

Principales alteraciones morfológicas en ovocitos de ovino madurados *in vitro*



Main morphological alterations in ovine oocytes matured *in vitro*

<http://opn.to/a/nITgL>

Sarahí Hernández-Martínez ¹, María del Carmen Navarro-Maldonado ¹, Demetrio Alonso Ambríz-García ¹, José Roberto Vázquez-Avenidaño ¹, José Ernesto Hernández-Pichardo ^{2*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.

²Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México.

RESUMEN: El ovocito es indispensable para el desarrollo embrionario de un organismo. Actualmente, su calidad se evalúa considerando parámetros morfológicos que permiten identificar alteraciones que comprometen el desarrollo del embrión. Sin embargo, en ovocitos de ovino, hasta el momento, no se han reportado anomalías morfológicas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia y el tipo de alteraciones morfológicas en ovocitos de borrega. Para ello se realizaron 10 colectas, de las que se obtuvieron 567 ovarios procedentes de hembras sacrificadas en rastro y, mediante aspiración folicular, se lograron 2 374 ovocitos; todos ellos fueron madurados *in vitro*. De acuerdo a los criterios de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), 798 ovocitos (33,6 %) se clasificaron de morfología normal y 1 576 (66,4 %) presentaron diferentes alteraciones morfológicas, como citoplasma granuloso (32,6 %), citoplasma incompleto (21,1 %), espacio perivitelino aumentado (11,7 %), presencia de vacuolas (11,6 %), ovocitos degenerados (8,9 %), alteraciones de la zona pelúcida (7 %), exudados citoplasmáticos (4,7 %), dimorfismo del cuerpo polar (0,3 %) y alteraciones producidas por la técnica de manejo, como la ausencia de zona pelúcida (2,1 %). Se concluye que, dada la alta tasa de anomalías morfológicas en los ovocitos de ovinos madurados *in vitro*, es importante su minuciosa selección para obtener mejores resultados en el desarrollo embrionario *in vitro*.

Palabras clave: alteraciones ovocitarias, evaluación morfológica, maduración *in vitro*, ovino.

ABSTRACT: The oocyte is indispensable for the embryonic development of an organism. Its quality is currently evaluated considering the morphological parameters that allow identifying the alterations that compromise the development of the embryo. So far, no morphological abnormalities have been reported in sheep oocytes. The objective of this study was to determine the frequency and type of morphological alterations in them. For this, 10 collections were carried out, of which 567 ovaries were obtained from slaughtered females and 2 374 oocytes were obtained by follicular aspiration; all of them matured *in vitro*. According to the criteria of the Association for the Study of Reproductive Biology (ASEBIR), 798 oocytes (33.6 %) were classified as normal morphology and 1 576 (66.4 %) presented different morphological alterations, as granular cytoplasm (32.6 %), incomplete cytoplasm (21.1 %), increased perivitelline space (11.7 %), presence of vacuoles (11.6 %), degenerated oocytes (8.9 %), abnormalities of the pellucid zone (7 %), cytoplasm exudates (4.7 %), polar body dimorphism (0.3 %), and alterations produced by the management technique, like the absence of pellucid zone (2.1 %). It is concluded that, given the high rate of morphological abnormalities in the *in vitro* maturation of oocytes, their detailed selection is important to obtain better results in the *in vitro* embryonic development.

Key words: oocyte alterations, morphological evaluation, *in vitro* maturation, ovine.

*Autor para correspondencia: José Ernesto Hernández-Pichardo: E-mail: ehernan@correo.xoc.uam.mx

Recibido: 09/06/2017

Aceptado: 05/04/2018

INTRODUCCIÓN

El ovocito se considera como único, al poseer cualidades que lo hacen diferente de las demás células del cuerpo; sin embargo, su cualidad más importante es la de ser la célula gestora del desarrollo embrionario preimplantacional. Actualmente ha sido materia de intensa investigación por ser el componente más importante en el potencial del desarrollo embrionario, por lo que se ha llegado a considerar que el éxito clínico de las técnicas de reproducción asistida se sustenta en la calidad ovocitaria (1).

