

NOTA TÉCNICA

Caracterización morfométrica de ovocitos de *Bubalus bubalis* en Cuba

Mara Dunia Quintana^I, P.E.C. Campos^I, P. Herrera^I, C. Gallego^{II}, E. Padrón^{III}

^IUniversidad Agraria de la Habana (UNAH). Facultad de Medicina Veterinaria. Departamento Clínica. Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: mdutra@isch.edu.cu;

^{II}Instituto de Ciencia Animal (ICA), Carretera Central km 47 1/2, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba;

^{III}Empresa Pecuaria Genética Bubalina «El Cangre», El Cangre km 6 1/2, Güines, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: Con el objetivo de caracterizar morfométricamente los ovocitos de *Bubalus bubalis*, se evaluaron 274 complejos cúmulo-ovocitos, extraídos por el método de disección quirúrgica de los folículos superficiales de 48 ovarios. Los ovocitos se obtuvieron mediante la maduración *in vitro*, la captura de los mismos se realizó bajo visión estereoscópica con capilares y se procedió a removerlos de las células del cúmulo. Los indicadores evaluados fueron: diámetro total del ovocito, diámetro del citoplasma y espesor de la zona pelúcida. Los ovocitos se maduraron en TCM 199 con 10% de SFB durante 24 h a 37°C. A las 24 horas de maduración *in vitro* se les realizaron las mismas mediciones bajo visión microscópica. Los datos se procesaron por prueba T para comparación de medias. Los valores obtenidos fueron para el diámetro total 154,61µm vs. 167,14µm, para el citoplasma 145,21µm vs. 148,46µm y para la zona pelúcida 7,85µm vs. 17,79µm (ovocitos inmaduros vs. maduros, respectivamente). Se evidenció que el incremento del diámetro total responde fundamentalmente al aumento del grosor de la zona pelúcida en 9,94 µm. Este tipo de caracterización se realiza por primera vez en Cuba para *Bubalus bubalis* y es parte de los elementos previos para la realización de biotecnologías relacionadas con el proceso reproductor.

Palabras clave: ovocitos, desarrollo, maduración, *Bubalus bubalis*, morfometría.

Morphometric characterization of *Bubalus bubalis* oocytes in Cuba

ABSTRACT: In order to morphometrically characterize *Bubalus bubalis* oocytes, 274 oocyte-cumulus complexes were evaluated. They were extracted by the surgical dissection method of the superficial follicles of 48 ovaries. The oocytes were obtained by *in vitro* maturation. Their capture was carried out under stereoscopic vision with hair, removing the cumulus cells. The indicators evaluated were: total diameter of oocyte, cytoplasm diameter and thickness of the pellucid zone. Oocytes were matured in TCM 199 with 10% FBS for 24 hours at 37°C. After 24 hours of *in vitro* maturation, the same measurements under microscopic vision were performed. Data were processed by t-test for mean comparison. The values obtained were: for the overall diameter: 154.61µm vs. 167.14µm, for cytoplasm: 145.21µm vs. 148.46µm and for the pellucid zone: 7.85µm vs. 17.79µm (immature oocytes vs. mature oocytes, respectively). It was evidenced that the overall diameter increase responds primarily to the thickness increase of the pellucid zone (PZ) at 9.94µm. This type of characterization has been carried out for *Bubalus bubalis* for the first time in Cuba, and it is part of the previous elements in performing biotechnologies related to the reproductive process.

Key words: oocytes, development, maturation, *Bubalus bubalis*, morphometry.

INTRODUCCIÓN

La maduración ovocitaria es un fenómeno complejo, durante el cual el ovocito progresa desde el estadio de diplotene hasta el de metafase II (maduración nuclear). Se necesita un periodo de 24 horas para que el

ovocito complete la maduración nuclear (1) y alcance el estadio de metafase II, en el que permanece hasta el momento de la fertilización, que es cuando completa la meiosis y se forman los pronúcleos.

