

# ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO* DURANTE LAS ETAPAS DEL DESARROLLO TEMPRANO Y TARDÍO

## Ultrastructural Study of *in Vitro* Produced Bovine Embryos during Early and Late Development

Yadira Urribarrí-Rodríguez<sup>1</sup>, Juan Pablo Hernández-Fonseca<sup>2,\*</sup>, Patricia Villamediana-Monreal<sup>1,3</sup>, Jesús Mosquera<sup>2</sup>, Amaru Pirela-Pirela<sup>1</sup>, Josanny Peláez-Gutiérrez<sup>3</sup> y Hugo Hernández-Fonseca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fecundación *in vitro*, Unidad de Investigación en Biotecnología Animal (UNIBIO), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4505-A, Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette", Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo 4001-A, Venezuela.

<sup>3</sup>Laboratorio de Citogenética, Unidad de Investigación en Biotecnología Animal, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. \*jphernan1970@gmail.com

### RESUMEN

Se analizó la ultraestructura de embriones bovinos producidos *in vitro* durante su desarrollo temprano y tardío, mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET). Los complejos cúmulus-ovocitos fueron aspirados de vacas sacrificadas en mataderos comerciales del estado Zulia y madurados, fecundados y cultivados *in vitro*. Luego de 24 horas (período temprano) y 48 horas (período tardío) de post inseminación, los embriones resultantes se fijaron en glutaraldehído y se procesaron para MET. Se observó la presencia de estructuras celulares como el aparato de Golgi, el núcleo, microvellosidades, la zona pelúcida y vacuolas citoplasmáticas de apariencia normal. Sin embargo, a nivel de las mitocondrias se encontró aumento en el porcentaje de mitocondrias vacuoladas y de mitocondrias edematizadas. Estas alteraciones mitocondriales se observaron mayormente en los embriones durante el período tardío. Estos hallazgos pudiesen tener relevancia en el retraso del desarrollo de los embriones obtenidos por el método *in vitro* durante el período tardío.

**Palabras clave:** Fecundación *in vitro*, embrión, ultraestructura, bovino, edematización, mitocondrias.

### ABSTRACT

This research studied the ultrastructure of *in vitro* produced bovine embryos at early and late development stages, using the transmission electron microscopy (TEM). Cumulus oocyte complexes were obtained by aspiration from cows sacrificed in local slaughterhouses and matured, fertilized and cultured *in vitro*. After 48 hours post insemination, resulting embryos were fixed in glutaraldehyde and processed for TEM. Samples were analyzed and evaluated in order to determine the presence of ultrastructural alterations. Cellular structures, such as Golgi apparatus, nucleus, micovilli, zona pellucida and cytoplasmic vacuolae had a normal appearance. Nonetheless, at the mitochondrial level, an increase in the percentage of vacuolated and edematous mitochondria in early and late developed embryos was observed. *In vitro* produced bovine embryos of late development had greater degrees of mitochondrial alterations than those of early development, which could indicate that mitochondrial alterations play a primordial deleterious role in the delayed development, normally observed in *in vitro* produced embryos. It is concluded that ultrastructural mitochondrial alterations are mostly found in *in vitro* produced bovine embryos with increased expression in embryos during late development.

**Key words:** *In vitro* fertilization, embryo, ultrastructure, cattle, edema, mitochondria.

## INTRODUCCIÓN

La fecundación *in vitro* de ovocitos mediante técnicas de maduración (MIV), fecundación (FIV) y cultivo embrionario *in vitro* (CIV), permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones que pueden ser utilizados para estudios científicos y fines comerciales [16, 25]. Sin embargo, para lograr que la fecundación *in vitro* sea una herramienta con impacto real a nivel de la producción bovina (*Bos taurus* y *Bos indicus*), ya sea a través de planes de mejora genética, o como medio directo de producción, hay que solucionar una serie de problemas técnicos relacionados con la calidad de los ovocitos obtenidos, la evaluación del potencial de desarrollo de los embriones y mejoras en los medios de cultivo [16].