La evaluación morfológica es una de las técnicas más utilizadas para determinar, de forma inmediata, la calidad del ovocito. En humanos, cerca del 60 % al 70 % de los ovocitos exhiben una o más características anormales, por lo que, al presentar estas alteraciones morfológicas o dimorfismos, permiten establecer parámetros puntuales de evaluación (2).

Algunas características morfológicas anormales del ovocito, a nivel citoplasmático y extracitoplasmático, pueden influir en los procesos de la reproducción animal asistida, como son: la fecundación, la formación y la morfología de los pronúcleos, la división embrionaria, el desarrollo embrionario, la calidad embrionaria, la formación del blastocito, la implantación, el embarazo bioquímico (embarazo no confirmado por la visualización de un embrión en ultrasonido) y la formación de aneuploidías (2).

Actualmente, la mayoría de los estudios de evaluación ovocitaria se realizan en humanos, debido al gran avance en las clínicas de reproducción asistida con técnicas como la fertilización *in vitro* (FIV) y la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) (3), mientras que en animales no se han descrito anomalías, especialmente en ovinos domésticos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue describir la frecuencia de las alteraciones morfológicas presentes en ovocitos de ovino doméstico madurados *in vitro* (MIV).

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de ovarios

Se colectaron ovarios de ovejas domésticas (*Ovis aries*) tipo criollo, sacrificadas en un rastro del Estado de México. Los ovarios se transportaron al laboratorio en un termo con solución salina fisiológica (NaCl 0,9 % y 1 % de antibiótico y antimicótico), a una temperatura de 30-35 °C, en un tiempo máximo de una hora (4).

Obtención y selección de Complejos Ovocito Cúmulo (COC)

En el laboratorio, los ovarios se lavaron tres veces consecutivas con solución salina fisiológica isotérmica. Los Complejos Ovocito Cúmulo (COC) se obtuvieron por aspiración de folículos ováricos de 2-5 mm de diámetro, utilizando una aguja hipodérmica de calibre 20G x 32 mm y una jeringa de 10 mL. Para ello se empleó medio de cultivo de tejidos 199 (TCM-199) con Hepes suplementado con 100 UI/mL de Sal de Sodio de Heparina (5).

Los COC recuperados se contabilizaron para calcular la tasa de obtención y, posteriormente, se colocaron en placas Petri de 55 mm de diámetro, para clasificarlos usando un microscopio estereoscópico (Olympus, SZ61). La clasificación de los COC se realizó por el número de capas de células de la granulosa sobre la base de los criterios de Kakkassery *et al.* (6):

Clase A: Caracterizados por tener más de cinco capas de células del cúmulo.

Clase B: Ovocitos con tres a cinco capas completas de células del cúmulo.

Clase C: Ovocitos con una a dos capas completas de células del cúmulo.

Clase D: Ovocitos desnudos.

Maduración *in vitro* de ovocitos

Una vez seleccionados los COC de Clase A-B, se lavaron dos veces consecutivas en 1 mL de medio con heparina. Para la maduración *in vitro* (MIV) se usaron placas estériles de cuatro pozos (Thermo-Scientific Nunc, Rochester NY), colocando 50 COC en cada pozo con 500 µL de medio de maduración a base de TCM-199 sin Hepes suplementado con Cisteína (0,57 mM), D-glucosa (3,05 mM), Alcohol polivinílico (0,1 %),

Piruvato de sodio (0,91 mM), 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB), Hormona Coriónica Humana (hCG, 5 UI/mL), Hormona Folículo Estimulante (FSH, 1.3 µL/mL), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) (10 µg/mL) y Antibiótico-antimicótico 100X (2 %); los pozos se cubrieron con aceite mineral. Los COC se incubaron durante 21 horas a 38 °C, 5 % de CO₂ en aire y 60 % de humedad relativa (7).

