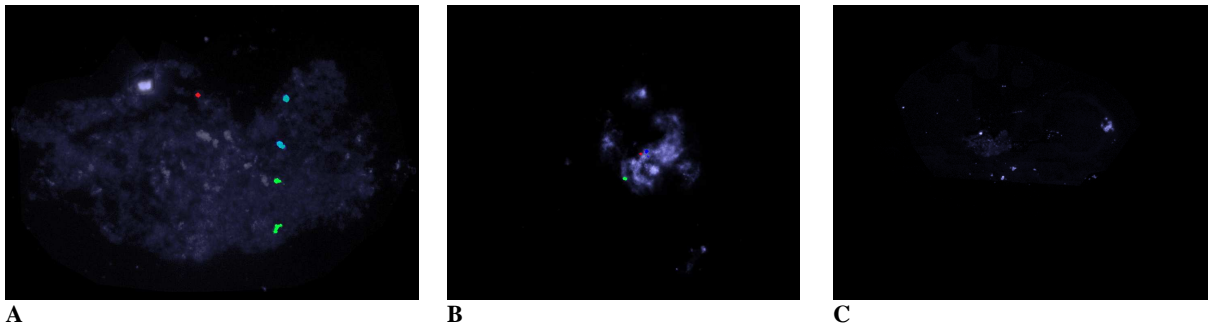


Fig.17 – Caso 24161. A - Pronúcleo feminino e espermatozóide condensado; B – 1° PB (Amp. x1000); C - Imagem total.

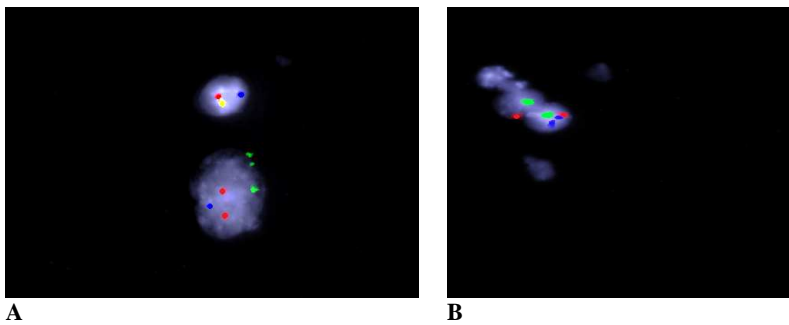


Fig.18 – Caso 26684.1 – Pronúcleos feminino e masculino; B – 1° PB (Amp. x1000).

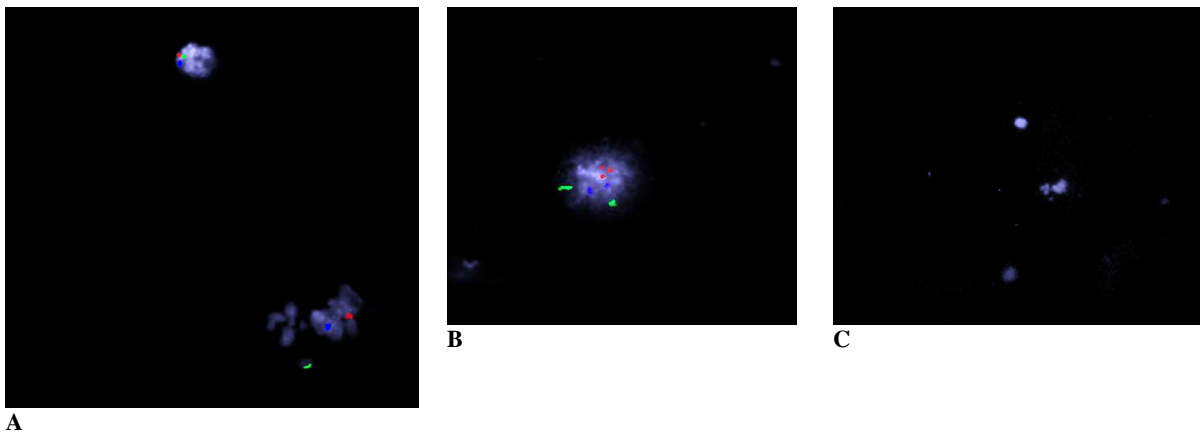


Fig.19 – Caso 26684.3 – A - Pronúcleo masculino e glóbulo polar; B – Pronúcleo feminino (Amp. x1000) C – Imagem total.

## 4.2 – Resultados da IF

Para IF seguida de FISH foram seleccionados 22 zigotos.

Os 6 zigotos de ciclos IVF processados, foram provenientes de um total de 4 casais. A média de idades das mulheres foi de 36 anos, variando entre os 35 e 36 anos. A média de idades dos homens foi de 38 anos, variando entre os 37 e 40 anos. Os dados das fichas clínicas destes pacientes encontram-se na tabela do Anexo 4.

Nos zigotos 1PN2PB (5), todos apresentavam dois pronúcleos aquando da observação após a imunofluorescência, embora em todos se tenha visto apenas um pronúcleo na observação ao microscópio invertido antes do processamento das amostras. Em 2 casos (40%), obtivemos marcação simultânea para os anticorpos contra as lamínas e contra a histona num dos pronúcleos, o que nos indicou que eram pronúcleos femininos e que tinham invólucro nuclear intacto (casos 26837.1 e 27410.2 – Tabela X). Quanto aos pronúcleos masculinos dos mesmos casos não apresentaram marcação para qualquer anticorpo. Em outros 2 casos (40%) houve marcação para o anticorpo contra a histona nos pronúcleos femininos, mas não se obteve marcação para o anticorpo contra as lamínas. Já nos pronúcleos masculinos dos mesmos casos, obtivemos marcação do anticorpo contra as lamínas (casos 28039 e 27410.1). No zigoto restante (20%), nos dois pronúcleos não se observou nenhuma marcação (caso 26837.2), o que pensamos ter sido devido a falha da técnica. No que respeita aos resultados da FISH após a IF, revelaram que 2 (40%) dos pronúcleos femininos tinham uma constituição cromossómica diplóide e os outros 3 (60%) tinham uma constituição haplóide. Quanto aos pronúcleos masculinos, 4 (80%) apresentavam haploidia e, em 1 (20%) dos casos, o pronúcleo masculino apresentava uma constituição cromossómica considerada diplóide (18,2121,XY), o que sugere fecundação por um espermatozóide diplóide com monossomia 18 (Tabela X).

No único zigoto 1PN1PB (caso 27361), foram encontrados 3 pronúcleos depois de realizada a imunofluorescência, apesar de também só se ter visto um pronúcleo antes do processamento da amostra. Dois dos pronúcleos tiveram marcação para o anticorpo contra a histona, e um deles apresentava também marcação para o anticorpo contra as lamínas nucleares. O outro pronúcleo não teve marcação para os dois anticorpos. Relativamente à sua constituição cromossómica revelada após a FISH, os três pronúcleos apresentaram haploidia (Tabela XI).

Tabela X: Resultados após a IF dos zigotos com 1PN2PB de IVF (n=5). Constituição cromossômica dos pronúcleos e glóbulos polares.

Caso	PB1	PB2	PNf	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9	PNm	D'	D°	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9
26837.1	1818,2121,XX	18*,21*,X	haplóide 18*,21*,X	-	+	-	-	+	+	haplóide 18,21*,X	-	-	-	+	-	-	-	-
27410.2	+ sem marcação	18,21,X	haplóide 18,21,X	+	-	-	-	+	+	haplóide 18,21,Y	-	-	+	-	-	-	-	-
28039	-	-	diplóide 1818,2121,XX	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
27410.1	+ sem marcação	-	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	+	haplóide 18,21,Y	-	-	-	+	-	-	+	-
26837.2	-	18,21,X	diplóide 1818,2121,XX	-	-	+	-	-	-	diplóide monossomia 18 18,2121,XY	-	-	-	-	+	-	-	-

Legenda: **PB1** – 1º glóbulo polar; **PB2** – 2º glóbulo polar; **PNf** – pronúcleo feminino; **PNm** – pronúcleo masculino; **D'** - espermatozóide não descensado; **D°** - espermatozóide a descensar já com cromossomas marcados; **I<sup>a</sup>** (intermédio a) – pronúcleo com cromatina mais condensada; **I<sup>b</sup>** (intermédio b) - pronúcleo com cromatina pouco condensada; **E** – pronúcleo com cromatina muito expandida; **M** – metafase; **Lam** – anticorpo contra as laminas nucleares; **H3K9** – anticorpo contra a histona H3 trimetilada na lisina 9; (+) – presente; (-) – ausente; (\*) - duas cromátides visíveis.

