

Tesis Doctoral

Suero en el medio de cultivo: actividad celular de embriones mantenidos in vitro en estadios iniciales de clivaje

Crocco, Melisa Candela de los Angeles

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Crocco, Melisa Candela de los Angeles. (2011). Suero en el medio de cultivo: actividad celular de embriones mantenidos in vitro en estadios iniciales de clivaje. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Crocco, Melisa Candela de los Angeles. "Suero en el medio de cultivo: actividad celular de embriones mantenidos in vitro en estadios iniciales de clivaje". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Suero en el medio de cultivo: actividad celular
de embriones mantenidos *in vitro* en estadios
iniciales de clivaje**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Melisa Candela de los Ángeles Crocco

Directora de tesis: Dra. Diana Mabel Kelmansky

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Parasitología
"Mario Fatała Chabén", ANLIS, Malbrán

Buenos Aires, 2011

Suero en el medio de cultivo: actividad celular de embriones mantenidos *in vitro* en estadios iniciales de clivaje

RESUMEN

El cultivo de embriones en medio suplementado con suero se utiliza durante el desarrollo parcial o total de embriones producidos *in vitro* (PIV). Este suplemento de composición compleja y variable se ha asociado con un alto grado de alteraciones de la estructura mitocondrial que provocaría una deficiente utilización y posterior acumulación de lípidos, respecto del medio sin suero. En esta tesis, se evaluó esta asociación y se determinó el día de desarrollo en que la adición de suero al medio produce menores daños mitocondriales en embriones bovinos.

El estudio de la ultraestructura mitocondrial en estadios iniciales de clivaje de embriones bovinos *in vitro* permitió completar la información disponible sobre la estructura de la organela, e interpretar el efecto del medio de cultivo sobre la organela. No se encontraron indicios que atribuyan al suero el daño mitocondrial morfológico *in vitro*, en embriones bovinos de 2 a 16 células. Se encontraron en cambio, modificaciones que podrían ser ventajosas para el desarrollo embrionario cuando la adición del suero al medio de cultivo se produce en el día 3 de desarrollo.

Como alternativa procedimental al cultivo de embriones en medio con suero, en esta tesis se estudiaron el crecimiento y la adhesión de embriones y ovocitos humanos, en condiciones libres de suero y de productos animales.

El cultivo de embriones en medio definido sin suero es de enorme interés en humanos, pues de él depende el desarrollo de líneas de células troncales embrionarias humanas (CTEh) con grado clínico. En este sentido, se emplearon condiciones de mínima complejidad durante el proceso de derivación de células troncales de grado clínico, utilizando una matriz de fibronectina como sustrato y medio de cultivo sin suero.

Palabras clave: suero, embrión, mitocondria, lípidos, bovino, humano, fibronectina

Serum in the culture media: cellular activity on early cleavage stages on *in vitro* maintained embryos

ABSTRACT

Serum-supplemented medium are used during the partial or complete development of *in vitro* produced (IVP) embryos. This supplement of complex and variable composition has been associated with a high degree of alterations of mitochondrial structure that would cause a poor use and accumulation of lipids, compared with the non-serum medium. The main objective of this thesis is to study this association and to state the day in which serum should be added in order to cause the minimum amount of mitochondrial damages in bovine embryos.

The study on mitochondrial ultra-structure in early cleavage stages of *in vitro* bovine embryos, allowed us to complete the already available information about the organelles' structure, understanding the effect that the culture medium has on the organelle. No evidence has been found to support the hypothesis that the serum damaged *in vitro* mitochondrial morphology in 2 to 16 cells stages bovine embryos. However, we have found changes that might be advantageous for the embryonic development when the addition of serum to the culture medium occurs in day 3 of this process.

As an alternative to the embryo cultured in a serum-supplemented medium, in this thesis we studied human embryos and oocytes growth and adhesion free of animal products and serum. Embryos cultured in a serum free media are of great interest, because of it depends the human embryonic stem cells (hESC) development, with clinical grade. Therefore, minimum complexity conditions were used during the derivation process of clinical grade stem cells, using a fibronectin matrix as substrate and serum-free culture medium.

Key words: serum, embryo, mitochondria, lipid, bovine, human, fibronectine

Resultados parciales de la presente Tesis fueron difundidos en los trabajos que se citan a continuación:

Crocco, M; Lauría De Cidre, L; Alberio, R; Mariano, MI (2011). Effect of serum on the mitochondrial active area on developmental days 1 to 4 in *in vitro*-produced bovine embryos. *Zygote* 19(4), 297-306.
DOI:10.1017/S0967199411000050

Bos-Mikich A, Ruggeri R, Rodrigues JL, Oliveira NP, Crocco M, Pranke PH. (2011). Emprego de oócitos de descarte como fonte de blastocistos partenotes para geração de linhagens de células-tronco embrionárias humanas com grau clínico. *JBRA Assist. Reprod.* 15(3), 38-40.

Crocco MC, Fratz N, Bos-Mikich A (2013). Substrates and supplements for hESCs: a critical review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30(3): 315-323. DOI 10.1007/s10815-012-9914-8

Crocco MC; Kelmansky D; Mariano MI (2013). Does serum cause lipid-droplet accumulation in bovine embryos produced *in vitro*, during developmental days 1 to 4? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 30(10): 1377-1388. DOI 10.1007/s10815-013-0060-8

Resúmenes publicados de presentaciones en reuniones científicas y congresos:

Crocco, M; Lauría De Cidre, L; Alberio, R; Mariano, MI (2009). Serum effect on mitochondrial active area of 1 to 4 days IVP bovine embryos *Biocell* 33 (2): A204.

Crocco, M; Bozzini, JP; Alberio, RH; Mariano, MI (2007). Mitochondrial morphotype's dynamic on early development of *in vitro* produced bovine embryos. *Biocell* . 31 (2).

Crocco, M; Bozzini, JP; Alberio, RH; Chertcoff, A; Mariano, MI (2006). Vesicle- and mitochondria-covered surface in IVP bovine embryos cultured in serum-free and serum-supplemented media. *Biocell*. 30 (1): 247.

Crocco, M; Mariano, MI; Bozzini, JP; Aller, J; Alberio, RH, Chertcoff A. (2005). Mitochondria: Ultra-structural characteristics of the different morphotypes in bovine embryos produced *in vitro*. *Biocell* 28 (3): 359.

Crocco, M; Mariano, MI; Bozzini, JP; Aller, J; Alberio, RH, Chertcoff A. (2005). Lipid distribution in blastomers of bovine embryos produced *in vitro*: preliminary observations. *Biocell* 28 (3): 359

Todo el material fotográfico incluido en esta Tesis es original y fue obtenido por la autora, excepto en los casos que se indique otra autoría.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar el agradecimiento es para la Dra. Marta Mariano y el Dr. Juan Pablo Bozzini, por haberme aceptado como becaria, por enseñarme, guiarme y por hacer todo dentro de sus posibilidades para que el trabajo saliera adelante. Además, por la calidad humana y el cariño y la paciencia. Lamentablemente fue muy poco lo que pude devolver a cambio.

Al grupo de Técnicos e Investigadores que fui encontrando, gente dispuesta que me enseñó mucho, y aceptó el desafío de trabajar con muestras pequeñísimas y frágiles. A Isabel López Farias del Instituto de Neurobiología, Agustín V. Chertcoff del Instituto Malbrán, Julián Diodati y Blanca del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Inta Castelar, a Roberto Fernández de la FCEN UBA. Con cada uno de ellos gente comprensiva con la que compartí muchas horas agradables y que hicieron posible este trabajo.

Al personal del Instituto Nacional de Parasitología “Mario Fatała Chabén” por hacerme sentir de la casa, por brindarme todo el material que tenían a disposición, por la confianza y por el cariño. A Kristina Oses, Mónica Esteva, Marta Lauricela particularmente.

Los investigadores y técnicos mencionados participaron en este trabajo a pesar que no formaba parte de sus propios proyectos financiados.

Inicialmente este trabajo de tesis contó con la financiación a través del Proyecto PICT/1999 Nro. 6480 “Estudios de desarrollo in vitro y ultramicroscópicos de embriones producto de la transferencia nuclear”, Director Dr. G. A. Palma, y de una Beca del mismo organismo. Este proyecto se discontinuó debido al alejamiento del Director. A partir de 2004 esta investigación contó con la única financiación de una Beca de Posgrado INTA-CONICET (4/2004 – 4/2009) bajo la dirección del Dr. Ricardo H. Alberio primero y luego de la Dra. Marta Mariano. Personalmente debí financiar todos

los costos adicionales a la producción *in vitro* de embriones. Entre ellos, la utilización de los microscopios electrónicos y confocal, la compra de los reactivos, la difusión de los resultados en reuniones científicas y publicaciones, etc. Haber podido superar las dificultades que se presentaron durante el transcurso de este trabajo no fue fácil, y me obligó a encontrar soluciones creativas, a fortalecerme y a valorar cada paso concretado.

Por otra parte, mucha gente que me apoyó para llevar este trabajo adelante y no desistir. El cariño de ellos fue un motor para mí. Agradezco a Memo Almeida, a María Elena Cuello, a Kristina Oses, a Dolores del Valle, a mi familia y especialmente a mi compañero Rodrigo Bittencourt.

Y agradezco a Diana Kelmansky, por ayudarme a convertir todo este esfuerzo en realidad, por dedicarse por completo, por estudiar, por contagiarme fuerzas para seguir adelante.

Este fue un trabajo hecho con el esfuerzo de mucha gente y tuve mucha suerte en poder compartirlo.

ÍNDICE

Abreviaturas	Pág. 1
1. Introducción	
1.1. Antecedentes históricos.....	Pág 4
1.2. Formación del embrión mamífero	
Ovogénesis y <i>foliculogénesis</i>	Pág. 8
Espermatogénesis y fecundación.....	Pág. 11
Obtención de embriones in vitro.....	Pág. 12
1.3. Desarrollo y metabolismo del embrión pre implantacional	
Expresión genómica.....	Pág. 13
Metabolismo energético.....	Pág. 13
Bloqueo del desarrollo.....	Pág. 17
1.4. Mitocondrias	
Origen y estructura.....	Pág. 20
Distribución durante el desarrollo.....	Pág. 21
Proliferación.....	Pág. 22
Actividad y <i>EROs</i>	Pág. 23
1.5. Lípidos.....	Pág. 25
1.6. Suplementos proteicos en el cultivo in vitro.....	Pág. 26
1.7. Embriones y células troncales humanas.....	Pág. 28
2. Objetivos	Pág. 31
3. Materiales y métodos	
3.1 Producción in vitro de embriones bovinos	
Obtención de ovocitos.....	Pág. 33
Maduración de los ovocitos.....	Pág. 33
Fecundación.....	Pág. 34
Cultivo de embriones.....	Pág. 34
3.2. Diseño experimental.....	Pág. 35
3.3. Citoquímica y microscopía confocal.....	Pág. 37

3.4. Procesamiento de muestras para MET.....	Pág. 38
3.5. Análisis morfométrico.....	Pág. 38
3.6. Análisis estadístico.....	Pág. 39
3.7. Ovocitos humanos	
Obtención.....	Pág. 40
Técnica de activación partenogenética.....	Pág. 41
3.8. Desarrollo de embriones para derivación de células troncales	Pág. 42

4. Resultados

Embriones bovinos PIV

4.1. Características ultraestructurales.....	Pág. 44
4.2. Distribución de mitocondrias activas en el blastómero....	Pág. 46
4.3. Morfotipos mitocondriales	
Mitocondrias hooded.....	Pág. 49
Mitocondrias ortodoxas.....	Pág. 50
Mitocondrias swollen.....	Pág. 51
Mitocondrias fusionadas.....	Pág. 51
4.4. Área embrionaria cubierta por mitocondrias	
Embriones de 1 a 4 días de desarrollo.....	Pág. 53
Embriones de 3 días de desarrollo.....	Pág. 56
Embriones de 4 días de desarrollo.....	Pág. 56
Tamaño y cantidad de mitocondrias hooded..	Pág. 58
Resumen de observaciones.....	Pág. 59
4.5. Distribución de lípidos en el blastómero.....	Pág. 60
4.6. Área embrionaria cubierta por lípidos	
Embriones de 1 a 4 días de desarrollo.....	Pág. 62
Embriones de 3 días de desarrollo.....	Pág. 64
Embriones de 4 días de desarrollo.....	Pág. 65
4.7. Relaciones entre mitocondrias y lípidos.....	Pág. 66

Embriones humanos	
4.8. Activación y desarrollo de ovocitos partenogénéticos	Pág. 68
4.9. Desarrollo de embriones en matriz de fibronectina	Pág. 68
5. Discusión	
5.1. Tipos mitocondriales y sus posibles estados funcionales.	Pág. 71
5.2. Área embrionaria cubierta por mitocondrias y lípidos	
Mitocondrias.....	Pág. 74
Mejor momento para la adición del suero...	Pág. 78
Lípidos.....	Pág. 81
Posible mecanismo de no- acumulación.....	Pág. 84
5.3. Células troncales embrionarias humanas de grado clínico....	Pág. 86
5.4. Suero en el medio de cultivo.....	Pág. 87
6. Conclusiones	Pág. 92
7. Bibliografía	Pág. 94
8. Apéndice	
8.1. Datos	Pág. 113
8.2. Figuras	Pág. 119

ABREVIATURAS

ADNm = Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ARN = Ácido ribonucleico
ARNm = Ácido ribonucleico, mensajero
BCS = Suero de vaca adulta
BSA = Albúmina sérica bovina
CR1 = *Charles Rosenkrans medium*
CTEh = Células troncales embrionarias humanas
COCs = Complejo ovocito-cúmulus
DMSO = Dimetil sulfóxido
DS = Desvío estándar
EGF = Factor de crecimiento epidérmico
EROs = Especies reactivas del oxígeno
FAF-BSA = Albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos
FBS = Suero fetal bovino
FGF = Factor de crecimiento de fibroblastos
FSH = Hormona folículo estimulante
G6PD = Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GL = Grados de libertad
Hpi = Horas pos inseminación
IGF = Factor de crecimiento similar a insulina
KCl = Cloruro de potasio
LH = Hormona luteinizante
LIF = Factor De inducción de leucocitos
MI = Primera meiosis
MII = Segunda meiosis
mM = Concentración milimolar
MET = Microscopía electrónica de transmisión
nM = Concentración nanomolar
nm = Nanómetros
PIV = Producidos *in vitro* (o producidos *in vitro*)
PPTM = Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial
EROs = Especies reactivas del oxígeno
TCM 199 = *Tissue Culture Medium 199*

TNF = Factor de necrosis tumoral

TGF = Factor transformante de crecimiento

μm = Micrómetros

μM = Concentración micromolar

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes históricos

Desde el comienzo de la aplicación de la tecnología *in vitro* se desarrollaron numerosos sistemas de cultivo, capaces de llevar a término la producción de embriones. Para la formulación de los medios de maduración y cultivo se estudió la composición bioquímica del ambiente tubárico y uterino. Se analizaron además, las necesidades metabólicas del embrión, las cuales variaron con el tiempo evidenciando interacciones complejas con el medio de cultivo. Sobre estos tópicos aún tenemos mucho por conocer. Por otra parte, existen diferencias sustanciales entre las condiciones de desarrollo *in vitro* y las condiciones maternas, tales como las abruptas variaciones térmicas, incidencia frecuente de fuentes luminosas y condiciones estáticas de mantenimiento. Debido a todas estas circunstancias, las condiciones de cultivo inducen diferencias morfológicas, fisiológicas y bioquímicas fundamentales en buena parte de los embriones producidos *in vitro* (PIV), que resultan en una variada cantidad de alteraciones. Estas alteraciones podrían producir un incorrecto funcionamiento metabólico posterior. En bovinos, inducirían modificaciones durante el desarrollo temprano, que se traducen en una disminución de la capacidad de supervivencia, con la consiguiente disminución de la tasa de preñez (en el caso de ser transferidos) y de nacimientos. Asimismo, estas alteraciones serían las responsables de la aparición de anomalías esqueléticas, placentarias y del mayor peso de las crías al nacer (Thompson y col., 1995; Lazzari y col., 2002).

En cuanto a las diferencias morfológicas de los embriones PIV en relación a los obtenidos *in vivo*, involucran mayormente a la forma y coloración de los blastómeros (Shamsuddin y R-Martinez, 1994), el número de células (Du y col., 1996), la calidad de la masa celular interna y la conformación del blastocele (Shamsuddin y col., 1993; Iwasaki y col., 1990). Conjuntamente ocurren

alteraciones a nivel subcelular (Thompson y col., 1995; Abe y col., 1999a,b; Fair y col., 2001; Rizos y col., 2002), particularmente un alto grado de alteraciones de la estructura mitocondrial (Dorland y col., 1994; Shamsuddin y R-Martinez, 1994) y una mayor cantidad de gotas lipídicas (Thompson y col., 1995; Ferguson y Leese, 1999; Rizos y col., 2002) que se han asociado al cultivo de embriones en medios suplementados con suero respecto de medios sin suero. Este suplemento de composición compleja, indefinida y variable se utiliza habitualmente durante el desarrollo parcial o total de embriones PIV para brindarle sustratos energéticos, aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento estimulantes del desarrollo.

Respecto a las mitocondrias, existen en la bibliografía datos incompletos acerca de las formas típicas que se encuentran en un embrión bovino producido *in vitro* durante los primeros días de desarrollo. Esto ha llevado a interpretaciones muy diferentes respecto al efecto del medio de cultivo sobre esta organela. Inicialmente varios autores esperaron hallar la conformación ortodoxa de la mitocondria y consideraron que las variaciones estructurales a ésta podrían tratarse como organelas degeneradas (Shamsuddin y R-Martinez, 1994). Más recientemente, mediante estudios ultraestructurales se hallaron, tanto *in vivo* como *in vitro*, las mismas variaciones a la estructura mitocondrial antes observadas, aunque sólo para los estadios de mórula y blastocisto (Crosier y col., 2000, 2001). Incluso algunos autores hicieron valiosas observaciones morfológicas mientras estudiaban el metabolismo mitocondrial temprano (Abe y col., 2002; Van Blerkom 2004). Sin embargo, la falta de información precisa sobre la estructura mitocondrial, para todos los estadios iniciales de clivaje pre-mórula de embriones bovinos *in vitro*, dejó muchos esfuerzos fragmentados y difíciles de vincular.

En cuanto a los lípidos, a medida que el embrión se desarrolla estos pueden ser introducidos en la célula y utilizados por las mitocondrias para incrementar la producción de adenosintrifosfato (ATP), (Kennedy y Lehninger, 1949). En embriones PIV respecto de los obtenidos *in vivo*, Shamsuddin y R-

Martinez (1994) observaron una mayor cantidad de gotas lipídicas. Los embriones cultivados en medio con suero acumulan lípidos en exceso respecto de los cultivados en medio sin suero, y los lípidos provendrían de este mismo suplemento (Ferguson y Leese, 1999; Sata y col., 1999). Además, en base a observaciones en estadios de mórula y blastocisto bovino, Crosier y col. (2000, 2001) Abe y col. (2002) y Abe y Hoshi, (2003) coinciden y concluyen que la presencia de suero tiene efectos adversos sobre la estructura de las mitocondrias, que podrían promover la acumulación excesiva de lípidos, reduciendo la calidad y viabilidad del embrión. Actualmente ésta es una de las hipótesis más generalizadas y explica muchas veces la reducción en la supervivencia y el aumento de la sensibilidad embrionaria a los tratamientos de criopreservación. Sin embargo, aunque en la bibliografía con frecuencia se le atribuye al suero el daño mitocondrial *in vitro* en forma directa o indirecta a través de la acumulación de lípidos, esta relación no está demostrada ni ha sido estudiada para estadios de clivaje temprano anteriores a mórula, y conformará entonces nuestra **hipótesis de trabajo**.

Si bien el éxito de la maduración y fecundación *in vitro* de ovocitos es alto (alrededor del 80%), sólo cerca del 30 % de los embriones PIV alcanzan el estadio de blastocisto. Los porcentajes de la producción de blastocistos en medios con suero durante diferentes periodos y con diferentes técnicas de cultivo son conocidos (Pinyopummintr y Bavister, 1991). Pero resulta complejo explicar el efecto del suero sobre las células a través de esos porcentajes. Considerando que la estructura es un buen indicador del estado fisiológico celular, los cambios en la morfología mitocondrial en presencia del suplemento, pondrían en evidencia su efecto. Además, se han percibido diferencias en el efecto del suero sobre distintos estadios de desarrollo (Maurer, 1992), manifestándose propiedades estimulantes para el desarrollo de blastocistos mientras que, sobre embriones de dos células se han observado propiedades inhibitorias (Pinyopummintr y Bavister, 1991). Estos resultados evidencian que este suplemento debería utilizarse sólo en determinados periodos del cultivo. En tal sentido, consideramos que los cambios mitocondriales permitirán

identificar los períodos de cultivo con suero en que se minimizan los daños subcelulares. Con ese conocimiento podremos finalmente dar nuevos pasos en el desarrollo biotécnico, relacionados con la producción animal y la biomedicina.

Además de poseer efectos estimulantes, el suplemento de suero por ser indefinido y complejo, dificulta el conocimiento de los requerimientos nutricionales y metabólicos de los embriones cultivados en su presencia y confunde las respuestas a hormonas o factores de crecimiento. Al estudiar la regulación del desarrollo embrionario, es necesario contar con medios de cultivo que, a diferencia del suero sean químicamente definidos (Pinyopummintr y Bavister, 1994).

El ovocito y el embrión bovino tienen características similares a los humanos, por esta razón los bovinos son un excelente modelo de investigación ampliamente utilizado para la reproducción humana (Campbell y col., 2003). Asimismo, el cultivo de embriones PIV en medio definido sin suero es de enorme interés, tanto en bovinos como en humanos. En humanos especialmente, pues de él depende el desarrollo de líneas de células troncales embrionarias humanas (CTEh, también llamadas células tronco o células madre) con grado clínico, para utilización en terapias biomédicas (Skottman y col., 2006). Sin embargo, el uso de embriones humanos para la obtención de células troncales con fines terapéuticos lleva a problemas éticos y constituye otra restricción para el avance de esa tecnología.

El primer paso para la derivación de una línea de CTEh es la división de los blastómeros embrionarios en un sustrato de crecimiento adecuado. A la fecha, en los procesos de derivación la mayoría de los grupos continúan utilizando compuestos indefinidos o sintéticos de origen animal (Kumar y col., 2009; Ilic y col., 2009; Priddle y col., 2010; Brook y col., 2010). Sin embargo, se han desarrollado unos pocos protocolos exitosos en medio sin suero y sin componentes animales en el medio y en el sustrato de crecimiento (Fletcher y col., 2006; Ellerström y col., 2006).

La utilización de CTEh en terapias biomédicas se encuentra en rápido crecimiento en nuestra región. Empero, es importante encontrar alternativas al uso de embriones humanos en su desarrollo, e incorporar procedimientos que permitan la obtención de líneas con grado clínico a través de protocolos de derivación en medio sin suero y libre de producto animal.

Teniendo en cuenta la similitud entre embriones bovinos y humanos así como las dificultades mencionadas atribuibles al cultivo suplementado con suero, en esta tesis se intenta responder a las siguientes preguntas,

¿Cuál es el día de desarrollo en que la adición de suero al medio de cultivo produce menos alteraciones desventajosas en embriones bovinos en estadio de clivaje temprano (2 a 16 células)? Además, ¿es posible el crecimiento y la adhesión de embriones y ovocitos a un sustrato definido, libre de producto animal y de suero?

Se realizaron experimentos para responder a la primera pregunta y se iniciaron investigaciones tendientes a responder el segundo punto.

1.2. Formación del embrión mamífero

Ovogénesis y foliculogénesis

Las células germinales primordiales de origen ectodérmico o gonocitos, son los precursores embrionarios de las gametas. Se diferencian temprano en el embrión mamífero y emigran primero hacia el saco vitelino y luego hacia la pared dorsal del cuerpo donde, alrededor de la séptima semana de la gestación, inducen la formación de los pliegues genitales o gónadas primitivas (Larsen y col., 2003). Una vez allí, los gonocitos incrementan la actividad mitótica y pasan a llamarse ovogonias. Luego, las ovogonias aumentan de tamaño y acumulan matriz citoplasmática y organelas, transformándose en ovocitos que se almacenan y maduran en el ovario para ser empleados en la fecundación.

El **ovocito primario** aparece durante la vida fetal; acumula matriz citoplasmática y organelas e inicia la meiosis quedando ésta detenida o arrestada en la profase I, próximo al nacimiento. La división meiótica se reanuda recién al alcanzar la madurez sexual (Sirard y Blondin, 1996). A continuación, los ovocitos primarios son rodeados de una capa única de células pre-granulosas aplanadas, y forman los **folículos primordiales**. Estos son los folículos más pequeños que se encuentran en el ovario y serán progresivamente eliminados durante la vida reproductiva. Cuando el ovocito aumenta de tamaño y las células aplanadas que lo rodean originan por mitosis las células cúbicas y proliferativas de la granulosa, ellos se convierten en **folículos preantrales primarios**. En el espacio entre el ovocito y las células de la granulosa, estas últimas formarán la zona pelúcida, encargada de dar especificidad al proceso de fecundación, contribuir a la reacción acrosómica e impedir la polispermia. Cuando los folículos tienen dos o más capas de granulosa, estos aumentan de tamaño y son denominados **folículos preantrales secundarios** (Diancourt y col., 1993).

Junto con la proliferación de las células de la granulosa, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células, la *teca follicular*. Las células de la teca y la granulosa cuentan con receptores de la Hormona Luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) respectivamente, por lo tanto sus crecimientos se encuentran modulados. Cuando el folículo alcanza un diámetro determinado, aparecen entre las células de la granulosa espacios irregulares llenos de fluido folicular. Al aumentar la cantidad de líquido, los espacios confluyen y se constituye la cavidad antral o antro, rodeada de células de la granulosa. Este folículo se convierte en **folículo terciario, antral o folículo de Graaf**. Antes de la formación del antro, los ovocitos son incapaces de superar el arresto en la meiosis I (MI). Sin embargo, en la mayoría de los ovocitos de folículos antrales, se reanuda la meiosis de forma espontánea si estos son retirados del folículo y cultivados en un medio adecuado (Eppig, 2001). La interrupción del contacto entre el ovocito y las células de la granulosa provoca el reinicio de la meiosis, por eso se cree que estas últimas serían responsables del arresto meiótico (De Loos y col., 1994). Al completarse la primera división

meiótica, se expulsa del primer corpúsculo polar que permanece retenido entre la membrana plasmática y la zona pelúcida, y se detiene nuevamente el proceso en el estadio de metafase de la meiosis (MII).

Algunas de las células de la granulosa se especializan formando un engrosamiento lateral, las células del cúmulus que mantienen una estrecha relación con el ovocito mediante uniones estrechas o gap. Además de alcanzar el estadio final de crecimiento del folículo antral, los **folículos preovulatorios** adquieren receptores de hormona luteneizante (LH) en las células de la granulosa y con ellos la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de la gonadotropina. Las células del cúmulus, por su parte, secretan el ácido hialurónico que, al hidratarse, agranda los espacios entre las células y produce la expansión del cúmulus. Este proceso debe ocurrir para que la ovulación se efectúe (Eppig, 2001). El pico de LH en la mitad del ciclo, dispara la ovulación del folículo dominante. En este proceso, el ovocito en el estadio de MII y las células del cúmulus que permanecen unidas a él formando la corona radiata, se desprenden de la pared del folículo y comienza el camino hasta el útero. La segunda división meiótica se completará durante la fecundación y lleva a la expulsión del segundo corpúsculo polar (Hyttel y col., 1997).

Los folículos pueden sufrir degeneración y muerte celular o atresia en cualquier momento de su desarrollo. Al mismo tiempo que unos forman parte del pool de crecimiento, otros ovulan o atresian (Hyttel y col., 1989). Es por esto que en la corteza del ovario podemos encontrar una distribución de folículos en distinto estado madurativo (Figura 1).

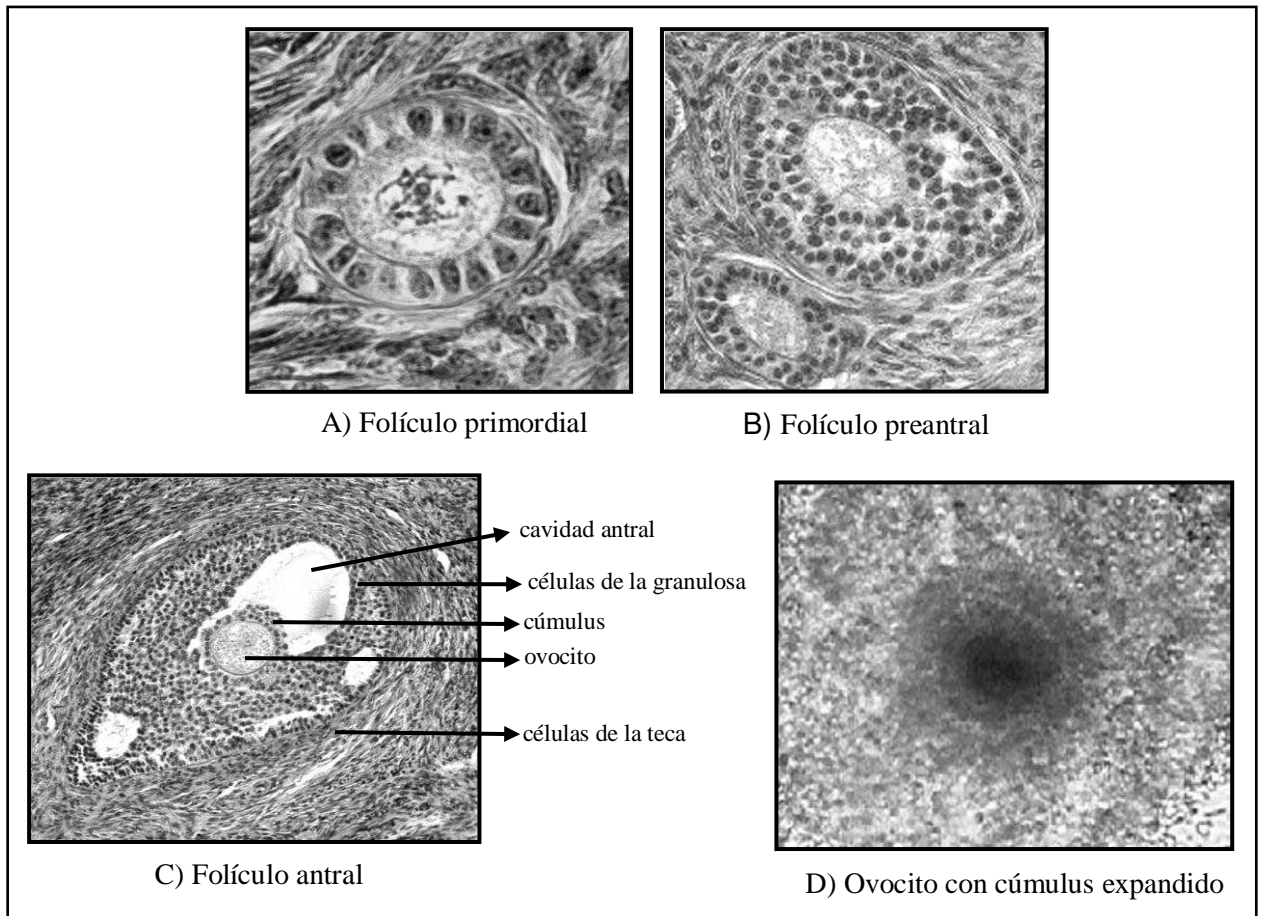


Figura 1: Folículos en distintos estadios de crecimiento (A, B, C) y ovocito maduro con cúmulus expandido (D, modificado de Palma, 2001).

