

**ESTUDIO MORFOLOGICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA  
MORULACION EN LA OVEJA \*\*\***

**(MORPHOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY OF  
THE MORULATION IN SHEEP)**

*Por M. Arias \**  
*F. Ferrer \**  
*C. García \**  
*L. Anel \*\**  
*y J. Ramos\**

Palabras clave: ultraestructura, mórula, oveja.  
Key words: ultrastructure, morula, sheep.

**SUMMARY**

A study was made of the morulation in the sheep embryos with special attention on the morphological and ultrastructural characteristics. For this embryos are classified in three stages depending of the number of cells, early morula (8-16 cells), intermediate morula (16-40 cells) and late morula (more than 40 cells).

The observed modifications was describes during the development of the morula. The results were discussed in relationship, with the differentiation of the blastocyst of two different cell populations, trophoblast and inner cell mass.

**RESUMEN**

Se realiza un estudio de la morulación en el embrión ovino atendiendo a sus características morfológicas y ultraestructurales. Para ello se clasifican los embriones en

---

\* Dpto. de Biología Celular y Anatomía. Universidad de León.

\*\* Dpto. de Patología Animal: Sanidad Animal. Universidad de León.

\*\*\* Este trabajo ha sido realizado con cargo a un proyecto de investigación subvencionado por la Comisión Mixta, Excma. Diputación Provincial - Universidad de León.

tres estadios dependientes del número de células, mórula joven (8-16 células), mórula intermedia (16-40 células) y mórula tardía (más de 40 células).

Se describen las modificaciones observadas durante el desarrollo de la mórula. Se discuten los resultados en relación con la posterior segregación en el blastocisto de dos poblaciones celulares diferenciadas, trofoblasto y masa interna celular.

## INTRODUCCION

El estudio de las fases de preimplantación en los embriones de mamíferos domésticos es de gran importancia por su aplicación en las técnicas de micromanipulación embrionaria. La evaluación morfológica de los embriones es considerada como prerrequisito para la realización de cultivos, congelación y transferencia de embriones. Por otra parte, la determinación de las características ultraestructurales de las primeras fases embrionarias permite establecer una población estándar, con la cual puedan ser comparados los embriones manipulados.

Se han realizado numerosos trabajos relacionados con la estructura de las primeras fases embrionarias en animales de experimentación<sup>5, 8, 9, 11, 16, 21, 29</sup>. En los animales domésticos las investigaciones se refieren principalmente a la vaca<sup>1, 2, 4, 17, 18</sup>; siendo, sin embargo, muy escasos en la oveja<sup>3</sup>.

La fase de morula representa una etapa clave en el desarrollo embrionario. Durante la morulación se produce un cambio en la adhesividad entre las células y una reordenación en las mismas, que dará lugar a su posterior diferenciación en células trofoblásticas y embrioblásticas.

El propósito de este trabajo es realizar un estudio detallado a nivel ultraestructural, con el fin de analizar la evolución que sufren los embriones de oveja, desde la fase de morula inicial (8-16 células) hasta que se produce la compactación celular.

## MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo, se analizaron embriones de oveja de raza churra, a las cuales les fue inducido y sincronizado el estro, mediante la implantación de esponjas vaginales impregnadas en acetato de fluorogestona, la superovulación fue posteriormente provocada por la administración de FSH (i.m.) en dosis decrecientes.

La recogida de embriones se realizó mediante laparotomía medial seguida de un lavado de trompas y cuernos uterinos con medio PBS. Se estudiaron veinticuatro embriones, previamente clasificados al microscopio óptico invertido como: mórula joven (8-16 células) correspondiente a 72-96 horas post-coito; mórula intermedia (16-40 células), de noventa y seis a ciento treinta y dos horas y mórula tardía (más de cuarenta células), de ciento treinta y dos a ciento cincuenta y seis horas. Para ello, se siguieron los criterios morfológicos siguientes: Estadio de desarrollo, forma y tamaño celular; presencia de granulaciones o vacuolizaciones en las células, presencia de degeneración celular o zona pelúcida deteriorada. Estos mismos criterios son utilizados por diferentes autores<sup>4, 21</sup>.

Los embriones se procesaron para el análisis ultraestructural al microscopio electrónico de transmisión, sometiéndolos a una primera fijación durante una hora a 4 °C, con Glutaraldehído al 2% en 0,1M tampón-fosfato a pH 7,4. A continuación se realizó la postfijación de tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón durante una hora a temperatura ambiente. Después de la deshidratación con alcoholes y óxido de propi-

leno, las piezas se incluyeron en Epon 812. Los cortes obtenidos se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico operando a 60 kv.