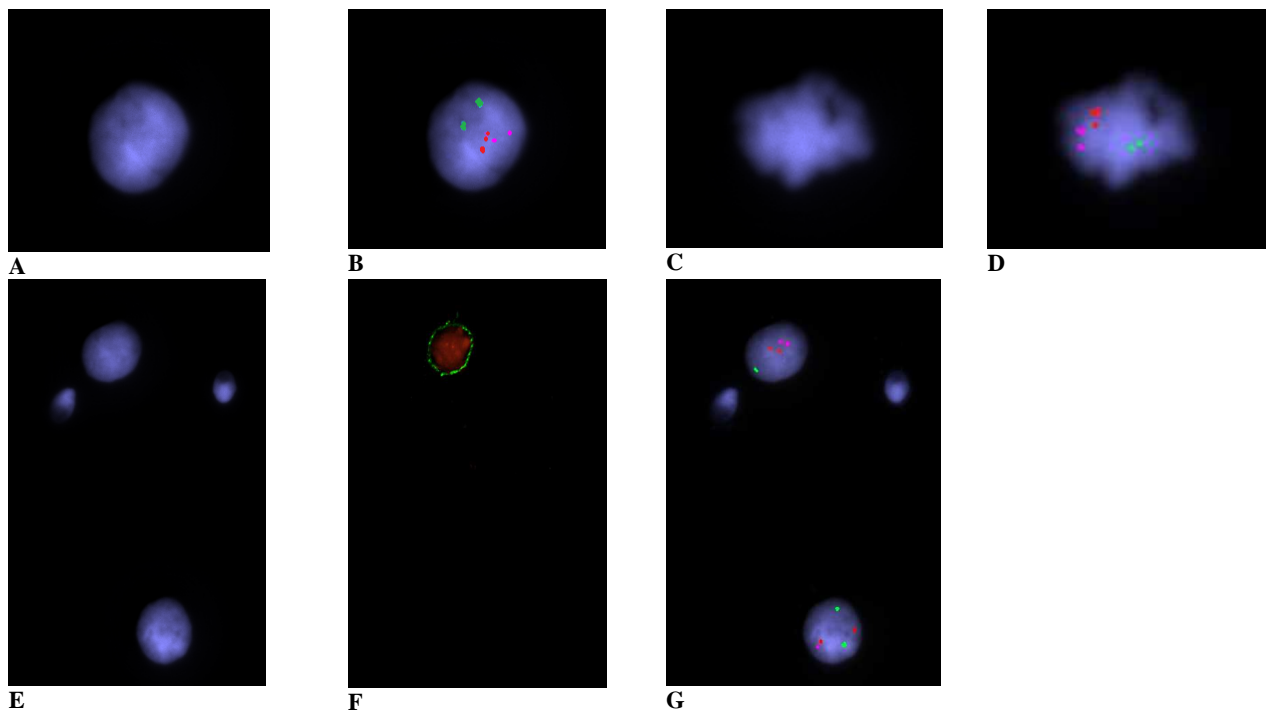


Fig.20 – Caso 26837.1. A e C - Glóbulos polares; B e D – FISH dos Glóbulos polares; E – Pronúcleos masculino e feminino; F – Marcação por Imunofluorescência dos PN; G – FISH dos PN

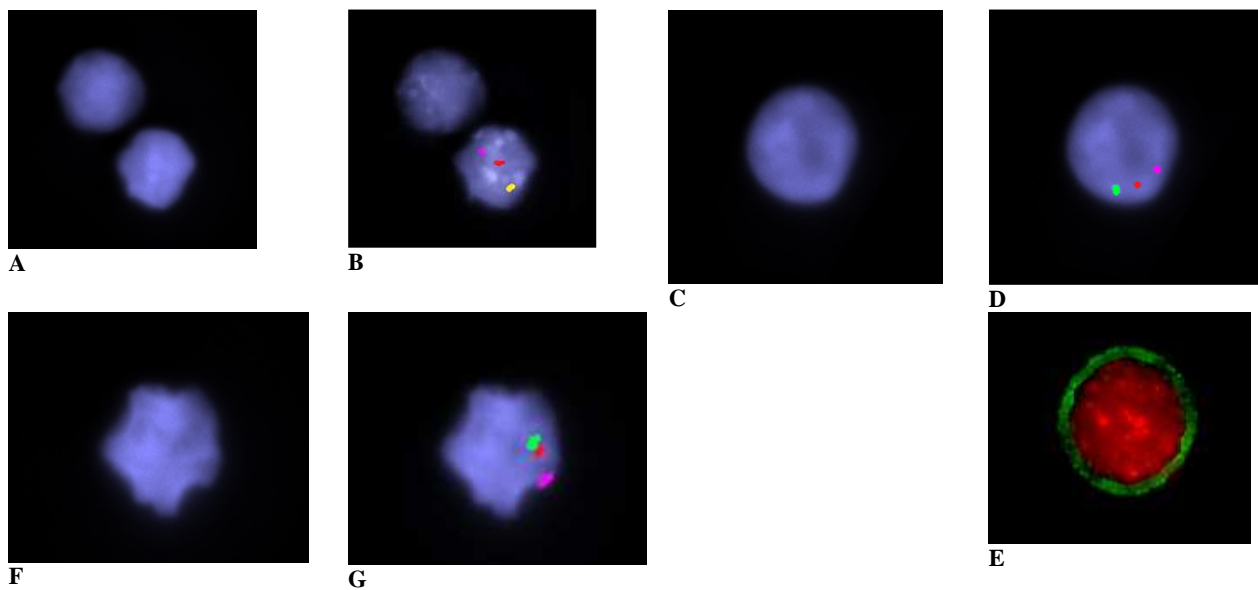


Fig.21 – Caso 27410.2. A – Pronúcleo masculino e 1° PB; B – FISH; C – Pronúcleo feminino; D – FISH; E – IF do pronúcleo feminino; F – 2°PB; G – FISH do 2°PB

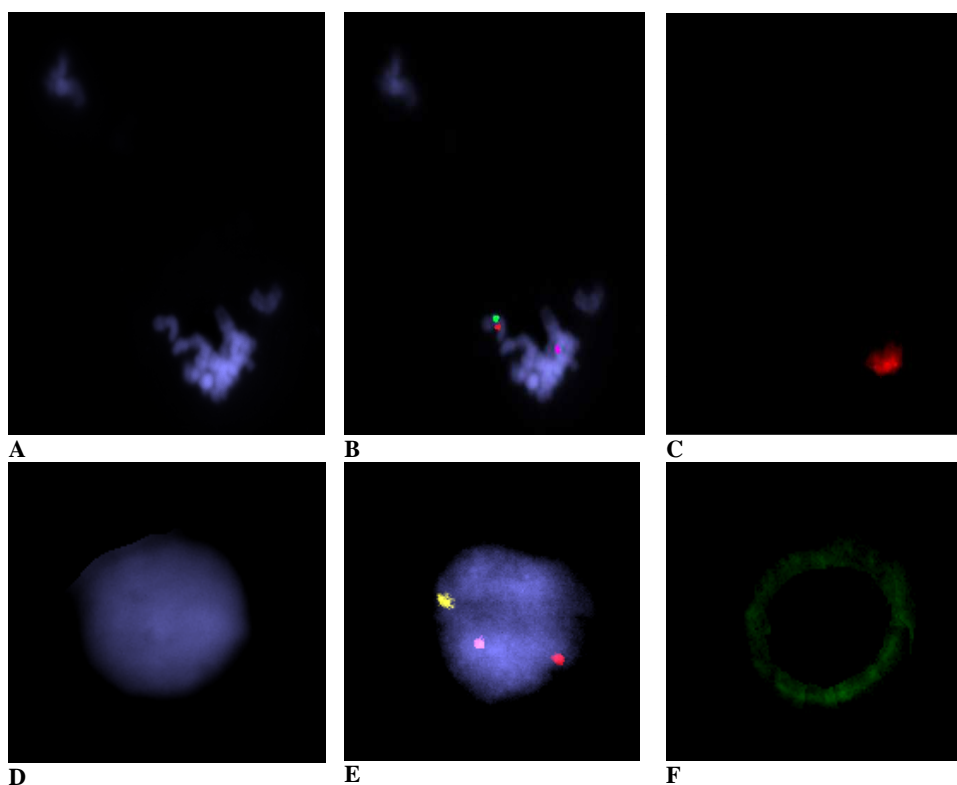


Fig.22 – Caso 27410.1. A – Pronúcleo feminino; B – FISH; C – IF do pronúcleo feminino; D – pronúcleo masculino; E – FISH; F – IF do pronúcleo masculino

Tabela XI: Resultados após a IF do zigoto com 1PN1PB de IVF (n=1). Constituição cromossômica dos pronúcleos e glóbulos polares.