Espermatogénesis y fecundación

La producción de espermatozoides o espermatogénesis ocurre en el testículo, y es seguida por la maduración de los espermatozoides en el epidídimo. El espermatozoide haploide durante su tránsito por el útero y el oviducto sufrirá modificaciones que le permitirán fecundar al ovocito. Este proceso es denominado capacitación y cuenta con dos etapas: activación y reacción acrosómica. La activación se inicia por cambios en la permeabilidad de la membrana y un aumento de la entrada de Ca^{2+} al espermatozoide (Brackett y

Zuelke, 1993), y produce el incremento de su motilidad. Los movimientos de híper activación provocan la migración del espermatozoide hacia la zona pelúcida. En la vecindad del ovocito, determinadas proteínas de la zona pelúcida inducen la reacción acrosómica. Esta reacción consiste en la pérdida de la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa subyacente (Parrish y col., 1986, 1989), permitiendo la liberación de las enzimas hidrolíticas del acrosoma como la acrosina, que ayudan al espermatozoide a seguir avanzando por la zona pelúcida. Una vez en contacto con la membrana celular del óvulo, se produce el reconocimiento y unión de las gametas. Cuando el primer espermatozoide penetra la zona pelúcida se disparan una serie de reacciones tendientes a impedir la entrada de otros espermatozoides y a prevenir la polispermia. Estas consisten en la exocitosis de los gránulos corticales ubicados por debajo de la membrana celular, que liberan su contenido con actividad enzimática al espacio perivitelino (delimitado por la membrana del ovocito y la zona pelúcida) endureciendo la zona pelúcida.

En el interior del óvulo y tras la penetración del espermatozoide se reanuda y concluye el proceso meiótico. Se forma así el segundo cuerpo polar y los pronúcleos, y ocurre la singamia que da comienzo al desarrollo embrionario.

Obtención de embriones in vitro

En la producción *in vitro* de embriones es habitual la extracción de folículos mediante punción ovárica. Los ovocitos recolectados de los folículos están recubiertos de células del cúmulus formando los Complejos Ovocito Cúmulus (COCs).

Cuando los ovocitos bovinos son retirados de los folículos y cultivados *in vitro*, más del 90% de los que se encontraban en estado inmaduro reinician la meiosis I en forma espontánea (Sirard y Coenen, 1993). Este reinicio se determina visualmente al aparecer el primer corpúsculo polar y es seguido por

la progresión a la segunda división meiótica. Entre 17 y 24 h después alcanzan el estado de metafase II (MII) y en ese estadio se detienen hasta el momento de la fecundación. En ese estado se los considera maduros. La maduración citoplasmática también sucede en esta etapa: se incrementa la síntesis y almacenamiento de ácido ribonucleico (ARN), lípidos y proteínas, que preparan al ovocito para la fertilización y el desarrollo embrionario temprano. Uno de los cambios más visibles después de la maduración es la expansión del cúmulus (Figura 1) que se torna laxo y adherente, propiedad que le permitiría *in vivo* ser atrapado por las fimbrias del oviducto y penetrado por el espermatozoide. En el momento de la fecundación se completa la meiosis II, se libera el segundo corpúsculo polar y se forman los pronúcleos.

1.3. Desarrollo y metabolismo del embrión pre implantacional

Expresión genómica

El desarrollo embrionario más temprano es dirigido por los ARN mensajeros y proteínas acumuladas durante el crecimiento y la maduración del ovocito. Además, entre los productos de origen materno, o programa materno, encontramos a las proteínas antioxidantes y las mitocondrias (Palma, 2001).

A lo largo de las divisiones de clivaje del embrión, el material materno desaparece y es reemplazado por material de origen embrionario. A este periodo se lo conoce como transición materno-cigótica y culmina cuando el desarrollo embrionario se vuelve dependiente sólo de la actividad transcripcional del genoma del embrión. En bovinos, esto sucede en el estadio de 8 células (Telford y col., 1990).

Metabolismo energético

En la célula eucariota, la energía circula en forma de enlaces de alta energía (ATP) y formas reducidas de dinucleótidos de flavina y nicotinamida

(FADH₂, NADH). Estos se generan principalmente por dos vías, una anaeróbica (en el citoplasma) y otra aeróbica (que involucra a la mitocondria). En la glicólisis anaeróbica, la glucosa es metabolizada a piruvato que luego puede ser convertido en ácido láctico y puede ser expulsado de la célula para mantener el pH interno. El ácido láctico puede también reconvertirse a piruvato. Este proceso produce poca cantidad de energía por molécula de glucosa. Cuando los niveles de respiración anaeróbica son altos, el ácido láctico se acumula y todo el proceso se enlentece. La respiración aeróbica comienza con la conversión de glucosa a piruvato en el citoplasma y luego el piruvato atraviesa la membrana mitocondrial interna donde es metabolizado hasta dióxido de carbono y agua, productos fáciles de eliminar sin que ocurra la inhibición por producto. La eficiencia de la respiración aeróbica es mucho mayor que la anaeróbica, sin embargo estas vías no son mutuamente excluyentes y contribuyen al mismo tiempo a los requerimientos energéticos de la célula (Wilding y col, 2009).

En los estadios de clivaje previos a la activación del genoma embrionario, cuando el embrión depende del programa materno para el desarrollo, este utiliza piruvato, lactato y aminoácidos como sustratos energéticos (Gardner y Lane, 1993; Gardner, 1998; Krisher y Bavister, 1998). En bovinos producidos *in vitro* el metabolismo de glutamina representa el 80% del intercambio energético total de embriones de 2 a 4 células, probablemente reflejando la degradación de las enzimas maternas (Rieger, 1992). La no utilización de la glucosa estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa (Gardner, 1998). En cambio, la escasa glucosa utilizada en los estadios previos a la activación del genoma embrionario, sería metabolizada a través de la vía de las pentosas fosfato principalmente. Esta vía cuenta con una fase oxidativa y otra no oxidativa, transcurre en el citosol y produce entre otras cosas el glutatión reducido que protege de la peroxidación y precursores de nucleótidos (Rieger, 1992). La adición de glucosa a los medios de cultivo en estas etapas generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo (Seshagiri y Bavister, 1991; Figura 2).

El momento de activación del genoma embrionario y la transcripción del ADNm ocurre en el estadio de 8 células en humanos y bovinos (Bavister 1995). Tras este evento, el embrión entra en el útero y se encuentra con una menor concentración de oxígeno que en el oviducto. En estos estadios la vía anaeróbica glucolítica continúa siendo privilegiada sobre las oxidativas (Cummins, 2004).

A partir del estadio de 8 a 16 células en embriones bovinos (Rieger y col., 1992), y en respuesta a una demanda de energía mayor para los procesos de compactación, formación y expansión del blastocelo, se reduciría la inhibición ejercida sobre la fosfofructoquinasa. Desde este momento, el consumo de glucosa aumenta y parece ser indispensable para el resto del desarrollo (Gardner, 1998).

La evidencia sugiere que tanto la respiración aeróbica como la anaeróbica son activas durante el desarrollo preimplantacional de embriones (Van Blerkom y col., 2000). En los estadios de clivaje, la contribución de la respiración mitocondrial al requerimiento energético del embrión mamífero sería escasa, ya que menos del 30% del ATP es producido vía fosforilación oxidativa (Trimarchi y col., 2000). Luego, esta proporción se eleva hasta el 85% en estadio de blastocisto (Bavister y Squirrell 2000). La respiración anaeróbica no sería suficiente durante largos períodos (Wakefield y col., 2011). El metabolismo mitocondrial, relativamente poco activo durante el desarrollo del embrión en estadios de pre implantación, posteriormente tendría un papel importante en el suministro de ATP y, ambas vías serían necesarias para el desarrollo óptimo del embrión (Wilding y col., 2009).

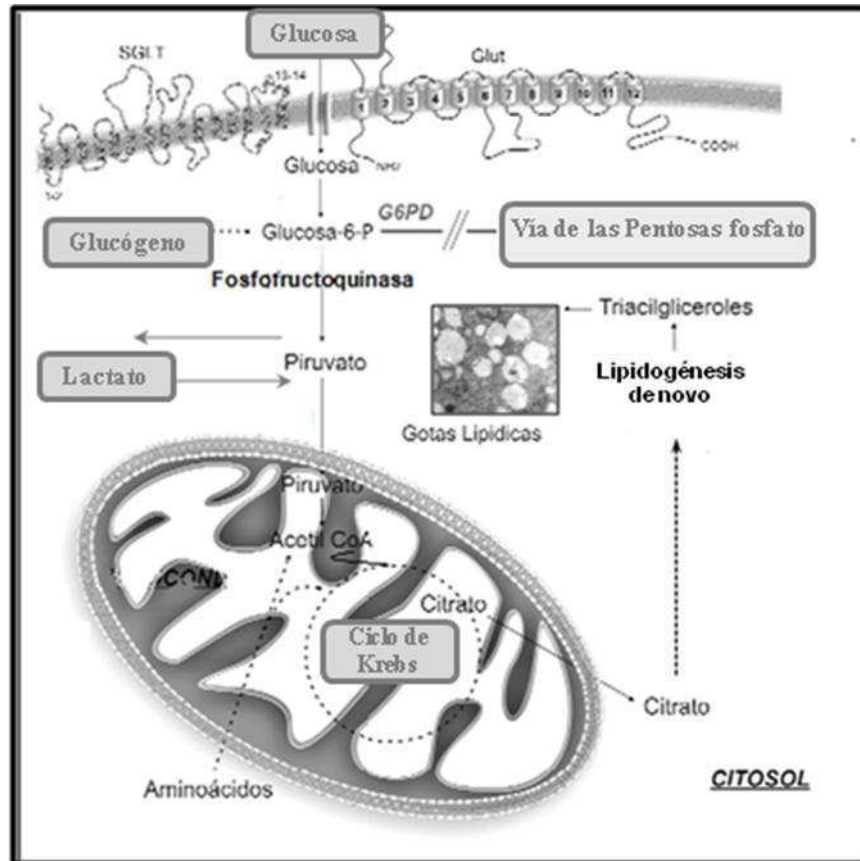


Figura 2: Principales vías involucradas en el metabolismo de la glucosa y la lipogénesis (modificado de Camargo et al, 2008).

Bloqueo del desarrollo

El bloqueo del desarrollo es característico del desarrollo *in vitro* de mamíferos y sucede en embriones bovinos de entre 8 y 16 células (Rexroad, 1989). En esta etapa las divisiones de clivaje (Fig. 3) son vulnerables y fácilmente detenidas por condiciones de cultivo estándar. Este periodo de sensibilidad al ambiente de cultivo coincide con el primer incremento de los niveles de utilización de glucosa en bovinos y humanos (Telford y col., 1990).

Aunque la causa de este evento es probablemente multifactorial, se consideran varios aspectos como los principales responsables. El primero sería el estrés inducido por el cultivo *in vitro* que genera aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y daño oxidativo (Tarazona y col., 2010); los embriones *in vitro*, pero no *in vivo*, muestran un pico de producción de EROs en estadios de 2 a 4 células previo al inicio del bloqueo (Betts y Madan, 2008). Sin embargo, el bloqueo podría no estar vinculado a una producción excesiva de EROs en sí, sino a la menor cantidad de antioxidantes generados, por no hallarse el embrión rodeado de fluido folicular rico en ellos (Nasr-Esfahani y Johnson, 1991). En este sentido, se ha demostrado que el bloqueo puede atenuarse mediante el uso de glutatión, SOD, transferrina y EDTA (De Matos y col., 1996; Guerin y col., 2001).

Otro factor responsable del bloqueo sería el desarrollo de procesos con alta demanda energética que no puede ser sostenido por el ambiente de cultivo (Barnett y Bavister, 1996), como la activación del genoma embrionario.

Finalmente, la glucosa y el fosfato (Glu/Pi) son dos de los componentes de los medios de cultivos más estudiados como responsables del bloqueo del desarrollo en bovinos (Kim y col., 1993). Seshagiri y Bavister (1991) sugirieron que la inhibición del desarrollo mediada por Glu/Pi actúa estimulando la glicólisis, y la excesiva glicólisis suprimiría la fosforilación oxidativa (Crabtree effect) alterando el balance entre metabolismo citosólico y mitocondrial. También sería posible que Glu/Pi dañe a las mitocondrias dejando al embrión

dependiente de la actividad glicolítica, inadecuada para el completo desarrollo (Barnett y Bavister, 1996).

El bloqueo del desarrollo finaliza en el estadio en que la glucosa comienza a ser el sustrato metabólico preferido del embrión mamífero (16 células, Bavister 1995; Gardner 1998). Luego, a partir del estadio de mórula (32 a 64 células), se observa un marcado incremento en el consumo de oxígeno (Trimarchi y col., 2000). En este estadio ocurre la compactación de los blastómeros propiciada por la aparición de uniones estrechas de tipo gap y tight. La ubicación externa o interna de los blastómeros en la masa compacta determinará la posición de las células hijas y llevará así a formar el blastocisto, una estructura hueca rodeada por células. Aquí se pueden diferenciar dos tipos celulares: el trofoectodermo que dará lugar a los tejidos de interacción embrio-materna, y la masa celular interna ICM que desarrollará los tejidos embrionarios y extraembrionarios. Finalmente el blastocisto se expande acumulando activamente electrolitos y agua en la cavidad blastocélica, y eclosiona de la zona pelúcida para implantarse en el tejido materno.

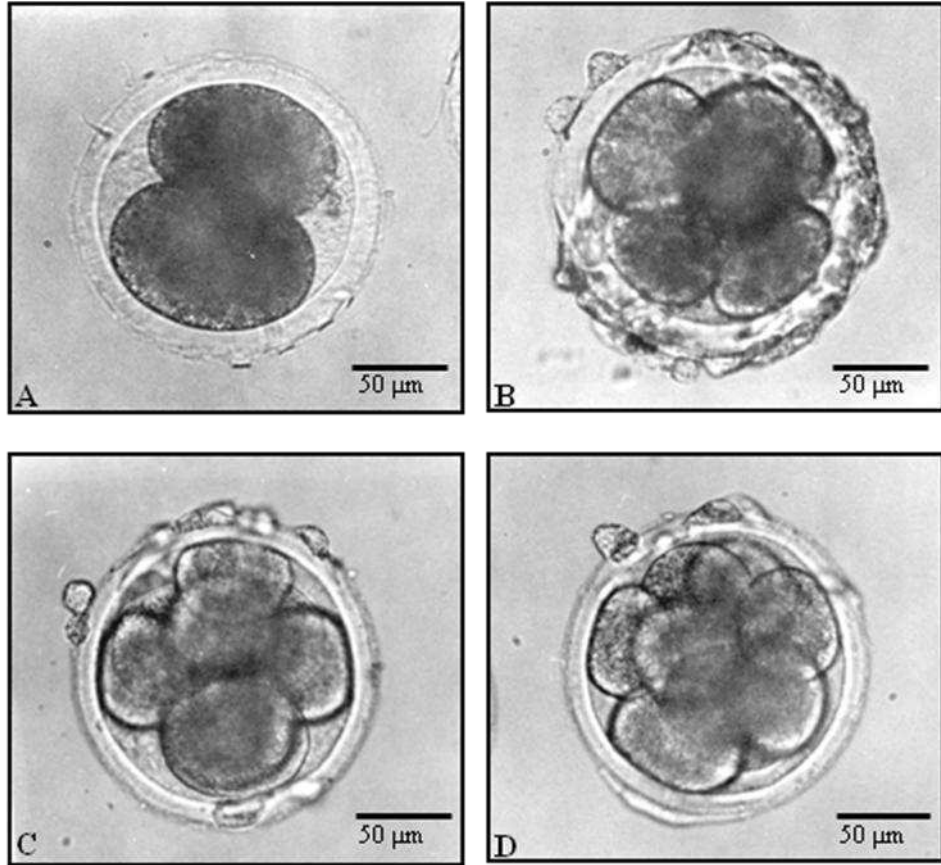


Figura 3: Embriones bovinos en estadios de clivaje. A) 1ra. división de clivaje, 2 blastómeros; B) 2da. división, 4 blastómeros; C y D) 3ra. división de clivaje, 6 y 8 blastómeros

1.4. Mitocondrias

Origen y estructura

En la mayoría de los mamíferos el cigoto cuenta con mitocondrias provenientes del espermatozoide y del ovocito. Las primeras, luego de ser marcadas con ubiquitina, sufren proteólisis durante el desarrollo y no son detectadas en el estadio de blastocisto (Cummins y col., 1998; Sutovsky y col., 2000). Por tanto, las mitocondrias embrionarias provienen exclusivamente de la madre.

La mitocondria es una organela con estructura compleja y dinámica que consta de: membrana externa e interna, espacio intermembranas, membrana de las crestas, el espacio intra crestas y la matriz (Figura 4). La membrana externa es permeable para moléculas de hasta 10 kDa, mientras que la membrana interna es impermeable y contiene a las enzimas involucradas en la cadena respiratoria. Las crestas son invaginaciones de la membrana interna y se hallan conectadas a ella y entre sí por uniones tubulares (Mannella y col., 1997; Mannella 2006; Logan 2006).

La topología de la membrana mitocondrial interna y de las crestas modifican las vías internas de difusión de metabolitos, con un efecto profundo sobre la actividad de la mitocondria. De esta manera, los cambios morfológicos estarían asociados a los estados funcionales de la mitocondria (Hackenbrock, 1968; Mannella, 2006).

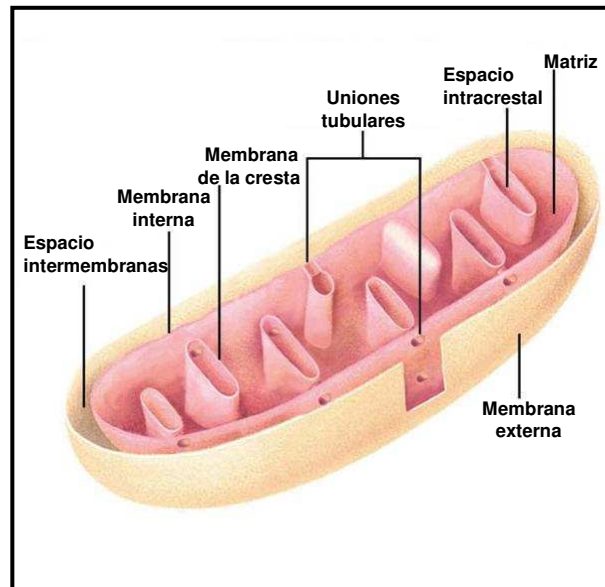


Figura 4: Modelo de arquitectura de las membranas mitocondriales basado en visualizaciones 3D (modificado de Logan, 2006).

En los vertebrados, las mitocondrias contienen una o múltiples copias del genoma circular de doble cadena (ADNm) que se replica dentro de la matriz de la organela (Cummins y col., 1998). Sin embargo, muchos de los polipéptidos mitocondriales son codificados en el genoma nuclear, sintetizados en el citosol e importados luego a la mitocondria. Es decir, el funcionamiento mitocondrial depende de la expresión coordinada de su genoma y del genoma nuclear (Smith y col., 2000).

Distribución durante el desarrollo

En ratones los ovocitos maduros y los embriones tempranos contienen cerca de 100.000 mitocondrias (Pikó y Taylor 1987) y en humanos entre 100.000 y 200.000 (Reynier y col., 2001). Se trata entonces de una de las organelas más abundantes en el citoplasma de ovocitos y blastómeros. Las

mitocondrias se distribuyen homogéneamente en el ooplasma de ovocitos mamíferos (Barnett y col., 1996; Sun y col., 2001). En humanos luego de la fecundación y en cada división de los estadios tempranos de clivaje, estas se encuentran en la región perinuclear de los blastómeros (Van Blerkom y col., 2000). *In vitro*, la misma distribución perinuclear fue observada durante la maduración del ovocito y la fecundación en ratón (Van Blerkom y Runner 1984), y durante la fecundación y el clivaje en cerdos (Sun y col., 2001). La distribución perinuclear podría deberse a una estrategia para ajustar la densidad mitocondrial a diferentes regiones celulares donde son requeridas altas concentraciones de ATP (Van Blerkom y col., 2000). Sin embargo, la distribución también podría ser modificada por el ambiente de cultivo (Barnett y col., 1996).

Durante el desarrollo temprano, el ADNm no parece replicarse. Este evento comenzaría a ocurrir en el estadio de blastocisto (Pikó y Taylor 1987) iniciando en las células del trofoectodermo (St. John y col., 2010). El elevado número copias en el ovocito maduro serviría para distribuirlo entre los blastómeros previo a reanudar la replicación del ADNm. La población inicial de mitocondrias se vería repartida y su actividad incrementada en la medida que crece la demanda celular (Acton y col., 2004; Ramalho-Santos y col., 2009). Sin embargo, el embrión en estadios preimplantacionales sería capaz de regular el contenido de ADNm, independientemente del número de copias acumuladas durante la ovogénesis (Chiaratti y col., 2010). Por su parte, Wai y col. (2010) manipularon el número de copias de ADNm en ovocitos de ratón demostrando que, con sólo 4.000 copias, estos pueden ser fecundados y progresar normalmente hasta la fase de blastocisto.

Proliferación

La forma, tamaño y número de mitocondrias está controlado por los procesos de fusión y fisión mitocondrial mediados, entre otras, por proteínas de

la superfamilia de las dinaminas (Logan, 2003; 2006) y mitofusinas (Chen y col., 2003, Okamoto y Shaw 2005). Aunque los modelos para estos procesos son aún incompletos, se sabe que involucran el contacto, la fusión y la fisión de las membranas mitocondriales. Las mitocondrias fusionadas forman una red que reduce el número de organelas individuales en la primera fase del ciclo celular de humanos (G1), respecto de la fase de división (M). Al pasar a la fase síntesis (S) la red se fragmenta y el número de mitocondrias vuelve a incrementarse (Margineantu y col., 2002). Algo similar ocurre en plantas, donde la fusión cumpliría un rol en la redistribución de ADN mitocondrial (Sheahan y col., 2005) y permitiría la cooperación entre organelas para el intercambio de membranas y matriz, ayudando a restaurar y mantener la funcionalidad. El proceso de fisión en cambio, aislaría las zonas de la red con daño mitocondrial para ser removidas de la población (Skulachev y col., 2004). Finalmente, la arquitectura y función mitocondrial estaría mantenida por el equilibrio entre los frecuentes y continuos ciclos de fusión y fisión (Bereiter-Hahn y Voth, 1994).

Actividad y EROs

La mitocondria es el lugar de la célula donde se asienta la mayor parte de las reacciones oxidativas responsables del suministro de energía. Además, interviene en el metabolismo de los ácidos grasos, el crecimiento y diferenciación celular, la producción de anti-oxidantes, y facilita el mantenimiento de la apoptosis en vertebrados (Chi y col., 2002). La mitocondria es también una fuente importante de especies reactivas de oxígeno, fragmentos moleculares muy reactivos debido a la gran tendencia a formar pares estables. Las EROs pueden originarse tanto en el ambiente interno de gametas y embriones como en el ambiente externo. Cuando ellos se hallan en exceso son eliminados mediante antioxidantes, sustancias que retardan o inhiben la oxidación de un sustrato. Entre los antioxidantes presentes en el desarrollo embrionario encontramos a la enzima superóxido dismutasa y la catalasa, el

glutación, la cisteamina, el piruvato, la albúmina y transferrina (De Matos y col., 1996).

In vivo, los embriones están protegidos de la excesiva producción de EROs por una reducción de la tensión de oxígeno en el tracto materno y por los antioxidantes presentes en fluido oviductal. En los estadios de clivaje la producción de EROs mitocondrial es mínima por las bajas necesidades energéticas del embrión, y el metabolismo predominantemente anaeróbico (Leese y col., 2008). Sin embargo, *in vitro* el nivel de producción de EROs en cultivos es importante, ya que las condiciones de manipulación de gametas y embriones favorecen su generación.

Cuando existen altos niveles de oxidantes o bajos niveles de defensas antioxidantes que alteran el equilibrio de oxido-reducción, las células resultan susceptibles al daño oxidativo. En las mitocondrias, las EROs producen daños en proteínas, ácidos grasos y ADNm. Además, a través de la apertura de poros de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), las EROs pueden provocar la reducción y pérdida del potencial de membrana (Peng y Jou, 2004). Cada PPTM es un complejo multiproteico que se forma en zonas de unión entre las membranas interna y externa de la organela. En condiciones fisiológicas, los componentes del poro se encuentran disgregados pero cuando se ensamblan, su apertura lleva a la disminución del potencial electroquímico (Torneró y col., 2002; Liu y col., 2000). El potencial de membrana mitocondrial refleja el gradiente producido por el paso de los iones hidrógeno a través de la membrana interna durante el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Los cambios de potencial son indicadores de integridad de membrana y de actividad mitocondrial (Van Blerkom, 2004). La generación de ATP y la lipogénesis, entre otras funciones, dependen del mantenimiento del potencial de membrana. Este, se reduce ante la remoción de los sustratos energéticos del medio de cultivo, haciendo más lento el desarrollo (Wilding y col., 2002).

1.5. Lípidos

Los lípidos citoplasmáticos desempeñan un papel importante como fuente de nutrientes para el embrión en desarrollo, y modifican las propiedades físicas y funcionales de las membranas. A medida que el embrión se desarrolla, el exceso de lípidos puede ser secuestrado dentro de la célula y utilizado por la mitocondria para incrementar la producción de ATP. Este proceso se inicia en el citosol con la activación del ácido graso, que es catalizada por la acil-CoA sintetasa, ubicada en el retículo endoplasmático o en la membrana mitocondrial externa. El acil-CoA formado reacciona con carnitina para formar acilcarnitina, que sirve de transportador a través de la membrana mitocondrial interna y lleva las moléculas al interior de la matriz. Una vez dentro de la mitocondria, los ácidos grasos sufren remoción de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo de beta-oxidación hasta que se descomponen por completo. Las unidades de dos carbonos en forma de acetil-CoA pueden ingresar en el ciclo de Krebs (Kennedy y Lehninger, 1949).

Como fuente de energía celular, los lípidos son varias veces más ricos en energía que la glucosa. La importancia del metabolismo de los lípidos para el desarrollo embrionario sólo fue demostrada recientemente encontrándose que, la inhibición específica de la beta-oxidación durante el cultivo *in vitro*, obstaculiza el desarrollo hasta blastocisto. El suplemento con carnitina en cambio, aumentó el clivaje de embriones (Dunning y col., 2010).

Algunos autores observaron un mayor contenido de lípidos en embriones PIV respecto de los embriones obtenidos *in vivo* (Shamsuddin y Rodriguez-Martinez, 1994), mientras que otros documentaron valores similares de contenido de lípidos entre embriones PIV cultivados sin suero y embriones obtenidos *in vivo* (Ferguson y Leese, 1999). Asimismo, se observó una densidad menor en los embriones PIV respecto de los obtenidos *in vivo*, que sería causada por la mayor cantidad de lípidos (Visintin y col., 2001; Ohboshi y col., 1998). Sin embargo, los resultados se unifican en cuanto al incremento de lípidos observado en embriones cultivados con suero respecto de los cultivados sin

suero (Thompson y col., 1995, Abe y col., 1999a). Los embriones PIV cultivados en medio con suero se caracterizan por la alta sensibilidad al enfriamiento y por la baja tolerancia a la criopreservación, el exceso de lípidos en el citoplasma sería responsable de este efecto (Leroy y col., 2010). Además, la menor tolerancia de blastocistos generados en presencia de suero frente a la criopreservación, mejoraría ante la omisión del suplemento durante el cultivo (Rizos y col., 2003) y ante la eliminación de gotas de lípidos intra citoplasmáticos (Ushijima y col., 1999). Esto último fue demostrado por Diez y col. (2001) quienes extrajeron los lípidos de los cigotos mediante centrifugación y remoción por microcirugía, y verificaron que la tolerancia a la congelación y la sobrevivencia de blastocistos bovinos PIV aumenta.

La tolerancia a la criopreservación ha sido utilizada rutinariamente como un parámetro de calidad del embrión. Para criopreservar embriones bovinos se utilizan comúnmente la congelación lenta y la vitrificación. La congelación lenta tiene la ventaja de la utilización de bajas concentraciones de crioprotectores respecto de la vitrificación (solidificación de la solución provocada por la elevación extrema de la viscosidad durante el enfriamiento rápido).

Durante el enfriamiento y el calentamiento las gotas de lípidos, las mitocondrias, las membranas, los gránulos corticales, los microtúbulos y los microfilamentos, a menudo sufren lesiones. Pero los cambios físicos de los lípidos en las diversas temperaturas de congelación, se encuentran entre las principales causas de daño celular (Zhou y Li, 2009). Es por esto que las grandes cantidades de lípidos citoplasmáticos son obstáculos importantes, que limitan la criopreservación y afectan claramente la viabilidad.

1.6. Suplementos proteicos en el cultivo *in vitro*

El suero fetal o de animal adulto y la albúmina sérica bovina (BSA por su sigla en inglés “bovine seric albumin”) se utilizan en los medios de cultivo de

embriones mamíferos, principalmente como fuentes de proteína. Esta suplementación proteica ha demostrado tener efectos beneficiosos tanto sobre la actividad metabólica como sobre la capacidad de desarrollo del embrión bovino (Krisher y col., 1998). El suero representa una compleja mezcla de componentes poco definidos que se utiliza al momento de la maduración y en el cultivo parcial o total, desde el inicio de la aplicación de la tecnología *in vitro*. Éste, estimula el desarrollo de embriones en ciertos estadios mientras que lo inhibe en otros, y estaría asociado a gran número de alteraciones subcelulares como la acumulación de lípidos. En este último caso, el suero estimularía al embrión a la síntesis de sus propios triglicéridos o le ofrecería los lípidos que serían tomados por pinocitosis (Thompson y col., 1995).