En el área de la reproducción animal, de los 470.000 embriones bovinos transferidos a nivel mundial en 1998, cerca de 7% fueron producidos *in vitro*, lo cual representa un incremento en relación con los años anteriores [16]. Sin embargo, se ha presentado una serie de dificultades después de la maduración y fecundación *in vitro* [39]. Es difícil determinar si el problema se debe directamente a condiciones no óptimas de cultivo de los embriones o a la reducción del desarrollo de competencia de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro*. Ambos aspectos podrían combinarse y producir embriones con desarrollo atrasado y/o presencia de anomalías estructurales, lo que llevaría a una reducción de su viabilidad [39].

Investigaciones acerca de la producción *in vivo* de embriones bovinos describen que, para lograr el éxito en la FIV se requiere de la evaluación del desarrollo embrionario y determinar la calidad de los mismos; el análisis de manera general a través de la observación estereoscópica, no siempre demuestra ser un método eficaz para predecir la viabilidad embrionaria. De igual manera, el uso de la microscopía óptica tampoco garantiza una evaluación eficaz del desarrollo y la calidad de los embriones [5]. Se ha demostrado mediante estudios ultraestructurales que la viabilidad de los embriones *in vivo* está relacionada con la presentación de blastómeras bien definidas y citoplasma homogéneo, relacionando la presencia de blastómeras no bien definidas, con pérdida de la membrana citoplasmática, núcleos redondeados, lisosomas abundantes, espacios en el citoplasma con carencia de organelos, disminución de las microvellosidades, vesículas lipídicas abundantes de diferentes formas y finalmente con mitocondrias mal definida con alteraciones de la viabilidad [20]. Siendo las mitocondrias importantes en el desarrollo de la célula al ser la proveedora de energía es lógico suponer que su alteración puede estar relacionada con disminución de la viabilidad celular [19]. Por ende, el propósito de este estudio fue determinar si las alteraciones de la viabilidad y desarrollo de los embriones producidos *in vitro* está relacionada con alteraciones de la ultraestructura mitocondrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y transporte de los ovarios

Se utilizaron ovarios de vacas y novillas sacrificadas en mataderos comerciales ubicados en la Villa del Rosario (Estado Zulia, Venezuela), y transportados al laboratorio de fecundación *in vitro* (Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela) en solución tamponada de buffer fosfato saline (PBS) a una temperatura de 30-35°C en un contenedor isotérmico. Posteriormente fueron lavados dos veces en 250 mL de PBS y un tercer lavado con 250 mL de PBS + 150 µL de penicilina/estreptomicina (15140-122, Gibco; San Rafael-Costa Rica), a una concentración de 1500UT/ mL de penicilina y 1500 µg/mL de estreptomicina, a 35-37°C [6].

### Aspiración de folículos y selección de los ovocitos

Para la aspiración de los folículos se utilizó una jeringa de plástico de 10 mL provista de aguja 19 g (Sensi Medical; Caracas-Venezuela). El contenido folicular aspirado se observó bajo el microscopio estereoscópico (Olympus SZ51, Japón), seleccionándose los complejos cúmulus-ovocitos (COC's) que presentaron mayor tamaño, zona pelúcida intacta, citoplasma homogéneo y con al menos una o dos capas completas de células del cúmulus compacta [22].

### Maduración *in vitro* (MIV)

El medio de maduración fue el TCM-199 (M-7528, Sigma, EUA) suplementado con 5 µL de 17 β-estradiol (E2758, Sigma, EUA), 500 µL de suero fetal bovino (SFB; 26140 Gibco, San Rafael de Heredia-Costa Rica), 5 µL de hormona folículo estimulante (FSH 500UI, Sigma, EUA), 50 µL hormona luteinizante LH (5269, Sigma EUA), 5 µL piruvato sódico (P5280, Sigma, EUA), 50 µL de antibióticos penicilina/estreptomicina (P/E) (15140-122, Gibco, San Rafael de Heredia-Costa Rica) y 5 µL factor de crecimiento epidermal FCE (13247-051, Gibco, San Rafael de Heredia-Costa Rica). Los COC's seleccionados se colocaron en MIV en grupos de 20-25 COC's por gota de 100 µL, durante 24 horas (h) a 38,5°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire saturado de humedad [31].