## RESULTADOS

La descripción de las características morfológicas y ultraestructurales de la morulación, se hace considerando tres etapas de mórula, en relación con el número de células.

### *Mórula joven* (8-16 células) (Fig. 1).

En la fase de ocho células, que corresponde a embriones obtenidos a las ochenta y cuatro horas post-coito, los blastómeros se caracterizan por su forma redondeada con un núcleo ligeramente ovalado. Estas células se aplanan en las zonas de vecindad, si bien, a veces, permanecen aisladas y conservan su forma redondeada. Su superficie presenta microvellosidades dispersas y poco abundantes. El espacio perivitelino es reducido y contiene escaso material extracelular de aspecto floculento y amorfo. (Fig. 2).

Es importante señalar, también, la presencia de algunas células de aspecto degenerado y sin membrana citoplasmática, pero identificables por la presencia de algunos orgánulos, como mitocondrias, reconocibles en su interior.

En el núcleo celular destaca la presencia de acúmulos de cromatina, tanto dispersos en el nucleoplasma como asociados a la cara interna de la membrana. Se observan, también, áreas de aspecto granular y menos electrodensas. El nucléolo de forma redondeada, es denso y con material granular, presentando en su interior una zona vacuolizada. (Fig. 3).

La característica más representativa del citoplasma es la presencia de gran número de vesículas distribuidas al azar. Su tamaño varía considerablemente, oscilando entre 140 nm y 1  $\mu$  m. Están rodeadas por una membrana y albergan en su interior un contenido muy claro. En general se encuentran aisladas, pero no es infrecuente verlas confluir. Dispersas entre estas vesículas se encuentran abundantes mitocondrias. Aunque su morfología es variada, observándose distintos tipos (bacilar, redondeada, en gancho o con forma de U), los más frecuentes son las formas bacilar y redondeada. Es de destacar también su electrodensidad, con una media de 4-6 crestas, siendo frecuente encontrar en su interior vesículas de retículo endoplásmico liso. (Fig. 4).

Destaca también en el citoplasma la presencia de grandes inclusiones lipídicas localizadas principalmente en la periferia celular. Ocasionalmente, pueden encontrarse estrechamente asociadas. Asimismo, los ribosomas son muy abundantes y dispersos en el citoplasma. En determinadas zonas próximas al núcleo se localizan otros orgánulos como, retículo endoplásmico, glucógeno y complejo de Golgi, compuesto por cisternas tubulares asociadas a pequeñas vesículas. En la zona cortical del citoplasma se observan numerosas vesículas de pinocitosis, microfilamentos y microtúbulos en disposición paralela a la membrana celular.

Por otra parte, creemos de interés señalar que en esta fase, los blastómeros llegan a contactar estrechamente en algunas zonas, sin embargo, no se reconocen especializaciones de unión. (Fig. 4).

La morula de dieciséis células, que corresponde a embriones obtenidos a las noventa y seis horas post-coito, presenta unas características ultraestructurales muy similares a las anteriormente descritas, si bien se observa la presencia de uno o dos nucléolos de