La albúmina es, junto con la glucosa, uno de los componentes más importantes del suero. Los roles de la albúmina en el desarrollo embrionario serían varios. Algunos autores mencionan que estimula el desarrollo (Lazzari y col., 2002), mientras que otros atribuyen estos efectos a sustancias vehiculizadas por la proteína (Kane y Headon, 1980). Se sostiene además que aumentaría la incorporación de piruvato y ayudaría a la disminución del consumo de oxígeno intracelular (Thompson, 2000) y ligaría metales catalizadores de reacciones oxidativas para removerlos del ambiente embrionario (Guerin y col., 2001). Sin embargo, a diferencia del suero, se comprobó que la albúmina, ni siquiera en grandes cantidades como 8 mg / ml, provoca aumento del número de gotas de lípidos en blastocistos ovinos en medio libre de suero (Thompson y col., 1995). Es más, los efectos negativos que el suero pudiera presentar son minimizados incorporando al mismo medio albúmina sérica bovina (Maurer, 1992).

La caracterización de las condiciones de maduración del ovocito y del cultivo del embrión en los sistemas *in vitro* es un tema prioritario en especial la remoción completa de suero. En la maduración *in vitro* en ausencia de suero y presencia de *Tissue Culture Medium* (Palma, 2001), se ha observado que los embriones se desarrollan exitosamente. Asimismo, el suero en medios pos

fecundación, ha sido exitosamente reemplazado por albumina sérica bovina (BSA), polivinil alcohol y amino ácidos (Krisher y Bavister, 1998). Por su parte, algunos autores han conseguido el completo y efectivo desarrollo de blastocistos en medios de maduración y cultivo libres de suero (Watson y col., 2000).

1.7. Embriones y células troncales humanas

Las células troncales embrionarias humanas (CTEh) tienen la capacidad de auto renovarse indefinidamente mediante mitosis formando una línea celular, así como de diferenciarse y producir células y tejidos maduros, los que podrían ser utilizados en terapias médicas. Diferentes laboratorios han establecido líneas de CTEh sin embargo, la mayoría de ellas no tienen uso clínico porque en algún paso de la generación fue utilizado un componente de origen animal capaz de introducir patógenos a las células y serios problemas a la salud humana (Skottman y col., 2006). Para la creación de una línea de CTEh de grado clínico, la derivación debe realizarse en condiciones definidas y sin componentes de origen animal en todas las etapas del proceso. En este sentido, la utilización de suero resulta inaceptable.

Desde los primeros reportes del crecimiento continuo (mantenimiento) de líneas de CTEh, los fibroblastos embrionarios de ratón fueron usados como sustrato de crecimiento para la derivación (Thomson y col., 1998). Si bien posteriormente fueron reemplazados por fibroblastos humanos, su sola obtención agrega complejidad a la técnica de derivación. En ausencia de fibroblastos, se utilizaron matrices indefinidas como sustrato de crecimiento. Entre ellas Matrigel™, nombre comercial que denomina a una compleja mezcla de proteínas de matriz extracelular tales como laminina, colágeno tipo IV, heparán sulfato, proteoglicanos. Sin embargo, debido a su origen animal ésta no es recomendada para células humanas (Skottman y col., 2006). Otros tipos de matrices exitosamente desarrolladas como sustrato incluyen las provenientes de fibroblastos de ratón, fibroblastos humanos y de suero humano, pero su

carácter animal o indefinido las hace potencialmente riesgosas. En cambio, la combinación de fibronectina, colágeno, vitronectina, y laminina humana fue exitosamente empleada en un sistema libre de componentes animales para mantener líneas de CTEh en crecimiento (Ludwig y col., 2006). La fibronectina humana, por su parte ha sido también efectiva para lograr el mantenimiento de líneas de CTEh en una matriz definida, aunque acompañada de medio acondicionado con fibroblastos animales o suero (Brimble y col., 2004; Lu y col., 2006). Respecto a su empleo en derivación de CTEh en cambio, no se conoce su desempeño.

Las CTEh son habitualmente obtenidas a partir de embriones frescos o criopreservados generados en los tratamientos de reproducción asistida y destinados a descarte. Sin embargo, en los ciclos de reproducción asistida humana es común la colecta de ovocitos inmaduros y maduros, los cuales son descartados por no presentar potencial de desarrollo. Una pequeña proporción de estos ovocitos todavía puede responder a un estímulo externo que lleva a la producción de embriones partenotes que, en mamíferos no tienen potencial para el desarrollo fetal (Obata & Kono, 2002, De Sousa y col., 2009), y son útiles como fuente de CTEh (Lin y col., 2007; Mai y col., 2007). La inducción al desarrollo embrionario se produce por exposición a un agente capaz de activar el ciclo celular, en un proceso denominado partenogénesis.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Analizar posibles alternativas al problema que introduce la incorporación del suero en el medio de cultivo de embriones.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estudiar si los tipos mitocondriales observados en cultivos suplementados con suero corresponden a variaciones propias de la morfología de la organela en cultivos sin suero.
- Analizar y comparar el efecto del suero sobre
 - el área cubierta por gotas lipídicas
 - el área cubierta por distintos tipos mitocondrialessegún el tiempo de adición del suero al medio de cultivo y según los días de desarrollo, de embriones bovinos.
- Evaluar si en alguno de los días de desarrollo estudiados (1 a 4) la adición del suplemento produce reducción de los morfotipos mitocondriales activos respecto del cultivo sin suero.
- Valorar la capacidad de las células troncales embrionarias, provenientes de embriones humanos inviiables y partenogénéticos, para adherirse y dividirse en la matriz de fibronectina en medio de cultivo sin suero.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Producción *in vitro* de embriones bovinos

Se llevó a cabo en el Lab. De Biotecnología de la Reproducción del INTA Balcarce, Buenos Aires.

Obtención de ovocitos

Los ovocitos fueron obtenidos de ovarios provenientes de matadero. Los ovarios fueron transportados en un termo conteniendo solución fisiológica y gentamicina, a 20-25°C de temperatura y llegaron al laboratorio dentro de las 4 hs de extraídos. Los folículos de 3 a 8 mm de diámetro fueron aislados del ovario mediante punción con una aguja de 18g y empleando una presión de vacío negativa de 50 mmHg. Los complejos cúmulus-ovocitos (COCs) obtenidos fueron seleccionados bajo microscopio estereoscópico, y sólo se conservaron aquellos con varias capas compactas de células del cúmulus y citoplasma del ovocito homogéneo (ovocitos Grado 1; Lindner and Wright, 1983).

Maduración de los ovocitos

Tras la selección, los ovocitos fueron lavados en medio de maduración. Como medio de maduración se utilizó Modified Parker Medium (*Tissue Culture Medium* 199, Hepes, gentamicina, lactato de calcio, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio) suplementado con 10 mg/ml de hormona folículo estimulante (rhFSH, Gonal F-75, Serono, UK), 10 mg/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 100µM de cisteamina. Todos los reactivos utilizados son de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), excepto que se indique otro laboratorio.

Los ovocitos reunidos en grupos de 50 fueron colocados en placas de cuatro pozos con 400ul de medio, bajo aceite mineral, a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación, durante un periodo de 20 a 24 hs.

Fecundación

Se utilizó semen congelado-descongelado proveniente de un único toro y seleccionado mediante gradiente de centrifugación (2000g 10 min + 800g 10 min) en columna de percoll (30-60-90%) para descartar del medio los espermatozoides muertos.

Los ovocitos maduros fueron colocados en una nueva placa con 400 µl de TALP (Tirodes, albúmina, lactato, piruvato) y 50 ug/ml de heparina por pozo, como inductor de la capacitación espermática. Finalmente, se co-incubaron ovocitos y espermatozoides a razón de 2 millones/ml en estufa a 38,5°C, con 5% de CO₂ y humedad a saturación, durante 24 hs.

Cultivo de embriones

Cumplido el tiempo de fecundación los presuntos cigotos fueron liberados de las células del cúmulus a través de la agitación mecánica con pipeta. Posteriormente fueron lavados y colocados en el medio de cultivo *Charles Ronsenkrans Medium* (CR1) suplementado con 3mg/ml FAF-BSA, amino ácidos esenciales, no esenciales y glutamina. Se mantuvieron durante 4 días en estufa de cultivo a 38,5°C, con atmósfera controlada a 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ y humedad a saturación. Cada 24 hs se renovaron los medios y se realizaron intervenciones de acuerdo con el diseño experimental descrito a continuación.

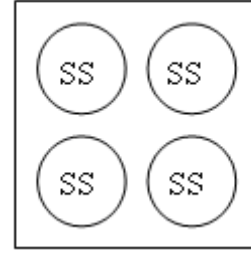
El suplemento utilizado durante todo el estudio consistió en 5% de suero obtenido de un mismo grupo de vacas en celo, inactivado a 56°C durante 30 min, filtrado y congelado hasta el momento de su utilización.

3.2. Diseño experimental

Se obtuvieron 200 ovocitos que fueron distribuidos al azar, 50 ovocitos en cada pozo, en una placa de 4 pozos. Allí se sometieron a maduración en medio sin suero durante 20 a 24hs.

Día 0

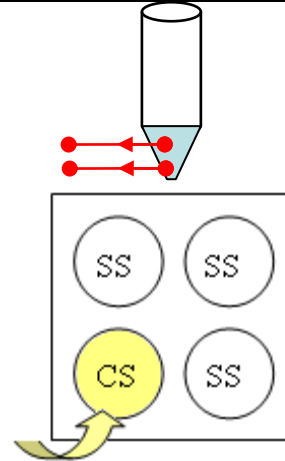
Tras la maduración se coincubaron los ovocitos con semen de un único toro.



Día 1

Entre 24 y 30 horas pos inseminación (hpi) se reunieron los presuntos cigotos, se procedió a la separación de las células de la granulosa con movimientos intensos de pipeta, y se retiraron del cultivo aquellos que no hubieran comenzado a dividirse. Luego se retiraron y fijaron 2 embriones (1SS).

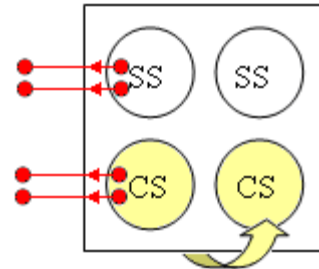
Los embriones restantes fueron puestos a cultivar en cantidades iguales en cuatro pozos, en 1 pozo se adicionó suero.



Día 2

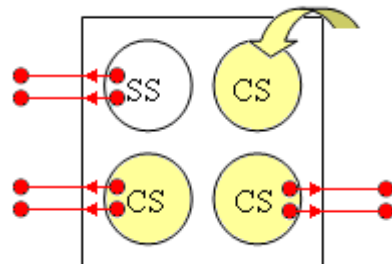
Pasadas 48 hpi se retiraron y fijaron 2 embriones de cada uno de 2 pozos: 1 sin suero (2SS) y 1 con suero (2CS24)

Luego los medios de los pozos se lavaron y renovaron, y se adicionó suero en uno más.



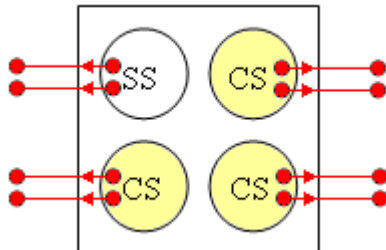
Día 3

Pasadas 72 hpi se retiraron y fijaron embriones de 3 pozos: un pozo sin suero (3SS) y dos con suero (3CS24, 3CS48) conformando las muestras del Día 3. Luego, se adicionó suero a otro pozo.



Día 4

Se retiraron y fijaron 2 embriones de cada uno de los 4 pozos (4SS, 4CS24, 4CS48, 4CS72).



SS, cultivo en medio sin suero. **CS**, cultivo en medio con suero. Cada flecha corresponde a 1 embrión retirado del cultivo.

Llamamos manipulación o réplica al proceso que comienza con la obtención de los ovocitos y finaliza con los embriones cultivados hasta el Día 4 (Fig. 5). Las manipulaciones fueron repetidas en 3 oportunidades para la obtención de imágenes mediante microscopía confocal, y en 6 oportunidades para la microscopía electrónica de transmisión (MET). En todos los casos la preparación fue realizada en uno de los dos embriones seleccionados por condición, quedando el otro como resguardo.

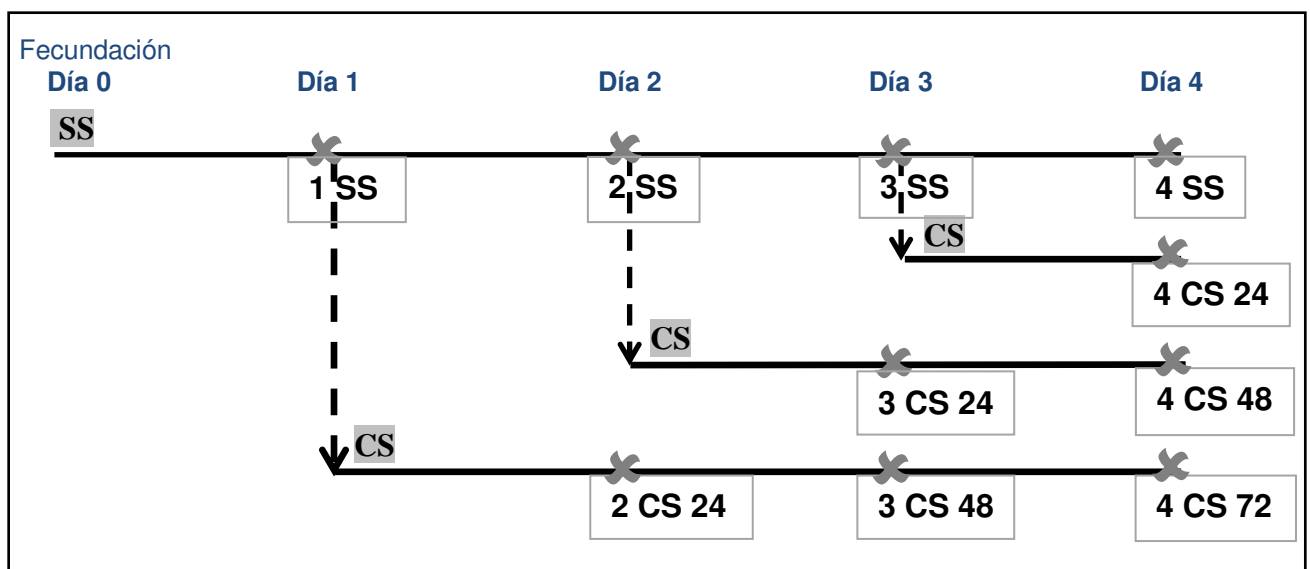


Figura 5: Esquema de las distintas etapas de una manipulación. La x indica la combinación de día de desarrollo y horas de cultivo con suero en la que se extrajeron embriones. **D SS/CS HH** - D, día de desarrollo; SS: medio sin suero; CS: medio suplementado con suero; HH: 24, 48 o 72 horas de cultivo con suero.

Los embriones extraídos del cultivo tuvieron el número de células más frecuente entre los esperados para cada día de desarrollo: Día 1: embriones de 2 células; Día 2: embriones de 4 a 6 células; Día 3: embriones de 7 y 8 células; Día 4: embriones de 9 a 16 células. Un total de 90 embriones fueron analizados.

3.3. Citoquímica y microscopía confocal

Se realizaron 3 manipulaciones o réplicas del diseño anterior para producir embriones bovinos. Al momento de ser retirados del cultivo, los embriones fueron tratados con Mito Tracker Deep Red 633 (Molecular Probes) para la visualización de las mitocondrias. MitoTracker es un colorante vital, que es captado específicamente por mitocondrias metabólicamente activas. Durante la incubación, el colorante difunde pasivamente a través de la membrana plasmática y se acumula en la mitocondria, manteniéndose aún después de la fijación. El tratamiento consistió en exponer los embriones a una concentración 150nM del reactivo en dimetil sulfóxido (DMSO), a 37°C, durante 15 minutos en oscuridad. Su fijación se realizó con formaldehído al 4% en buffer fosfato durante 1h. A fin de evidenciar posibles reacciones de fluorescencia que no fueran debidas al Mito Tracker, simultáneamente se realizaron controles tratando a otros embriones con una solución de DMSO sin reactivos. Al colocar los embriones tratados sobre los portaobjetos, se utilizó Vectashield (Vector Labs, USA) como medio de montaje. Este, evita el decaimiento de fluorescencia durante el almacenamiento. Los preparados fueron envueltos en papel de aluminio y mantenidos a 4°C hasta el momento de la observación.

La observación de los embriones se realizó con un microscopio confocal Olympus FV300 asociado a un microscopio de fluorescencia Olympus BX61. Durante la observación se tomaron secciones ópticas seriadas cada 5µm, utilizando un objetivo de 40X con inmersor en aceite, y apertura numérica de 1.0. Para la excitación del fluorocromo se utilizó un laser de Helio Neón rojo con una longitud de onda de 633nm. La emisión de fluorescencia se capturó mediante un filtro “pasa altos” con una longitud de onda de corte de 660nm. Todas las imágenes fueron tomadas conservando los mismos parámetros de adquisición. Un total de 40 embriones fueron analizados.

3.4. Procesamiento de embriones para microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se realizaron 6 manipulaciones del diseño anterior para producir embriones bovinos. Los embriones producidos fueron retirados del medio y fijados en glutaraldehído 2% en buffer cacodilato a 4°C durante 2 hs. Posteriormente fueron lavados y post fijados en tetraóxido de osmio al 1% en el mismo buffer durante 45 minutos. Fueron deshidratados mediante el pasaje a través de concentraciones crecientes de alcohol y óxido de propileno. Finalmente se realizó una pre inclusión en resina y óxido de propileno durante 5 horas en estufa y la inclusión definitiva en polybed-araldita de acuerdo con Mollenhauer (1964).

Tras la polimerización de la resina se obtuvieron tacos planos a partir de los cuales se realizaron cortes semifinos (aprox. 1,5µm) los cuales se colorearon con una solución de azul de metileno o toluidina y se observaron en microscopio óptico (Ultraphot2 Zeiss). Las secciones ultrafinas (aprox. 60 nm) para MET se depositaron en grillas de red de cobre o en grillas de orificio único sobre las que previamente se generó una membrana de Formvar 2,5% en dicloruro de etileno, y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963).

Las grillas contrastadas fueron examinadas con el microscopio electrónico de transmisión Zeiss 902.

Un total de 50 embriones fueron analizados. Cinco embriones, cada uno de una manipulación diferente, fueron utilizados para evaluar cada condición (combinación de día de desarrollo y horas de cultivo con suero, Fig. 5).

3.5. Análisis morfométrico

Entre 2004 y 2005 los estudios se realizaron con el microscopio electrónico del Instituto Malbrán, hasta que este quedó inutilizado por desperfectos técnicos. Trabajando con los microscopios el Instituto Roffo y de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) no se consiguieron buenos resultados, ya que las delicadas muestras eran alteradas durante la

manipulación. Finalmente las muestras se analizaron con resultados satisfactorios en el Servicio de Microscopía Electrónica, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas de INTA Castelar, donde se consiguió evaluar más de una vez a cada embrión sin dañar el corte ultrafino. Las variaciones en las escalas de observación de los distintos microscopios utilizados, resultó en variaciones en las áreas embrionarias estudiadas.

En la evaluación ultramicroscópica de embriones se emplearon aumentos de 3.000 hasta 20.000. Para efectuar los análisis morfométricos distinguiendo las estructuras subcelulares con precisión, las resoluciones elegidas fueron de 6000 a 9000 aumentos. Las medidas fueron tomadas sobre 5 a 7 micrografías en sectores elegidos independientemente del contenido, una en cada célula del embrión, o bien sobre 2 sectores distantes de la misma célula en embriones con pocos blastómeros. Cada micrografía fue copiada a papel y transformada a formato digital TIFF. Para evaluar el área ocupada por los diferentes tipos morfológicos mitocondriales y por las inclusiones o gotas lipídicas, se utilizó el analizador de imágenes Image Pro Plus. Los resultados se presentan como porcentajes de áreas cubiertas por cada estructura respecto del área total de la micrografía.

3.6. Análisis estadístico

Cada grupo de micrografías correspondientes a un mismo embrión, constituyó un bloque de análisis determinado por manipulación – día de desarrollo – horas de cultivo en suero. Para cada condición (día y hora) se estudiaron 5 embriones.

Los datos fueron tratados estadísticamente a través de análisis de regresión múltiple donde se incluyeron día de desarrollo, horas de tratamiento con suero y manipulación como co-variables de control.

Para caracterizar el área cubierta por mitocondrias en cada día de desarrollo se ajustaron 2 modelos de regresión, uno para datos sin suero y otro

para datos con suero. En ambos modelos se utilizaron el día de desarrollo y la manipulación como variables explicativas. Se incluyó la manipulación para controlar por diferencias entre ellas. Un análisis similar fue realizado para caracterizar el área cubierta por lípidos.

Para caracterizar diferencias en el área cubierta por mitocondrias debidas al tratamiento en un mismo día de desarrollo, se ajustó un modelo para cada día, con tratamiento y manipulación como variables explicativas. Un análisis similar fue realizado para caracterizar diferencias en el área cubierta por lípidos.

Para caracterizar diferencias en el área promedio (dentro de cada foto) de las gotas de lípidos, y el área promedio de las mitocondrias *hooded* se ajustó un modelo de regresión múltiple con el porcentaje de área como variable dependiente y el día de desarrollo, las horas de tratamiento con suero y la manipulación como variables explicativas.

Para determinar si el porcentaje de área mitocondrial está asociado con el número de organelas en cada micrografía y el área media de las mitocondrias, se utilizaron regresiones múltiples con el porcentaje de área mitocondrial como variable dependiente.

Las pruebas estadísticas fueron realizadas empleando los programas XLSTAT Addinsoft 2009.3.02 y R 2.11.1.

3.7. Ovocitos humanos

Obtención

Los siguientes experimentos se desarrollaron en el marco de un entrenamiento del Programa Latinoamericano de Investigación en Salud Sexual

y Reproductiva (PLISSER), correspondiente al proyecto “*Ativação partenogenética de oócitos de descarte como fonte de blastômeros e blastocistos para geração de linhagens de células tronco embrionárias humanas com grau clínico*”, dirigido por la Dra. Adriana Bos-Mikich, aprobado por el *Comité de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Brasil (CEP-UFRGS). Los embriones y ovocitos utilizados, fueron donados con el consentimiento informado de pacientes del *Centro de Pesquisa e Reprodução Humana Nilo Frantz* y de la Clínica de Fertilización *in vitro* PROGEST, ambas de Porto Alegre, RS, Brasil.

Técnica de activación partenogenética

A partir de los ovocitos humanos descartados de ciclos de reproducción asistida, se produjeron partenotes diploides por exposición de los ovocitos a un medio con ionóforo de calcio (A23187, Sigma) y/o dimetilaminopurina (6-DMAP, Sigma-Aldrich). El tratamiento con ionóforo de calcio permitió inducir ondas intracitoplasmático de Ca^{2+} semejantes a las observadas durante la fecundación y accionar así el desarrollo embrionario (Whittingham y Siraccusa, 1978). El 6-DMAP es inhibidor de la síntesis proteica y previene la extrusión del segundo corpúsculo polar. Describimos a continuación los diferentes periodos de exposición a los reactivos mencionados, de acuerdo con el estado de maduración de los ovocitos.

Los ovocitos colectados en estado de meiosis I (MI) fueron expuestos durante 5 minutos a $5\mu\text{M}$ de ionóforo de calcio (CI, Sigma-Aldrich) en medio de cultivo sin suero *Human Tubal Fluid* (HTF, Irvine) y posteriormente cultivados para activación y expulsión del primer corpúsculo polar. Luego de un periodo comprendido entre 22 y 24hs fueron nuevamente tratados con ionóforo de calcio y seguidamente con 2mM de 6-DMAP durante 4 hs (Hall y col., 2007).

Los ovocitos colectados en estado de meiosis II (MII) fueron expuestos durante 5 minutos a $5\mu\text{M}$ de ionóforo de calcio en medio de cultivo sin suero

Human Tubal Fluid y posteriormente tratados con 2mM de 6-DMAP durante 4 horas.

En ovocitos colectados en estadio de meiosis II (MII), inseminados con técnicas de reproducción asistida y que no mostraron signos de fecundación tras 30hs de cultivo, se presume que el espermatozoide penetró en el ovocito. Por tanto en estos casos, solamente se los expuso brevemente a 5 μ M de ionóforo de calcio para activar la maduración nuclear, permitiendo luego la extrusión del 2do corpúsculo polar.

La activación partenogenética de ovocitos se verificó exponiendo a dos ovocitos activados, a una solución hipotónica de cloruro de potasio (KCL) 75mM, fijándolos con ácido acético 3: metanol y coloreándolos con Giemsa y observando la aparición de los corpúsculos polares.

3.8. Desarrollo de embriones para derivación de células troncales

Los embriones que resultaron inviábiles para ser transferidos, fueron clasificados de acuerdo a los criterios de Veeck (1999): clase I, con blastómeros regulares, sin fragmentación; clase II, con blastómeros regulares, fragmentación menor al 10%; clase III, con blastómeros regulares o irregulares, entre 20 y 40% de fragmentación; clase IV, blastómeros regulares o irregulares, 40% de fragmentación; clase V, blastómeros irregulares, fragmentación mayor al 50 %

Los embriones en distinto estadio de desarrollo junto con los embriones obtenidos de ovocitos partenogenéticos, fueron liberados de la zona pelúcida mediante tratamiento con Tyrodes (Irvine Scientific) y cultivados *in toto*. Como sustrato de crecimiento se utilizó fibronectina humana (Invitrogen) que fue colocada a razón de 2mg/ml en cada pozo, equilibrada en estufa por 2 hs y retirada el excedente. Sobre ese sustrato, se colocó medio de cultivo Stem Pro (Invitrogen). Finalmente allí se colocaron los embriones. El progreso en el desarrollo y la adhesión al sustrato fue evaluado cada 24 hs.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Embriones bovinos PIV

4.1. Características ultraestructurales

En todos los embriones evaluados se observó que la estructura celular fue preservada en los diferentes tratamientos. Se verificaron la presencia de microvellosidades alrededor de los blastómeros y la integridad de la membrana plasmática. No se evidenciaron alteraciones del citoplasma que podría dar indicios de necrosis, ni alteraciones del núcleo que podrían indicar apoptosis. Cada blastómero contó con un núcleo y a veces se pudo observar un nucleolo. El citoplasma resultó granular debido a la presencia de ribosomas (Fig. 6). El sistema reticular a veces fue escaso y otras conspicuo. Las organelas presentes con mayor frecuencia fueron: las mitocondrias, las vesículas lisosomales y las inclusiones o gotas lipídicas. Las vesículas lisosomales se distinguieron por estar rodeadas por una doble membrana y a veces contener material membranoso o vesículas menores. Se las encontró en distintas etapas de desarrollo y a veces dispuestas en la periferia del blastómero, indicativo de un proceso próximo de exocitosis. Las gotas lipídicas se distinguieron por el contenido denso y a veces se las encontró aglutinadas formando cadenas o rodeadas de mitocondrias.

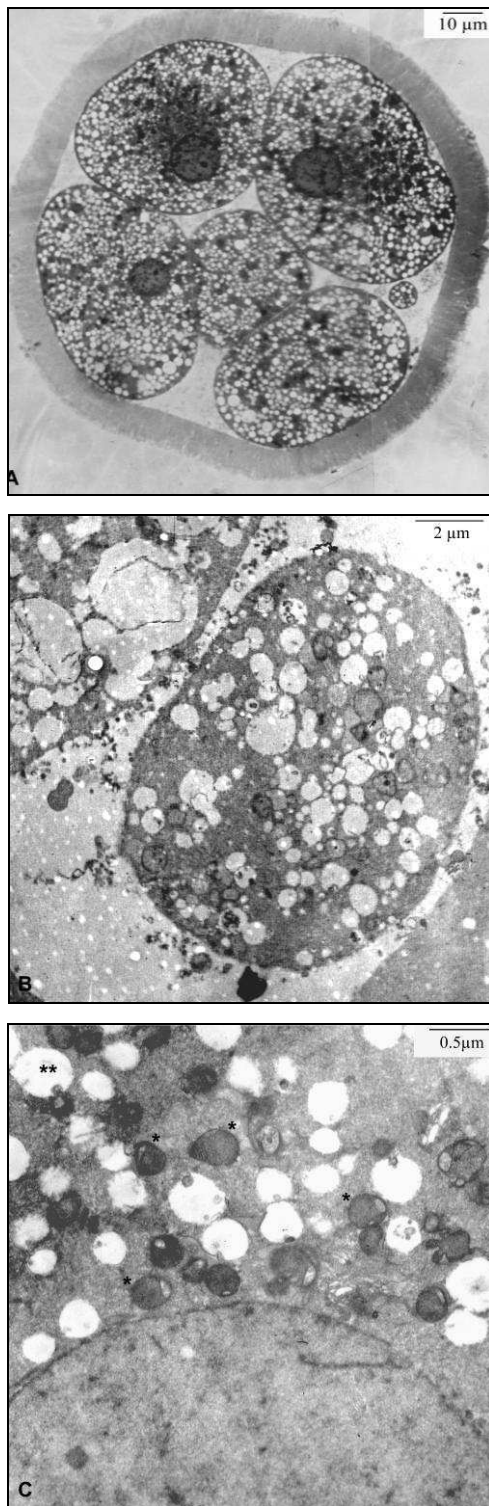

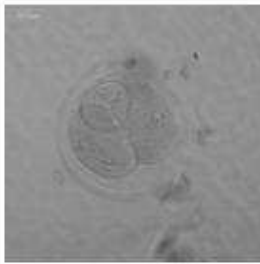
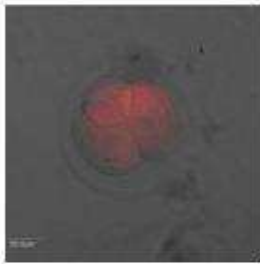


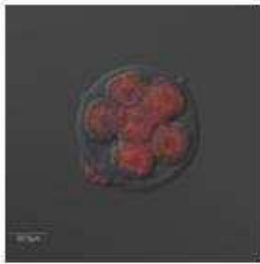






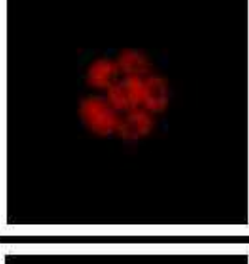







Figura 6: Fotomicrografías electrónicas de embrión bovino de 3 días de desarrollo. A) Composición de micrografías formando una vista general, B) detalle de blastómero, C) detalle de estructuras subcelulares: mitocondria (*) y vesículas (**).

4.2. Distribución de mitocondrias activas en el blastómero

La coloración con el reactivo Mito Tracker Red evidenció actividad mitocondrial en todos los embriones tratados y analizados, y mostró la distribución de la organela activa en los blastómeros (Fig. 7). En los blastómeros de embriones de días 1, 2 y 3, se observó una distribución perinuclear de mitocondrias activas. En cambio, en el día 4 la distribución de las mitocondrias se presentó más difusa. Serían necesarias cuantificaciones precisas para distinguir un efecto diferenciado debido al suplemento de suero por distintos periodos.