Denudación de los Complejos Ovocito Cúmulo

De acuerdo a la metodología de Kragh *et al.* (8), después del periodo de MIV los ovocitos fueron desprovistos de sus células del cúmulo; para ello, todos los COC se recuperaron de la caja de cultivo y se colocaron en un vial que contenía 500 µL de hialuronidasa (0,5 mg/mL). Durante cinco minutos se realizó pipeteo constante; luego, el contenido del vial se vació en una placa Petri que contenía TCM-199 con Heps suplementado con 2 % de SFB para inactivar la reacción enzimática. Los ovocitos se clasificaron en dos grupos: de morfología normal y ovocitos dañados. Estos últimos, a su vez, se evaluaron de acuerdo a los criterios de ASEBIR (2) para identificar el tipo y la frecuencia de las siguientes alteraciones:

- Alteraciones morfológicas citoplasmáticas:
 - Agrupación de orgánulos/granulosidad central en el ovocito.
 - Agregación del Retículo Endoplasmático Liso (AREL).
 - Presencia de vacuolas.
 - Inclusiones citoplasmáticas: cuerpos refringentes y no refringentes.
 - Citoplasma incompleto.
 - Ovocitos degenerados.

- Alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas:

Restos celulares en el espacio perivitelino: exudados.

Anomalías de la zona pelúcida: grosor, color oscuro o deformación.

Espacio perivitelino aumentado.

Alteraciones del primer corpúsculo polar: tamaño, número y fragmentación.

Análisis estadístico

Para determinar si el porcentaje de ovocitos obtenidos con alteraciones morfológicas difería del porcentaje con morfología normal, se realizó la prueba de Chi-cuadrada de inferencia sobre una proporción mediante el paquete estadístico NCSS versión 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron 10 repeticiones y se colectaron 567 ovarios, de los cuales se obtuvieron 2 374 ovocitos, con una tasa de 4,2 ovocitos por ovario. De los ovocitos obtenidos, 798 (33,6 %) se clasificaron con morfología normal y 1 576 con alteraciones morfológicas (66,4 %) (Tabla 1). En la Tabla 2 se enumeran las alteraciones morfológicas citoplasmáticas identificadas en ovocitos de ovino madurados *in vitro*.

La presencia de alteraciones morfológicas en el ovocito compromete el desarrollo y la calidad del futuro embrión; sin embargo, la causa de estas alteraciones, en muchos casos, no ha sido esclarecida, tampoco la relación que existe con las características intrínsecas del propio ovocito (9). Actualmente, los reportes en esta temática solo se encuentran descritos para la especie humana, por lo que no hay datos documentados y comparables en la especie ovina.

Faramarzi *et al.* (10) clasificaron ovocitos de humanos y reportaron tan solo 23 % de ovocitos

TABLA 1. Obtención de ovocitos con morfología normal y alterada. / *Obtaining oocytes with normal and altered morphology.*

Ovarios	Tasa de obtención	Ovocitos			
		Obtenidos (n)	Morfología normal n(%)	Alteración morfológica n(%)	
Total	567	4,2*	2 374	798(33,6) ^a	1 576(66,4) ^b

^{a,b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

*Promedio de ovocitos obtenidos por ovario.

TABLA 2. Principales alteraciones morfológicas en ovocitos de ovino madurados *in vitro*. / *Main morphological alterations in sheep oocytes matured in vitro.*

Alteraciones	Categorías	Total n(%)
Citoplasmáticas	Citoplasma granuloso	513(32,6)
	Citoplasma incompleto	333(21,1)
	Presencia de vacuolas	183(11,6)
	Ovocitos degenerados	141(8,9)
Extracitoplasmáticas	Espacio perivitelino aumentado	184(11,7)
	Alteración de la zona pelúcida	111(7,0)
	Exudados citoplasmáticos	74(4,7)
	Dimorfismo del cuerpo polar	4(0,3)
Por técnica	Sin zona pelúcida	33(2,1)

con morfología normal y 77 % de ovocitos que presentaron alguna alteración morfológica, lo que es similar a lo reportado en este trabajo (34 y 66 %, respectivamente).