Además de la maduración nuclear, el ovocito también soporta una maduración citoplasmática, que pre-

para al ovocito para soportar la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplasmática). Cuando el ovocito culmina todos estos cambios con éxito, completa la competencia meiótica. Los cambios señalados se demuestran con un desarrollo de la morfometría de los ovocitos Palma *et al.* (2); en la especie bovina como modelo demuestran que los diámetros de los ovocitos pueden variar de 150 a 190µm de inmaduros hasta maduros, lo cual puede servir de comparación para la especie bufalina.

En Cuba no se ha realizado este tipo de estudio en la especie y tal caracterización puede ayudar al desarrollo de biotecnologías reproductivas en el búfalo de agua; por lo que el objetivo de este trabajo fue la caracterización morfométrica de los ovocitos antes y después de la *maduración in vitro*, comparando las dimensiones totales, así como el diámetro del citoplasma y el espesor de la zona pelúcida (ZP).

Se utilizaron 274 ovocitos obtenidos a partir de 48 ovarios de hembras bufalinas sacrificadas, provenientes de una Empresa Pecuaria Genética. Los ovarios se trasladaron en 500mL de solución salina al 0,9% y a una temperatura de 29,09±1,2°C.

La extracción de los ovocitos se realizó por el método de disección quirúrgica de los folículos superficiales, fijando cada ovario previamente ubicado en una placa Petri de 60mm de diámetro con una pinza quirúrgica y seccionando la pared de cada folículo con un micro-escalpelo oftálmico. El contenido folicular se diluyó en 10mL de PBS con (10% de Suero fetal bovino, 100UI/mL de penicilina, 0,1mg/mL de estreptomina y 0,25µg/mL de anfotericina B (SIGMA, A5955) previamente depositado en la placa. Para realizar las mediciones los ovocitos fueron desnudados de las células del cúmulo mediante agitación mecánica con una pipeta Gilson (P 1000) en una placa bajo visión microscópica a 40x en microscopio Leica DMIL tipo 090-135.001. Se midieron los diámetros del ovocito total y del citoplasma, así como el espesor de la ZP con ayuda de un micrómetro acoplado a la platina del microscopio.

La *maduración in vitro* (MIV) se realizó en medio Tissue Culture Medium 199 suplementado con bicarbonato (m4530) , 0,2mL de Sodio piruvato, 10µg/mL LH, 40µg/mL de FSH, 10µg/mL de 17b-estradiol, 0,2µg/mL de EGF, 1mL de L-Glutamina, Suero Fetal Bovino al 10% (SFB) y 10µg/mL de gentamicina a razón de 400 µL/pozo durante 24 horas en una incubadora Micro Galaxy a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂.

Para evaluar la MIV se observó la presencia del primer cuerpo polar ubicado en el espacio perivitelino de cada ovocito maduro, con ayuda de un microscopio de

40X y se procedió a medir el diámetro total, el diámetro del citoplasma y el espesor pelúcida de los ovocitos cultivados por 24 horas en medios de maduración.

Se realizó estadística descriptiva y correlación entre las tres variables, con ayuda del paquete estadístico Statgraphics 5.1; también se realizó un test «t» de comparación de medias para los datos de los ovocitos antes y después de la MIV.

Los resultados muestran el incremento del diámetro total del ovocito a expensas fundamentalmente de la ZP (p<0,05) Tabla 1. Ebner *et al.* (3) plantearon que el ovocito maduro de los mamíferos mide entre 110-115µm hasta el oolema. Sin embargo, las dimensiones de los ovocitos bufalinos obtenidas en este experimento fueron superiores, coincidiendo con Palma *et al.* (2), quienes plantean que los ovocitos en el vacuno miden entre 150 y 190µm si se comparan antes y después de la *maduración in vitro* (MIV), por lo que concordamos con este resultado.

TABLA 1. Diámetro total, diámetro del citoplasma y de la ZP del ovocito bufalino antes y después de la *maduración in vitro*./ *Total diameter, cytoplasm diameter and PZ of buffalo oocyte before and after in vitro maturation*

Ovocito	Inmaduro (µm)	Maduro(µm)
Diámetro total	154,61a	167,14b
Diámetro citoplasmático	145,21a	148,46a
ZP	7,85a	17,79b

Letras desiguales por fila: p≤0,05

Sirard *et al.* (4) refirieron que el mayor desarrollo ovocitario se encuentra luego de pasar la MIV, aspecto que consideramos en los resultados de esta investigación. En el búfalo los estudios de esta naturaleza son escasos, Chauhan *et al.* (5) plantean que los ovocitos en esta especie alcanzan las 160µm después de la MIV, nuestros resultados están en el rango y se asume que la mayor parte de los ovocitos que crecieron hasta 160µm presentan características morfométricas para formar un embrión.