	Mito Red	Transmisión	Mit R+Trans
1SS			
2SS			
2CS24			
3SS			
3CS24			
3CS48			

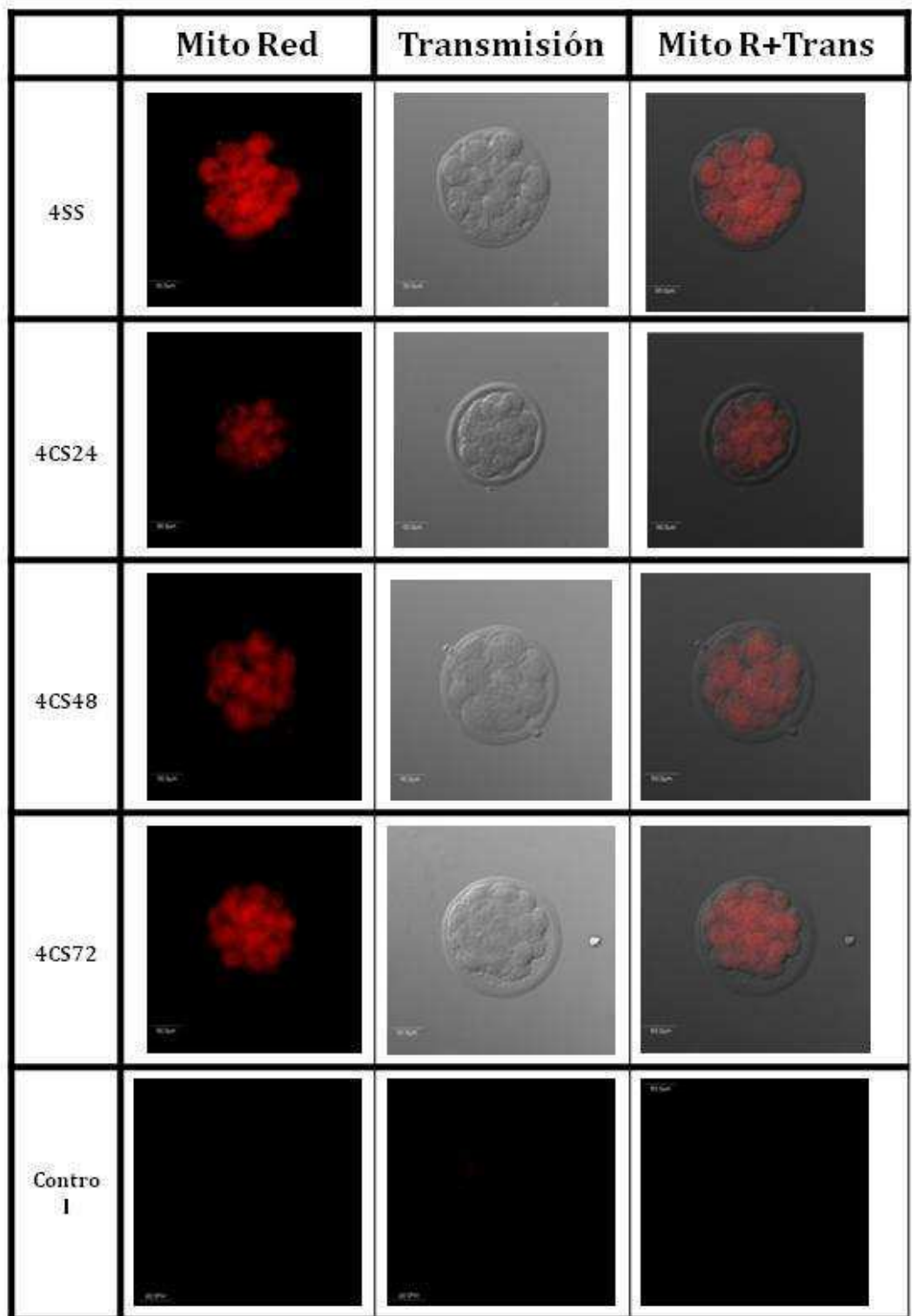


Figura 7: Mitocondrias activas en los blastómeros de embriones bovinos de 1 a 4 días cultivados sin suero o con suero por diferentes periodos de tiempo. Las mitocondrias fluorescen en rojo.

D SS/CS HH - D, día de desarrollo; SS: medio sin suero; CS: medio suplementado con suero; HH: 24, 48 o 72 horas de cultivo con suero;

4.3. Morfotipos mitocondriales

Este es el primer trabajo en describir en forma completa los distintos tipos mitocondriales encontrados en embriones bovinos PIV en estadios de 2 a 16 células.

Para caracterizar a los tipos mitocondriales de acuerdo en su ultraestructura, consideramos la densidad de los electrones dentro de la organela, las diferentes formas tomadas por la organela al ser observada en cortes transversales y la distribución de las crestas. Describimos a continuación los diferentes tipos morfológicos o morfotipos observados.

Mitocondrias hooded

Este tipo mitocondrial se caracteriza por poseer un apéndice en forma de gancho en uno de los extremos que se puede ver sólo en ciertos planos de corte. En sección transversal la organela puede también aparecer redonda o con forma trapezoidal. En sección longitudinal al eje mayor, el gancho delimita una cavidad abierta al citoplasma. Cuando éste es tomado en sección transversal al eje mayor, aparece como un círculo dentro de la estructura mitocondrial que asemeja una vacuola interna (Figura 8C, D). Este tipo de secciones del gancho se encuentran con frecuencia, y el contenido de la estructura interna es generalmente similar al del resto del citoplasma. Pero también puede ser bien diferente del citoplasma cuando el gancho se encuentra rodeando una vesícula membranosa. Esta última situación también fue observada y descrita claramente por Senger y Saacke (1970). La densidad de electrones en la mitocondria *hooded* se presentó a veces uniforme y en ocasiones, el gancho contó con más densidad que el resto de la mitocondria. Las crestas fueron escasas y aparecieron mayormente concéntricas y retraídas hacia la periferia.

El tipo *hooded* fue observado en todos los estadios de desarrollo, desde el día 1 al 4, tanto en tratamientos con suero como en tratamientos sin suero. Frecuentemente se encontraron asociadas a gotas de lípidos (Figura 8E).

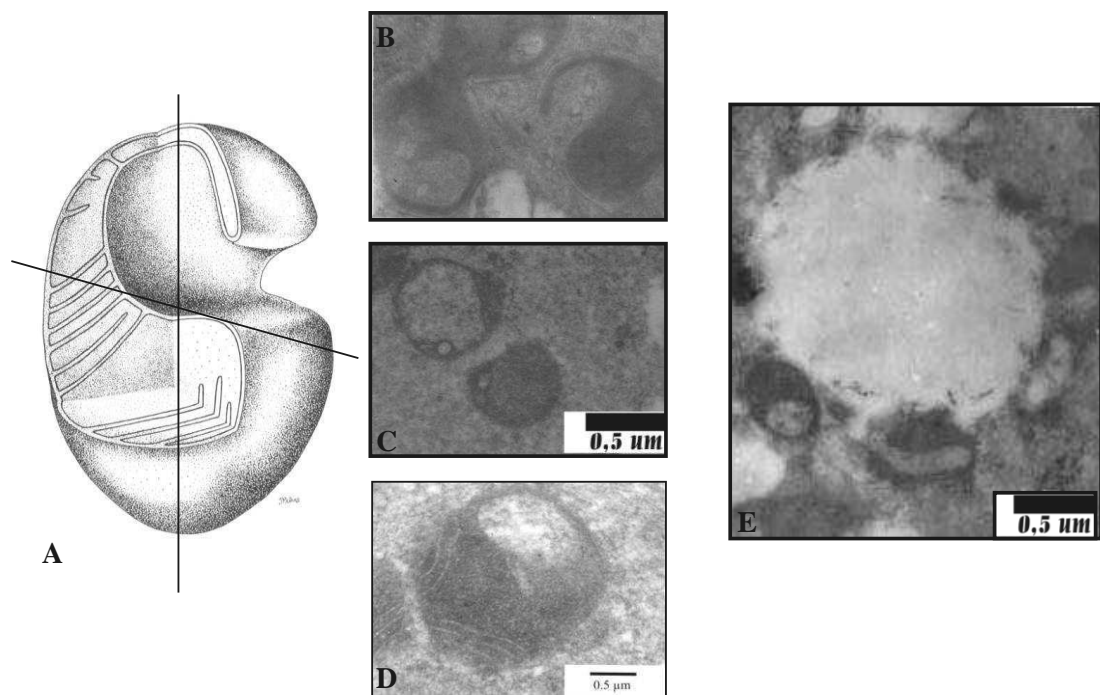


Figura 8: A) Ilustración esquemática tridimensional de mitocondria *hooded* (adaptada de Senger y Saacke, 1970), B, C y D) algunas formas en que se puede observar al tipo *hooded* de acuerdo a la sección de corte, E) mitocondrias *hooded* asociadas a una gota de lípidos.

Mitocondrias ortodoxas

Tienen densidad electrónica uniforme y en corte transversal se presentan redondas o alargadas. Las crestas son transversales al eje mayor cubriendo toda (madura) o parte (inmadura) de la organela. Estos dos estados del morfotipo ya fueron señalados por otros autores (Crosier y col., 2000). Sin

embargo consideramos que los términos “maduro” e “inmaduro” tienen una connotación funcional que se aplica igualmente a otros tipos de mitocondrias. Es por esto que decidimos denominarlas “ortodoxas” de acuerdo a la literatura tradicional (Fig. 9B).

Particularmente, las mitocondrias ortodoxas solo se observaron durante los días 1 y 2 de desarrollo, en medios con o sin suero. No se hallaron en los días 3 y 4, en ninguna de las condiciones de cultivo estudiadas.

Mitocondrias swollen

En el tipo *swollen* (hinchado), la matriz de la organela cuenta generalmente con menor densidad electrónica que la periferia (Fig. 9C). Se trata de mitocondrias con formas redondas, con escasa cantidad de crestas las que aparecen retraídas hacia la periferia. Se encontraron en todos los estadios y tratamientos excepto en el día 1 y en el día 2 luego de 24 hs de cultivo con suero (2CS24).

Mitocondrias fusionadas

Llamamos así a un tipo mitocondrial cuya forma sugiere la adhesión de varias mitocondrias en una sola estructura (Fig. 9D-F). Frecuentemente y observando por secciones, pueden encontrarse los mismos planos de corte de las formas *hooded* y, tal como en estas, las crestas se encuentran en disposición concéntrica. La densidad electrónica en el tipo fusionado no resulta uniforme.

Se hallaron en todos los estadios de desarrollo y horas de tratamiento con suero, excepto en el día 2 de cultivo sin suero, y en el día 4 con suero desde el Día 1 (4CS72).

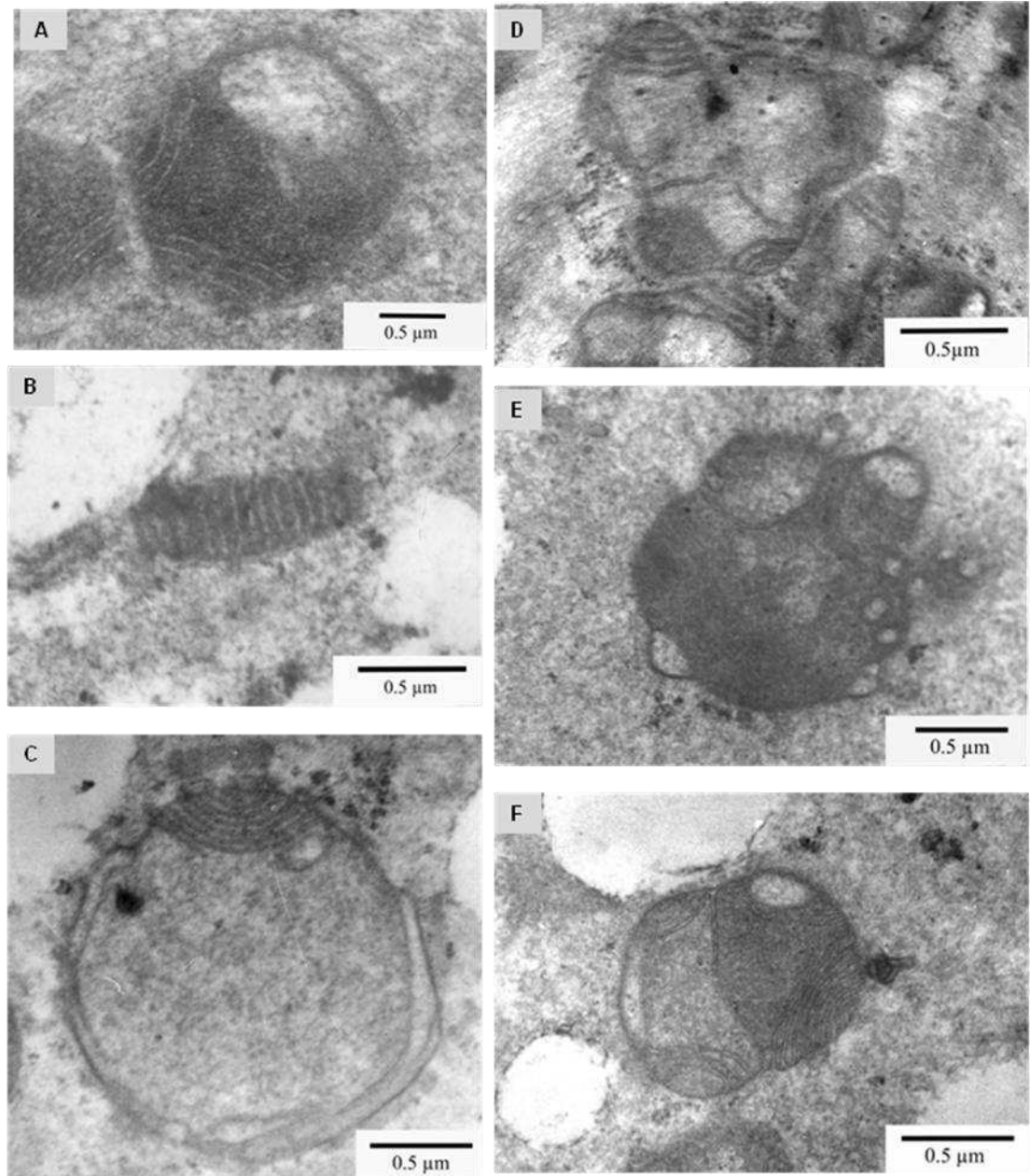


Figura 9: Morfotipos mitocondriales de embriones de 1 a 4 días. A) tipo *hooded*
B) ortodoxo; C) *swollen*; D, E, F) mitocondrias fusionadas

En algunos casos las mitocondrias observadas contaron con inclusiones como gránulos o vesículas con contenido diferenciado respecto del citoplasma celular (Fig. 10). Sin embargo, la morfología en estos casos no se vio alterada y por eso decidimos tomarlas como variantes del tipo correspondiente: *hooded*, *swollen*, ortodoxo o fusionado. Las mitocondrias con inclusiones como gránulos o vesículas, se encontraron en todos los días de desarrollo y tratamientos.

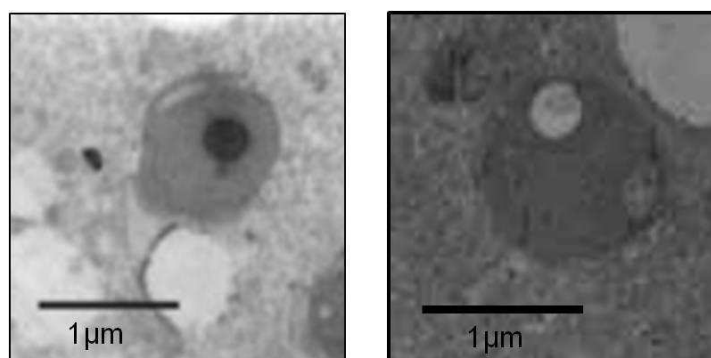


Figura 10: Mitocondrias *hooded* con gránulo de glicógeno (izquierda) y con vesícula (derecha). En el corte de la derecha nótese además el gancho en sección transversal, con apariencia de vacuola pero con contenido citoplasmático.

4.4. Área embrionaria cubierta por mitocondrias

En esta sección, a efectos gráficos, los porcentajes medios de todas las micrografías de cada embrión se resumen en un punto. Para evaluar mayores detalles puede consultarse la sección 7.2. Figuras del Apéndice, donde se presentan los gráficos de los resultados de cada micrografía por embrión.

Embriones de 1 a 4 días de desarrollo

Las mitocondrias *hooded* fueron claramente las más representadas en todas las condiciones estudiadas. Los tipos mitocondriales *swollen*, ortodoxo y fusionado, fueron agrupados bajo el nombre de “otros tipos” para facilitar la observación gráfica de los tipos encontrados en menores proporciones.

La dinámica mitocondrial del tipo *hooded*, entendida como el cambio de porcentajes entre un día de desarrollo y otro, obtenida para embriones cultivados en medio sin suero (2SS, 3SS, 4SS) y la dinámica para embriones cultivados a partir del Día 1 en medio suplementado (2CS24, 3CS48, 4CS72), resultaron similares en tendencias (Fig. 11A y 11B): el área cubierta decrece hacia el día 2, incrementa hacia el día 3 y vuelve a decrecer hacia el día 4. Hacia el día 2 en medio sin suero (2SS) hallamos una reducción significativa respecto del día 1 (**t= -2,758, P= 0,007, GL 100**) y del día 3 (**t= -2,754, P= 0,007, GL 100**). Sin embargo, esa reducción no resultó significativa en embriones de día 2 cultivados en medio suplementado (2CS24) respecto del día 1. El incremento hacia el día 3 respecto del día 2, solo resultó significativo en medio sin suero. Hacia el día 4 en cultivos suplementados (4CS72) el área cubierta por el tipo mitocondrial *hooded* se redujo respecto del día 1 (**AB: t= -2,079, P= 0,040, GL 93**) y del día 3 (**t= -2,286, P= 0,025, GL 93**, Fig. 11B), tal como sucedía en cultivos sin suero (4SS), aunque ahora significativamente.

Respecto a los otros tipos mitocondriales, los rangos de los porcentajes de áreas obtenidos entre los días 1 a 4, fueron similares para cultivos con suero y sin suero, no hallándose diferencias estadísticas.

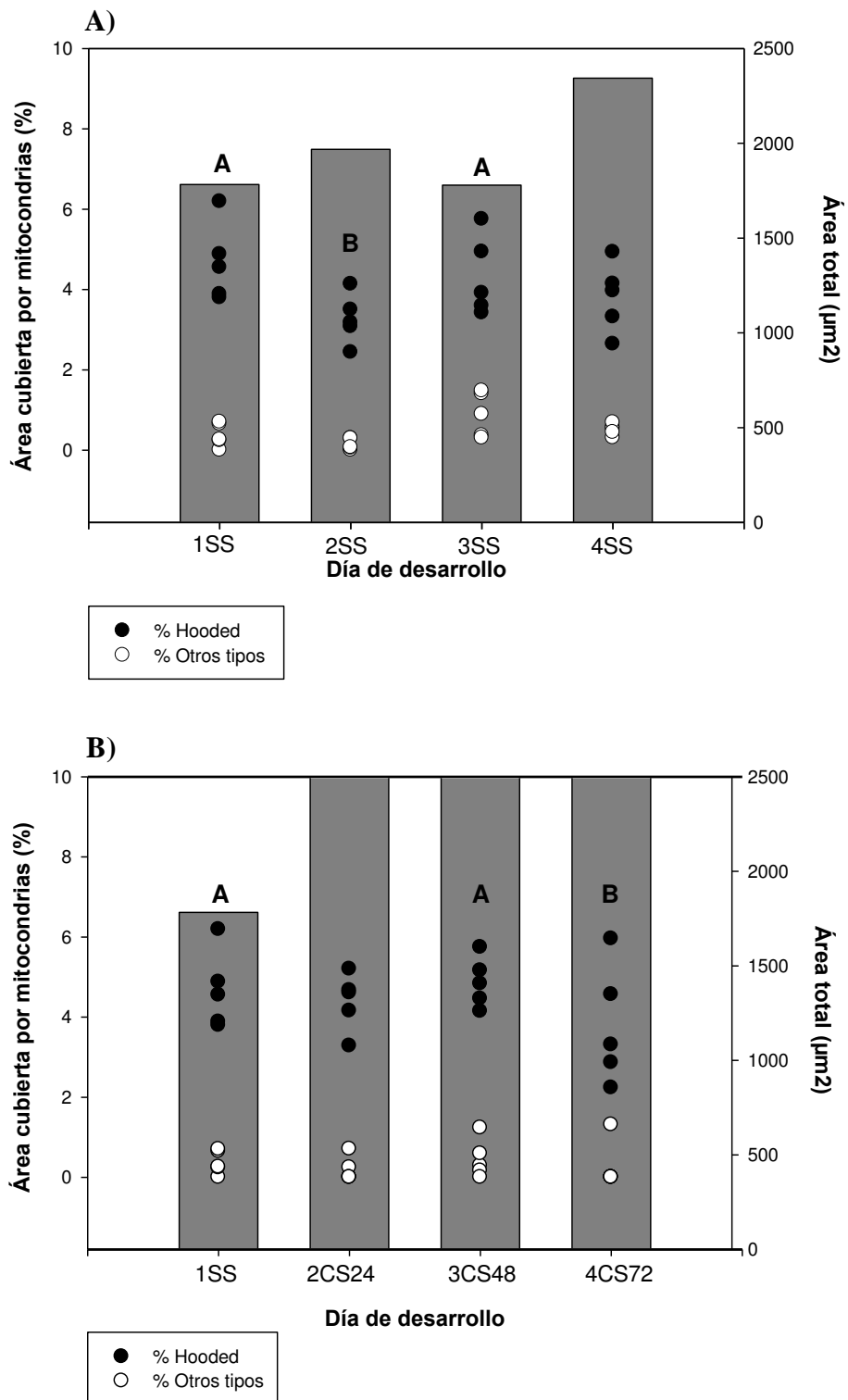


Figure 11: Área cubierta por mitocondrias en embriones cultivados **A)** sin suero, **B)** con suero desde el Día 1. Distinta letra indica diferencias significativas. La altura de las barras representa el área total observada de los 5 embriones. Las barras mayores a 2.500 µm² aparecen cortadas.

Embriones de 3 días de desarrollo

Hacia el día 3 y comparando las diferentes condiciones de cultivo entre sí (3SS, 3CS24, 3CS48, Fig. 11C) encontramos que los porcentajes obtenidos no fueron significativamente diferentes.

Respecto a los otros tipos mitocondriales, no se hallaron diferencias significativas.

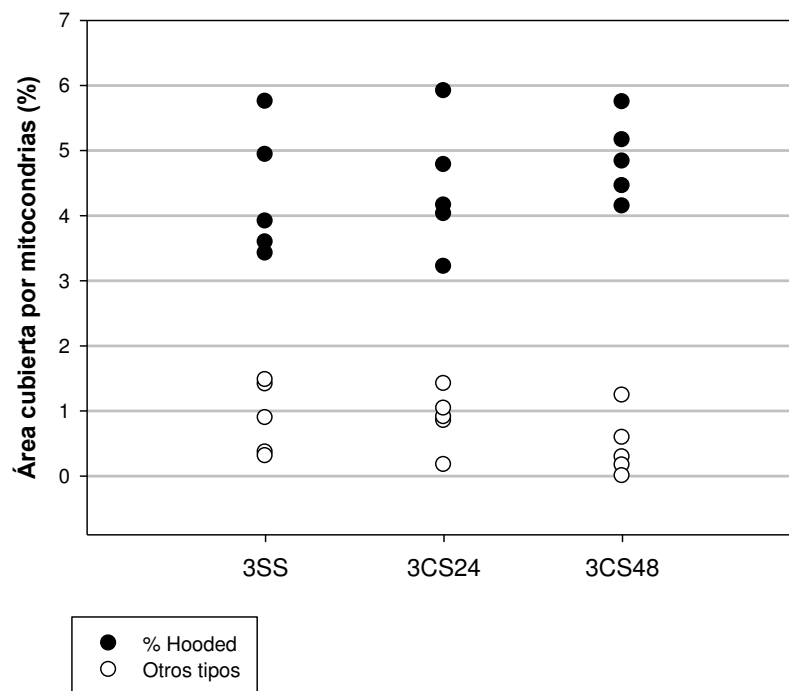


Figure 11C: Área cubierta por mitocondrias en embriones de día 3.

Embriones de 4 días de desarrollo

Evaluando el día 4 de desarrollo y comparando los embriones cultivados completamente sin suero (4SS), y con suplemento de suero durante diferentes periodos (4CS24, 4CS48, 4CS72), encontramos que el área cubierta por mitocondrias *hooded* de embriones desarrollados en medio de cultivo suplementado durante 24hs, fue significativamente mayor respecto del área

cubierta por embriones desarrollados completamente sin suero ($t=-2,452$; $P=0,016$; **GL 90**) y embriones desarrollados con suero durante 72hs ($t=2,332$, $P=0,022$; **GL 90**, Figure 11D).

Además, en embriones de día 4 cultivados en medios con suero por 72hs (4CS72), la amplitud del rango de porcentajes fue notablemente mayor respecto de las demás condiciones (4SS, 4CS24, 4CS48). Esto se debe a que 1 de los 5 embriones se alejó del resto, alcanzando porcentajes mayores.

Entre los “otros tipos” mitocondriales las diferencias no fueron significativas.

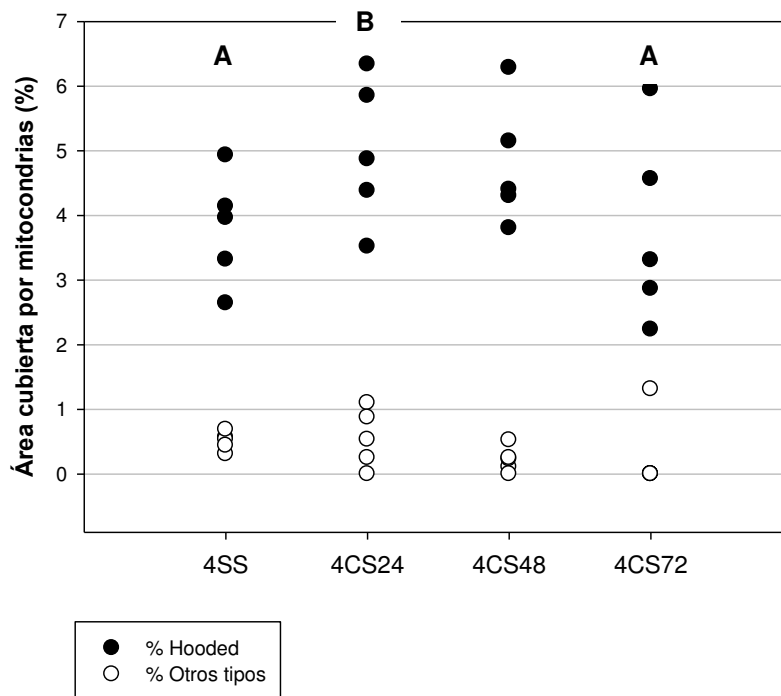


Figure 11D: Área cubierta por mitocondrias en embriones de día 4. Distinta letra indica diferencias significativas.

Tamaño y cantidad de mitocondrias hooded.

Evaluamos las relaciones entre el área cubierta por mitocondrias *hooded* y, el área promedio y la cantidad de mitocondrias por micrografía.

Observamos que el área cubierta por mitocondrias *hooded* tiene una asociación positiva tanto con la cantidad de organelas en la micrografía (0,59, p-valor < 0.00001) como con el área promedio de las mitocondrias (0,26, p-valor < 0.00001). Sin embargo, dicha asociación (Fig. 12) es más fuerte en el primer caso.

Otra manera de evaluar estas asociaciones es mediante estudios de regresiones múltiples, en las que se controla por posibles efectos debidos a la manipulación, día de desarrollo y horas en cultivo con suero. De dichos estudios obtenemos que, el 47% de la variabilidad observada en el porcentaje de *hooded* puede ser explicada por el número de mitocondrias. Además, el 18% de la variabilidad de observada en el porcentaje de *hooded* puede ser explicada por el área promedio.

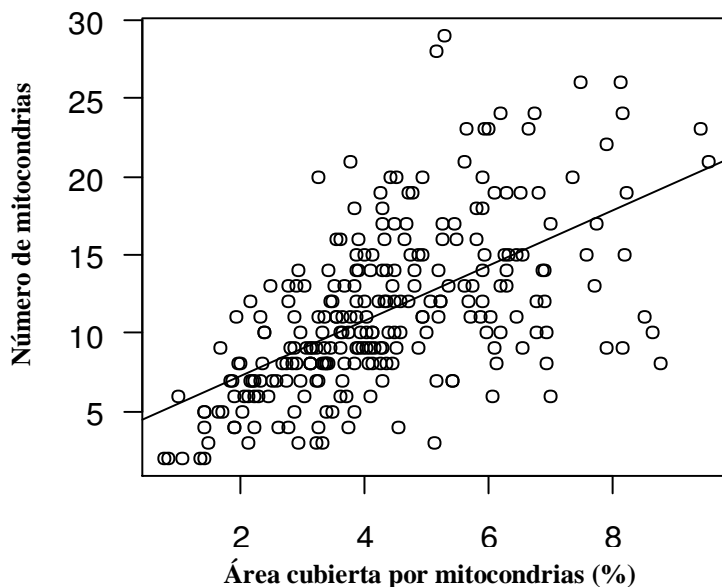


Figura 12: Relación entre área cubierta por mitocondrias *hooded* y número de organelas.

Resumen de observaciones

Las formas *hooded* fueron las mayoritarias en todas las condiciones estudiadas.

Los tipos ortodoxo, inmaduro, *swollen* y fusionado denominados “otros tipos mitocondriales” alcanzaron áreas muy pequeñas y con una alta variabilidad relativa. Es por esto que no podemos ser concluyentes al momento de analizar los cambios en el área cubierta por los otros tipos mitocondriales durante el desarrollo o en diferentes condiciones de cultivo. A pesar de no poder ser concluyentes en relación a los cambios, consideramos importante indicar su presencia a fin de completar la caracterización de las mitocondrias en todas las condiciones estudiadas.

TABLA 1: Área promedio cubierta por mitocondrias (%) en embriones bovinos PIV. Los datos representan valores medios de porcentajes de mitocondrias *hooded*, ortodoxas, *swollen* y fusionadas (“otros tipos”), obtenidos para cada día de desarrollo y horas de cultivo con suero.