Caso	PB1	PNf	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9	PNm	D'	D''	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9
27361	18,2121,X	haplóide 1818,21*,X*	+	-	-	-	+	+	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	-	-	-
		haplóide 18,21*,X	+	-	-	-	-	+									

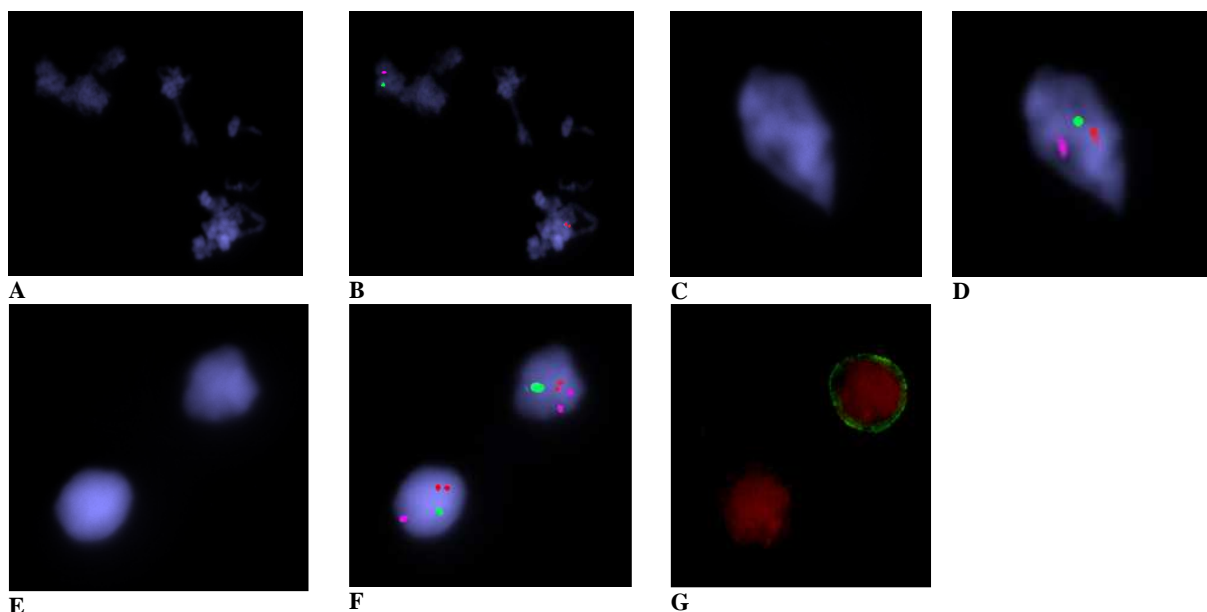


Fig.23 – Caso 27361. A – PB; B – FISH; C – Pronúcleo masculino; D – FISH; E – Pronúcleo feminino; F – FISH; G - IF

Os 16 zigotos de ciclos ICSI processados, foram provenientes de um total de 17 casais. A média de idades das mulheres foi de 36 anos, variando entre os 31 e 43 anos. A média de idades dos homens foi de 37 anos, variando entre os 33 e 44 anos. Os dados das fichas clínicas destes pacientes encontram-se na tabela no Anexo 5.

Nos zigotos 1PN2PB (14), em 1 (7%) observou-se apenas um pronúcleo após a IF, com marcação somente para o anticorpo contra a histona (caso 24023 – Tabela XII), enquanto que em 13 (93%) foram encontrados dois pronúcleos. Em 5 destes 13 casos (38%), obteve-se marcação para os dois anticorpos num dos pronúcleos (feminino), e para o outro pronúcleo não se obteve marcação; um destes (1/5) tinha o espermatozóide ainda condensado (caso 21642). Em 4 (31%), um dos pronúcleos só teve marcação para as lamínas, enquanto que o outro pronúcleo só apresentou marcação para a histona. Noutros 3 zigotos (23%), foram encontrados espermatozóides ainda com cromatina condensada, e, relativamente ao pronúcleo feminino, 2 (67%) casos, não apresentaram marcação para os anticorpos, e 1 (33%) só teve marcação do anticorpo contra as lamínas. No restante zigoto com dois pronúcleos (8%), só um deles teve marcação para a histona, e o outro pronúcleo não teve qualquer marcação. Relativamente à FISH realizada após a IF, todos os pronúcleos masculinos já visíveis apresentavam uma constituição cromossômica haplóide, e em 8 casos (57%) os pronúcleos femininos apresentavam haploidia; já em 4 zigotos (29%), os pronúcleos femininos apresentavam diploidia. Em 2 casos (14%) não se obteve marcação na FISH, devido à cromatina apresentar-se degradada (Tabela XII).

Dos 2 zigotos 1PN1PB, num (50%), após a IF, foi encontrado um espermatozóide ainda por descondensar, e o pronúcleo feminino teve marcação apenas para o anticorpo contra a histona. Já no outro zigoto (50%), foram encontrados dois pronúcleos após a IF, e neste caso, um teve marcação para a histona e não teve marcação para as lamínas (pronúcleo feminino) e o outro tinha marcação para as lamínas e não tinha marcação para a histona (pronúcleo masculino). Os resultados após a FISH, revelaram que o caso que apresentava o espermatozóide ainda por descondensar, tinha o pronúcleo feminino com constituição cromossômica diplóide (muito provavelmente devido a não extrusão do 2º glóbulo polar), e o caso que apresentava dois pronúcleos tinha os dois com constituição cromossômica haplóide (Tabela XIII).

Tabela XII: Resultados após IF dos zigotos com 1PN2PB de ICSI (n=14). Constituição cromossômica dos pronúcleos e glóbulos polares.

Caso	PB1	PB2	PNf	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9	PNm	D'	D°	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9
24023	+ sem marcação	+ sem marcação	+ sem marcação	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27724	1818,2121,XX	1818,21	haplóide 18,21,X	+	-	-	-	+	+	haplóide 18,21,Y	-	-	-	-	+	-	-	-
26678	18,2121,XX	+ sem marcação	diplóide com monossomia 21 1818,21*,XX	+	-	-	-	+	+	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	-	-	-
26915	fragmentado 18,X 18,21 18,X 18,X	+ sem marcação	diplóide 1818,2121,XX	-	+	-	-	+	+	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	-	-	-
25882	+ sem marcação	+ sem marcação	haplóide 18,X	-	+	-	-	+	+	+ sem marcação	-	-	-	-	+	-	-	-
21642	dividido 21,X 21,X 18,21,X	18,X	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
27970	+ sem marcação	+ sem marcação	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	+	haplóide 18,21,Y	-	-	+	-	-	-	+	-
27618	1818,21,XX	18,X	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	+	haplóide 18,21,Y	-	-	+	-	-	-	+	-
26684.1	-	18,21,X	haplóide 18,21,X	+	-	-	-	-	+	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	-	+	-
17931	18,21,X	18,21,X	haplóide 18,X	-	-	+	-	-	-	haplóide 18,21,X	-	-	-	+	-	-	+	-
26684.2	1818,2121,XX	18,21,X	haplóide 18,21,X	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
27905	-	-	+ sem marcação	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8006	-	18,21,X	diplóide com trisomia X (em divisão) 1818,2121,XXX	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
28038	+ sem marcação	+ sem marcação	diplóide 1818,2121,XX	-	+	-	-	-	+	haplóide 18*,21*,X	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabela XIII: Resultados após IF dos zigotos com 1PN1PB de ICSI (n=2). Constituição cromossômica dos pronúcleos e glóbulos polares.