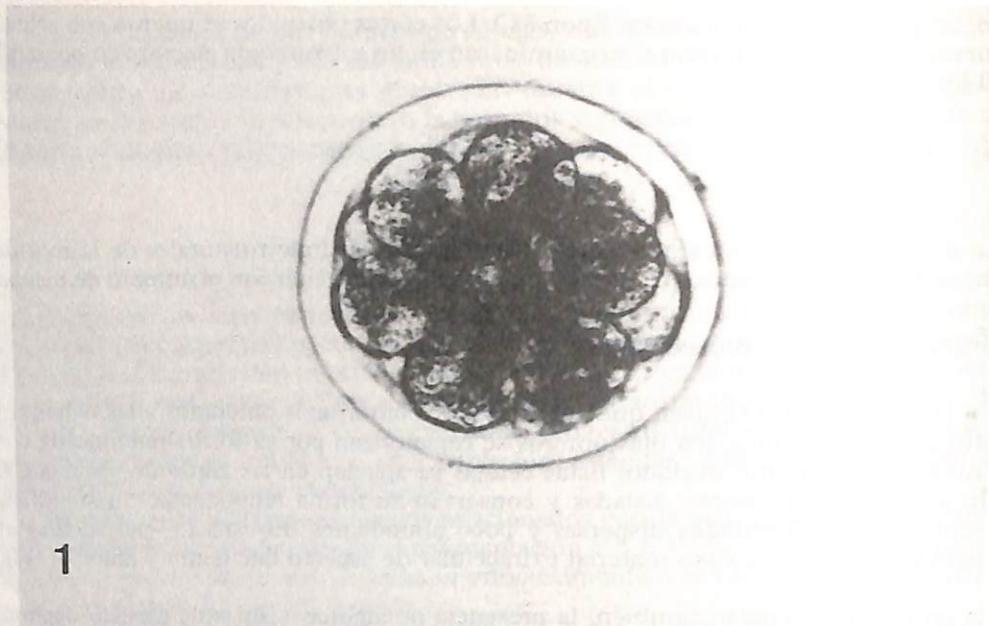


Fig. 1.- Embrión de dieciséis células observado al microscopio óptico invertido. 400 x.

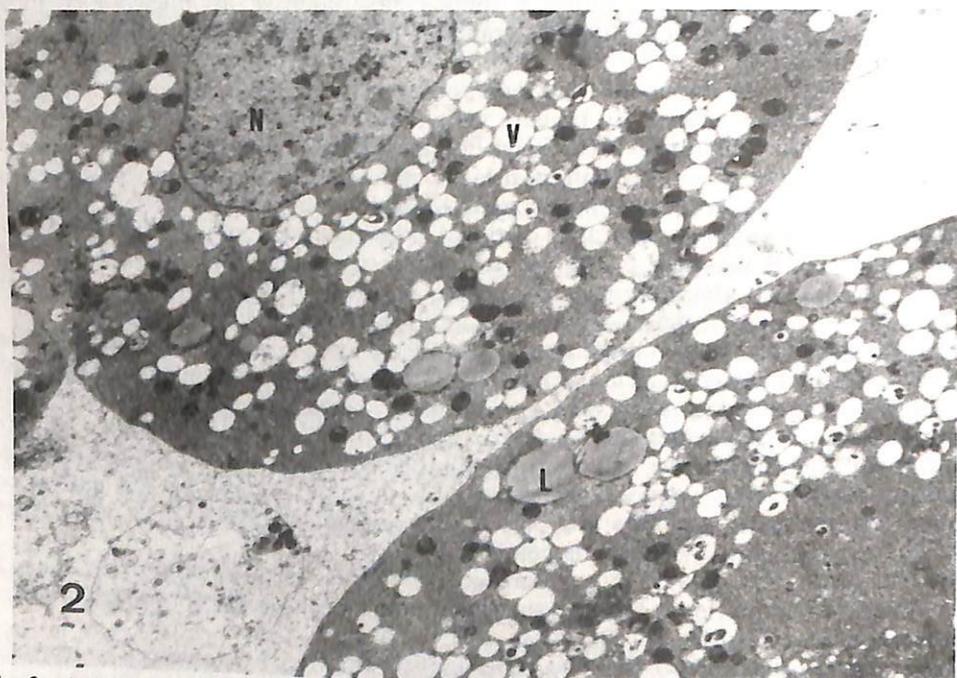


Fig. 2.- Aspecto parcial de un embrión de ocho células. N, núcleo; V, vesículas; L, inclusiones lipídicas. 7.200 x.

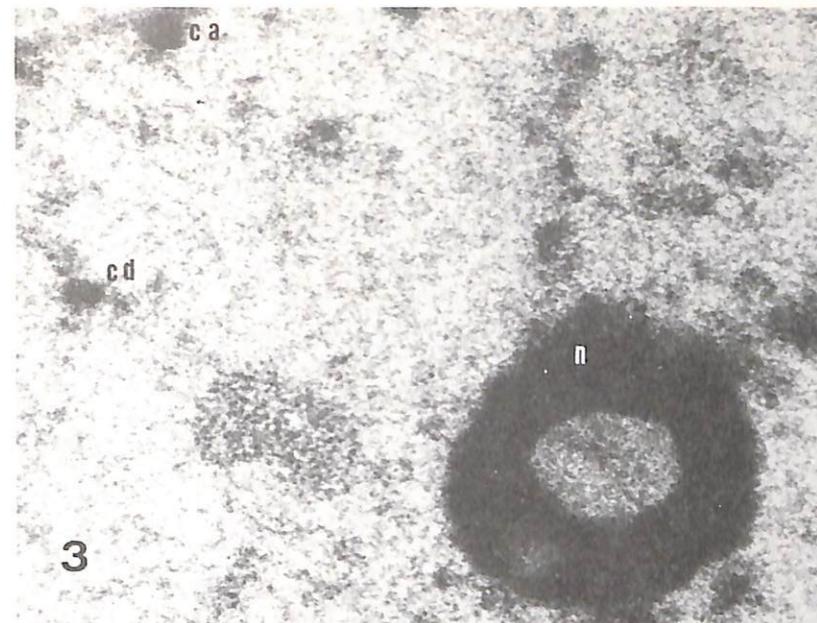


Fig. 3.- Micrografía electrónica de un embrión de ocho células, mostrando detalle de un núcleo. Nótese el denso nucléolo (n) con una zona vacuolizada en su interior; cd, condensación dispersa de cromatina; ca, cromatina asociada a la membrana nuclear 84.000 x.