Día de desarrollo y horas en suero	HOODED		ORTODOXAS		SWOLLEN		FUSIONADAS		Área Total (µm ²)
	%	σ	%	σ	%	σ	%	σ	
1 SS	4,657	0,968	0,130	0,153	0	0	0,239	0,290	1783
2 SS	3,262	0,621	0,067	0,091	0,073	0,125	0	0	1968
2 CS 24h	4,381	0,719	0,059	0,106	0	0	0,130	0,291	2990
3 SS	4,320	0,992	0	0	0,775	0,617	0,114	0,193	1779
3 CS 24h	4,417	1,005	0	0	0,712	0,345	0,164	0,226	1611
3 CS 48h	4,867	0,622	0	0	0,091	0,132	0,365	0,463	3744
4 SS	3,798	0,865	0	0	0,449	0,333	0,179	0,227	2344
4 CS 24h	4,991	1,130	0	0	0,306	0,389	0,312	0,454	2845
4 CS 48 h	4,786	0,964	0	0	0,137	0,152	0,085	0,119	1694
4 CS 72 h	3,786	1,483	0	0	0,363	0,811	0	0	3581

Día 0: Fecundación; **%:** Porcentaje de área cubierta respecto del área total; **σ:** desviación standard estima la variabilidad del área cubierta entre embriones; **D SS/CS HH:** **D,** día de desarrollo; **SS:** medio sin suero; **CS:** medio suplementado con suero; **HH:** 24, 48 o 72 horas de cultivo con suero

4.5. Distribución de lípidos en el blastómero

Las inclusiones o gotas lipídicas se distinguen ultraestructuralmente por ser estructuras sin doble membrana (característica de las vesículas acuosas) y por tener contenido denso en electrones (o electro denso). La distribución de las gotas lipídicas fue irregular sobre todo el blastómero y ellas aparecieron con diferentes tamaños (Fig. 13). La comparación del diámetro promedio de las gotas lipídicas en cada micrografía, controlando por efecto de la manipulación y por las horas de cultivo con suero, indica que:

- no se observa ningún efecto debido al cultivo en suero,
- existe un efecto significativo (p-valor = 0.0008662) debido a los días de desarrollo (Tabla 2), en el diámetro promedio de las gotas lipídicas.

Tabla 2: Tabla de análisis de varianza para el porcentaje de área promedio de la gota de lípidos.

	GL	Suma Cuadr.	Cuadr.	F valor	P (>F)
Día	3	10.365	3.4550	5.7025	0.0008662
Horas	3	1.854	0.6181	1.0202	0.3842949
Manip	5	4.809	0.9619	1.5876	0.1641478
Residuales	245	148.438	0.6059		

Día: día de desarrollo; **Horas:** horas de cultivo en suero; **Manip:** manipulación

En la tabla siguiente observamos que las áreas promedio aproximadamente se triplican con cada día de desarrollo (Tabla 3).

Tabla 3: Estimación del cambio del área promedio de lípidos respecto del día 1

Día	Estimación	Error Estd.	t	P (> t)
Día2	0.06364	0.19218	0.331	0.740811
Día3	0.20904	0.18425	1.134	0.257694
Día4	0.62165	0.18595	3.343	0.000958

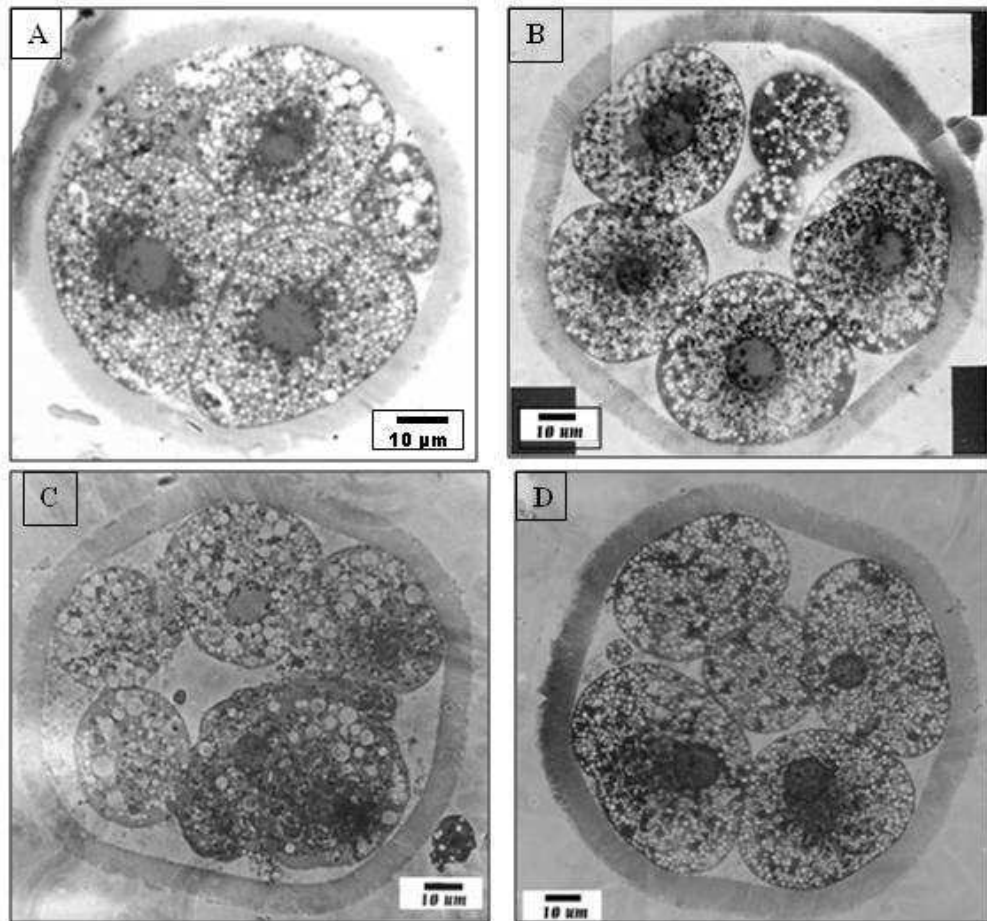


Figura 13: Distribución de vesículas lisosomales y gotas de lípidos en embriones de A) 2 días de desarrollo cultivado con suero desde el día 1 (2CS24, sección semifina coloreada con Azul de Toluidina); B) 3 días cultivados sin suero (3SS); C) 3 días cultivado con suero del Día 1 (3CS48); D) 3 días cultivado con suero desde el día 2 (3CS24). B, C y D son composiciones realizadas a partir de micrografías electrónicas, con la colaboración del Dr. Juan Pablo Bozzini.

4.6. Área embrionaria cubierta por lípidos

Embriones de 1 a 4 días de desarrollo

Las superficies cubiertas por gotas de lípidos cuadruplicaron aproximadamente las superficies cubiertas por mitocondrias y no repitieron la dinámica de estas últimas entre los días 1 a 4 de desarrollo.

En cultivo sin suero, entre los días 1 a 3, los porcentajes del área cubierta por gotas lipídicas fueron de rangos semejantes. Hacia el día 4, estos incrementaron significativamente respecto de los días 1 (**t= 3,184, P= 0,002; GL 91**) y 3 (**t= 2,611, P= 0,011; GL 91**; Fig. 14A). Estas diferencias significativas se debieron a la presencia de dos embriones cuyos porcentajes promedio son $30,89 \% \pm 8,76$ y $31,89 \% \pm 6,49$.

En cultivos suplementados desde el día 1 observamos una reducción significativa en el día 3, respecto a los días 1 (**t= 2,269, P= 0,026; GL 85**) y 2 (**t=2,054, P= 0,043; GL 85**; Fig. 14B).

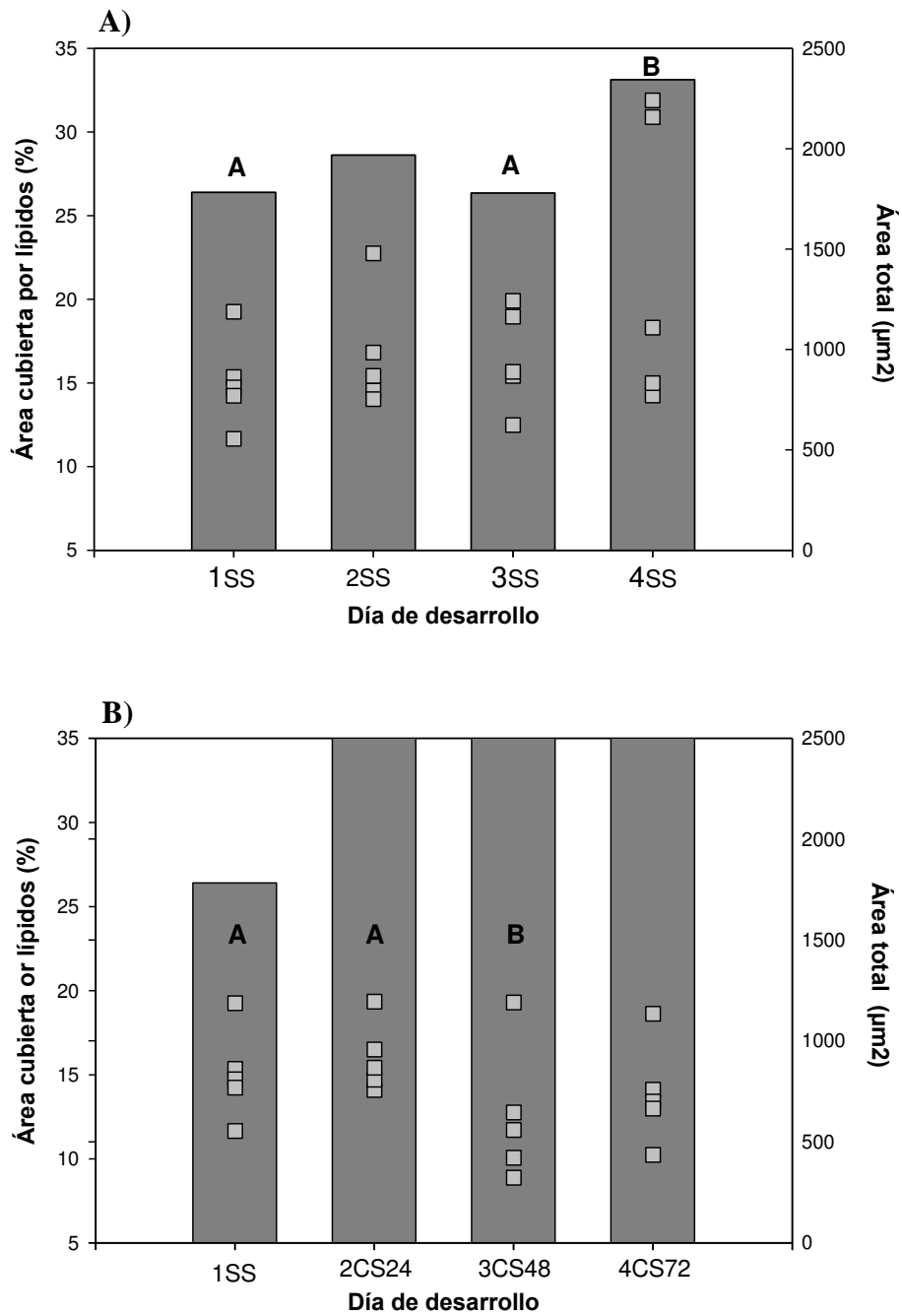


Figura 14: Área cubierta por lípidos en embriones de 1 a 4 días cultivados **A)** sin suero, **B)** con suero. Distinta letra indica diferencias significativas. La altura de las barras representa el área total observada de los 5 embriones. Las barras mayores a $2.500 \mu\text{m}^2$ aparecen cortadas.

Embriones de 3 días de desarrollo

En el día 3 de desarrollo se observó un decrecimiento significativo en el área cubierta por gotas lipídicas de embriones tratados con suero durante 48hs (3CS48) respecto de los embriones tratados con suero por 24hs (3CS24, $t = -3,532$, $P = 0,001$, GL 66) y cultivados sin suplemento (3SS, $t = -2,621$, $P = 0,011$, GL 66; Fig. 14C).

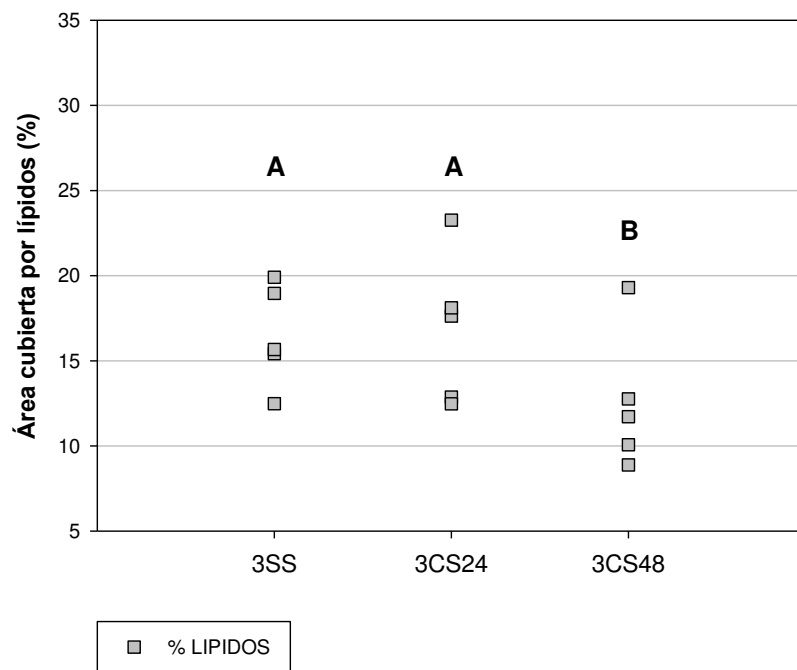


Figure 14C: Área cubierta por lípidos en embriones de Día3. Distinta letra indica diferencias significativas.

Embriones de 4 días de desarrollo

En el día 4, los porcentajes del área cubierta por lípidos obtenidos en cultivo sin suero (4SS) fueron significativamente mayores a los obtenidos en medio con suero durante 24hs (4CS24; $t=-2,906$, $P= 0,005$; GL 89) y durante 72hs (4CS72; $t=-3,064$, $P=0,003$; GL 89, Fig. 14D).

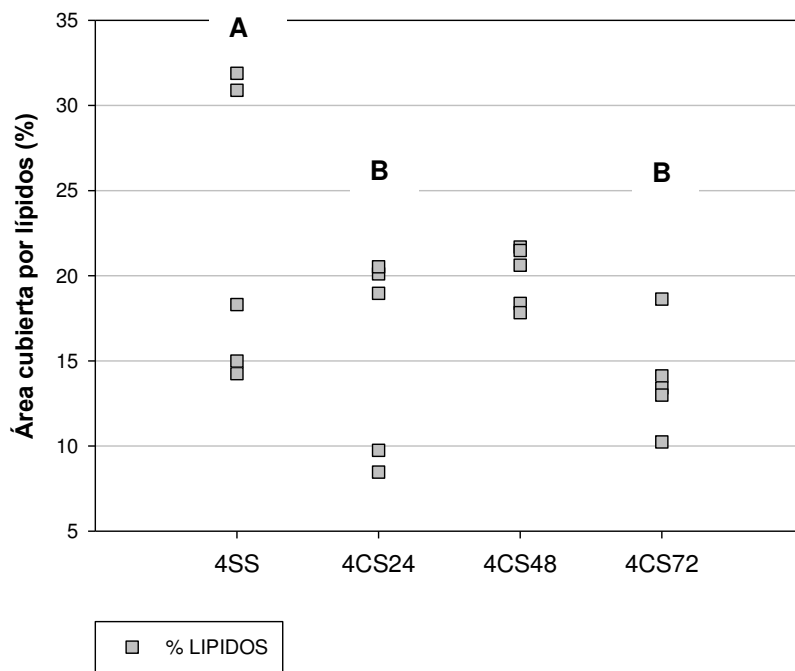


Figure 14D: Área cubierta por lípidos en embriones de Día 4. Distinta letra indica diferencias significativas. Además, existen diferencias significativas entre 4CS48 respecto de 4CS72 ($t=2,871$, $p= 0,005$; GDL 89).

4.7. Relaciones entre mitocondrias y lípidos

A continuación se presentan los resultados de los análisis estadísticos realizados para evaluar la relación entre mitocondrias y lípidos.

Mediante una regresión lineal simple entre el % de área cubierta por mitocondrias *hooded* y el % de área cubierta por lípidos, se estimó un coeficiente de correlación de -0.29 (p-valor < 0.00001).

Como esta correlación podría estar afectada por efectos de confusión debido a diferencias en los días de desarrollo, las horas de cultivo en suero y las manipulaciones, también se ajustó un modelo de regresión múltiple donde estas variables se incluyen como co-variables de control (Tabla 4).

Tabla 4:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	3.0115828	0.2653373	11.350	< 2e-16 ***
Lípidos	-0.3044528	0.0618472	-4.923	1.57e-06 ***
Dia2	-0.4551654	0.2324204	-1.958	0.0513 .
Dia3	-0.1235022	0.2223726	-0.555	0.5791
Dia4	-0.0008306	0.2301191	-0.004	0.9971
Horas24	0.3377874	0.1509676	2.237	0.0262 *
Horas48	0.2825906	0.1860752	1.519	0.1301
Horas72	-0.3596151	0.2471586	-1.455	0.1470
Manip10	0.2762827	0.2091492	1.321	0.1877
Manip17	-0.1580478	0.2146606	-0.736	0.4623
Manip29	0.1475378	0.2165950	0.681	0.4964
Manip30	-0.1548365	0.2168161	-0.714	0.4758
Manip34	0.1302968	0.2064417	0.631	0.5285

Se obtuvo un coeficiente de -0.30 para el área cubierta por lípidos (p-valor <0,00001); este resultado reforzó el obtenido con el coeficiente de correlación. Por lo tanto, existe una clara asociación negativa de manera que en general, si hay aumento en el área cubierta por mitocondrias *hooded* se produce

una reducción en el área cubierta por lípidos en cada categoría, y viceversa (Fig. 15). Y esto es independiente del cultivo con o sin suero.

Además, la regresión múltiple refuerza la observación hecha en la sección 4.4. “Área embrionaria cubierta por mitocondrias”, mostrando un aumento estadísticamente significativo (p -valor < 0.03) del área de mitocondrias *hooded* a las 24 hs después del adición de suero respecto del cultivo sin suero.

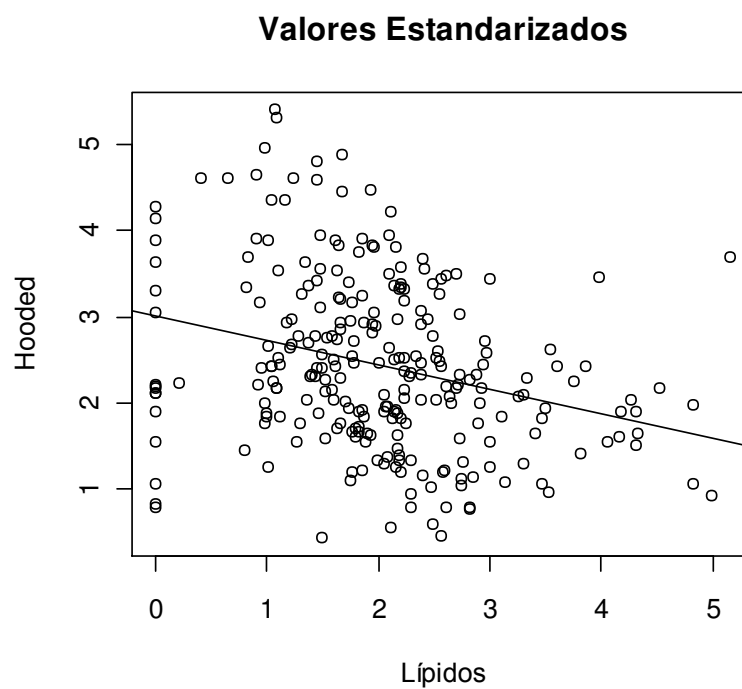


Figura 15: Asociación entre el porcentaje de área cubierta por mitocondrias *hooded* y el porcentaje de lípidos para cada micrografía.

Embriones humanos

4.8. Activación y desarrollo de ovocitos partenogénéticos

- De un total de 7 ovocitos (inmaduros, maduros y maduros no fecundados luego de ser inseminados) se obtuvieron 2 embriones por activación partenogénica de ovocitos en estadios MI y MII de desarrollo. Estos embriones continuaron desarrollándose en medio sin suplemento de suero hasta 6-8 células, y en uno de los casos se verificó la firme adhesión a la placa de cultivo con matriz de fibronectina como sustrato de crecimiento (Fig. 16A y B).

4.9. Desarrollo de embriones en matriz de fibronectina

- Se recibieron un total de 55 embriones. En la mayoría de ellos se observaron blastómeros irregulares, fragmentación alta y retraso en el desarrollo al momento de la transferencia. De acuerdo a los criterios de Veeck (1999) descriptos en la sección 3.8, los embriones se clasificaron en,
 - clase "I": 5 embriones
 - clase "II": 13 embriones
 - clase "III": 25 embriones
 - clase "IV": 12 embriones

Del total de los 5 embriones clase "I"

- 2 de triploides sin dividir, desarrollaron hasta estadios de 2 y 4 células (aproximadamente 24hs, Fig. 16E y F)
- 2 en estadio de clivaje temprano, 1 desarrolló hasta 7-8 células (aproximadamente 24hs)
- 1 blastocisto, continuó desarrollándose durante 24 hs (Fig. 16C y D)

Estos 4 embriones adhirieron firmemente a la matriz de fibronectina, posibilitando el cambio de medio de cultivo y la fijación sin desprenderse.

Ninguno de los embriones de las clases "II", "III" y "IV", entre los cuáles se contaron 5 blastocistos, siguieron desarrollando luego del trasladado al laboratorio.

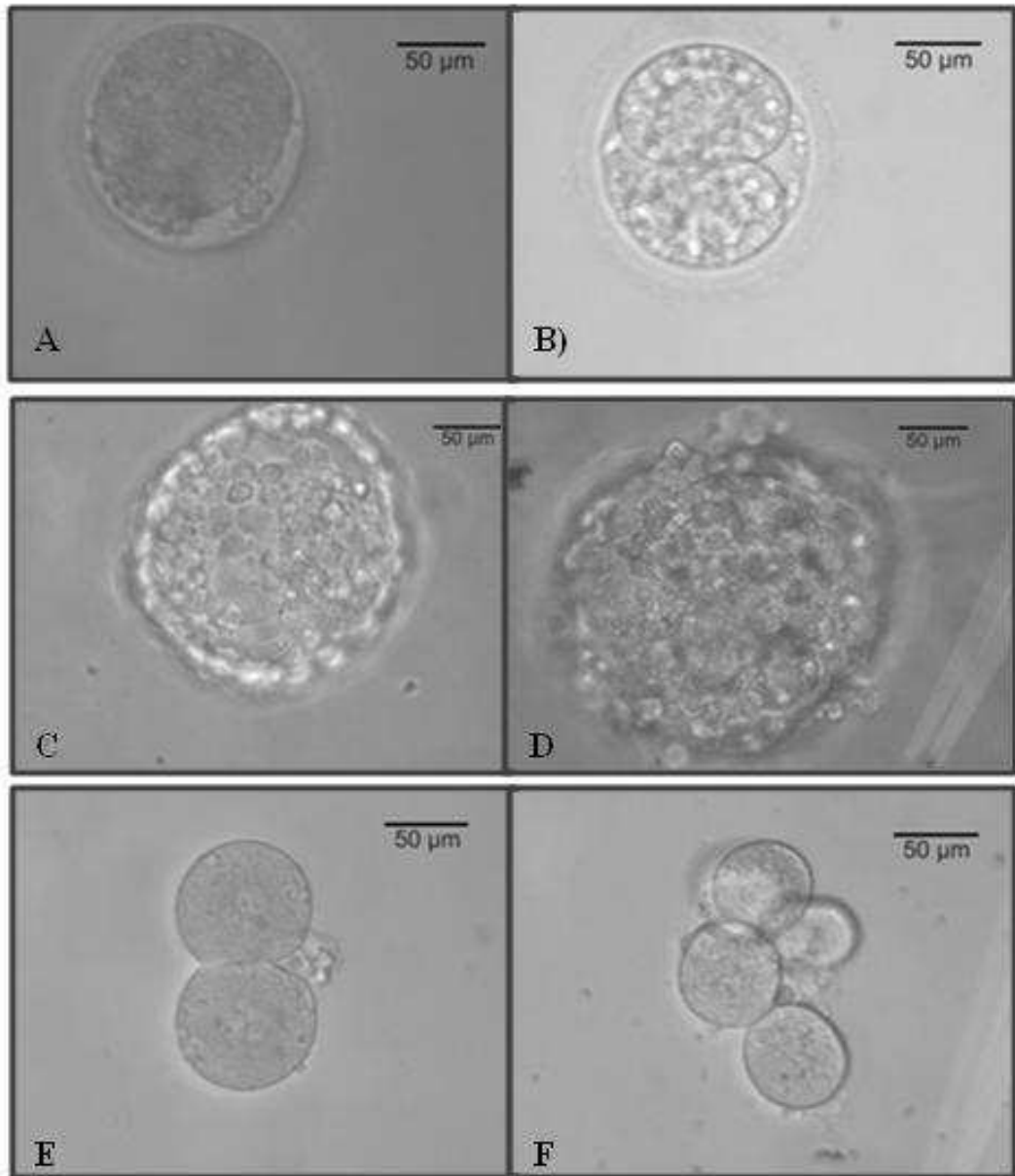


Figura 16: **A y B)** Ovocito antes y después de la activación partenogénica **C y D)** Blastocisto sin zona pelúcida y luego de 24hs de desarrollo y adhesión a la matriz. **E y F)** Dos embriones polinucleados sin zona pelúcida antes y después de 24 hs de desarrollo y adhesión a la matriz.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Tipos mitocondriales y sus posibles estados funcionales

El tipo mitocondrial *hooded* fue descrito primero por Senger y Saacke (1970) caracterizando usualmente al ovocito bovino. Entre los autores abocados al estudio de la producción *in vitro* de embriones, este tipo mitocondrial generó desacuerdos. Algunos lo vincularon a formas anormales o de degeneración, ya sea porque parecía tener una vacuola interna o porque no se lo observa en embriones *in vivo* (Pikó y Chase, 1973; Shamsuddin y R-Martinez 1994). Se consideró además que este tipo mitocondrial había deformado su estructura de crestas y matriz, y por esto resultaría incapaz de efectuar el metabolismo mitocondrial (Abe y col., 1999a; Heyman y col., 1995; Dorland y col., 1994). Otros autores en cambio, consideraron a las mitocondrias *hooded* estructuras usuales del embrión temprano, que resultan de la transición hacia las mitocondrias maduras (Crosier y col. 2000, 2001; Abe y col., 2002), observadas en embriones mamíferos producidos *in vitro* e *in vivo*, incluidos los embriones humanos, persistiendo a través de los estadios de clivaje y la mórula tardía (Van Blerkom, 2004).

Entre los tipos mitocondriales hallados en nuestro trabajo, el *hooded* es la forma predominante en todos los embriones bovinos en estadio de clivaje temprano, 2 a 16 células, independientemente del medio de cultivo con o sin suero. Este morfotipo ha sido denominado "subdesarrollado", ya que parece ser la forma mitocondrial que regula las actividades de la organela, limitando la capacidad para efectuar la fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno, mientras que reduce la generación de EROs, las que comprometen la función mitocondrial e inician la apoptosis (Van Blerkom, 2004). En este sentido, las mitocondrias de los estadios de clivaje anteriores a mórula han demostrado tener baja actividad metabólica (Van Blerkom y col., 1995), baja tasa respiratoria (Trimarchi y col., 2000) y escaso metabolismo de glucosa (Gardner, 1998).

Las mitocondrias **ortodoxas**, sólo fueron halladas en los estadios de 2 a 6 células y en cantidades muy reducidas respecto de las *hooded*, independientemente del medio de cultivo utilizado. Este tipo mitocondrial también llamado “maduro” había sido encontrado en mórulas producida en medio con y sin suero, con proporciones mucho menores que las *hooded* (Crosier y col., 2000). Pero en el estadio de blastocisto ambos tipos alcanzaban proporciones similares, mientras que las *hooded* se encontraron reducidas respecto del mismo tipo en los estadios anteriores (Crosier y col., 2001). Estas observaciones fundamentaron la idea de que existe una transición del tipo *hooded* hacia el ortodoxo, el tipo de alta actividad respiratoria dominante en la mayoría de los blastocistos mamíferos (Van Blerkom 2004). Sin embargo, en nuestro estudio, no encontramos al tipo ortodoxo en los días 3 y 4. Es posible que necesitaríamos evaluar áreas mayores o utilizar técnicas más precisas para detectar la transición o reemplazo de un tipo mitocondrial por otro.

Las mitocondrias tipo **swollen** o hinchadas fueron observadas en blastocistos bovinos PIV (Plante y King, 1994), en embriones de día 13 congelados y luego descongelados (Mohr y Trounson, 1981) y en embriones de 2 células obtenidos *in vivo* y partenogénéticos (Han y col., 2008). Este tipo mitocondrial es común en muchas condiciones patológicas, donde se lo considera “degenerado” por la drástica reducción en el número de crestas, indicativo de menor actividad (Ferreirinha y col., 2004). La inflamación o “swelling” parece provenir de la apertura de poros de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM o MPTP por su sigla en inglés, *mitochondrial permeability transition pore*). Altas cantidades de EROs dispararían la apertura de estos poros, a través de los cuales se disipa el gradiente entre citoplasma y matriz posibilitando la entrada de agua a la organela y el hinchamiento (Torner y col., 2002). En este sentido, se comprobó que en astrocitos de ratón, cuando se induce la síntesis de cantidades muy altas de EROs por foto irradiación y no existen signos de potencial de membrana, el tipo mitocondrial presente es el

swollen (Peng y Jou, 2004). *In vitro*, las EROs podrían provenir de las altas concentraciones de espermatozoides que permanecen en cultivo conjunto con el ovocito y en volúmenes de medio muy reducido durante la fecundación, de la continua exposición a la luz visible, de enzimas como la amino oxidasa presentes en el suplemento de suero o de trazas de metales presentes en el medio de cultivo o en el agua utilizada.

Nuestros resultados muestran que este tipo mitocondrial considerado degenerado, en general está presente en porcentajes menores a 1,5 dependiendo del día y tratamiento. Además, en embriones de 4 a 16 células (días 2, 3 y 4) cultivados en medio suplementado con suero, en comparación con los embriones cultivados en medio libre de suero, la proporción del área cubierta por el tipo *swollen* no presentó ningún aumento (ver Tabla 1). Estos datos nos hacen sospechar que, en cambio, podría haber una reducción del tipo *swollen* debida al medio suplementado con suero. Sería preciso profundizar el estudio de los tipos *swollen*, que claramente representan estados degenerativos, pero cuyo estudio no pudo completarse mediante la técnica utilizada.

Consideramos a las mitocondrias ***fusionadas***, estructuras provenientes del proceso de fusión o fisión mitocondrial debido a la gran similitud entre ellas y el tipo *hooded*, cuando a las primeras se las observa por secciones. Con un criterio semejante, las mitocondrias con crestas desorganizadas halladas en axones de ratón, fueron consideradas estructuras resultantes de la fusión mitocondrial (Ferreirinha y col., 2004). Las mitocondrias fusionadas cubren un área muy escasa del blastómero y están presentes en embriones de 2 a 16 células (días 1 a 4 de desarrollo). Este tipo mitocondrial, aunque no descrito, se ha observado anteriormente en embriones de 5 a 13 días de desarrollo (Mohr y Trounson, 1981).