Caso	PB1	PNf	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9	PNm	D'	D°	Ia	Ib	E	M	Lam	H3K9
27500	+ sem marcação	diplóide 1818,2121,XX	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
13286	1818,XX	haplóide 18,21,X	-	-	+	-	-	+	haplóide 18,21,Y	-	-	-	+	-	-	+	-

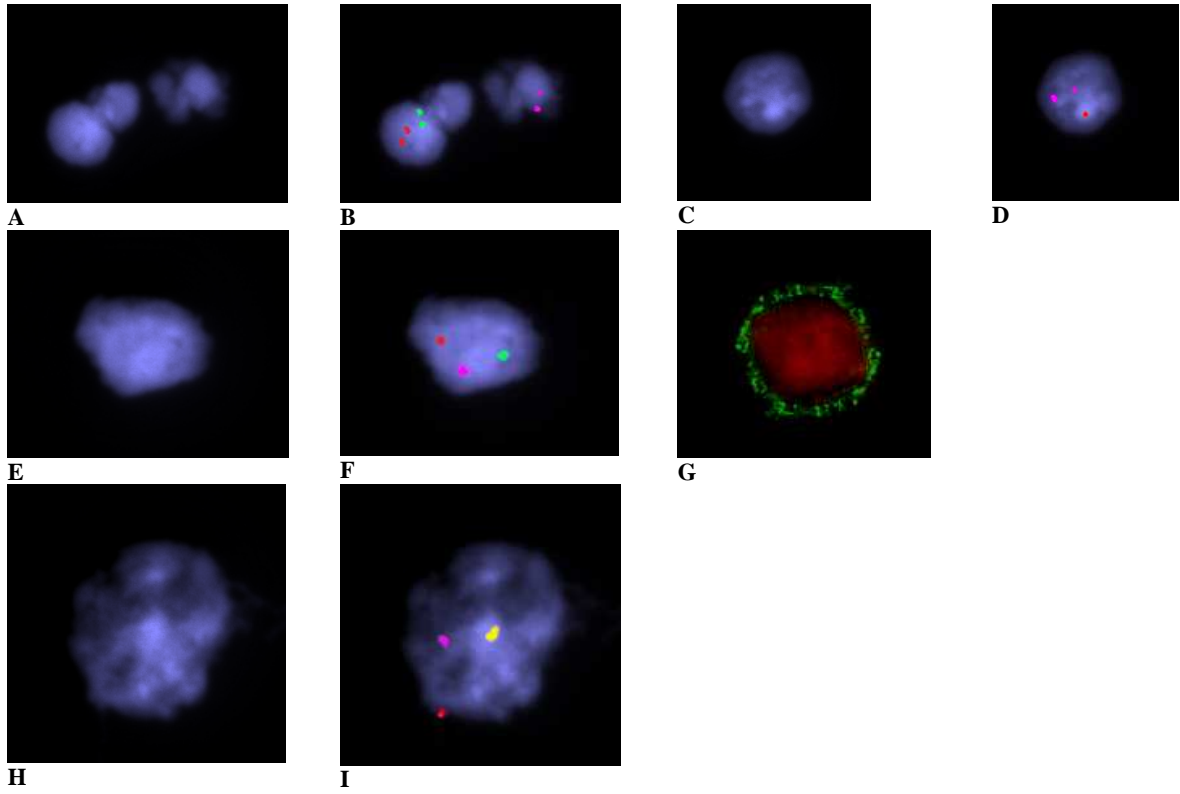


Fig.24 – Caso 27724. A – 1° PB; B – FISH; C – 2° PB; D – FISH; E – Pronúcleo feminino; F – FISH; G – IF; H – Pronúcleo masculino; I – FISH

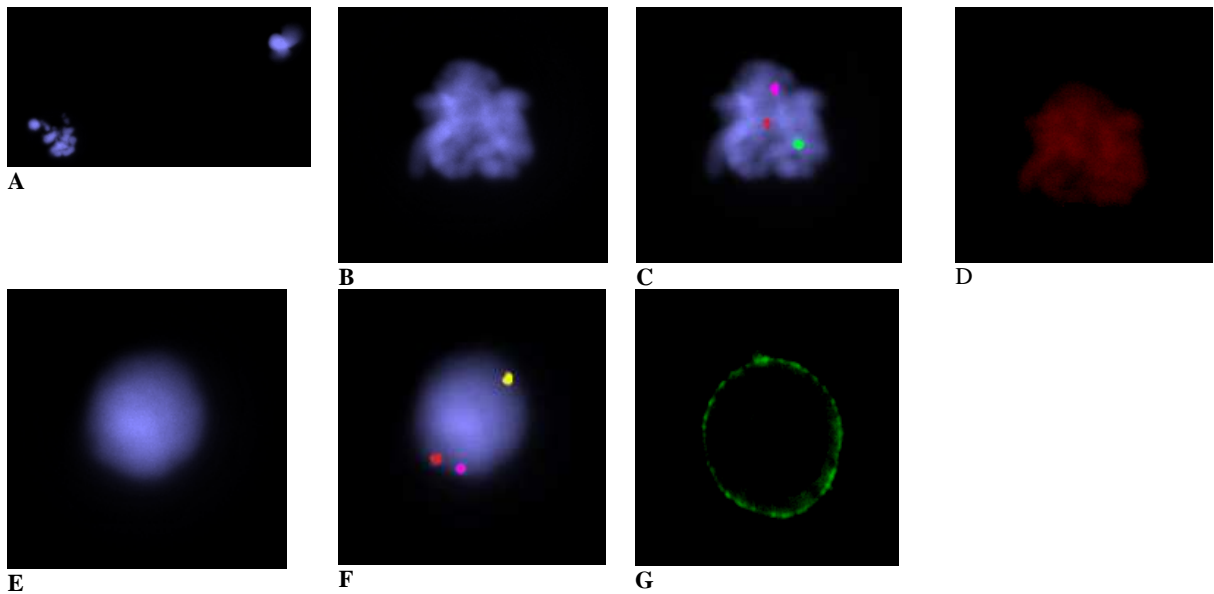


Fig.25 – Caso 27970. A – Glóbulos Polares; B – Pronúcleo feminino; C – FISH; D – IF; E – Pronúcleo masculino; F – FISH; G – IF

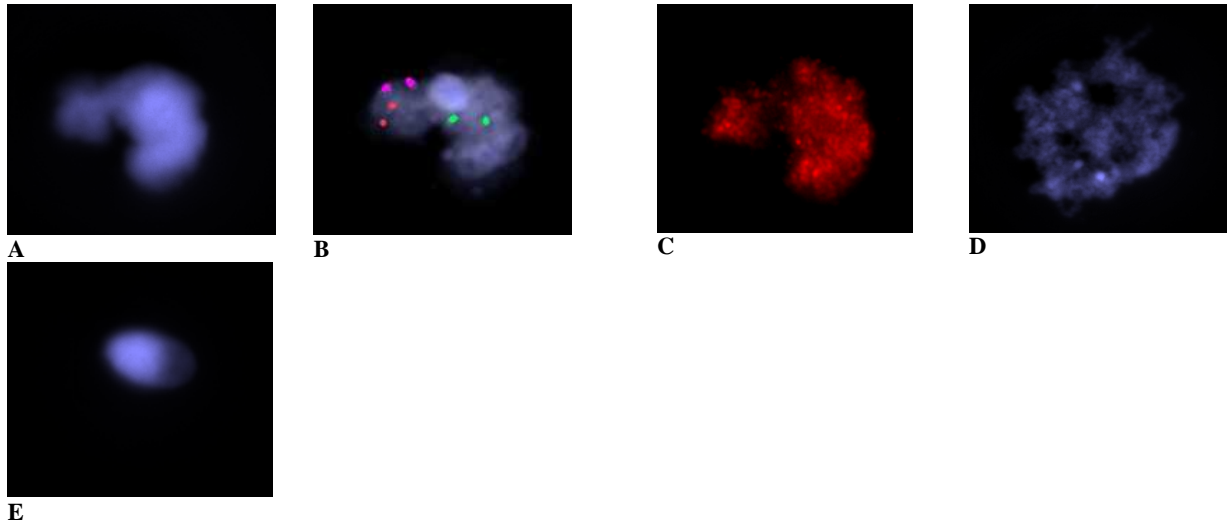


Fig.26 – Caso 27500. A – Pronúcleo feminino; B – FISH; C – IF; D – PB; E – Espermatozóide condensado