Fig. 4.- Micrografía mostrando la aposición de dos células de una mórula joven. Destaca también la presencia de mitocondrias (m), de diferentes tipos asociadas a retículo endoplásmico (flecha). Nótese también la presencia de vesículas de pinocitosis (v). 24.000 x.

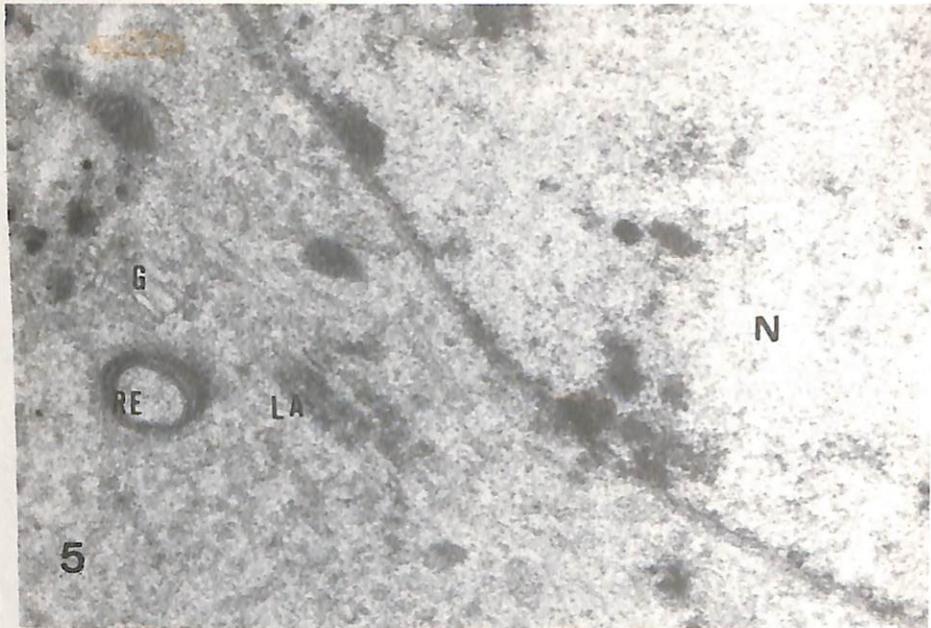


Fig. 5.- Micrografía electrónica de una mórula de dieciséis células, mostrando diferentes orgánulos perinucleares. N, núcleo; LA, "lamelas anulares"; G, complejo de Golgi; RE, retículo endoplásmico. 52.000 x.

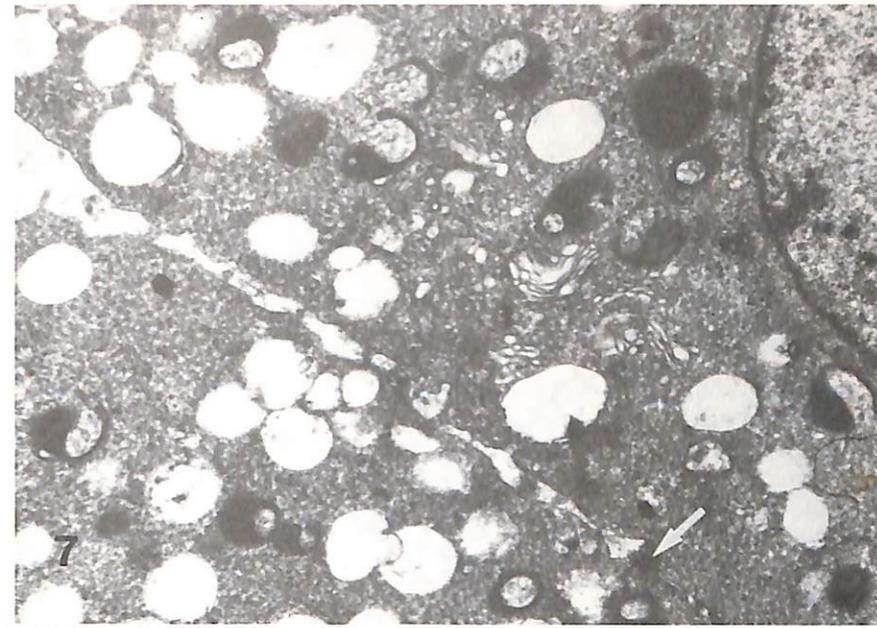


Fig. 7.- Mórula de cinco días mostrando la unión de dos células con condensaciones de membrana (flecha). Destaca el aspecto vesicular del retículo endoplásmico asociado a las mitocondrias. 26.500 x.