La cantidad de mitocondrias fusionadas varía de acuerdo al momento del ciclo celular, siendo mayor en la primera fase de crecimiento de humanos (G1), y menor al pasar a la fase de síntesis (S), respecto de la fase de división (Margineantu y col., 2002). Por lo tanto, sería posible hallarlas en cantidades pequeñas en los blastómeros en división, de acuerdo al momento en que

ocurriera la fijación. Este tipo que denominamos fusionado, y que hallamos en embriones bovinos *in vitro* de 1 a 4 días cultivados con y sin suero, son la evidencia de que los eventos de fusión y fisión mitocondrial suceden en los estadios de clivaje anteriores a mórula, a pesar de que, como fuera observado por Pikó y Taylor (1987), no existe nuevo ADNm hasta el estadio de blastocisto. En este sentido, los resultados de Chiaratti y col. (2010) refuerzan nuestras observaciones: los embriones de 1 célula que lograron recuperar el alto contenido de ADNm removido por centrifugación y desarrollarse normalmente hasta blastocisto, debieron mantener funcionales los mecanismos de fusión y fisión necesarios para la distribución del nuevo material genético.

Respecto de las mitocondrias con inclusiones de vacuolas, nuestras observaciones indican que estas estructuras además de estar casi ausentes, no alteraran la disposición de crestas de la organelas tipo *hooded* o *swollen*. Además, por encontrarse tanto en cultivos con suero como sin suero de embriones bovinos en estadio de clivaje, esta variante morfo fisiológica no puede ser atribuida al medio de cultivo suplementado, tal como fuera mencionado previamente para el estadio de mórula (Crosier te al., 2000).

5.2. Área embrionaria cubierta por mitocondrias y lípidos

Mitocondrias

Cada tipo mitocondrial observado caracteriza un estado fisiológico de la organela. De acuerdo a nuestros resultados, el tipo morfológico más representado en embriones bovinos de 2 a 16 células producidos *in vitro* corresponde al de las mitocondrias *hooded*. Ellas, junto con las ortodoxas y posiblemente las fusionadas, llevarían a cabo las reacciones responsables del suministro de energía embrionaria para el crecimiento y diferenciación celular.

A través de la microscopia confocal, observamos que la mayor parte del embrión se encuentra cubierta por mitocondrias activas, dispuestas en la zona

perinuclear de los blastómeros durante los primeros 3 días de desarrollo, en coincidencia con lo observado por Krisher y Bavister (1998) y Van Blerkom y col. (2000), y homogéneamente distribuidas al día 4. Sin embargo entre las mitocondrias activas, solo el tipo *hooded* por los altos porcentajes encontrados, permitió detectar modificaciones del área mitocondrial entre las condiciones estudiadas. Por su capacidad de regular las funciones oxidativas del blastómero y por hallarlas presentes en eventos de proliferación mitocondrial a través del tipo fusionado, consideramos que las mitocondrias *hooded* son las indicadas para estudiar el efecto del suero sobre la fisiología celular.

Tomaremos, como único indicador de actividad de las mitocondrias el área cubierta por ellas y supondremos que, mayores áreas cubiertas por mitocondrias tipo *hooded* se corresponden con un mayor potencial de actividad metabólica mitocondrial. Las técnicas utilizadas excluyen la evaluación del incremento de actividad por otras vías. Sin embargo, teniendo en cuenta que la estructura es la base sobre la que actúan las demás formas de activación, su determinación es fundamental.

Teniendo en cuenta que el mecanismo conocido de incremento y reducción de mitocondrias implica a los procesos de fusión y fisión mitocondrial, podríamos pensar que las diferencias detectadas atribuibles al suero son producidas por cambios en esos procesos. Nuestras observaciones apoyan esta idea, en embriones bovinos de 2 a 16 células se encontraron mitocondrias en estado de fusión o fisión y además la variabilidad en el área total cubierta por mitocondrias pudo explicarse principalmente por el incremento en número de organelas para cada categoría.

La dinámica mitocondrial del tipo *hooded*, obtenida para embriones cultivados en medio sin suero (2SS, 3SS, 4SS) y con suero a partir del Día 1 (2CS24, 3CS48, 4CS72, Figura 11) resultaron similares en tendencias, y esto nos llevó a considerar que los eventos del desarrollo podrían revestir más importancia en la dinámica mitocondrial que el medio de cultivo en sí mismo. Pero al profundizar estos resultados hallamos algunas diferencias atribuibles al

suero. En el día 2 respecto del día 1 y 3, observamos que el área mitocondrial se reduce significativamente para embriones cultivados en medio sin suero (2SS; Fig. 11A) y no para embriones cultivados en medio suplementado (2CS24; Fig. 11B). Esto podría interpretarse como un efecto del suero adicionado al Día 1, que propiciaría el mantenimiento de la actividad mitocondrial entre los días 1 y 3 de desarrollo, contribuyendo con la gran demanda energética provocada por la activación del genoma embrionario en el día 3 (8 células, Bavister 1995). Estos resultados podrían estar relacionados con los de Acton y col. (2004), quienes observaron un sustancial incremento en el potencial de membrana mitocondrial del embrión de ratón *in vivo*, ante la activación del genoma embrionario. En cambio en cultivo *in vitro*, el potencial se mantuvo hasta el estadio de activación genómica, y consideran que el medio de cultivo es responsable de este efecto.

En el día 3 (8 células), cuando el desarrollo se vuelve dependiente de la actividad del genoma embrionario y durante el inicio del bloqueo del desarrollo, encontramos evidencias de que el área mitocondrial activa no está siendo modificada por los adicionado de suero al cultivo, ya sea desde el Día 1 (3CS48) o desde el D1 a 2 (3CS24) respecto de los embriones cultivados sin suero (3SS; Figura 11C). Esto podría indicar que el bloqueo del desarrollo embrionario alcanza a los efectos del adicionado de suero. Si el bloqueo ocurre a causa de la gran demanda energética no sostenida por el medio de cultivo (Barnett y Bavister, 1996), nuestros resultados podrían estar indicando que, ni el medio CR1aa sin suero ni con suero desde el día 1 y 2 alcanza para sostener esa demanda. Una posible manera en que el bloqueo puede afectar a las mitocondrias sería inhibiendo los procesos de proliferación, fusión y fisión.

Entre los días 3 y 4, cuando el embrión tiene entre 8 y 16 células observamos que, tanto en medio sin suplementar como en medios con suero desde el Día 1, los porcentajes de mitocondrias se reducen (Fig. 11A y 11B). Sólo en medios suplementados la reducción es significativa, y esto podría

deberse a un efecto del suero adicionado al Día 1, que reduciría el área mitocondrial entre los días 3 y 4 de desarrollo.

En cambio, cuando el suero es adicionado en el día 2, parece haber un mantenimiento de los porcentajes entre el día 3 (3CS24, Fig. 11C) y el día 4 (4CS48, Fig. 11D). En embriones bovinos cultivados con suero desde el día 2, Tarazona y col. (2006) estudiaron la actividad mitocondrial a través de la intensidad de fluorescencia con JC1. En el día 3 observaron un nivel medio de actividad mitocondrial en aprox. el 55% de los embriones o bajo en aprox. 35% de los embriones (n=210) mientras que en el estadio de 16 células (día 4) el porcentaje de embriones con actividad mitocondrial media redujo al 23%, y el de actividad baja o muy baja incrementó hasta el 65% (n=210, Tarazona y col., 2006). A pesar de la coherencia entre nuestros resultados y los de los nombrados autores, existen amplias diferencias por estar basados unos en actividad de todas las mitocondrias y otros en áreas cubiertas por el tipo mitocondrial *hooded*.

Al comparar todos los tratamientos del día 4 (9 a 16 células), durante la salida del bloqueo del desarrollo de bovinos, observamos que nuevamente el suero propicia el incremento del área mitocondrial activa en los embriones que recibieron el suplemento desde el Día 3 de desarrollo (4CS24), respecto al cultivo sin suero (4SS), y con suero desde el Día 1 (4CS72).

El suplemento de suero desde el día 1, cuando el desarrollo del embrión aún depende de las reservas de energía maternas, estaría reduciendo el potencial de actividad dado por el área mitocondrial al día 4 (4CS72), respecto del suplemento desde el día 3. Se destaca en este día de desarrollo, el rango mayor de valores obtenidos: uno de los embriones, con las mayores proporciones de mitocondrias *hooded*, tiene un potencial de actividad mitocondrial diferente al del resto. Para los embriones de las demás condiciones de cultivo las observaciones son más parecidas, es decir, los embriones cuentan con potenciales de actividad semejantes entre sí. Esta respuesta diferencial del embrión ante la condición de cultivo podría indicar que, el medio adicionado

con suero desde el día 1 no sostiene igualmente el desarrollo de todos los embriones durante la salida del bloqueo. Esto podría deberse a diferentes capacidades de desarrollo individual, teniendo en cuenta que la calidad innata del ovocito afecta ampliamente el porcentaje de éstos que se desarrollan hasta el estadio de blastocisto (Rizos y col., 2002). Teniendo en cuenta que los test estadísticos no detectan diferencias significativas en las varianzas entre las distintas condiciones, sería necesario aumentar la cantidad de embriones estudiados para confirmar o descartar estas variaciones en la respuesta embrionaria a la condición de cultivo.

Cuando el suero es adicionado al Día 2 (4CS48), la reserva materna de energía aún sostenía el desarrollo, tal como ocurrió durante el día 1 (embriones de 2 a 6 células). De igual manera que para el suero adicionado al día 1, el suero adicionado en ese momento no propició incremento del área mitocondrial respecto al cultivo sin suero. A pesar de que en la Figura 11D los valores correspondientes a la condición 4CS48 parecen estar incrementados respecto de la condición sin suero (4SS), esto proviene del hecho de que se graficaron los promedios. Al observar los valores individuales pueden verse las semejanzas entre las dos condiciones (Apéndice Fig. 20).

En cambio, el suplemento de suero a partir del día 3 (4CS24) cuando el embrión depende de su propia producción energética (embrión de 8 células), parece ser ventajoso. Este, estaría propiciando el cambio a un metabolismo glucosídico a través del incremento potencial de la actividad mitocondrial al día 4.

Mejor momento para la adición del suero

Al evaluar el área cubierta por mitocondrias *hooded* respecto del mejor momento del cultivo para adicionar el suplemento de suero, tendremos en cuenta que los efectos favorables se observaron únicamente en los estadios de

4-6 células (días 2 de desarrollo, cuando el suero es adicionado al día 1, 2CS24) y 9-16 células (día 4 de desarrollo, cuando el suero es adicionado al día 3, 4CS72).

En el primer caso, cuando el suero es adicionado al día 1, el mantenimiento del área mitocondrial en el día 2 (2CS24) respecto del día 1 y 3 podría favorecer al embrión ante la alta demanda energética del día 3, en comparación con el cultivo sin suero. Pero cuando el suero es adicionado al día 1 podemos observar además los porcentajes de mitocondrias en los días 3 y 4 (3CS48, 4CS72; Fig. 11B). Si bien en el día 3 (3CS48) no hay diferencias respecto de las demás condiciones (3SS, 3CS24, Fig. 11C), hacia el día 4 observamos una reducción del área mitocondrial activa respecto del día 3 (3CS48, 4CS72; Fig. 11B). Esa reducción en el día 4 es evidente también cuando comparamos con los embriones obtenidos en cultivos suplementados desde el Día 3 (4CS24). Es decir, el suplemento de suero desde el Día 1 podría ser desventajoso para el embrión en el reinicio del desarrollo, al día 4.

Por tanto, al evaluar el mejor momento del cultivo para adicionar el suplemento de suero, podemos afirmar que sólo el suero mantenido en cultivo durante 24hs. muestra ser favorable al desarrollo del embrión, incrementando el área mitocondrial al día 4(4CS24), y por tanto el potencial para producir energía y para enfrentar el cambio a metabolismo glucosídico.

Nuestras observaciones coinciden con las de Crosier y col., (2000), quienes evaluando mórulas de 6 días de desarrollo observaron que el área cubierta por mitocondrias embrionarias totales se reduce en embriones cultivados en medio suplementado desde el día 1 respecto de medios suplementados desde el día 3. Esa reducción mitocondrial también fue debida al tipo *hooded*.

A continuación comparamos nuestras expectativas por las cuales la adición de suero en el Día 3 sería ventajosa para el desarrollo de embriones, con las proporciones de embriones obtenidas previamente por algunos autores. Pinyopumintr y Bavister (1994) trabajando con suero de vaca adulta en concentraciones de 10% v/v, comprobaron que al adicionar suero al cultivo

antes de cumplir el Día 1 de desarrollo (18hpi), se reduce significativamente la proporción de embriones que alcanzan el estadio de mórula y blastocisto respecto del cultivo con suero desde el Día 3.5 (82 hpi). Esto coincide con nuestras expectativas. Sin embargo también observaron que el suplemento desde el día 1 reduce la proporción de mórulas y blastocistos respecto del control sin suero. En nuestro estudio sin embargo, no hallamos reducción del área cubierta por mitocondrias entre embriones de 4 días desarrollados con suero desde el día 1 respecto del control sin suero. Esto podría deberse a que trabajamos con un medio de cultivo simple CR1aa con FAF-BSA, mientras que los autores mencionados trabajan con un medio más complejo como lo es el TCM 199 (Gomez y Diez, 2000) suplementado además con polivinilalcohol (PVA) como fuente proteica, y obtienen proporciones más parecidas entre cultivos sin suero y cultivos con suero desde el Día 3.5. Para otros autores, la adición de suero al Día 1 o 2, tampoco parece producir mejoras en el porcentaje de blastocistos respecto a cultivos sin suero (Carolan y col., 1995; Rizos y col., 2003, Duque y col., 2003). En el caso de Duque y col., (2003) se utilizó suero fetal (FBS) como suplemento, el que tienen un mayor contenido de glucosa respecto del suero de vaca adulta (BCS). Pinyopumintr y Bavister (1994) compararon además los dos tipos de sueros, obteniendo resultados superiores con BCS en términos de producción de blastocistos, y demostraron que no hay diferencia en cuanto a si el suero está o no inactivado por calor. Este procedimiento se realiza para evitar efectos citotóxicos que el suero pudiera tener (Palma, 2001).

En cuanto a la obtención de blastocistos, se concluye entonces que el momento de inclusión es un factor que afecta notoriamente el desarrollo del embrión bovino *in vitro* (Pinyopumintr y Bavister, 1994). Sin embargo, en un estudio desarrollado en el mismo laboratorio donde se realizó la PIV de embriones para nuestro trabajo, Lab. de PIV de embriones del EEA-INTA Balcarce, se observó que la producción de blastocistos no varía para cultivo con suero adicionado en el Día 3 en presencia de co-cultivo, respecto a la producción obtenida con medio sin suero (Mucci y col., 2006). Pero aunque utilizaron la misma técnica de producción y la misma suplementación para el medio de

cultivo que en este trabajo, los resultados no son comparables por el hecho de haber incorporado co-cultivo con células de la granulosa. La presencia del co-cultivo en el medio suplementado podría enmascarar los efectos del suero. Al respecto, algunas observaciones indican que sólo en presencia de co-cultivo la velocidad de desarrollo de los embriones incrementaría respecto del medio sin suero y acondicionado (Rieger y col., 1995).

En nuestro estudio, los embriones cultivados con suero desde el Día 3, cuentan con mayores áreas cubiertas por mitocondrias *hooded* al día 4 (4CS24), respecto de embriones cultivados sin suero (4SS), o de embriones cultivados con suero desde el Día 1 (4CS72, Fig. 11D). El incremento de mitocondrias activas facilitaría el reinicio del desarrollo luego del bloqueo y sería útil para maximizar la utilización de glucosa, que incrementa desde el día 4. Al ser adicionado en estadios de clivaje correspondientes al Días 2 y 3 de desarrollo (3 a 8 células), el suero fetal 10% v/v aceleró el desarrollo entre la salida del bloqueo (Día 4) y el estadio de mórula (Van Langendonck y col., 1997). Según estos autores, es difícil determinar si esa aceleración es ventajosa respecto a la velocidad de desarrollo en cultivo sin suero. En este sentido, consideramos que al adicionar suero en el Día 3, el mayor porcentaje de mitocondrias observado al día 4 podría acompañar la aceleración del desarrollo.

Lípidos

En embriones cultivados sin suero (Fig. 14A), el área cubierta por lípidos intracelulares sólo se incrementó en el día 4 respecto de los días anteriores. Estas observaciones resultan contrarias a las de Ferguson y Leese (1999), quienes observaron mediante la cuantificación de triglicéridos embrionarios, que el contenido principal de las gotas lipídicas se mantiene constante entre el estadio de 2 células y blastocisto en embriones PIV cultivados en medio sin suero suplementado con FAF-BSA. En nuestro trabajo, el incremento al día 4 se

debe a la presencia de 2 embriones con porcentajes de área de lípidos lejanos al resto del grupo. Ellos podrían reflejar:

- un incremento de lípidos respecto de los días anteriores, independiente del suero,
- una variabilidad biológica intrínseca o/y
- alteraciones debidas al manejo de los embriones en el laboratorio

Los embriones cultivados en presencia de suero desde el Día 1 (Fig. 14B), no presentan incremento de gotas lipídicas entre los estadios de 2 y 16 células (días 1 y 4). En este caso no se cuenta con estudios previos sobre cuantificación de triglicéridos de embriones cultivados con suero desde el Día 1, con los cuáles realizar comparaciones.

En el día 3 de desarrollo los embriones cultivados en suero desde el Día 1 (3CS48) presentan una reducción de lípidos respecto de los días previos (Fig. 14B). Estas observaciones coinciden parcialmente con las de Abe y col., (2002), por las que el número de gotas lipídicas disminuiría en embriones cultivados con suero a medida que el desarrollo progresa hasta el estadio de mórula.

Asimismo, en el día 3 (3CS48) se reducen las proporciones de lípidos respecto del mismo día de desarrollo de embriones cultivados en las otras condiciones (Fig. 14C). Esto podría indicar un aumento en la utilización de lípidos al inicio del bloqueo del desarrollo, sea para la conformación de membranas y/o como sustrato energético en la beta-oxidación mitocondrial. Si ocurriera esto último sería debido a una actividad mitocondrial aumentada, ya que el área cubierta por mitocondrias al día 3 no resultó incrementada respecto de las demás condiciones o de los días previos.

Entre las condiciones 3SS y 3CS24 no se observaron diferencias. Esto coincide con observaciones realizadas por Ferguson y Leese (1999), donde el contenido de triglicéridos de embriones cultivados con 10% suero desde el día 2 (3CS24), es similar respecto del de embriones de 3 días desarrollados sin suero (3SS).

Comparando los embriones de 3 días de desarrollo cultivados sin suero, con suplemento desde el Día 1 y Día 2 (3SS, 3CS48, 3CS24, Fig. 14C); y comparando embriones de 4 días de desarrollo cultivados sin suero y con suero desde el Día 1, Día 2 y Día 3 (4SS, 4CS72, 4CS48, 4CS24, Fig. 14D), no encontramos evidencias de que el cultivo en medio con suero incremente el área cubierta por gotas lipídicas. En el estadio de mórulas de día 6, Crosier y col. (2000) tampoco encuentran incremento en el porcentaje de área cubierta por lípidos entre embriones obtenidos de cultivos con suero respecto de los cultivos sin suero.

En el día 4 de cultivo sin suero (4SS) volvemos a encontrar a los 2 embriones con porcentajes de área de lípidos lejanos al resto del grupo, sin los cuales se desvanecerían las diferencias significativas observadas respecto del cultivo con suero durante 24hs (4CS24) y durante 72hs (4CS72). Excluyendo de los análisis anteriores a estos 2 embriones, observamos que las asociaciones previamente descritas (Tabla 2 y 3) no se modifican, aunque el incremento de mitocondrias en la condición de cultivo con suero durante 24 hs, sólo resulta significativo al 10% respecto del cultivo sin suero.

A medida que aumenta el área cubierta por mitocondrias *hooded*, los lípidos se reducen, o viceversa (Fig. 15). Esta asociación negativa observada en cada día de desarrollo y cada condición de cultivo, podría indicar que al incrementar el área mitocondrial y la capacidad embrionaria de realizar beta-oxidación de ácidos grasos, se reduce la reserva energética en forma de lípidos. Tal como fuera demostrado por Dunning y col. (2010), la β -oxidación sería esencial para el clivaje celular en estadio de 2 células.

Si bien no encontramos evidencias de acumulación de lípidos debida al cultivo en medio con suero, observamos que el tamaño promedio de la gota de lípidos aumentaría con los días (Tablas 2 y 3). Este aumento genera estructuras menos estables termodinámicamente, tal como sucede durante el enfriamiento

cuando las gotas lipídicas se agregan. Luego, durante la criopreservación las gotas de mayor tamaño provocan pérdidas de la organización del citoplasma y lesiones irreversibles al embrión (Guyader-Joly 1998; Hyttel y col., 1986) que limitan la tolerancia a esta técnica y afectan claramente la viabilidad. Sin embargo, en los días 1 a 4 observamos que el incremento del tamaño promedio de la gota es independiente de la condición de cultivo. Por tanto, no esperaríamos que la tolerancia de embriones de 2 a 16 células a la criopreservación sea diferente para embriones cultivados con o sin suero, como sucede en blastocistos (Rizos y col., 2003). En cambio, a causa del tamaño mayor de las gotas respecto de los días previos, consideramos que la sensibilidad a la criopreservación podría ser mayor al día 4 del desarrollo.

Posible mecanismo de no- acumulación de lípidos

En este trabajo no observamos indicios morfológicos de la acumulación de lípidos en los estadios de clivaje temprano de embriones bovinos cultivados con suero. Sin embargo, las observaciones de Ferguson y Leese (1999) realizadas en embriones cultivados con 10% suero fetal desde el día 2 indican que el contenido de triglicéridos incrementa de forma evidente en el estadio de 9-16 células (día 4, 4CS48) respecto de los días anteriores y respecto del mismo estadio sin suero (4SS). Es en este estadio donde, según la bibliografía, fueron observadas y cuantificadas las primeras acumulaciones. Es probable que la técnica utilizada por nosotros para cuantificar el área de gotas de lípidos, no halla sido tan sensible para detectar la acumulación como la de los mencionados autores. O es posible que el 10% de suero fetal utilizado por ellos genere acumulación más tempranamente que el 5% de suero de vaca utilizado por nosotros.

Luego, a partir del día 4 de desarrollo y hasta el estadio de blastocisto de embriones cultivados con suero, la acumulación de lípidos ya fue cuantificada (Ferguson y Leese, 1999, Crosier y col., 2001). Particularmente en el estadio de blastocisto de embriones bovinos PIV se observó además que la abundancia

relativa de ARNm para genes lipídogenicos aumentó respecto de los estadios anteriores (Algriany y col., 2007). En este sentido, Camargo y col. (2008) describieron un nexo entre el nivel de glucosa metabolizada a través de la vía de las pentosas fosfato y la expresión de ciertos genes lipídogenicos que explicaría la acumulación de lípidos en el citoplasma del embrión. En este nexo, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzima limitante que controla el flujo en la vía de las pentosas fosfato. La mayor actividad de esta enzima, se asocia con un mayor rendimiento de la vía en general. El uso de inhibidores de la G6PD en los medios de cultivo, hace que una mayor proporción de embriones sobreviva al proceso de criopreservación (Kimura y col., 2005). Además, como la enzima G6PD es codificada por un gen ubicado en el cromosoma X, la abundancia relativa de ARNm de estos genes lipídogenicos, podría ser mayor en hembras que en machos bovinos PIV en presencia de glucosa (Camargo y col., 2008). En embriones hembra, la vía pentosas fosfato estaría sobre regulada a consecuencia de la doble dosis de su enzima limitante (G6PD) y, en presencia de elevados niveles de glucosa, conduciría a una mayor acumulación de lípidos obtenidos mediante lipídogenisis de novo (Camargo y col., 2008).

En estadios previos a la activación del genoma embrionario (8 células), parte de la escasa glucosa utilizada sería metabolizada a través de la vía de las pentosas fosfato (Rieger, 1992). Luego, partir del estadio 16 células (día 4), y en respuesta a una demanda de energía mayor, el consumo de glucosa aumenta y parece ser indispensable para el desarrollo posterior (Bavister 1995, Gardner, 1998). Si bien la contribución de la respiración mitocondrial al requerimiento energético del embrión mamífero, que sería escasa en los estadios de clivaje (Trimarchi y col., 2000) también incrementa hacia el estadio de blastocisto (Bavister y Squirrell 2000), sería la vía de las pentosas fosfato la que conduzca a la acumulación de lípidos obtenidos mediante lipídogenisis de novo, en presencia de elevados niveles de glucosa.

Esta hipótesis basada en la glucosa como sustrato, explicaría porqué en los embriones de estadios de clivaje temprano analizados en este estudio, los

cuáles tiene como sustratos energéticos preferidos al piruvato, lactato y glutamina, no hay evidencias de acumulación de lípidos.

La glucosa además es uno de los componentes más importantes del suero, y es más importante aún en suero fetal respecto del adulto (Pinyopummintr y Bavister, 1994). Sería posible que esta diferencia fuera la que llevó a Ferguson y Leese (1999) a encontrar acumulación de lípidos en embriones de 4 días de desarrollo.

5.3. Células troncales embrionarias humanas de grado clínico

La utilización de embriones inviábiles para el desarrollo de CTEh presentó una importante limitación ya que, en este trabajo, además de que unos pocos fueron donados, sólo los embriones de clase I (Veeck, 1999) fueron capaces de continuar el desarrollo. La activación partenogenética resultó efectiva como forma de aumentar la cantidad de embriones para evaluar, aunque los ovocitos también fueron muy escasos. Esta estrategia evita los problemas éticos que implica el uso de embriones humanos creados con fines reproductivos para la generación de CTEh.

Muchos factores actúan juntos o aislados produciendo la contaminación de líneas de CTEh con productos animales. La adición de estos componentes fue necesaria en los comienzos de la técnica para el establecimiento de líneas celulares, pero actualmente se ha demostrado que los productos animales son innecesarios (Fletcher, y col., 2006; Rajala y col., 2010; Meng y col., 2008; Ellerström y col., 2006).

En este trabajo pusimos en práctica condiciones químicamente definidas y libres de producto animal en el desarrollo de CTEh. Sin embargo, los blastómeros de embriones inviábiles o provenientes de ovocitos partenogenéticos, crecieron en medio sin suero sólo entre 24 y 48hs. Esto se debe a que, al cultivar CTEh en condiciones libres de suero, los factores

estimulantes del desarrollo deben ser reemplazados. Para eso se utilizan habitualmente diferentes factores o combinaciones de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Este se incluye generalmente en todas las formulaciones de los medios de derivación y parece ser clave para sostener la proliferación de CTEh en ausencia de fibroblastos como sustrato y de medio acondicionado con fibroblastos (Levenstein y col., 2006). Aunque conseguimos verificar la adhesión y crecimiento durante 24hs en el sustrato de crecimiento, sería necesaria la suplementación con factores como FGF, para que los blastómeros embrionarios continuaran dividiéndose indefinidamente.

Los blastómeros de embriones considerados inviables o provenientes de ovocitos partenogénéticos, se adhirieron y crecieron en una matriz de fibronectina humana y medio sin suero. La fibronectina, constituyó una estructura tridimensional donde el embrión pudo continuar el clivaje. Este sustrato podría facilitar la interacción y el crecimiento de los blastómeros, ya que se trata de una molécula de la matriz extracelular a las cuales las células se adhieren, y que es fundamental para la migración celular y el desarrollo embrionario (George y col., 1993). En esta interacción entre el embrión y el medio, la membrana celular se une a la fibronectina mediante proteínas receptoras como integrinas que, a su vez interaccionan con proteínas del citoesqueleto. Esta interacción podría verificarse mediante una reacción histoquímica para alguna proteína citoplasmática que participe en los complejos de adhesión con la fibronectina de la matriz (vinculina, paxilina, o enzimas de adhesión focal). La identificación de proteínas o dominios proteicos involucrados en la interacción nos permitirían entender y posiblemente mejorar los sistemas de derivación de CTEh libres de producto animal y de suero.

5.4. Suero en el medio de cultivo

Para lograr un desarrollo eficiente del embrión bovino *in vitro*, muchos investigadores utilizan co-cultivo con células somáticas, medios acondicionados,

o medios con suero. Mientras que en co-cultivos, los embriones son incubados en contacto con células somáticas, en los medios acondicionados se enriquece el medio en contacto con células del cúmulus u oviductales previo al cultivo de los embriones. Si bien estos sistemas de cultivo producen buenos resultados de desarrollo en cuanto a la producción de blastocistos, también hay desventajas. El cultivo celular puede cambiar los sustratos disponibles para el embrión, alterando las concentraciones iniciales en el medio de cultivo original (Gardner y Lane, 2003; Gardner y col., 2000).

El suero es una fracción resultante del proceso de coagulación sanguínea, que podría introducir en los medios de cultivo cantidades variables de factores con efectos positivos y negativos sobre el desarrollo embrionario. Esto depende por ejemplo, del tipo y estado del donante y la forma de preparación del suplemento (Pinyopummintr y Bavister, 1994). Así, la presencia y concentración de los componentes del suero, puede variar entre lotes, generando diferencias en la composición final de los medios, efectos diversos en el desarrollo, interfiriendo con la repetibilidad de los resultados y dificultando finalmente el conocimiento de los requerimientos nutricionales y metabólicos de los embriones cultivados en su presencia.

En lugar del suero como suplemento pueden ser utilizados reemplazos sintéticos (UltroserG®, Invitrogen; CPSR-3® Controlled Process Serum Replacement, SIGMA), y con algunos de ellos se consiguen tasas similares de producción de blastocistos bovinos (Duque y col., 2003).

En la ausencia del suero y remplazo con BSA además, se pueden cumplir los requerimientos metabólicos de los embriones en estadios de clivaje temprano (Krisher y col., 1999). En este trabajo observamos que, en presencia de BSA, la restricción de la utilización del suero hasta el estadio de 8 células (día 3) sería ventajosa respecto a la utilización del suero desde el día 1, y esto evita además la exposición innecesaria a factores potencialmente inhibitorios.

En otra línea de alternativas, se han desarrollado exitosamente medios de cultivo definidos y secuenciales, que toman en cuenta el estadio de desarrollo

y las necesidades específicas del embrión (Gardner y col., 2002; Summers y Biggers, 2003). En los medios definidos, la suplementación con el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1, insulin-like growth factor), reduce la incidencia de apoptosis y aumenta el número de blastómeros (Makarevich y Markkula 2002; Byrne y col., 1999). Asimismo, el factor transformante de crecimiento (TGF, transforming growth factor, Brison y Shultz, 1998) se propone como un factor para la supervivencia de las células en el embrión de ratón de preimplantacional.