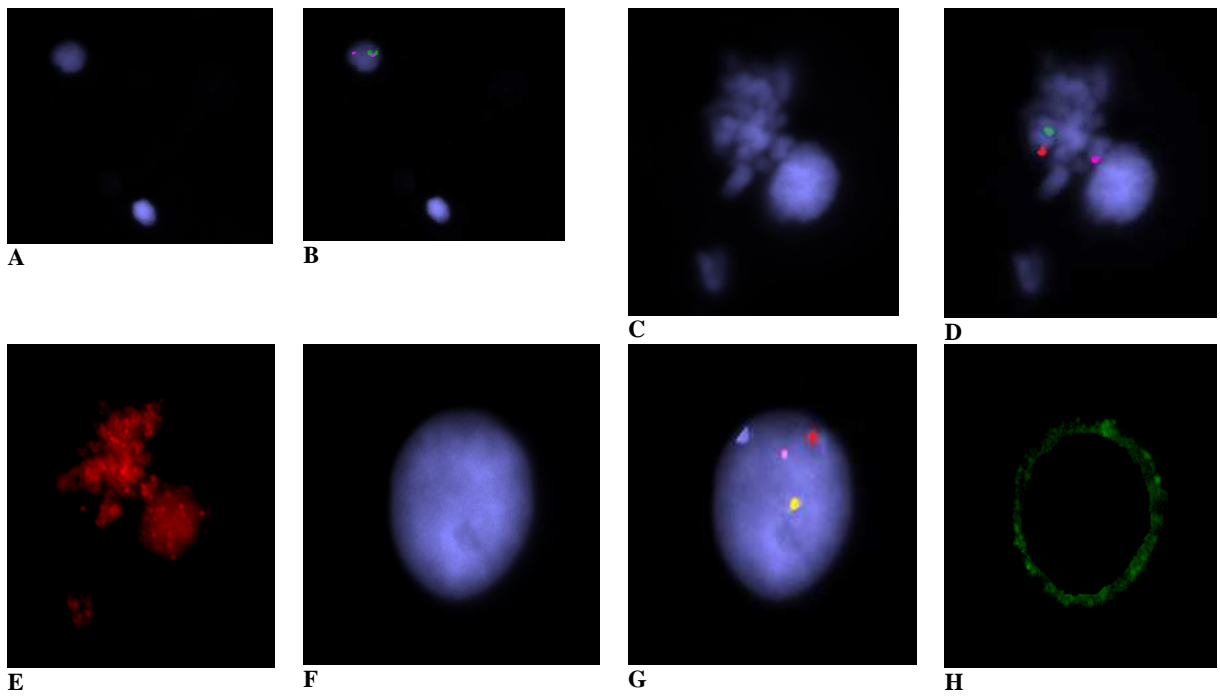


Fig.27 – Caso 13286. A – Glóbulos Polares; B – FISH; C – Pronúcleo feminino; D – FISH; E – IF; F – Pronúcleo masculino; G – FISH; H - IF

## 5 – Discussão

Após o nosso trabalho, precisávamos saber se a incidência de zigotos 1PN no Centro de Genética da Reprodução Prof. A. Barros estava dentro do intervalo descrito de 2-7% [13-20]. Fez-se um levantamento de todos os ciclos (ICSI e IVF) realizados entre 01.09.2006 e 30.08.07 no CGR, e a incidência total de zigotos 1PN foi de 6.6%, tendo a ICSI registado uma taxa de 6.9% e a IVF uma taxa de 5.45%. Estes valores não revelaram diferença entre ICSI e IVF ( $p=0.112$ ) e a taxa de incidência total encontra-se efectivamente dentro do intervalo descrito por outros autores. Neste período de tempo, a taxa de 2PN, para a ICSI foi de 69.2% e para a IVF 72.6%, e os dados revelaram diferenças entre as técnicas ( $p=0.038$ ).

Quanto aos resultados obtidos no nosso trabalho, no que respeita aos 16 zigotos 1PN2PB de IVF, observámos 1 (6.3%), em que considerámos ter ocorrido falha na fecundação do ovócito, visto que não encontrámos espermatozóide (caso 23495 – Tabela VI) e, conseqüentemente, o ovócito terá sofrido uma activação partenogénica. Noutro caso (6.3%) (25646 – Tabela VI), o mecanismo de aparecimento de 1PN foi a falha da descondensação do espermatozóide, mecanismo de formação já descrito previamente [14]. Quanto aos restantes 14 zigotos (87.5%), encontrámos dois pronúcleos após FISH e não apenas 1, ao contrário dos outros estudos realizados em zigotos [14, 15, 49]. Esta observação sugere um mecanismo diferente que iremos descrever aqui pela primeira vez. Aparentemente, estes casos devem-se a uma ruptura prematura do invólucro nuclear (pPNBD – premature pronuclear envelope breakdown), que consiste numa desagregação precoce das lamínas nucleares, o que faz com que o invólucro do pronúcleo se rompa prematuramente e deixe de ser visível na primeira observação ao microscópio para classificação dos zigotos. Destes 14 zigotos, 6 (42.9%) mostraram uma constituição cromossómica normal (os dois pronúcleos eram haplóides) e 8 (57.1%) apresentaram diploidia de um dos 2PN (5 feminina, 1 masculina, 2 dupla), o que sugere um fenómeno de endoduplicação ou a presença de aneuploidia germinal de base. Nos estudos realizados a endoduplicação foi sugerida em 81% dos casos de IVF em [17], 48% em [16] e 37% em [22].

Dos 2 zigotos 1PN1PB de IVF, naquele em que se observaram 2PN (50%), o mecanismo de formação de 1PN foi a pPNBD com não extrusão do segundo glóbulo polar e conseqüente diploidia do PN feminino. Quanto ao outro zigoto (50%), em que se

observaram três pronúcleos haplóides, ocorreu pPNBD com cariocinese do feminino (que seria inicialmente diplóide por não extrusão do segundo glóbulo polar). O facto de poder ocorrer cariocinese nos pronúcleos também não se encontra descrito nos estudos realizados previamente.

Nos 55 zigotos 1PN2PB de ICSI, 32 (58.2%) apresentaram alterações na descondensação do espermatozóide. Destes, 20 (62.5%) tinham o espermatozóide condensado e 12 (37.5%) apresentavam descondensação parcial do espermatozóide. Excepto num caso, todos apresentaram genomas haplóides (87.5%). No único com genoma feminino diplóide (3.1%) terá ocorrido endoduplicação precoce do DNA ou ser resultado de uma aneuploidia germinal de base (triploidia). O mecanismo que originou estes 32 zigotos foi a falha na descondensação do espermatozóide ou da activação do ovócito, mecanismo que em [18] é sugerido para 67% dos casos e em [22] para 31% dos casos. Dos 23 zigotos em que se observaram dois pronúcleos (41.8%), 16 (69.6%) apresentaram pronúcleos haplóides. Já em 6 (26.1%) um dos pronúcleos era diplóide (5 femininos, 1 masculino), o que sugere endoduplicação do DNA ou uma aneuploidia germinal. Um outro (4.3%) foi fecundado por um espermatozóide aneuplóide. Nestes 23 casos o mecanismo de formação foi a pPNBD.

Nos 8 zigotos 1PN1PB de ICSI, 4 (50%) apresentavam alteração na descondensação do espermatozóide, sendo que destes, 3 (75%) apresentavam o espermatozóide condensado e 1 (25%), o espermatozóide parcialmente descondensado. Em todos eles, o genoma feminino era anómalo, com diploidia (3) ou caótico (1). A diploidia é explicada pela não extrusão do segundo glóbulo polar, enquanto que a constituição caótica se deverá a uma endoreplicação desregulada do DNA materno, visto que o glóbulo polar tinha constituição cromossómica normal. O mecanismo que originou estes 4 zigotos foi a falha na descondensação do espermatozóide. Dos 4 (50%) zigotos em que observámos 2PN, 1 tinha pronúcleos haplóides (25%) e um glóbulo polar diplóide, sugerindo uma aneuploidia germinal feminina de base. Os outros 3 apresentaram diploidia feminina por não terem realizado a extrusão do segundo glóbulo polar. O mecanismo geral que levou ao aparecimento destes 4 zigotos com 2PN foi, mais uma vez, a pPNBD.

Para confirmarmos o novo mecanismo responsável pelo aparecimento de 1PN (pPNBD), foi decidido estudar alguns zigotos por Imunofluorescência, usando um anticorpo para as lamínas nucleares e um anticorpo para a Me(3)H3K9 (histona H3 tri-

metilada na lisina 9). A marcação das lamínas seria esperada ocorrer apenas no PN visível, demonstrando que no outro teria ocorrido pPNBD por fosforilação das lamínas e desagregação do invólucro nuclear. A marcação da histona H3, por ser específica da cromatina feminina, permitir-nos-ia distinguir o PN materno do PN paterno, caso apresentassem ambos cromossomas X. Ao diferenciarmos os pronúcleos, poderíamos observar qual deles sofreria pPNBD, se se verificasse o mecanismo.

Nos zigotos de IVF confirmou-se o mecanismo de pPNBD (Tabelas X e XI), tendo-se observado um predomínio de casos masculinos (60%). No zigoto 1PN1PB (Tabela XI) observou-se apenas invólucro nuclear num dos 3 pronúcleos confirmando a cariocinese do pronúcleo feminino.

Nos zigotos de ICSI veio a confirmar-se também a existência de pPNBD (Tabelas XII e XIII) em 31% dos casos quer no pronúcleo masculino, quer no pronúcleo feminino. Nos restantes casos não ocorreu descondensação do espermatozóide.