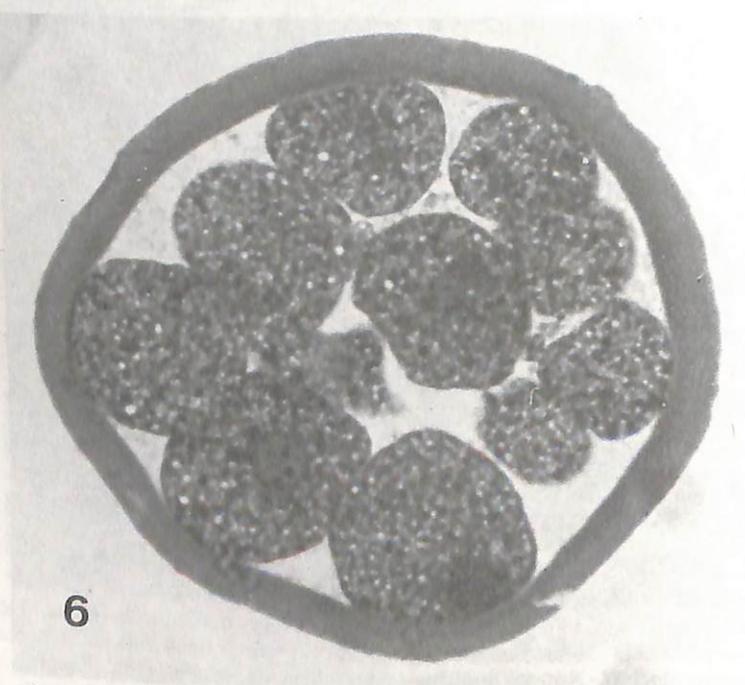


Fig. 6.- Corte histológico de un embrión de cinco días. 700 x.

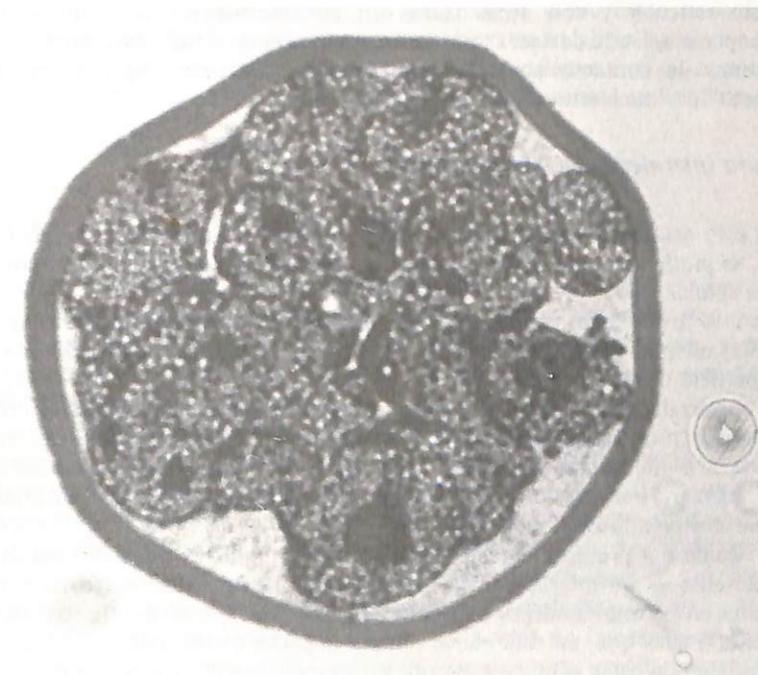


Fig. 8.- Corte histológico de una mórula tardía. 650 x.