El aumento del diámetro total de ovocito maduro está relacionado con el diámetro del citoplasma y el espesor de la ZP al llegar al estadio de metafase II (MII) (6) con una maduración completa del citoplasma y del núcleo. La diferencia en el diámetro total de 12,53µm entre el ovocito inmaduro y el maduro *in vitro* lo demuestra, dicho aspecto también es planteado por Brevini-Gandolfi y Gandolfi (7).

Independientemente de los elementos que influyen en el aumento del diámetro total del ovocito (el citoplasma y la ZP), se observó que la media del diámetro del citoplasma varía en solo 3µm de un ovocito inmaduro a uno maduro, sin diferencias significativas. Palma *et al.* (2) demuestran una diferencia de 10µm, se considera que nuestros resultados puede estar dados por las diferencias entre estas dos especies bovinas.

Como indicador de maduración se tomó en cuenta la presencia del primer cuerpo polar en el espacio perivitelino, demostrando una tasa de *MIV* del 55%, resultados ligeramente inferiores a los obtenidos por Gupta *et al.* (8).

El espesor de la ZP fue superior para los maduros con una media de 17,79µm. (Tabla 1), Ebner *et al.* (3) plantearon que la ZP mide en todos los mamíferos de 12 a 15µm y Palma *et al.* (4) plantearon diámetros entre 15 y 20µm, por lo que nuestros resultados están dentro de estos intervalos, descrito por los autores antes mencionados.

El desarrollo de la ZP (9) se relaciona con los eventos de reconocimiento y unión al espermatozoide, la reacción acrosómica y el bloqueo de la polispermia. Criterios similares fueron expresados por Wassarman y Litscher (10) y en cuanto a la importancia de la zona pelúcida (11, 12) después de la maduración para la obtención de un embrión de buena calidad

Se concluye que el tamaño de los ovocitos de la especie bubalina aumenta en cuanto a su diámetro luego de haber pasado la *MIV*, esencialmente a expensas del espesor de la ZP.

Este resultado, obtenido por primera vez en Cuba, contribuye al conocimiento de la fisiología de la reproducción en los búfalos de agua y puede ser una herramienta para la realización de biotecnologías reproductivas.

REFERENCIAS

- Cecconi S, Mauro A, Capacchietti G. Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocytes is induced by paracrine factor(s) released by gonadotropin-stimulated oocytes-cumulus cell complexes and involves mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*. 2008;149(1):100-107.
- Palma GA. Producción in vitro de embriones bovinos. *Biología de la Reproducción*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires. 2001;225-294.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M. editors. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development. *Hum Reprod*. 2003;9:251-262.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006;65:126-136.
- Chauhan MS, Singla SK, Palta P. *In-vitro* maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos: effects of oocytes quality and type of sperm. *Reprod Fertil Dev*. 1998;10:173-177.
- Gasparrini B, Atanasio L, De Rosa A. Cryoconservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Anim. Reprod Sci*. 2007;98(3-4):335-342.
- Brevini-Gandolfi TAL, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*. 2001;55:1255-1276.
- Gupta PSP, Ramesh HS, Nandi S. Recovery of large preantral follicles from buffalo ovary: effect of season and corpus luteum. *Anim. Reprod Sci*. 2007;101:145-152.
- Barisone GA, Krapf D, Correa-Fiz F. Glycoproteins of the vitelline envelope of Amphibian oocyte: biological and molecular characterization of ZPC component (gp41) in *Bufo arenarum*. *Mol Reprod Dev*. 2007;74:629-640.
- Wassarman PM, Litscher ES. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5-6):665-676.
- Litscher ES, Wassarman PM. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol*. 2007;22:337-347.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol Reprod*. 2008;78:796-806.

Recibido: 8-12-2011.

Aceptado: 20-6-2012.