Comparativamente aos estudos efectuados previamente por outros autores em zigotos humanos monopronucleados [14, 15, 49], não observámos pronúcleos de origem bi-parental, nem em ICSI, nem em IVF, ou seja, não observámos ocorrência de cariogamia dos pronúcleos. Os nossos resultados são, portanto, contrários ao que tinha também sido observado em outros estudos anteriormente realizados usando embriões derivados de zigotos 1PN [18, 22].

## 6 – Considerações finais

Nos mecanismos de formação dos 1PN estudados, pôde observar-se que os mecanismos predominantes na ICSI são a não descondensação do espermatozóide, 37/64 (57.8%), confirmada pelos estudos [18, 22, 56] seguida da pPNBD, 27/64 (42.2%), e na IVF o mecanismo predominante é a pPNBD, 16/18 (89%) versus 2/18 (11%). No nosso estudo não considerámos a assincronia na formação dos pronúcleos, pois os zigotos que aparentemente apresentavam assincronia (estando um pronúcleo muito mais atrasado relativamente ao outro na descondensação da cromatina, mas já com cromossomas marcados) resultaram, no fundo, de uma alteração da descondensação do espermatozóide e foram contabilizados como pertencentes a esse mecanismo. Nos estudos anteriormente realizados, a assincronia foi sugerida como sendo o mecanismo por detrás da formação dos 1PN em 28% dos casos na ICSI e em 71% na IVF no estudo [18] e em 49% dos casos de IVF em [22], apesar destas observações só se basearem na observação do aparecimento de um segundo PN em alguns zigotos 1PN aquando da segunda classificação ao microscópio, 2-6h após a primeira observação.

A técnica de IF, no nosso estudo, confirmou a ocorrência de um mecanismo novo de pPNBD, envolvendo, de facto, a desagregação das lamínas nucleares e, portanto, do invólucro nuclear. Também descrevemos aqui pela primeira vez a possibilidade de ocorrer cariocinese nos pronúcleos, o que não tinha sido ainda observado em estudos anteriores. A cariocinese poderá estar relacionada com aneuploidias germinais de base.

Quanto à constituição cromossómica dos pronúcleos, a maioria (57/82, 69.5% haplóides; 25/82, 30.5% aneuplóides) apresentou uma constituição cromossómica normal. Os casos de monossomias/dissomias verificados nos cromossomas 18, 21 e X, estão de acordo com a incidência destas anomalias cromossómicas numéricas na população, sendo as mais frequentes [64].

Os zigotos 1PN são geralmente descartados em reprodução medicamente assistida por apresentarem um desenvolvimento anómalo, apesar de já terem ocorrido nascimentos pontuais depois da utilização destes [17, 24]. Avaliando indirectamente a possibilidade destes zigotos serem utilizados em reprodução medicamente assistida quando não haja zigotos 2PN2PB, pensamos que a maioria tem todo o potencial e constituição cromossómica para gerar um desenvolvimento embrionário normal, mas não podemos deixar de referir as anomalias numéricas que se verificam em alguns casos

e que coloca reticências na sua utilização. Por esse motivo, os casais com embriões gerados a partir de zigotos 1PN2PB só deverão utilizá-los após recurso a diagnóstico genético de pré-implantação (PGD).

## 7 – Bibliografia

1. Gilbert, S., *Developmental Biology*. 7ª ed. 2003: Sinauer Associates.
2. Bloom, W. e Fawcett, D.W., *A Textbook of Histology*. 1994, Chapman & Hall. 810-830.
3. Junqueira, L. e Carneiro, J., *Histologia Básica*. 10ª ed. 2004, Guanabara Koogan.
4. Griffiths, A., et al., *An Introduction to Genetic Analysis*. 7ª ed. 2002, New York.
5. Sousa, M., *Fertilização Animal in Biologia Celular e Molecular*, C. Azevedo, 2005, Lidel. p. 447-453.
6. Sá, R., Sousa M. e Barros A., *Manual do internato médico*, ed. ICBAS - Hospital de S. António, 2008: Afrontamento.
7. Arslan, M., Oehninger S., e Kruger T., *Clinical management of male infertility*, in *Male Infertility*, S.C. Oehninger, 2007, Informa UK Ltd. p. 333-344.
8. WHO, *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction* 4ª ed., 1999, Cambridge: Cambridge University Press.
9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, *Optimal evaluation of the infertile female*. *Fertil Steril*, 2004. **82 Suppl 1**: p. S169-72.
10. Hull, M.G., et al., *Population study of causes, treatment, and outcome of infertility*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1985. **291**(6510): p. 1693-7.
11. Adamson, G.D. e Baker, V.L., *Subfertility: causes, treatment and outcome*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003. **17**(2): p. 169-85.
12. Rowe, P., *Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple*, WHO, 1993, Cambridge University Press: New York.
13. Plachot, M., et al., *Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF*. *Hum Reprod*, 1989. **4**(8 Suppl): p. 99-103.
14. Balakier, H., Squire, J. e Casper, R.F., *Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and in-situ hybridization*. *Hum Reprod*, 1993. **8**(3): p. 402-8.
15. Levron, J., et al., *Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes*. *Biol Reprod*, 1995. **52**(3): p. 653-7.

16. Munne, S., et al., *Origin of single pronucleated human zygotes*. J Assist Reprod Genet, 1993. **10**(4): p. 276-9.
17. Staessen, C., et al., *Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization*. Hum Reprod, 1993. **8**(2): p. 221-3.
18. Sultan, K.M., et al., *Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1995. **10**(1): p. 132-6.
19. Munne, S. e Cohen, J., *Chromosome abnormalities in human embryos*. Hum Reprod Update, 1998. **4**(6): p. 842-55.
20. Feenan, K. e Herbert, M., *Can 'abnormally' fertilized zygotes give rise to viable embryos?* Hum Fertil (Camb), 2006. **9**(3): p. 157-69.
21. Capmany, G., et al., *The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(5): p. 299-306.
22. Staessen, C. e Van Steirteghem, A.C., *The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization*. Hum Reprod, 1997. **12**(2): p. 321-7.
23. Flaherty, S.P., et al., *Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1995. **10**(10): p. 2623-9.
24. Gras, L. e Trounson, A.O., *Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization*. Hum Reprod, 1999. **14**(7): p. 1869-71.
25. Krukowska, A. e Tarkowski, A.K., *Mouse zygotes with one diploid pronucleus formed as a result of ICSI can develop normally beyond birth*. Mol Reprod Dev, 2005. **72**(3): p. 346-53.
26. Suss-Toby, E., et al., *Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote*. Hum Reprod, 2004. **19**(3): p. 670-5.
27. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 5<sup>a</sup> ed. 2008, New York: Garland Science.
28. Fisher, D.Z., Chaudhary, N. e Blobel, G., *cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6450-4.
29. McKeon, F.D., Kirschner, M.W. e Caput, D., *Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins*. Nature, 1986. **319**(6053): p. 463-8.

30. Furukawa, A., Inagaki, H. e Hotta, Y., *Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice*. Exp Cell Res, 1994. **212**: p. 426-430.
31. Pollard, K.M., et al., *In vitro posttranslational modification of lamin B cloned from a human T-cell line*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2164-75.
32. Machiels, B.M., et al., *An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9249-53.
33. Biamonti, G., et al., *The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(8): p. 3499-506.
34. Stuurman, N., Sasse, B. e Fisher, P.A., *Intermediate filament protein polymerization: molecular analysis of Drosophila nuclear lamin head-to-tail binding*. J Struct Biol, 1996. **117**(1): p. 1-15.
35. Furukawa, K. e Hotta, Y., *cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells*. Embo J, 1993. **12**(1): p. 97-106.
36. Stuurman, N., Heins, S. e Aebi, U., *Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions*. J Struct Biol, 1998. **122**(1-2): p. 42-66.
37. Capco, D.G. e Penman, S., *Mitotic architecture of the cell: the filament networks of the nucleus and cytoplasm*. J Cell Biol, 1983. **96**(3): p. 896-906.
38. Moir, R.D., et al., *Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1155-68.
39. Goldman, R.D., et al., *Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture*. Genes Dev, 2002. **16**(5): p. 533-47.
40. Heald, R. e F. McKeon, *Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis*. Cell, 1990. **61**(4): p. 579-89.
41. Kornberg, R.D. e Lorch, Y., *Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome*. Cell, 1999. **98**(3): p. 285-94.
42. Arney, K.L., et al., *Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote*. Int J Dev Biol, 2002. **46**(3): p. 317-20.
43. Cowell, I.G., et al., *Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals*. Chromosoma, 2002. **111**(1): p. 22-36.
44. Lepikhov, K. e Walter, J. *Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote*. BMC Dev Biol, 2004. **4**: p. 12.