Para la obtención de CTEh de grado clínico, el uso de suero o co-cultivo que podrían introducir elementos tóxicos o patógenos, se encuentra excluido. Para obtener una línea de CTEh de grado clínico deben utilizarse métodos de aislamiento de los blastómeros, medios de cultivo y sustratos de crecimiento libres de componentes animales (Skottman y col., 2006).

En los cultivos de CTEh el suero bovino también ha sido reemplazado por variantes sintéticas (Serum Replacement, Knockout Serum Replacement, Synthetic Serum Supplement) pero todas ellas poseen algún contenido de origen animal (Lu y col., 2006; Rajala y col., 2007). El mayor avance en cultivo de CTEh, surgió de la capacidad de lograr que las células crecieran en condiciones libres de suero. Para esto se utilizaron diferentes factores como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento trofodérmico (TGF), activina A, nodal, el factor de inducción de leucocitos (LIF) y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF). El FGF parece desempeñar un papel clave en el mantenimiento de la auto-renovación de células madre (Vaajasaari y col., 2011). Además, la suplementación con factores de crecimiento, ha superado parcialmente algunas de las limitaciones de los sistemas originales de hESCs cultivo tales como la diferenciación espontánea, una observación común cuando se utiliza suero fetal bovino en el cultivo. Activina, nodal y TGF- β han demostrado que son necesarios para mantener el estado indiferenciado de las CTEh (Beattie y col., 2005).

El crecimiento de blastómeros en una matriz definida de fibronectina, en ausencia de co-cultivo y de suero realizado en este trabajo, se presenta como una alternativa de mínima complejidad a la cual se le podrían incorporar suplementos definidos en futuras investigaciones a fin de alcanzar el proceso de derivación de grado clínico.

Para comprender las necesidades del embrión y estudiar la regulación del desarrollo deben utilizarse medios sin suero. Los medios químicamente definidos permiten resultados reproducibles y pueden variar de una manera controlada. Un sistema de cultivo definido es, además, el requisito para seguir avanzando en la investigación de las CTEh para utilización en terapias biomédicas.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Respecto a la hipótesis que atribuye al suero el daño mitocondrial morfológico *in vitro* (y que luego propiciaría la acumulación de lípidos), consideramos que tenemos suficiente evidencia para descartarla en embriones bovinos de 2 a 16 células. Esto es debido a:

- No hallamos mitocondrias con indicios de degeneración. El *swollen*, único tipo encontrado que fue asociado con degeneración de las funciones mitocondriales (Peng and Jou, 2004), estuvo presente en todas las condiciones estudiadas y no podemos asociarlo con el suplemento de suero.
- No tenemos evidencias de reducción de las mitocondrias activas *hooded* en medio con suero respecto del sin suero. En cambio, al tratar los embriones por 24hs con suero, los porcentajes de áreas cubiertas por mitocondrias *hooded* aumentan.

2. No encontramos evidencias de incremento en el área cubierta por lípidos asociada al cultivo en medio suplementado con 5% de suero de vaca en celo, respecto del cultivo sin suero, para ninguna de las condiciones estudiadas.

3. Respecto al mejor momento del cultivo para adicionar el suplemento entre los días 1 y 3, el tratamiento con suero desde el Día 3 muestra indicios de ser ventajoso para los embriones, ya que promueve la actividad mitocondrial al día 4, sin exhibir acumulación de lípidos.

4. Surgieron indicios para suponer que están ocurriendo eventos de proliferación mitocondrial.

5. Las células troncales provenientes de embriones humanos de clase I considerados inviábiles y de ovocitos activados partenogénicamente, son capaces de adherirse y dividirse, al menos durante 24hs, en la matriz de fibronectina y medio sin suero ni factores de crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abe H, Hoshi H. (2003). Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev* 49 (3), 193-202.

Abe H, Yamahita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. (1999a). Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol Reprod Dev* 53, 325-335.

Abe H, Otoi T, Tachikawa S, Yamahita S, Satoh T, Hoshi H. (1999b). Fine structure of bovine morulae and blastocysts *in vivo* and *in vitro*. *Anat Embryol* 199, 519-527.

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 61, 57-66.

Acton BM, Jurisicova A, Jurisica I, Casper RF. (2004). Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod* 10(1), 23-32.

Algriany O, Vos PLAM, Sirard MA, Dieleman SJ. (2007). Switch in the expression of genes involved in lipid metabolism for *in vivo* matured bovine oocytes and blastocysts. *Reprod Fert Devel* 19, 244.

Barnett DK, Bavister BD. (1996). Inhibitory effect of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos: is it linked to metabolism? *Hum Reprod* 11(1), 177-183.

- Barnett DK, Kimura J, Bavister BD. (1996).** Translocation of active mitochondria during hamster preimplantation embryo development studied by confocal laser scanning microscopy. *Developmental Dynamics* 205, 64-72.
- Bavister BD. (1995).** Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1, 91-148.
- Bavister BD, Squirrell JM. (2000).** Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod* 15(Suppl 2), 189-198.
- Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC, Hayek A. (2005).** Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 23, 489-495.
- Bereiter-Hahn J, Voth M. (1994).** Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27, 198-219.
- Betts DH, Madan P. (2008).** Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. *Mol Hum Reprod* 14(8), 445-453.
- Brackett BG, Zuelke KA. (1993).** Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39, 43-64.
- Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, Luo Y, Liu Y, Lyons IG, Freed WJ, Robins AJ, Rao MS, Schulz TC. (2004).** Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 13(6), 585-597.
- Brison DR, Schultz RM. (1998).** Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor a-deficient mouse blastocysts. *Biol Reprod* 59, 136-144
- Brook FA, Cowley SA, Evans EP, Turner K, James WS, Mardon HJ. (2010).** Derivation and characterisation of the human embryonic stem cell line, OxF1. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 46, 173-177.

- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. (1999).** Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil* 117, 97-105
- Camargo O, Ruiz T, Olivera M. (2008).** Theoretical model for explaining accumulation of fat drops in *in vitro* produced bovine embryos. *Acta Biológica Colombiana* 13(2), 89-102.
- Campbell BK, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE, Baird DT. (2003).** Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarians follicle development in humans. *Reprod Suppl* 61, 429–443.
- Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A, Mermillod P. (1995).** Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 43, 1115–1128.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. (2003).** Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology* 160(2), 189-200.
- Chi MM-Y, Hoehn A, Moley KH. (2002).** Metabolic changes in the glucose-induced apoptotic blastocyst suggest alterations in mitochondrial physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E226-E232.
- Chiaratti MR, Bressan FF, Ferreira CR, Caetano AR, Smith LC, Vercesi AE, Meirelles FV. (2010).** Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. *Biol Reprod* 82, 76–85.
- Crosier AA, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. (2000).** Ultrastructural morphometry of bovine compact murulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod* 62, 1459-1465.

- Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. (2001).** Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. Biol Reprod 64, 1375-1385.
- Cummins J. (2004).** The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 115 (1), S23-S29.
- Cummins JM, Wakayama T, Yanagimachi R. (1998).** Fate of microinjected spermatid mitochondria in the mouse oocyte and embryo. Zygote 6, 213-222.
- De Loos FAM, Zeinstra E, Bevers MM. (1994).** Follicular wall maintain meiotic arrest in bovine oocytes cultured *in vitro*. Mol Reprod Dev 39, 162-165.
- De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. (1996).** Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. Mol Reprod Dev 45(4), 451-457.
- De Sousa PA, Gardner J, Sneddon S, Pells S, Tye BJ, Dand P, Collins DM, Stewart K, Shaw L, Przyborski S, Cooke M, McLaughlin JK, Kimber SJ, Lieberman BA, Wilmut I, Brison DR. (2009).** Clinically failed eggs as a source of normal human embryo stem cells. Stem Cell Research 2(3), 188-197.
- Diancourt MA, Gougeon A, Royère D, Thibault CH. (1993).** Ovarian function, In: Thibault Ch, Levasseur MC, Hunter RHF (eds.), Reproduction in Mammals and Man, Editon Marketin, Paris, p. 281-306.
- Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, Renard JP. (2001).** Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: Effect on further development and consequences for freezability. Theriogenology 55, 923-936.
- Dorland M, Gardner DK, Trounson AO. (1994).** Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. J Reprod Fertil Abstract Series 13, 70.

- Du F, Looney CR, Yang X. (1996).** Evaluation of bovine embryos produced *in vitro* vs *in vivo* by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells. *Theriogenology* 45, 211.
- Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. (2010).** Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 83(6), 909-918.
- Duque P, Gómez E, Díaz E, Facal N, Hidalgo C, Díez C. (2003).** Use of two replacements of serum during bovine embryo culture *in vitro*. *Theriogenology* 59(3-4), 889-99.
- Ellerström C, Strehl R, Moya K, Andersson K, Bergh C, Lundin K, Hyllner J, Semb H. (2006).** Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells* 24, 2170-2176.
- Eppig, JJ. (2001).** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122, 829-838
- Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP. (2001).** Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev* 58, 186-195.
- Ferguson EM, Leese HJ. (1999).** Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J Reprod Fertil* 116(2), 373-378.
- Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, Auricchio A, Piemonte F, Tozzi G, Gaeta L, Casari G, Ballabio A, Rugarli E. (2004).** Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *The Journal of Clinical Investigation* 113(2), 231-243.
- Fletcher JM, Ferrier PM, Gardner JO, Harkness L, Dhanjal S, Serhal P, Harper J, Delhanty J, Brownstein D, Prasad YR, Lebkowski J, Mandalam R, Wilmut I, De Sousa P. (2006).** Variations in humanized and defined culture conditions

supporting derivation of new human embryonic stem cell lines. *Cloning and Stem Cells* 8(4), 319-334.

Gardner DK. (1998). Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49, 83-102.

Gardner DK, Lane M. (1993). Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 48, 377-385.

Gardner DK, Lane M. (2003). Towards a single embryo transfer. *Reproductive BioMedicine Online* 6 Comp.2, 103-114.

Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. (2000). Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 15 (Suppl. 6), 9-23.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. (2002). Ongoing development of a human blastocyst culture system. *Fertility and Sterility* 78, S8.

George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119(4), 1079-1091.

Gomez E, Diez C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *An Reprod Sci* 58, 23-37.

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7, 175-189.

Guyader-Joly C. (1998). Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit *in vitro*. *Elevage et Insémination* 288, 3-23.

- Hackenbrock CR. (1968).** Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 61, 598–605.
- Hall VJ, Compton D, Stojkovic P, Nesbitt M, Herbert M, Murdoch A, Stojkovic M. (2007).** Developmental competence of human *in vitro* aged oocytes as host cells for nuclear transfer. *Hum Reprod* 22, 52-62.
- Han Z, Vassena R, Chi MM, Potireddy S, Sutovsky M, Moley KH, Sutovsky P, Latham KE. (2008).** Role of glucose in cloned mouse embryo development. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E798–E809.
- Heyman Y, Degrolard J, Adenot P, Chesne P, Flechon B, Renard JP, JE Flechon. (1995).** Cellular evaluation of bovine nuclear transfer embryos developed *in vitro*. *Reprod Nutr Dev* 35, 713-723.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. (1997).** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle *Theriogenology* 47, 23-32
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. (1989).** Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fert* 38, 35-47.
- Hyttel P, Lehn-Jensen H, Greve T. (1986).** Ultrastructure of bovine embryos frozen and thawed by a two-step freezing method. *Acta anat* 125, 27- 31.
- Ilic D, Giritharan G, Zdravkovic T, Caceres E, Genbacev O, Fisher SJ, Krtolica A. (2009).** Derivation of human embryonic stem cell lines from biopsied blastomeres on human feeders with minimal exposure to xenomaterials. *Stem Cells Dev* 18(9), 1343-1349.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. (1990).** Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts followed fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fert* 90, 279-284.

- Kane MT, Headon DR. (1980).** The role of commercial bovine serum albumen preparation in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. *J Reprod Fert* 60, 469-475.
- Kennedy EP, Lehninger AL. (1949).** Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 179, 957-972.
- Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. (1993).** Glucose requirement at different developmental stages of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 39, 875-886.
- Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. (2005).** Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 72, 201-207.
- Krisher RL, Bavister BD. (1998).** Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49, 103-114.
- Krisher RL, Lane M, Bavister BD. (1998).** Influence of semi-defined and defined culture media on the development, cell number and metabolism of bovine embryos. *Theriogenology* 49, 207.
- Krisher RL, Lane M, Bavister BD. (1999).** Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* 60, 1345-1352 .
- Kumar N, Hinduja I, Nagvenkar P, Pillai L, Zaveri K, Mukadam L, Telang J, Desai S, Mangoli V, Mangoli R, Padgaonkar S, Kaur G, Puri C, Bhartiya D. (2009).** Derivation and characterization of two genetically unique human embryonic stem cell lines on in-house-derived human feeders. *Stem Cells Dev* 18(3), 435-445.

- Larsen WJ, Sherman LS, Potter SS, Scott WJ. (2003).** Gametogénesis y fecundación, la primera semana. In:; Larsen WJ ed. Embriología Humana 3ra edn, Elsevier España. p 1-22.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, Galli C. (2002).** Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring síndrome. Biol Reprod 67, 767-775.
- Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. (2008).** Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. Mol Hum Reprod 14(12), 667-672.
- Leroy JLMR, Van Hoeck V, Clemente M, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Van Soom A, Uytterhoeven M, Bols PEJ. (2010).** The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. Hum Reprod 25(3), 768-778.
- Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, Thomson JA. (2006).** Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. Stem Cells 24(3), 568-574.
- Lin G, OuYang Q, Zhou X, Gu Y, Yuan D, Li W, Liu G, Liu T, Lu G. (2007).** A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following *in vitro* fertilization procedure. Cell Res 17(12), 999-1007.
- Lindner GM, Wright RW. (1983).** Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20, 407-416.
- Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. (2000).** Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. Biol Reprod 62, 1745-1753.
- Logan DC. (2003).** Mitochondrial dynamics. New Phytologist 160, 463-478.
- Logan DC. (2006).** The mitochondrial compartment. Journal of Experimental Botany 57(6), 1225-1243.

Lu J, Hou R, Booth CJ, Yang S, Snyder M. (2006). Defined culture conditions of human embryonic stem cells. PNAS 103(15), 5688–5693.

Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. Nat Biotechnol 24(2), 185-187.

Mai Q, Yu Y, Li T, Wang L, Chen MJ, Huang SZ, Zhou C, Zhou Q. (2007). Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. Cell Res 17, 1008-1019.

Makarevich AV, Markkula M. (2002). Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor during *in vitro* maturation and culture. Biol Reprod 66 (2), 86-392.

Mannella CA. (2006). The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. Biochimica et Biophysica Acta 1762, 140–147.

Mannella CA, Marko M, Buttle K. (1997). Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. Trends in Biochemical Sciences 22, 37–38.

Margineantu DH, Cox WG, Sundell L, Sherwood SW, Beechemb JM, Capaldi RA. (2002). Cell cycle dependent morphology changes and associated mtDNA redistribution in mitochondria of human cell lines. Mitochondrion 1, 425–435.

Maurer HR. (1992). Towards serum-free, chemical defined media for mammalian cell culture. In: Freshney RI, editor. Animal Cell Culture: A Practical Approach. 2nd edn. Oxford: Oxford Univ Press. p 15-46.

Meng G, Liu S, Krawetz R, Chan M, Chernos J, Rancourt DE. (2008). A novel method for generating xeno-free human feeder cells for human embryonic stem cell culture. Stem Cells Dev 17, 413–422.

- Mohr LR, Trounson AO. (1981).** Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol Reprod* 25, 1009-1025.
- Mollenhauer HH. (1964).** Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Technology* 39, 111.
- Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. (2006).** Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65, 1551-1562.
- Nasr-Esfahani MH, Johnson MH (1991).** The origin of reactive oxygen species in mouse embryo cultured *in vitro*. *Development* 113, 551-560.
- Obata Y, Kono T. (2002).** Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 277, 5285-5289.
- Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomagane H. (1998).** Ultrastructure of bovine *in vitro*-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. *Zygote* 6: 17-26.
- Okamoto K, Shaw JM. (2005).** Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 39, 503-536.
- Palma G. (2001).** Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: Palma G, ed. *Biotecnología de la Reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p 225-294.
- Parrish J, Susko-Parrish J, Handrow R, Sims M, First N. (1989).** Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 40, 1020-1025.
- Parrish J, Susko-Parrish J, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NF. (1986).** Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.

- Peng TI, Jou MJ (2004).** Mitochondrial swelling and generation of reactive oxygen species induced by photoirradiation are heterogeneously distributed. *Ann NY Acad Sci* 1011, 112–122.
- Pikó L, Chase DG. (1973).** Role of the mitochondrial genome during early development in mice. Effects of ethidium bromide and chloramphenicol. *J. CeU Bid* 58,357-378.
- Pikó L, Taylor KD. (1987).** Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* 123, 364-374.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. (1991).** *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free cultured media. *Biol Reprod* 45, 736–742.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. (1994).** Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41, 1241-1249.
- Plante L, King WA. (1994).** Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. *J Assist Reprod Genet* 11, 515-529.
- Priddle H, Allegrucci C, Burridge P, Munoz M, Smith NM, Devlin L, Sjoblom C, Chamberlain S, Watson S, Young LE, Denning C. (2010).** Derivation and characterisation of the human embryonic stem cell lines, NOTT1 and NOTT2. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 46, 367–375.
- Rajala K, Hakala H, Panula S, Aivio S, Pihlajamäki H, Suuronen R, Hovatta O, Skottman H. (2007).** Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum Reprod* 22(5), 1231-1238.
- Rajala K, Lindroos B, Hussein SM, Lappalainen RS, Pekkanen-Mattila M, Inzunza J, Rozell B, Miettinen S, Narkilahti S, Kerkelä E, Aalto-Setälä K, Otonkoski T, Suuronen R, Hovatta O, Skottman H. (2010).** A defined and xeno-free culture

method enabling the establishment of clinical-grade human embryonic, induced pluripotent and adipose stem cells. PLoS One 5(4), e10246.

Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. (2009).

Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. Hum Reprod Update 15, 553–572.

Rexroad CE[Jr]. (1989). Co-culture of domestic animal embryos. Theriogenology 31, 105-114.

Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barriere P, Malthiery Y. (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. Mol Hum Reprod 7, 425-429.

Reynolds EW. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17, 208-212.

Rieger D. (1992). Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. Theriogenology 37(1), 75-93.

Rieger D, Grisart B, Semple E, Van Langendonck A, Betteridge KJ, Dessy F. (1995). Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. J Reprod Fert 105, 91-98.

Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. (1992). Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. J Reprod Fert 95, 585-595.

Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. Biol Reprod 68, 236–243.

- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. (2002).** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61, 234-248.
- Sata R, Tsuji H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H. (1999).** Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *J Reprod Dev* 45, 97-103.
- Senger PL, Saacke RG. (1970).** Unusual mitochondria of the bovine oocyte. *The Journal of Cell Biology* 46, 405-408.
- Seshagiri PB, Bavister BD (1991)** Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the 'Crabtree effect'. *Mol Reprod Dev* 30, 105-111.
- Shamsuddin M, Larsson B, Gustafsson H, Rodriguez-Martinez H. (1993).** A serum-free, cell culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. Doctoral Thesis, Univ Of Uppsala, Sweden V, 1-12.
- Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H. (1994).** Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. *J Vet Med* 41, 307-316.
- Sheahan MB, McCurdy DW, Rose RJ. (2005).** Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *The Plant Journal* 44, 744-755.
- Sirard MA, Blondin P. (1996).** Oocyte maturation and IVF in cattle. *An Reprod Sci* 42, 417-426.

- Sirard MA, Coenen K. (1993).** The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles, effects on meiotic resumption. *Theriogenology* 40, 933-942.
- Skottman H, Dilber MS, Hovatta O. (2006).** The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines. *FEBS Letters* 580, 2875–2878.
- Skulachev VP, Bakeeva LE, Chernyak BV, Domnina LV, Minin AA, Pletjushkina OY, Saprunova VB, Skulachev IV, Tsyplenkova VG, Vasiliev JM, Yaguzhinsky LS, Zorov DB. (2004).** Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 256/257, 341-358.
- Smith LC, Bordignon V, García JM, Meirelles FV. (2000).** Mitochondrial genotype segregation and effects during mammalian development: applications to biotechnology. *Theriogenology* 53, 35-46.
- St. John JC, Facucho-Oliveira J, Jiang Y, Kelly R, Salah R. (2010).** Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 16(5), 488-509.
- Summers MC, Biggers JD. (2003).** Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* 9 (6), 557-582.
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cebot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Schatten H. (2001).** Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction* 122, 155-163.
- Sutovsky P, Moreno, RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. (2000).** Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 63, 582–590.

- Tarazona AM, Olivera-Angel M, Lenis YY (2010).** Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. Archivos de Medicina Veterinaria (Chile) 42(3), 125-133
- Tarazona AM, Rodríguez JI, Restrepo LF, Olivera-Angel M. (2006).** Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. Reprod Dom Anim 41, 5-11.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. (1990).** Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. Mol Reprod Dev 26, 90-100.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998).** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282(5391), 1145-1147.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillan WH, Tervit HR. (1995).** Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. Biol Reprod 53, 1385-1391.
- Thompson JG, McNaughton C, Gasparinni B, McGowan LT, Tervit HR. (2000).** Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos. J Reprod Fert 118, 47-55.
- Trimarchi JR, Liu L, Portereld DM, Smith PJ, Keefe DL (2000).** Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. Biol Reprod 62, 1866-1874.
- Tornero D, Ceña V, González-García C, Jordán J. (2002).** The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes. Revista de Neurología. 35, 354-361.
- Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. (1999).** Cryopreservation of bovine pre-morula-stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. Biol Reprod 60, 535-539.

- Vaajasaari H, Ilmarinen T, Juuti-Uusitalo K, Rajala K, Onnela N, Narkilahti S, Suuronen R, Hyttinen J, Uusitalo H, Skottman H. (2011).** Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis* 17, 558–575.
- Van Blerkom J. (2004).** Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 128, 269-280.
- Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. (2000).** Differential mitochondrial inheritance between blastomeres in cleavage stage human embryos: determination at the pronuclear stage and relationship to microtubular organization, ATP content and developmental competence. *Hum Reprod* 15, 2621-2633.
- Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. (1995).** ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 10, 415-424.
- Van Blerkom J, Runner M. (1984).** Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *American Journal of Anatomy* 171, 335-355.
- Van Langendonck A, Donnay I, Schuurbiens N, Auquier P, Carolan C, Massip A, Dessy F. (1997).** Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J Reprod Fert* 109, 87-93.
- Veeck LL. (1999).** Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In: Veeck LL, editor. *An atlas of human gametes and conceptuses*. New York: Parthenon, p. 46-51.
- Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicácio AC, Assumpção MEOA. (2001).** Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology* 57, 345-359.

- Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. (2010).** The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod* 83, 52-62.
- Wakefield SL, Lane M, Mitchell M. (2011).** Impaired mitochondrial function in the preimplantation embryo perturbs fetal and placental development in the mouse. *Biol Reprod* 84(3), 572-580.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Westhusin ME. (2000).** impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol Reprod* 62, 355-364.
- Whittingham DG, Siracusa G. (1978).** The involvement of calcium in the activation of mammalian oocytes. *Exp Cell Res* 113(2), 311-317.
- Wilding M, Coppola G, Dale B, Di Matteo L. (2009).** Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction* 137, 619-624.
- Wilding M, Fiorentino A, De Simone ML, Infante V, De Matteo L, Marino M, Dale B. (2002).** Energy substrates, mitochondrial membrane potential and human preimplantation embryo division. *Reproductive BioMedicine Online* 5, 39-42.
- Zhou G-B, Li N. (2009).** Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. *Mol Hum Reprod* 15(5), 279-285.

APÉNDICE

8. APÉNDICE

8.1. Datos

Manip	Dia	Horas	Lipidos	Hooded	Otros tipos	Area media lípidos	Area media hooded	Número de hooded
80	2	24	18,631	4,108	0,000	0,847	0,274	15
80	2	24	23,150	4,811	0,000	0,926	0,370	13
80	2	24	22,507	4,134	0,357	0,900	0,413	10
80	2	24	10,487	6,434	0,862	0,617	0,429	15
80	2	24	7,721	3,552	0,000	0,336	0,323	11
10	2	24	12,044	4,875	0,000	0,708	0,325	15
10	2	24	15,593	2,375	0,000	0,917	0,237	10
10	2	24	13,536	6,014	0,000	1,354	0,547	11
10	2	24	19,461	5,971	0,000	1,946	0,597	10
10	2	24	12,892	6,765	0,000	1,172	0,564	12
17	2	24	22,093	4,015	0,000	0,884	0,365	11
17	2	24	16,818	3,398	0,000	0,989	0,425	8
17	2	24	21,385	5,356	0,000	0,930	0,412	13
17	2	24	17,092	5,890	0,000	1,005	0,491	12
29	2	24	16,418	4,671	0,885	0,631	0,275	17
29	2	24	17,052	2,475	1,580	0,461	0,206	13
29	2	24	14,208	2,947	0,000	0,710	0,295	10
29	2	24	14,870	2,902	0,266	0,531	0,223	13
29	2	24	14,557	3,409	0,793	0,633	0,243	14
34	2	24	17,386	3,813	0,000	1,739	0,477	8
34	2	24	10,218	5,794	0,000	0,487	0,322	18
34	2	24	10,679	4,769	0,000	0,593	0,341	19
34	2	24	17,484	3,631	0,000	1,166	0,330	11
34	2	24	14,741	2,759	0,000	0,670	0,230	12
80	3	48	17,944	4,154	0,000	1,122	0,462	9
80	3	48	26,072	4,047	0,000	1,242	0,506	8
80	3	48	20,426	6,173	1,160	1,075	0,617	10
80	3	48	12,743	6,268	0,000	0,980	0,448	14
10	3	48	0,000	5,857	0,000	0,000	0,586	11
10	3	48	8,758	3,251	3,332	1,095	0,464	7
10	3	48	7,719	3,135	0,000	0,702	0,348	9
10	3	48	11,355	4,259	3,084	0,668	0,532	8
10	3	48	10,825	4,089	0,000	1,203	0,682	6
10	3	48	11,681	4,258	1,001	0,973	0,473	9
29	3	48	9,569	4,732	0,000	0,736	0,315	15
29	3	48	8,138	4,283	0,000	0,543	0,306	14
29	3	48	10,692	5,943	1,796	0,509	0,396	15
29	3	48	8,224	3,997	0,000	0,633	0,333	12
29	3	48	7,770	3,325	1,148	0,863	0,333	10
30	3	48	10,002	4,932	0,000	0,455	0,448	11
30	3	48	9,389	4,691	0,000	0,552	0,391	12

30	3	48	13,630	5,212	0,000	0,440	0,434	12
30	3	48	13,850	4,494	0,000	0,554	0,499	9
34	3	48	7,850	6,896	0,000	1,121	0,493	14
34	3	48	5,091	8,173	0,000	0,727	0,545	15
34	3	48	12,423	4,918	0,825	1,553	0,492	11
34	3	48	25,431	3,666	0,000	1,413	0,458	8
34	3	48	12,997	5,061	0,000	0,812	0,422	12
80	4	72	21,476	1,849	0,000	0,716	0,264	7
80	4	72	13,577	3,441	0,000	0,485	0,287	12
80	4	72	17,950	1,670	0,000	0,619	0,186	9
80	4	72	21,497	1,982	0,000	0,977	0,248	8
10	4	72	14,520	2,159	0,000	1,613	0,308	7
10	4	72	8,518	3,846	0,000	1,217	0,350	11
10	4	72	13,854	4,353	0,000	0,693	0,363	12
10	4	72	15,068	2,878	0,000	0,718	0,360	8
17	4	72	14,002	2,854	0,000	1,273	0,317	9
17	4	72	20,268	2,166	0,000	1,351	0,309	7
17	4	72	16,063	3,722	0,000	1,785	0,372	10
17	4	72	6,253	2,576	0,000	0,481	0,368	7
17	4	72	13,997	3,005	0,000	0,933	0,231	13
30	4	72	12,671	6,876	0,000	1,056	0,491	14
30	4	72	7,247	3,912	0,000	0,518	0,435	10
30	4	72	13,930	4,797	0,000	1,161	0,343	14
30	4	72	7,117	8,236	0,000	0,647	0,433	19
34	4	72	13,835	2,105	2,803	2,767	0,702	3
34	4	72	21,122	6,197	0,000	2,112	0,477	13
34	4	72	27,144	3,228	0,000	4,524	1,076	3
34	4	72	1,709	3,967	2,841	0,427	0,441	9
34	4	72	3,234	8,149	1,046	0,270	0,905	9
34	4	72	0,000	3,740	1,184	0,000	0,935	4
80	2	0	14,300	3,359	0,000	0,461	0,420	8
80	2	0	10,621	3,598	0,000	0,590	0,400	9
80	2	0	20,163	2,133	0,253	1,186	0,305	12
80	2	0	19,704	4,474	0,000	0,657	0,373	12
80	2	0	19,304	1,816	0,000	0,552	0,259	7
10	2	0	33,783	2,930	0,289	3,378	0,209	14
10	2	0	8,637	4,462	0,000	0,279	0,262	17
10	2	0	0,000	3,908	0,000	0,000	0,244	16
10	2	0	37,662	3,503	0,000	1,712	0,269	13
10	2	0	13,761	5,596	0,000	0,306	0,266	21
10	2	0	19,874	4,411	0,108	0,552	0,232	20
17	2	0	12,699	4,862	0,000	0,705	0,540	9
17	2	0	16,258	3,466	0,373	0,625	0,289	12
17	2	0	8,507	3,858	0,678	0,448	0,276	14
17	2	0	16,564	3,226	0,424	0,720	0,358	9
17	2	0	18,695	2,057	0,000	0,984	0,343	6
30	2	0	11,919	2,815	0,000	0,745	0,352	8
30	2	0	19,414	1,040	0,000	1,079	0,520	2
30	2	0	20,430	3,883	0,965	1,362	0,431	9
30	2	0	10,134	3,130	0,000	0,780	0,391	8