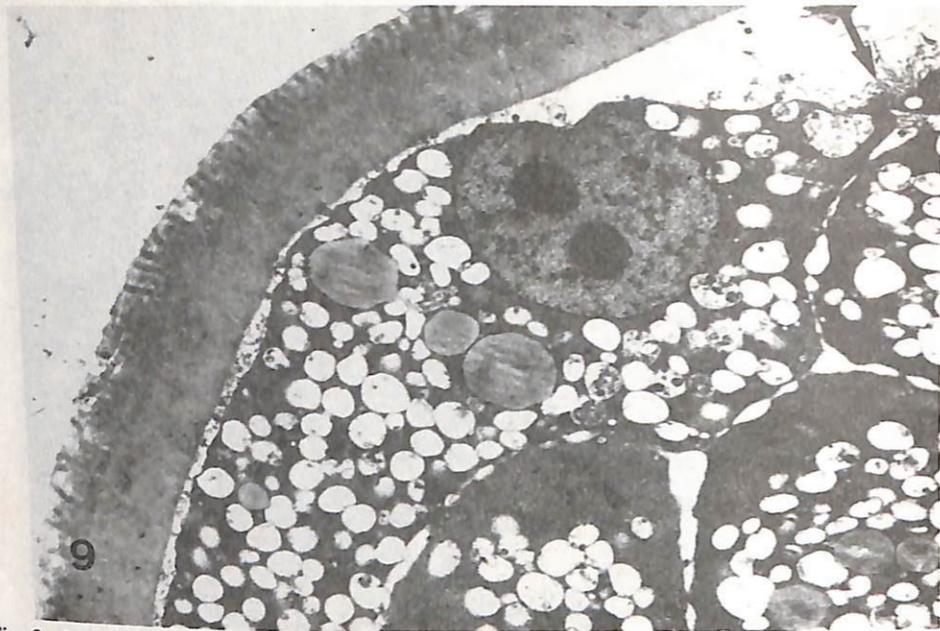


Fig. 9.- Mórula tardía mostrando la diferente morfología de las células. Microvellosidades (flecha). 6.500 x.

aspecto reticular y con áreas claras en su interior de diferente densidad que el nucleoplasma. Es de destacar también la presencia de condensaciones de membrana en las zonas de contacto entre los blastómeros, así como la existencia de "lamelas anulares" perinucleares. (Fig. 5).

#### *Mórula intermedia* (16-40 células) (Fig. 6)

En este estadio del desarrollo, correspondiente a embriones de 96-132 horas post-coito, se produce un aumento del espacio perivitelino, debido a la mayor compactación de las células.

Por otra parte, las zonas de contacto intercelular son más numerosas y electrodensas. En estas mismas áreas se concentran las microvellosidades, muy escasas en el resto de la superficie celular. (Fig. 7).

El núcleo de estas células, presenta numerosas condensaciones de cromatina distribuidas por todo el citoplasma, pero disminuyen los acúmulos asociados a la cara interna de la membrana nuclear. Son visibles también uno o dos nucléolos de aspecto más reticular, denso y con áreas intersticiales claras. En las proximidades del núcleo siguen observándose "lamelas anulares".

El citoplasma presenta características semejantes a las descritas en la fase anterior. Únicamente es de interés señalar el claro predominio de las formas redondeadas y bacilares en las mitocondrias, así como, el cambio de aspecto del retículo endoplásmico asociado a ellas que, en esta etapa, adopta aspecto multivesicular. (Fig. 7).

El núcleo de estas células, presenta numerosas condensaciones de cromatina distribuidas por todo el citoplasma, pero disminuyen los acúmulos asociados a la cara

interna de la membrana nuclear. Son visibles también uno o dos nucléolos de aspecto más reticular, denso y con áreas intersticiales claras. En las proximidades del núcleo siguen observándose "lamelas anulares".

El citoplasma presenta características semejantes a las descritas en la fase anterior. Únicamente es de interés señalar el claro predominio de las formas redondeadas y bacilares en las mitocondrias, así como, el cambio de aspecto del retículo endoplásmico asociado a ellas que, en esta etapa, adopta aspecto multivesicular. (Fig. 7).

Asimismo, se observan en el citoplasma microtúbulos con diferentes orientaciones y, a veces, asociados al retículo endoplásmico.

#### *Mórula tardía* (más de cuarenta células) (Fig. 8).

En esta fase, correspondiente a embriones de seis días, destaca la íntima unión entre las células, por lo que resulta difícil diferenciar, al microscopio óptico, los contornos de los blastómeros. Las uniones intercelulares aumentan, tanto en el número como en el grado de especialización, sobre todo en los bordes apicales de los blastómeros externos. En estas mismas áreas se observa un incremento en la densidad de las microvellosidades, orientadas hacia el espacio perivitelino. (Fig. 9)

La morfología celular es irregular. En general, las células de posición más externa tienden a aplanarse y a envolver a las más internas que conservan su forma redondeada. (Fig. 9).