45. Kourmouli, N., et al., *Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2491-501.
46. Van der Heijden, G.W., et al., *Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote*. Mech Dev, 2005. **122**(9): p. 1008-22.
47. Santos, F., et al., *Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos*. Dev Biol, 2005. **280**(1): p. 225-36.
48. Xu, Y., et al., *DNA methylation patterns in human tripronuclear zygotes*. Mol Hum Reprod, 2005. **11**(3): p. 167-71.
49. Van der Heijden, G.W., et al., *Parental origin of chromatin in human monopronuclear zygotes revealed by asymmetric histone methylation patterns, differs between IVF and ICSI*. Mol Reprod Dev, 2008.
50. Sousa, M., et al., *Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification scheme*. Hum Reprod, 1999. **14**(5): p. 1279-86.
51. Sousa, M., et al., *Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells*. Hum Reprod, 2002. **17**(1): p. 161-72.
52. Tesarik, J., et al., *Fertilizable oocytes reconstructed from patient's somatic cell nuclei and donor ooplasts*. Reprod Biomed Online, 2001. **2**(3): p. 160-164.
53. Sousa, M., et al., *Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids*. Hum Reprod, 2002. **17**(7): p. 1800-10.
54. Alves, C., et al., *Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of Robertsonian translocations: the Portuguese experience*. Prenat Diagn, 2002. **22**(12): p. 1153-62.
55. Sousa, M. e Tesarik, J., *Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1994. **9**(12): p. 2374-80.
56. Tesarik, J., Sousa, M. e Testart, J., *Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1994. **9**(3): p. 511-8.
57. Tesarik, J. e Sousa, M., *Comparison of Ca<sup>2+</sup> responses in human oocytes fertilized by subzonal insemination and by intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 1994. **62**(6): p. 1197-204.
58. Tesarik, J. e Sousa, M., *Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca<sup>2+</sup> fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation*. Fertil Steril, 1995. **64**(4): p. 770-6.

59. Tesarik, J. e Sousa, M., *More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore*. Fertil Steril, 1995. **63**(2): p. 343-9.
60. Tarkowski, A.K., *An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs*. Cytogenetics, 1966. **5**: p. 394-400.
61. Coonen, E., et al., *Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescence in-situ hybridization*. Hum Reprod, 1994. **9**(3): p. 533-7.
62. Harper, J.C., et al., *Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes*. Hum Reprod, 1994. **9**(4): p. 721-4.
63. Baart, E.B., et al., *Distribution of Atr protein in primary spermatocytes of a mouse chromosomal mutant: a comparison of preparation techniques*. Chromosoma, 2000. **109**(1-2): p. 139-47.
64. Jones, K.T., *Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(2): p. 143-58.

# Anexos

## **Anexo 1**

### **Soluções**

#### **Soluções para Hibridização in situ com fluorescência (FISH)**

##### Tampão de lise:

Num tubo de centrífuga cônico adicionar:

- 2.5µl de Tween 20 (Cat. N° P1379)
- 2.5ml de H<sub>2</sub>O-Embryo Transfer (Cat. N° W1503)
- 25µl de HCl (1N) (Cat. N° H9892)
- Agitar suavemente

##### Solução Stock de Pepsina:

Numa câmara de fluxo laminar:

- A 10ml de H<sub>2</sub>O-Embryo Transfer adicionar 0.1g de pepsina (Cat. N°P7000)
- Homogeneizar
- Filtrar a solução (com filtros redondos de seringa)
- Distribuir a solução por *ependorfs* (1ml em cada *ependorf* e armazenar a -20°C

##### Solução de Pepsina:

Num copo para lâminas adicionar:

- 98ml de água destilada
- 1ml de HCl (1N) (Cat. N° H9892)
- colocar o copo num banho-maria a 37°C
- 1ml de pepsina da solução stock (adicionar a pepsina só quando a solução tiver atingido os 37°C)

##### Mistura de sondas para hibridização in situ com fluorescência:

Num *ependorf*:

- 7µl de tampão de hibridização LSI
- 1µl de sonda CEPX espectro verde (região Xp11.1-q11.1)
- 1µl de sonda CEP18 espectro azul (região 18p11.1-q11.1)
- 1µl de sonda LSI 21 espectro vermelho (região 21q22.13-q22.2)

- 0.5µl de sonda YSATIII espectro vermelho (região p11.3)
- 0.5µl de sonda YSATIII espectro verde

(a mistura entre as sondas YSATIII espectro vermelho e verde permite a observação ao microscópio de um espectro amarelo)

Preparação de 20xSSC (saline sodium citrate):

- 175.3g de Cloreto de sódio 3M (Cat. Nº 16818)
- 88.3g de Citrato de sódio 0.3M (Cat. Nº W302600)
- Perfazer com 1L de H<sub>2</sub>O destilada

Solução de Formamida (60%):

Numa proveta

- 42ml de formamida (a formamida tem que ser manipulada na hotte)
- 7ml de 20xSSC
- 21ml de H<sub>2</sub>O destilada
- Agitar e passar a solução para um copo de lâminas

Solução de 2xSSC (a partir da solução de 20xSSC):

Num copo para lâminas

- 7ml de 20xSSC
- 63ml de H<sub>2</sub>O destilada

Solução de 4xSSC/0.05% Tween 20:

Numa proveta

- 80ml de H<sub>2</sub>O destilada
- 20ml de 20xSSC
- 250µl de Tween 20 a 20% (armazenado a 4°C)
- Agitar e passar a solução para um copo de lâminas

Solução de PBS:

- dissolver 2 pastilhas de PBS (Cat. Nº P4417) em 400ml de H<sub>2</sub>O destilada

Solução de Etanol a 70%:

- 70ml de etanol puro (Cat. Nº 1.00983.2511)

- 30ml de H<sub>2</sub>O destilada

Solução de Etanol a 96%:

- 96ml de etanol puro
- 4ml de H<sub>2</sub>O destilada

Solução de Paraformaldeído:

Num frasco Sigma F-1635:

- a 500ml de Paraformaldeído (formalina, 37% - Cat. N° 47670) adicionar cerca de 5cm de Hidrogenocarbonato de sódio (Cat. N° S-4019) para saturar a solução (armazenar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz)

Solução 1% de Paraformaldeído:

- 49ml de PBS
- 1.34ml de Paraformaldeído
- guardar a solução a 4°C

**Soluções para Imunofluorescência (IF)**

Solução de 0.25% Triton X-100:

- 25µl de Triton X-100 (Cat. N° T8787)
- 10ml de PBS

Solução de 1% de BSA:

- pesar 0.1g de BSA (Cat. N° A3311)
- adicionar a 10ml de PBS

Solução de PBST (0.5% Tween20):

- 50µl de Tween20
- 9.95ml de PBS

Solução de 1% de BSA em PBST:

- pesar 0.1g de BSA

- adicionar a 10ml de PBS

Solução de mistura dos anticorpos primários:

- 1µl de anticorpo ab8898, *rabbit polyclonal to Histone H3, tri methylated at lysine 9*
- 10µl de anticorpo ab20740, *mouse monoclonal to pan Lamin*
- 489µl de 1% de BSA em PBST

Solução de mistura dos anticorpos secundários:

- 1µl de anticorpo ab6564, *goat polyclonal to rabbit IgG – H&L* conjugado com Cy5
- 6µl de anticorpo sc-2078, *goat anti-mouse IgG1* - conjugado com FITC
- 593µl de 1% de BSA em PBST

**Anexo 2 - Dados dos casais que realizaram IVF (cujos zigotos 1PN foram seleccionados para FISH)**

Código	FA	MA	INS	2PN	1PN	1PN1PB	1PN2PB	C	MPR	MN	D
25541	30	40	19	17	2	0	2				
25454	39	32	7	4	1	0	1				
25646	33	33	18	15	2	0	2				
24853	36	36	7	4	1	0	1				
24060	34	34	10	6	1	0	1				
23844	35	37	10	6	1	1	0				
20543	36	42	9	7	2	0	2	42	20	5	
23495	36	40	16	12	1	0	1				D
25097	34	39	16	11	2	0	2				D
25677	34	39	7	6	1	0	1	43	30	8	
9802	40	41	7	5	1	0	1	253	23	13	
<b>TOTAIS</b>	<b>387</b>	<b>413</b>	<b>126</b>	<b>93</b>	<b>15</b>	<b>1</b>	<b>14</b>				
<b>Médias</b>	<b>35,2</b>	<b>37,5</b>	<b>11,5</b>	<b>8,5</b>	<b>1,4</b>						