Considerando que el ovino es una especie monovular como los humanos, lo que representa un modelo animal óptimo por su cercanía con la fisiología reproductiva, la humana (11), una de las anomalías que con mayor frecuencia presentan los ovocitos de humanos es el citoplasma granuloso. Este puede deberse al colapso de algunos organelos celulares, como el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi (9). Esta anomalía se encontró en el 32,6 % de los ovocitos de ovino evaluados.

El citoplasma incompleto fue la segunda anomalía más frecuente en los ovocitos ovinos (21,1 %) y, aunque se desconoce la causa de esta anomalía, se ha relacionado con los procesos apoptóticos que desencadenan la condensación del citoplasma (12).

La presencia de numerosas vacuolas es común en ovocitos de ovino (11) y se describen como lagunas de absorción de líquido del espacio perivitelino, consecuencia de una posible dilatación del retículo endoplásmico liso y del aparato de Golgi (13). Su frecuencia en humanos va desde 3 % (10), 3,9 % (14) y 5-12 % (15); datos similares a lo encontrado en el presente estudio en ovocitos de ovino (11,6 %). Por otro lado, la disminución en el número de vacuolas se relaciona con el proceso de maduración y con la edad en ovinos, disminuye su número durante la maduración y su presencia es menor en animales prepúberes. Se desconoce el contenido de las vacuolas, aunque se supone que son ricas en

lípidos saturados como el ácido palmítico y esteárico, los mismos que componen los triglicéridos de los ovocitos de ovino, bovino y porcino (16).

Otzuki *et al.* (17) mencionan la presencia de grupos, o agregados de retículo endoplásmico liso, como una de las anomalías presentes en ovocitos humanos que pueden causar alteraciones en el trofoectodermo afectan la masa celular interna del blastocisto y causan anomalías en él. Stigliani *et al.* (18) observaron que estos agregados semejan vacuolas y se derivan de alteraciones en el citoesqueleto. También señalan que se presentan en ovocitos en MII y que afectan la competencia del ovocito debido a una señalización anormal del calcio durante su activación, una actividad respiratoria anormal de las mitocondrias, los errores cromosómicos y la citocinesis anormal.

El espacio perivitelino aumentado se relaciona con una sobremaduración del ovocito y su frecuencia va de 15 % (14) a 22 % en humanos (10), lo cual se encuentra por encima de lo observado en este estudio (11,7 %).

En cuanto a las alteraciones de la zona pelúcida (engrosamiento, oscuridad, deformación, etc.), se relacionan con la foliculogénesis cuando esta capa de glicoproteínas se sintetiza; en humanos se presenta con una frecuencia de 15 % (14) a 16 % (10). Estos valores están por encima de lo obtenido en este trabajo (7 %).

Los exudados citoplasmáticos son causados por un deterioro de la zona pelúcida y la estimulación excesiva de gonadotropinas; su frecuencia está reportado en humanos por

Famarzi *et al.* (10) en 22 %, valor también por encima de lo aquí obtenido (4,7 %).

El dimorfismo del cuerpo polar (tamaño, fragmentación, etc.) se asocia con una carencia de la formación del huso meiótico y daños generados por el proceso de MIV. Sousa *et al.* (14) reportan 10 a 15 % de frecuencia, mientras que Famarzi *et al.* (10) informan 23 %. Nuevamente, estos valores en humano superan a lo encontrado en esta especie en el presente estudio (0,3 %).

Ebner *et al.* (19) mencionan que algunas alteraciones involucradas con la organización del citoplasma, la concentración de ATP, la formación del huso mitótico y la distribución de los cromosomas se debe a una disminución del aporte sanguíneo al folículo que genera hipoxia en ovocitos humanos.