El núcleo, que presenta uno o dos nucléolos, destaca por su posición excéntrica en la célula, llegando a quedar, solamente, un fino halo de citoplasma entre él y la membrana citoplasmática.

Es importante señalar que, en el citoplasma, se observa un aumento en el número de vesículas en relación con los estadios anteriores. Asimismo, destaca la presencia de material denso y floculento en el interior de algunas de ellas. Estas vesículas se distribuyen uniformemente por todo el citoplasma, o bien, se localizan en ciertas áreas del mismo. En este último caso, el citoplasma libre de vesículas es rico en ribosomas, que le confieren un aspecto denso, muy granular y prácticamente carente de otros orgánulos. (Fig. 9).

## DISCUSION

Las características ultraestructurales de la morulación en la oveja, descritas en el capítulo de resultados, muestran la existencia de diferencias fundamentales durante esta etapa del desarrollo. Ello, parece indicar la existencia de importantes procesos evolutivos en las células de la mórula, relacionados con la posterior diferenciación de las células trofoblásticas y embrioblásticas.

Una de las características más destacables durante la fase de mórula, es la presencia en el citoplasma de un gran número de vesículas. Estas, han sido señaladas también por otros autores en las primeras fases del desarrollo, tanto en la oveja<sup>3</sup>, como en la vaca<sup>1</sup>. Es interesante señalar, asimismo, la estrecha relación observada entre vesículas, mitocondrias, gotas lipídicas, complejo de Golgi y retículo endoplásmico. Esta relación, ha sido interpretada como la existencia de unidades metabólicas<sup>15</sup>, señalándose también, la posibilidad de que vacuolas lisosomales procedentes del complejo de Golgi, viertan su contenido en estas vesículas<sup>18</sup>. El hecho de haber observado, en nuestro caso, inclusiones lipídicas en las vesículas membranosas podría corroborar la relación metabólica entre estos orgánulos, considerada por los autores antes mencio-

nados. Por otra parte, las vesículas con material denso y amorfo, observadas en la fase de mórula tardía, podrían interpretarse como vacuolas autofágicas, que contienen productos de desecho de las divisiones celulares; siendo similares a las descritas en la vaca<sup>18</sup> y en la coneja<sup>12</sup>. Estos últimos autores sugieren que dichas vacuolas vierten su contenido en los espacios interblastoméricos y pueden jugar un papel en la formación de la cavidad blastocística. Ello explicaría la presencia de estas vesículas en la fase de mórula tardía y no en las anteriores.

Es conocida la variada morfología que muestran las mitocondrias de los embriones de oveja, así como, su estrecha relación con el retículo endoplásmico. El progresivo predominio en las mitocondrias de las formas redondeadas y bacilares, a lo largo del desarrollo, ha sido interpretado como un cambio en las funciones metabólicas de la célula<sup>3, 6</sup>. La modificación de la forma, observada por nosotros, en el retículo endoplásmico, que pasa a adoptar un aspecto multivesicular en las células de las últimas etapas de la mórula, podría estar relacionada, asimismo, con estos cambios metabólicos.

A la vista de nuestros resultados, es interesante señalar los cambios ultraestructurales que se producen en el núcleo, durante las primeras fases de la morulación, fundamentalmente, a nivel del nucléolo. En los embriones tardíos de ocho células, tiene forma redondeada y está compuesto por una zona central clara, rodeada de otra más densa con acúmulos granulares de cromatina. Posteriormente el nucléolo adopta una estructura reticular con intersticios nucleolares. Estos cambios en el nucléolo, pueden indicar una modificación de la actividad transcripcional del embrión<sup>3, 7, 17</sup>. Considerando el bloqueo que se produce en el desarrollo de los embriones de oveja, cultivados "in vitro", alrededor de la fase de ocho células<sup>10, 14, 20</sup>, y que este tiene lugar coincidiendo en el tiempo con la activación transcripcional de la región organizadora del nucléolo<sup>17</sup>, parece lógica la relación entre ambos fenómenos. Ello, explicaría las especiales condiciones de cultivo que requieren los embriones de esta especie<sup>10, 14</sup>, puesto que la activación del genoma embrionario podría necesitar la presencia de factores esenciales en el medio de cultivo, para superar dicho bloqueo.

Por otra parte, los resultados obtenidos muestran, asimismo, que la compactación celular en la oveja, ocurre en el estadio de mórula tardía, caracterizándose por el aumento de los contactos celulares, formación de uniones intercelulares especializadas y la extensión de uniones a los márgenes apicolaterales de blastómeros adosados. Estas características son semejantes a las descritas en otras especies<sup>1, 2, 13</sup>.