FR=2PN/INS	73,8%
1PNrate=1PN/INS	11,9%
1PN1PB=1PN1PB/1PN	6,7%
1PN2PB=1PN2PB/1PN	93,3%
F1PN=1PN/nºciclos	1,4

**Legenda:** **FA** – idade da mulher; **MA** – idade do homem; **INS** – ovócitos inseminados; **2PN** – zigotos com dois pronúcleos (normais); **1PN** – zigotos monopronucleados; **1PN1PB** – zigotos com um pronúcleo e um glóbulo polar; **1PN2PB** – zigotos com um pronúcleo e dois glóbulos polares; **C** – concentração total de espermatozóides após espermograma (10<sup>6</sup> por mL); **MPR** – percentagem de espermatozóides progressivos rápidos; **MN** – percentagem de espermatozóides com morfologia normal; **D** – esperma de dador

### Anexo 3 - Dados dos casais que realizaram ICSI (cujos zigotos 1PN foram seleccionados para FISH)

Código	FA	MA	COC	MII	2PN	1PN	1PN1PB	1PN2PB	AZO	C	MPR	MN
25346	31	33	8	7	4	1	0	1				
24262	36	39	10	10	7	1	0	1				
24654	36	39	8	7	5	1	0	1				
24161	31	30	9	9	4	3	1	2				
25573	29	28	18	16	12	1	0	1				
24914	32	32	9	8	7	1	0	1				
23793	34	34	8	7	5	1	0	1		123	32	5
12677	31	33	24	20	14	3	0	3				
25047	36	29	16	16	12	1	0	1		0	2	má morfologia (anterior 3%)
26233	29	29	11	11	8	1	0	1		1	11	4
26113	36	33	6	6	5	1	0	1		125	27	7
25704	34	32	9	7	4	1	0	1		28	14	5
21554	36	32	9	8	7	1	0	1		28	26	9
25265	31	32	9	8	6	1	0	1		2	9	1
17047	35	35	14	13	12	1	0	1		128	34	0
19943	33	37	12	5	3	1	0	1		146	4	1
26137	32	31	9	9	8	1	0	1		3	2	0
25784	35	33	9	9	7	1	0	1		12	27	4
26461	33	36	7	7	2	2	1	1		45	11	4
25577	40	41	6	6	4	1	0	1		1	2	
19623	34	37	8	7	5	1	0	1		210	62	15
26684	38	41	18	14	10	3	3	0				
25960	27	29	11	10	5	4	1	3		26	58	3
26619	34	43	8	6	4	1	0	1		0	29	
12652	39	39	11	8	5	1	0	1	AZO			
25785	35	39	6	6	5	1	0	1		6	12	2
19575	34	37	13	13	11	1	0	1				
24857	32	37	10	8	5	2	0	2		35	5	1
22240	32	48	15	13	10	3	0	3		7	19	2
24914	33	32	12	10	8	1	0	1		21	40	3
26976	36	37	15	9	6	2	0	2		69	51	2
15260	33	33	8	8	7	1	0	1		30	19	10
25315	32	34	10	10	6	3	0	3		10	20	3
24895	20	33	12	10	5	1	0	1	AZO			
TOTAIS	1129	1187	368	321	228	50	6	44				
Médias	33,2	34,9	10,8	9,4	6,7	1,5						

FR=2PN/MII 71,0%  
 1PNrate=1PN/MII 15,6%  
 1PN1PB=1PN1PB/1PN 12,0%  
 1PN2PB=1PN2PB/1PN 88,0%  
 F1PN=1PN/Nºciclos 1,5  
 Mrate=MII/COC 87,2%

**Legenda:** FA – idade da mulher; MA – idade do homem; COC – número de folículos obtidos; MII – ovócitos MII injectados; 2PN – zigotos com dois pronúcleos (normais); 1PN – zigotos monopronucleados; 1PN1PB – zigotos com um pronúcleo e um glóbulo polar; 1PN2PB – zigotos com um pronúcleo e dois glóbulos polares; AZO – azoospermia C – concentração total de espermatozóides após espermograma (10<sup>6</sup> por mL); MPR – percentagem de espermatozóides progressivos rápidos; MN – percentagem de espermatozóides com morfologia normal

**Anexo 4 - Dados dos casais que realizaram IVF (cujos zigotos 1PN foram seleccionados para IF)**

Código	FA	MA	INS	2PN	1PN	1PN1PB	1PN2PB	C	MPR	MN	D
26837	36	38	11	6	2	0	2	89	69	8	
27361	35	40	5	3	1	1	0	72	76	10	
28039	35	38	8	6	1	0	1				D
27410	36	37	9	3	2	0	2				D
<b>TOTAIS</b>	<b>142</b>	<b>153</b>	<b>33</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>5</b>				
<b>Médias</b>	<b>35,5</b>	<b>38,3</b>	<b>8,3</b>	<b>4,5</b>	<b>1,5</b>						

FR=2PN/INS	54,5%
1PNrate=1PN/INS	18,2%
1PN1PB=1PN1PB/1PN	16,7%
1PN2PB=1PN2PB/1PN	83,3%
F1PN=1PN/nºciclos	1,5

**Legenda:** **FA** – idade da mulher; **MA** – idade do homem; **INS** – ovócitos inseminados; **2PN** – zigotos com dois pronúcleos (normais); **1PN** – zigotos monopronucleados; **1PN1PB** – zigotos com um pronúcleo e um glóbulo polar; **1PN2PB** – zigotos com um pronúcleo e dois glóbulos polares; **C** – concentração total de espermatozóides após espermograma (10<sup>6</sup> por mL); **MPR** – percentagem de espermatozóides progressivos rápidos; **MN** – percentagem de espermatozóides com morfologia normal; **D** – esperma de dador

**Anexo 5 - Dados dos casais que realizaram ICSI (cujos zigotos foram seleccionados para IF)**

Código	FA	MA	COC	MII	2PN	1PN	1PN1PB	1PN2PB	C	MPR	MN
27724	33	35	7	6	4	1	0	1	6	28	1
13286	33	35	7	7	6	1	1	0	35	3	1
27500	43	38	2	2	0	2	1	1	51	65	10
27970	33	33	6	5	4	1	0	1	44	17	2
26684	39	41	16	13	9	2	1	1	4	12	1
24023	35	39	7	6	4	1	0	1	32	4	2
27905	35	34	16	15	10	1	0	1	31	17	2
27618	35	36	6	6	5	1	0	1	20	29	3
8006	34	37	9	8	6	1	0	1	105	30	11
26678	35	36	12	11	6	1	0	1			
26915	41	38	10	10	8	1	0	1	32	52	2
25882	36	37	16	14	11	1	0	1	25	62	4
21642	33	37	7	7	6	1	0	1	160	25	12
17931	36	36	7	6	4	1	0	1	27	0	1
28038	31	34	6	6	5	1	0	1	75	55	9
25933	35	38	7	6	3	1	0	1	21	1	1
27168	36	44	14	13	8	1	0	1			
<b>TOTAIS</b>	<b>603</b>	<b>628</b>	<b>155</b>	<b>141</b>	<b>99</b>	<b>19</b>	<b>3</b>	<b>16</b>			
<b>Médias</b>	<b>35,5</b>	<b>36,9</b>	<b>9,1</b>	<b>8,3</b>	<b>5,8</b>	<b>1,1</b>					

FR=2PN/MII 70,2%  
 1PNrate=1PN/MII 13,5%  
 1PN1PB=1PN1PB/1PN 15,8%  
 1PN2PB=1PN2PB/1PN 84,2%  
 F1PN=1PN/Nºciclos 1,1  
 Mrate=MII/COC 91,0%

**Legenda:** **FA** – idade da mulher; **MA** – idade do homem; **COC** – número de folículos obtidos; **MII** – ovócitos MII injectados; **2PN** – zigotos com dois pronúcleos (normais); **1PN** – zigotos monopronucleados; **1PN1PB** – zigotos com um pronúcleo e um glóbulo polar; **1PN2PB** – zigotos com um pronúcleo e dois glóbulos polares; **AZO** – azoospermia **C** – concentração total de espermatozóides após espermograma (10<sup>6</sup> por mL); **MPR** – percentagem de espermatozóides progressivos rápidos; **MN** – percentagem de espermatozóides com morfologia normal

**Anexo 6 – Imagens de zigotos antes de serem processados**



Fig.A – Zigoto 1PN2PB de ICSI (Amp. x1000)



Fig.B – Zigoto 1PN1PB de ICSI (Amp. x1000)



Fig.C – Zigoto 1PN2PB de IVF (Amp. x1000)