Se concluye que, dada la alta tasa de anomalías morfológicas presentes en los ovocitos de oveja doméstica madurados *in vitro*, es importante efectuar una selección minuciosa y evaluar su calidad, basada en la morfología del ovocito y, posteriormente, implementar técnicas de evaluación de la calidad, con la finalidad de obtener mejores resultados en el desarrollo embrionario *in vitro* en esta especie.

REFERENCIAS

1. Aguilar-Piña RE. El regreso del ovocito: de la olvidada transferencia citoplasmática a la actual transferencia del huso meiótico. *Rev Mex Med Reprod.* 2012;4(3):132-138.
2. ASEBIR. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción, Criterios ASEBIR de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de embriología clínica, 3ª edición, España. 2015.
3. Ingilizova G, Ivanov D, Kovachev E, Evrev M, Kostov I, Necheva V. Oocyte quality as a predictive marker for assessment of IVF/ICSI procedure outcome. *Akush Ginekol.* 2014;53(6):41-46.
4. Palma G. Biotecnología de la Reproducción, Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1ª edición, Argentina. 2001.
5. Robledo-Verduzco JM, Herrera-Camacho J, Cajero-Juárez M, Navarro-Maldonado MC, García-Valladares A. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. *Trop Subtrop Agroecosyst.* 2004;10(1):95-99.
6. Kakkassery MP, Vijayakumaran V, Sreekumaran T. Effect of cumulus oocyte complex morphology on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *J Vet Anim Sci.* 2010;41:12-17.
7. Rodríguez-Suástegui JL, Romo-García S, Ducolomb I, Casas-Hernández E, Hernández-Pichardo J. Desarrollo de mórulas de ovino en medio simple o secuencial: relación entre evaluación morfológica y viabilidad embrionaria. *Rev Salud Anim.* 2017;39(1):9-18.
8. Kragh PM, Vajta G, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Callesen H. Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(3):315-318.
9. Dal Canto M, Guglielmo MM, Mignini RM, Fadini R, Moutier C, Merola M, et al. Dysmorphic patterns are associated with cytoskeletal alterations in human oocytes. *Hum Reprod.* 2017;32(4):750-775
10. Famarzi A, Mohammad AK, Ashourzadeh S. Oocyte morphology and embryo morphokinetics in an intra-cytoplasmic sperm injection programme. Is there a relationship? *Zygote.* 2017;7:1-7.
11. Palmerini MG, Nottola SA, Leoni GG, Succu S, Borshi X, Berlinguer F, et al. *In vitro* maturation is slowed in prepubertal lamb oocytes: ultrastructural evidences. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:115.
12. Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology.* 2003;47(1):73-81.
13. Wallbutton S, Kasraie J. Vacuolated oocytes: fertilization and embryonic arrest following intra-cytoplasmic sperm injection in a patient exhibiting persistent oocyte macro vacuolization-Case report. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(4):183-188.
14. Sousa M, Cunha M, Silva J, Oliveira E, Joao M, Almeida C, et al. Ultrastructural and

- cytogenetic analyses of mature human oocyte dysmorphisms with respect to clinical outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33:1041-1057.
15. Yu EJ, Ahn H, Lee JM, Jee BC, Kim SH. Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. *Clin Exp Reprod Med.* 2015;42:156-162.
16. Reader KL, Cox NR, Stanton J-AL, Juengel JL. Effects of acetyl L-carnitine on lamb oocyte blastocyst rate, ultrastructure and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology.* 2015;83(9):1484-1492.
17. Otsuki J, Iwasaki T, Katada Y, Tsutsumi Y, Tsuji Y, Furuhashi K, et al. A higher incidence of cleavage failure in oocytes containing smooth endoplasmic reticulum clusters. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(5):899-905.
18. Stigliani S, Moretti S, Casciano I, Canepa P, Remorgida V, Anserini P, et al. Presence of aggregates of smooth endoplasmic reticulum in MII oocytes affects oocyte competence: molecular based evidence. *Mol Hum Reprod.* 2018;24(6):310-317.
19. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod.* 2002;17:2415-2418.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.