En nuestras observaciones, los primeros signos claros de la aparición de uniones especializadas, tiene lugar en el estadio de dieciséis células, con la presencia de uniones focales revestidas por citoplasma electrodense. En cualquier caso, es difícil determinar este extremo, en nuestras condiciones experimentales.

A la vista de estos datos, se puede concluir que la morulación representa una etapa clave para el posterior desarrollo de los embriones de oveja. Los evidentes cambios ultraestructurales observados durante esta fase, podrían ser considerados como la base morfológica de los cambios implicados en la posterior diferenciación de dos poblaciones celulares, trofoblasto y masa interna celular; creando el microambiente adecuado para la formación del futuro blastocisto.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) BETTERIDGE, K.J., y FLECHON, J.E. (1988). The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Ther* 29: 155-187.
- 2) BRACKETT, B.G., OH, Y.K., EVANS, J.F. y DONAWICK, W.J. (1980). Fertilization and early development of cow ova. *Biol Reprod* 23: 189-205.
- 3) CALARCO, P. y McLAREN, A. (1976). Ultrastructural observations of preimplantation stages of the sheep. *J. Embryol. exp. Morph.* 36: 609-622.
- 4) CHARTRAIN, I. y PICARD, L. (1988). Ultrastructural analysis of bovine embryos at days 6 to 8: correlation with embryo quality. *Ther.* 29: 236.
- 5) CHISHOLM, J.C. (1988). Analysis of the fifth cell cycle of mouse development. *J. Reprod. Fert.* 84: 29-36.
- 6) CRAN, D.G.; MOOR, R.M. y HAY, M.F. (1980). Fine structure of the sheep oocyte during astral follicle development. *J. Reprod. Fert.* 59: 125-132.
- 7) CROSBY, I.M.; GANDOLFI, F., y MOOR, R.M. (1988). Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 82: 769-775.
- 8) DUCIBELLA, T. y ANDERSON, E. (1975). Cell shape and membrane change in the eight-cell mouse embryo. Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Devel. Biol.* 47: 45-58.
- 9) EBERT, K.M., LIEM, H. y HECHT, N.B. (1988). Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. *J. Reprod. Fert.* 82: 145-149.
- 10) GANDOLFI, F. y MOOR, R.M. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 81: 23-28.
- 11) GEUSKENS, M. y ALEXANDRE, J. (1984). Electron microscopy of glycogen in mouse cleaving embryos. *J. Submicrosc. Cytol.* 16: 691-696.
- 12) HEGELE-HARTUNG, C.; FISCHER, B. y BEIER, H.M. (1988). Development of preimplantation rabbit embryos after in-vitro culture and embryo transfer: an electron microscopic study. *Anat Record.* 220: 31-42.
- 13) HEGELE-HARTUNG, C.; SCHUMACHER, A. y FISCHER, B. (1988). Ultrastructure of preimplantation rabbit embryos exposed to visible light and room temperature. *Anat. Embryol.* 178: 229-241.
- 14) HEYMAN, Y.; MENEZO, Y.; CHESNE, P.; CAMOUS, S. y GARNIER, V. (1987). In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Ther.* 27: 59-68.
- 15) HYTTTEL, P.; CALLESEN, H. y GREVE, T. (1986). Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J. Reprod. Fert.* 76: 645-656.
- 16) JOHNSON, M.H. y ZIOMEK, C.A. (1982). Cell subpopulations in the late morula and early blastocyst of the mouse. *Dev. Biol.* 91: 431-439.
- 17) KING, W.A.; NIAR, A.; CHARTRAIN, I.; BETTERIDGE, K.J. y GUAY, P. (1988). Nucleolus organizer regions and nucleoli preattachment bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 82: 87-95.
- 18) LINARES, T. y PLOEN, L. (1981). On the ultrastructure of seven day old normal (Blastocysts) and abnormal bovine embryos. *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.* 10: 212-226.
- 19) MATTE, C.; DOGGENWEILER, C.F. e IZQUIERDO, L. (1987). Development of mouse embryos following the destruction of blastomeres. *Arch. Biol. Med. Exp.* 20: 295-303.
- 20) MUWALLA, M.; FOOTE, W.C.; BUNCH, T.D. y CALL, J.W. (1988). The influence of culture and transport on pretransfer development and posttransfer survival of sheep embryos. *Ther.* 29: 369-379.
- 21) SKRZECZ, I. y KARASIEWICZ, J. (1987). De compaction and recompaction of mouse preimplantation embryos. *Rouxs Arch. Dev. Biol.* 196: 397-400.