30	2	0	15,200	4,996	0,480	0,661	0,500	10
34	2	0	14,226	3,039	0,000	0,527	0,338	9
34	2	0	17,133	2,366	0,000	1,008	0,237	10
34	2	0	12,939	3,125	0,000	0,392	0,347	9
34	2	0	7,924	2,227	0,000	0,396	0,371	6
34	2	0	17,914	1,413	0,000	0,995	0,353	4
80	3	0	16,826	2,226	0,630	0,886	0,557	4
80	3	0	21,999	1,347	2,099	1,564	0,674	2
80	3	0	17,567	3,131	1,720	0,837	0,391	8
80	3	0	11,349	8,506	0,922	0,811	0,773	11
80	3	0	27,073	1,881	1,673	1,504	0,470	4
17	3	0	16,938	3,313	0,000	0,770	0,414	8
17	3	0	11,582	6,295	0,000	0,463	0,484	13
17	3	0	16,858	6,753	1,429	0,624	0,675	10
17	3	0	20,049	0,822	0,389	0,668	0,411	2
17	3	0	11,664	0,764	0,000	1,060	0,382	2
29	3	0	16,326	6,981	0,000	0,777	1,396	6
29	3	0	14,505	6,924	2,229	0,853	0,865	8
29	3	0	13,076	8,657	1,002	0,654	0,866	10
29	3	0	26,597	2,923	0,000	1,400	0,974	3
29	3	0	7,822	3,262	1,225	0,978	0,815	4
30	3	0	16,931	2,595	1,211	0,651	0,649	4
30	3	0	16,127	3,472	0,928	0,701	0,694	5
30	3	0	9,864	2,751	1,574	0,395	0,688	4
30	3	0	12,412	3,822	2,614	0,730	0,764	5
30	3	0	7,064	6,916	1,048	0,589	0,692	10
34	3	0	8,490	9,408	1,308	0,404	0,409	23
34	3	0	0,000	7,344	0,000	0,000	0,367	20
34	3	0	0,000	3,351	0,000	0,000	0,305	11
34	3	0	32,695	3,372	0,335	1,308	0,889	8
34	3	0	29,789	2,501	0,000	1,064	0,357	7
34	3	0	17,408	4,463	0,508	0,829	0,446	10
34	3	0	11,167	4,102	0,000	0,486	0,293	14
80	4	0	6,387	5,906	0,000	0,581	0,422	14
80	4	0	23,485	2,744	0,934	1,068	0,392	7
80	4	0	23,229	4,568	0,620	1,549	0,381	12
80	4	0	12,642	4,299	0,000	1,053	0,358	12
80	4	0	25,810	2,298	0,000	1,434	0,328	7
10	4	0	10,950	4,124	1,346	0,912	0,412	10
10	4	0	15,064	7,914	0,410	1,255	0,360	22
10	4	0	21,081	3,831	0,452	1,318	0,295	13
10	4	0	14,588	5,188	0,000	1,216	0,371	14
10	4	0	13,275	3,588	0,000	0,664	0,359	10
17	4	0	32,502	2,853	0,000	2,955	0,571	5
17	4	0	33,293	3,621	0,000	4,162	0,362	10
17	4	0	35,302	3,854	0,000	2,077	0,428	9
17	4	0	15,644	4,375	2,444	1,117	0,438	10
17	4	0	37,715	1,882	0,383	3,429	0,470	4
29	4	0	39,014	1,647	0,000	2,295	0,329	5
29	4	0	33,702	3,365	0,000	4,815	0,421	8

29	4	0	33,680	2,659	0,000	2,591	0,332	8
29	4	0	21,335	2,801	2,675	1,255	0,311	9
29	4	0	31,725	2,735	0,000	1,586	0,342	8
34	4	0	11,516	5,492	1,476	1,645	0,343	16
34	4	0	22,632	3,118	0,000	1,029	0,390	8
34	4	0	16,051	2,289	0,602	1,235	0,382	6
34	4	0	14,575	3,249	1,350	0,972	0,295	11
34	4	0	6,496	6,544	0,000	0,722	0,436	15
10	1	0	18,567	5,449	1,162	1,031	0,321	17
10	1	0	11,207	4,934	1,793	0,700	0,329	15
10	1	0	9,724	8,172	0,000	0,884	0,340	24
10	1	0	11,312	8,125	0,549	0,754	0,312	26
10	1	0	7,491	4,256	0,000	0,441	0,224	19
17	1	0	0,000	1,461	0,000	0,000	0,487	3
17	1	0	0,000	1,890	0,000	0,000	0,315	6
17	1	0	0,000	3,759	0,000	0,000	0,342	11
17	1	0	0,000	1,409	0,000	0,000	0,282	5
17	1	0	0,000	3,867	0,000	0,000	0,258	15
17	1	0	0,000	3,850	0,000	0,000	0,321	12
17	1	0	19,073	5,257	2,025	0,658	0,329	16
17	1	0	8,100	4,287	0,518	0,675	0,252	17
17	1	0	7,853	4,704	0,270	0,654	0,248	19
17	1	0	18,913	6,299	0,000	1,113	0,386	19
17	1	0	17,248	5,903	0,000	0,784	0,328	18
29	1	0	23,018	4,327	0,301	1,096	0,270	16
29	1	0	17,005	2,876	1,571	0,630	0,261	11
29	1	0	20,356	1,410	0,000	0,925	0,282	5
29	1	0	18,673	4,357	1,378	0,718	0,311	14
29	1	0	17,229	5,992	0,000	0,663	0,261	23
30	1	0	16,785	5,937	0,000	0,671	0,258	23
30	1	0	16,738	3,355	0,316	1,116	0,373	9
30	1	0	9,223	5,204	0,424	0,543	0,434	12
30	1	0	13,690	1,942	0,000	0,548	0,243	8
30	1	0	17,239	6,316	0,444	0,750	0,421	15
34	1	0	15,206	5,165	0,000	1,170	0,646	7
34	1	0	21,359	4,108	0,000	4,272	0,514	8
34	1	0	13,020	5,667	0,000	1,302	0,472	12
34	1	0	15,304	5,405	0,000	1,530	0,772	7
34	1	0	11,871	4,030	0,000	0,913	0,448	9
80	4	48	23,421	6,092	0,000	1,018	0,321	19
80	4	48	16,454	7,472	0,542	0,531	0,287	26
80	4	48	19,405	4,924	0,000	0,924	0,246	20
80	4	48	14,230	6,642	0,377	0,619	0,302	23
10	4	48	27,743	4,633	0,000	2,522	0,309	16
10	4	48	21,222	3,903	0,000	1,061	0,279	14
10	4	48	15,370	6,733	0,000	0,854	0,281	24
10	4	48	21,584	2,323	0,000	0,830	0,211	11
29	4	48	18,218	4,521	0,700	1,215	0,226	20
29	4	48	17,486	5,629	0,739	0,833	0,245	23
29	4	48	17,010	5,270	0,654	0,567	0,182	29

29	4	48	18,617	5,162	0,000	0,745	0,184	28
30	4	48	28,112	4,294	0,000	1,124	0,239	18
30	4	48	22,703	3,554	0,000	1,622	0,323	11
30	4	48	19,707	3,593	0,000	0,857	0,225	16
30	4	48	11,951	3,777	0,996	0,996	0,180	21
34	4	48	29,356	3,986	0,000	1,631	0,266	15
34	4	48	24,503	1,907	0,000	1,531	0,173	11
34	4	48	16,440	6,188	0,000	1,495	0,258	24
34	4	48	17,426	5,883	0,531	1,025	0,294	20
34	4	48	20,702	3,545	0,000	0,828	0,222	16
80	4	24	24,296	3,245	0,000	3,037	0,162	20
80	4	24	22,822	3,837	0,000	1,630	0,213	18
80	4	24	17,076	4,473	0,000	1,314	0,320	14
80	4	24	20,594	3,679	0,000	1,373	0,283	13
80	4	24	17,857	2,357	0,000	1,488	0,295	8
10	4	24	31,150	6,130	0,579	2,832	0,766	8
10	4	24	12,825	5,700	1,375	0,442	0,518	11
10	4	24	7,270	5,603	1,095	0,519	0,431	13
10	4	24	9,067	7,724	3,005	0,363	0,445	17
10	4	24	40,236	6,530	0,000	6,706	0,726	9
17	4	24	17,455	4,205	0,907	1,091	0,350	12
17	4	24	18,773	6,511	0,341	0,894	0,343	19
17	4	24	16,767	4,452	0,000	1,048	0,342	13
17	4	24	14,496	5,735	0,000	0,906	0,441	13
17	4	24	27,351	3,441	0,000	1,302	0,382	9
29	4	24	11,497	6,991	0,833	0,442	0,411	17
29	4	24	13,016	4,036	1,207	0,723	0,404	10
29	4	24	8,655	6,251	0,519	0,456	0,417	15
29	4	24	17,171	3,220	0,000	0,715	0,460	7
29	4	24	8,138	7,718	0,631	0,428	0,594	13
29	4	24	0,000	6,890	0,000	0,000	0,574	12
30	4	24	11,350	6,060	1,399	0,811	1,010	6
30	4	24	0,000	5,403	0,696	0,000	0,772	7
30	4	24	18,681	3,622	0,000	1,099	0,517	7
30	4	24	0,000	6,451	0,000	0,000	0,586	11
30	4	24	0,000	7,578	0,000	0,000	0,505	15
30	4	24	17,174	2,129	0,000	0,954	0,355	6
30	4	24	0,000	2,754	0,336	0,000	0,212	13
30	4	24	12,503	4,444	2,993	0,834	0,556	8
30	4	24	16,527	0,994	2,458	1,653	0,199	6
10	3	24	8,771	4,335	2,396	0,487	0,542	8
10	3	24	17,771	4,102	0,632	0,773	0,456	9
10	3	24	19,761	4,587	0,790	2,470	0,459	10
10	3	24	25,784	3,709	0,419	1,517	0,618	6
10	3	24	16,061	3,385	0,000	0,845	0,677	5
17	3	24	12,694	3,026	1,931	1,813	0,605	6
17	3	24	11,714	4,533	0,000	1,171	1,133	4
17	3	24	11,386	3,321	0,000	0,633	1,107	3
17	3	24	13,063	7,902	1,444	1,188	0,878	9
17	3	24	15,501	5,112	1,155	1,192	1,704	3

29	3	24	8,427	9,555	2,151	0,468	0,420	21
29	3	24	12,933	5,178	3,055	0,616	0,471	11
29	3	24	7,648	8,775	0,000	0,956	1,097	8
29	3	24	20,050	4,296	0,000	0,911	0,614	7
29	3	24	16,240	2,425	1,016	0,601	0,404	6
29	3	24	9,543	5,255	0,000	0,434	0,328	17
30	3	24	13,771	2,953	2,785	0,725	0,422	7
30	3	24	12,466	3,607	1,544	0,567	0,601	6
30	3	24	22,041	1,402	0,306	2,004	0,701	2
30	3	24	20,042	6,080	0,887	1,822	0,676	9
30	3	24	22,246	2,026	1,560	1,112	0,405	5
34	3	24	19,886	5,788	0,000	0,710	0,362	16
34	3	24	15,235	6,790	0,856	0,586	0,357	19
34	3	24	27,549	1,703	0,000	1,377	0,341	5
34	3	24	30,174	4,291	0,000	1,257	0,477	9
34	3	24	23,442	2,206	0,000	1,234	0,315	7

8.2. Figuras

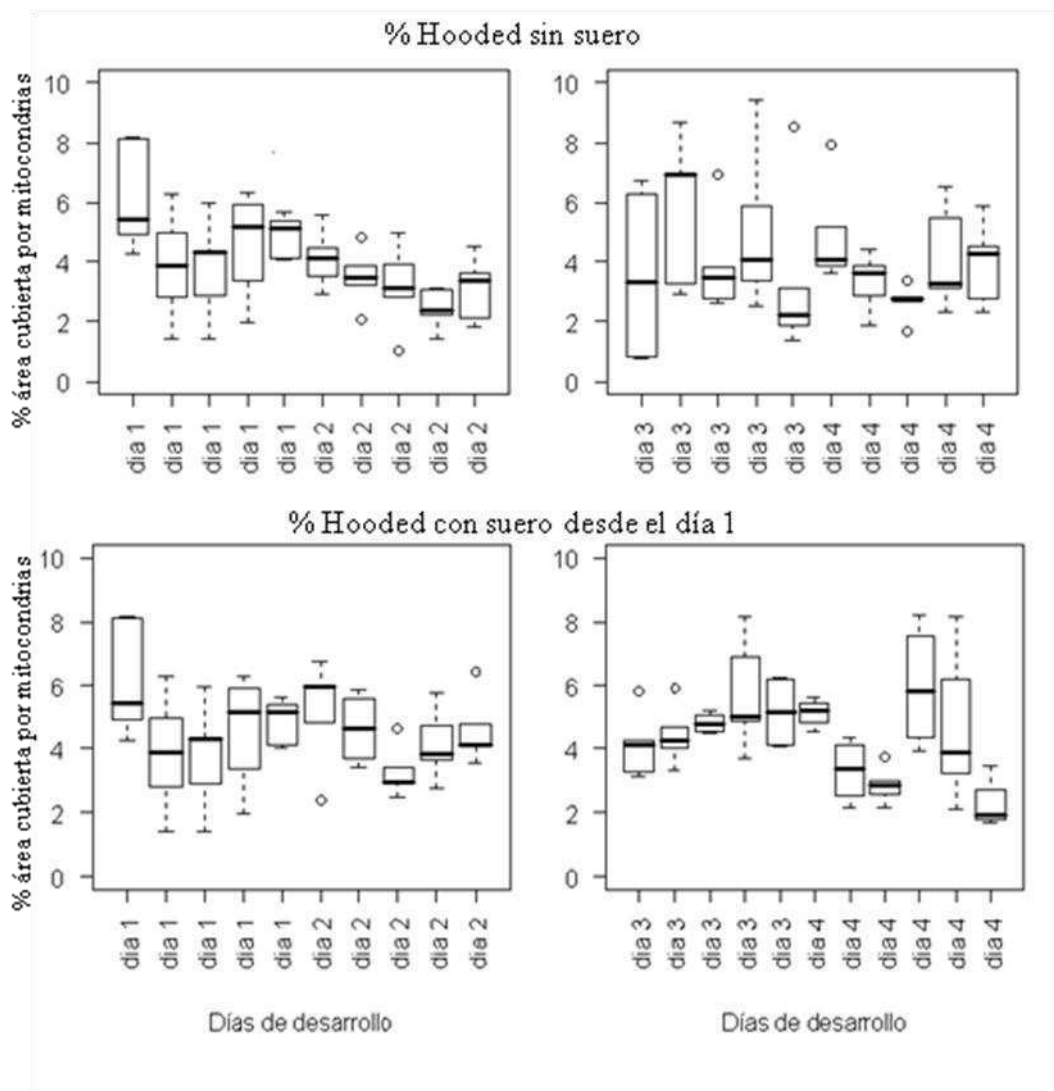


Figura 17: Días 1 a 4. Porcentajes de mitocondrias *hooded*, cada caja representa 1 embrión. Corresponde a la Figura 11A y B.

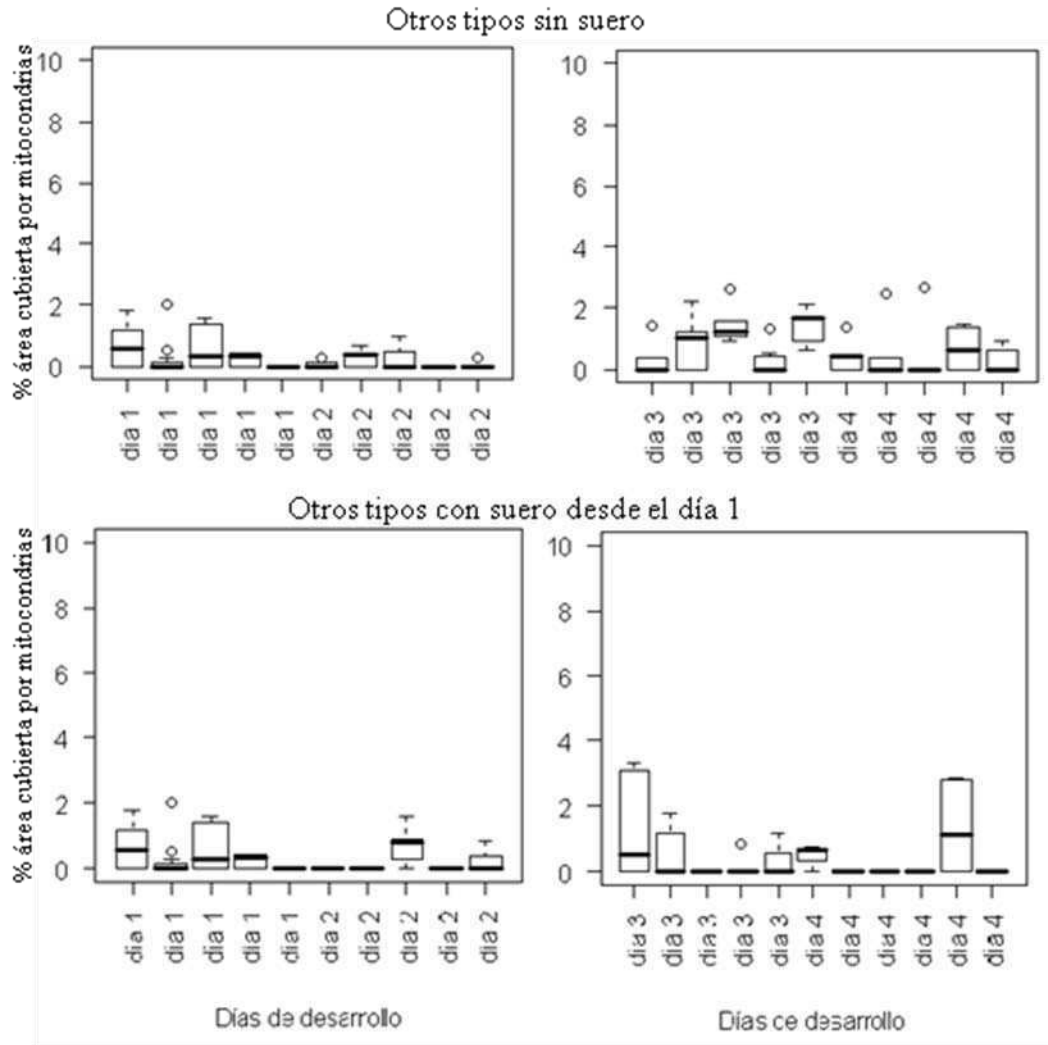


Figura 18: Días 1 a 4. Porcentajes de otros tipos de mitocondrias, cada caja representa 1 embrión. Corresponde a la Figura 11A y B.

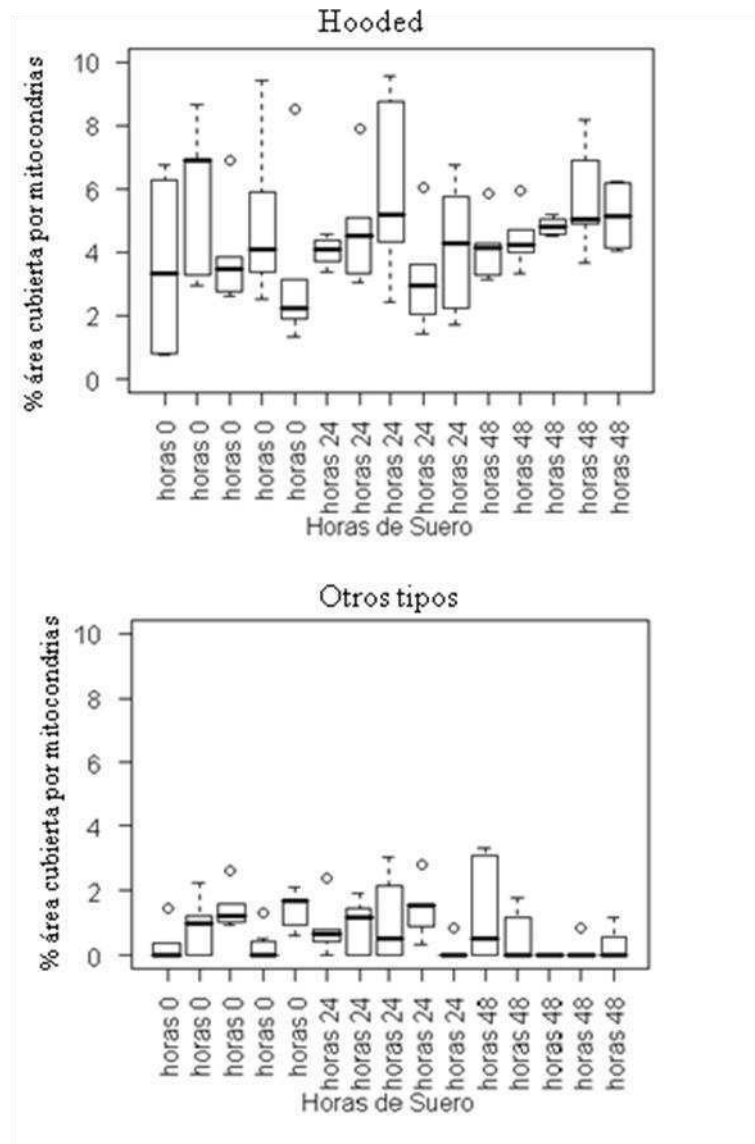


Figura 19: Día 3. Porcentajes de mitocondrias *hooded* y otros tipos, cada caja representa 1 embrión. Corresponde a la Figura 11C

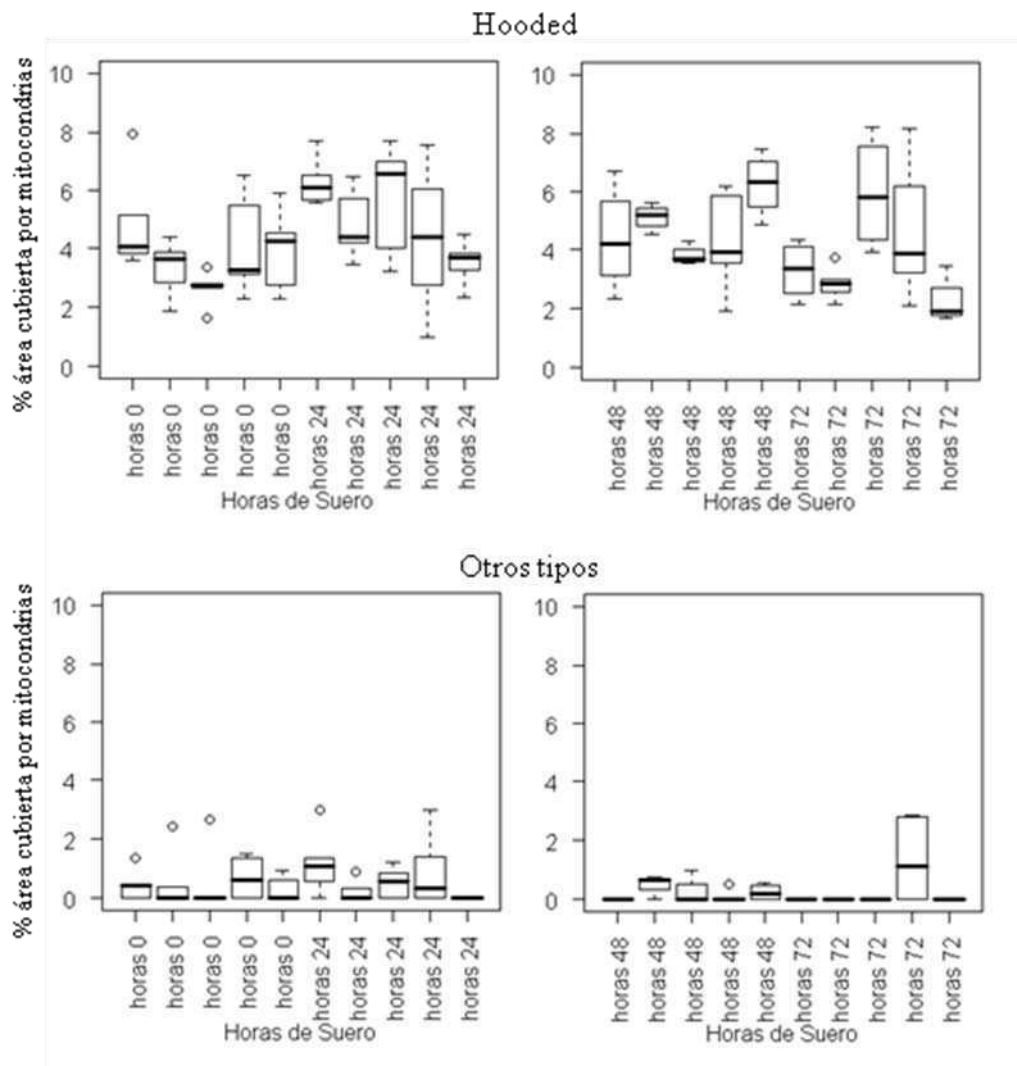


Figura 20: Día 4. Porcentajes de mitocondrias *hooded* y otros tipos, cada caja representa 1 embrión.. Corresponde a la Figura 11D

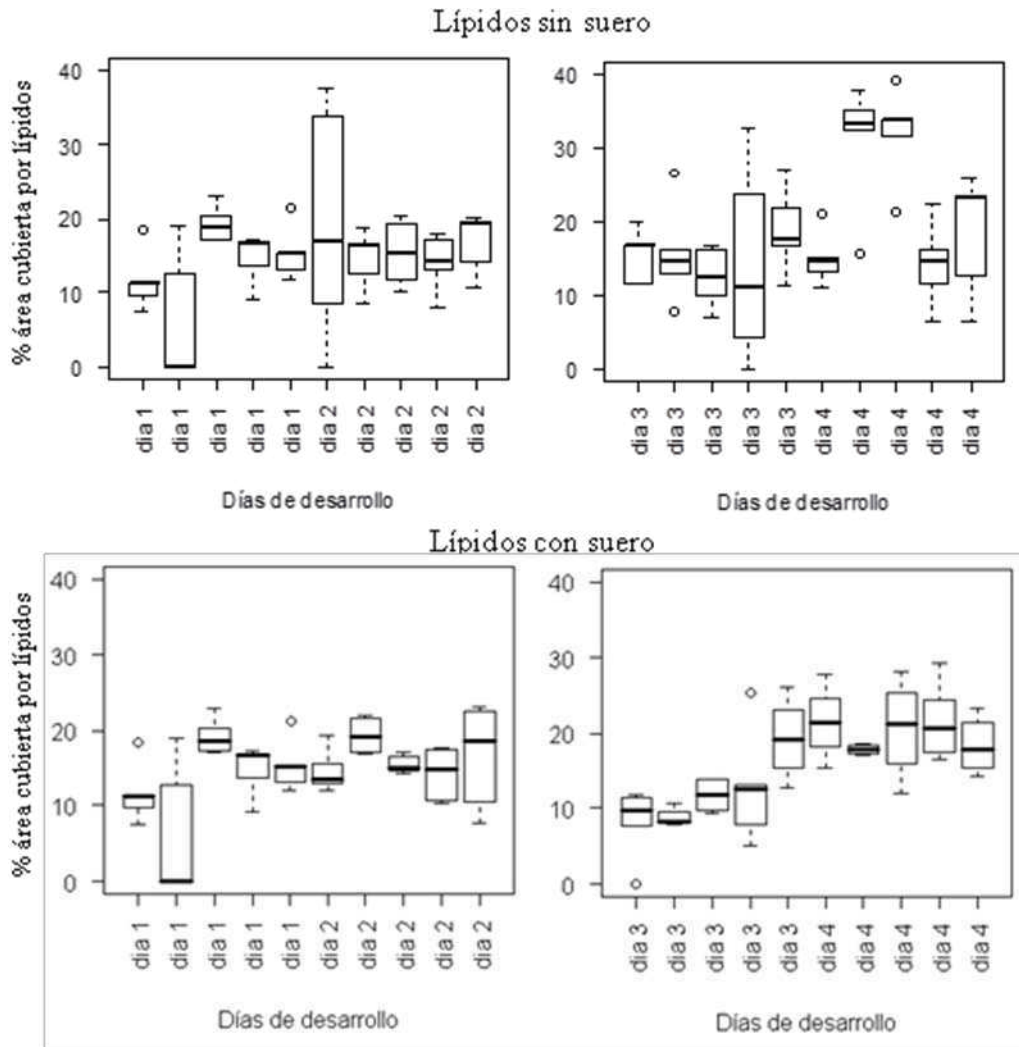


Figura 21: Días 1 a 4. Porcentajes de lípidos, cada caja representa 1 embrión. Corresponde a la Figura 14A y B.

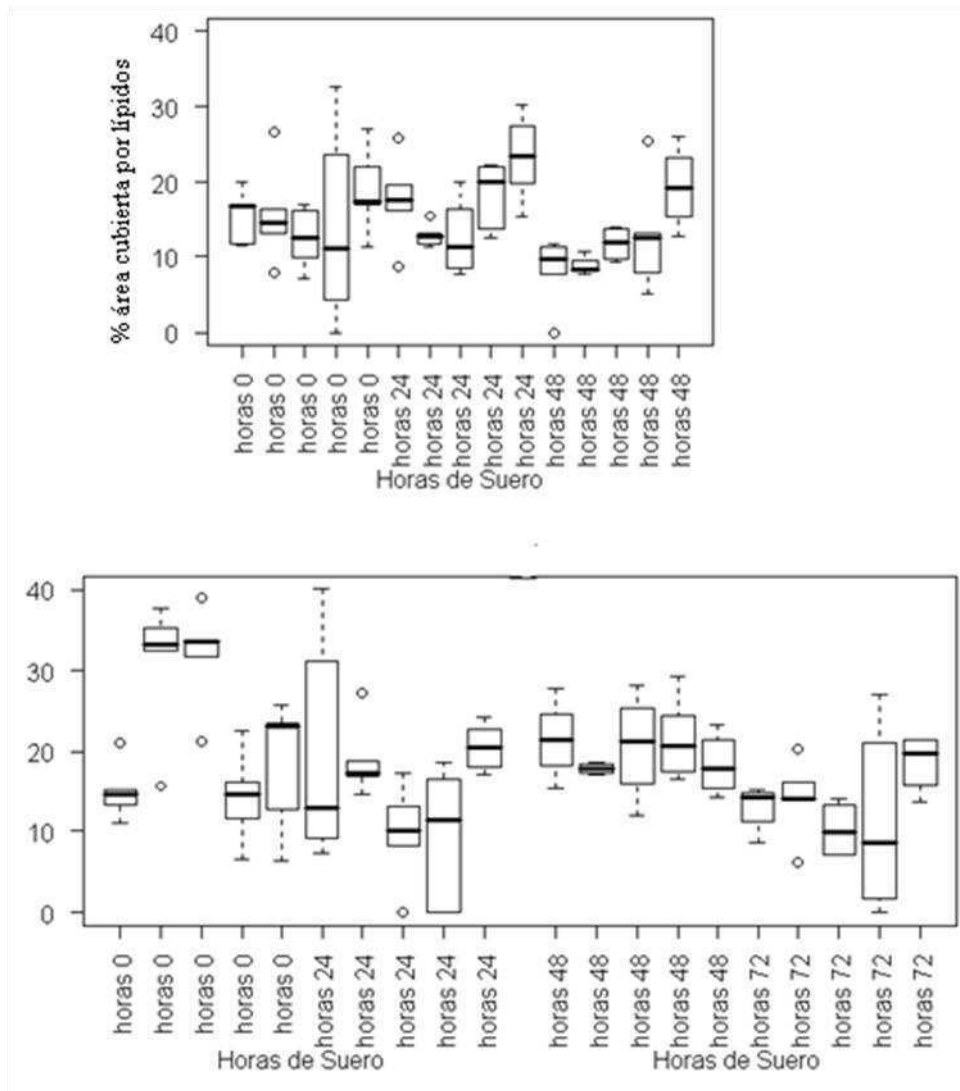


Figura 22: Días 3 (superior) y 4 (inferior). Porcentajes de lípidos, cada caja representa 1 embrión. Corresponde a la Figura 14C y D.