### Capacitación espermática

Se utilizó semen congelado de toros de probada fertilidad. Las pajuelas contenidas en el tanque de nitrógeno líquido se extrajeron y se descongelaron en baño María (Fisher Scientific, Isotemp 205, Buduque, Iowa EUA) a 37°C durante 30 segundos (seg). Se utilizó el semen en 2 mL de TL-Semen suplementado con 100 mM de piruvato de sodio y 50 mg/L de gentamicina y se centrifugó (Eppendorf, 5415D, Alemania) a 39 g, 5 min. Se procedió a retirar el sobrenadante para repetir nuevamente el lavado. Posteriormente se tomaron 30 µL del "pellet" y se mezclaron con 30 µL del medio TL- Stock. De esta

mezcla se tomaron 5  $\mu\text{L}$  para diluirlo con 250  $\mu\text{L}$  de agua para calcular la concentración espermática y 5  $\mu\text{L}$  se vertieron en 150  $\mu\text{L}$  de medio TL-Stock para evaluar motilidad y llevar la concentración a  $1 \times 10^6$  spz/mL [13].

### Fecundación *In vitro* (FIV)

El medio TL FIV fue suplementado con 0,003 g/mL de heparina (H3149, Sigma, EUA.) y 6 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA), libre de ácidos grasos (A6003, Sigma, EUA). Una vez denudados los ovocitos en medio TL-Semen mediante una pipeta Pauster con movimientos constantes se colocaron en una placa de 20-25 ovocitos por gota de medio para FIV más 5  $\mu\text{L}$  de semen por 18 h en las condiciones antes mencionadas [8].

### Cultivos *in vitro* (CIV) y evaluación de los cigotos

El medio de cultivo Synthetic Oviductal Fluid (SOF) fue suplementado con piruvato de sodio (P5280, Sigma, EUA), antibiótico penicilina/estreptomina P/E (15140-122, Gibco, San Rafael, Costa Rica) y SFB (26140, Gibco, San Rafael, Costa Rica), como se mencionó anteriormente. La placa de CIV fue preparada de igual manera como se hizo con el medio de MIV y FIV. Los presuntos cigotos fueron incubados por 24 h [7]. La evaluación inicial se realizó bajo el microscopio estereoscópico a las 24 h y 48 h post-inseminación (hpi). Aquellos embriones de dos células seleccionados a las 24 hpi y que continuaron su división de tres a seis células hasta las 48 hpi se clasificaron como embriones de desarrollo temprano. Aquellos embriones con al menos dos células a las 48 hpi se clasificaron como embriones de desarrollo tardío.

### Evaluación microscópica de los embriones

La evaluación estereoscópica y óptica se realizó según lo descrito por Palma [27] para la evaluación de embriones bovinos naturales. Los criterios ultraestructurales a estudiar fueron la presencia de gotas lipídicas, alteraciones en mitocondrias, aparato de Golgi, nucléolo, retículo endoplasmático, zona pelúcida, microvellosidades y presencia de vacuolas. Las mitocondrias fueron clasificadas como mitocondrias normales y mitocondrias alteradas (vacuoladas o edematizadas). La edematización mitocondrial fue reportada en cuatro grados (I al IV) de acuerdo a la extensión del edema mitocondrial [17].

### Preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión

Los embriones seleccionados se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en solución tamponada 0,1 M cacodilato de sodio, 24 h. Luego las muestras fueron postfijadas en 1% de tetraóxido de osmio durante 1,5 h y deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol, para ser inmersas en óxido de propileno y embebidas en resina Araldite 502 a 60°C (Laboratorio de Inmunología y Biología Celular, Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette", Universidad del Zulia). Para deli-

mitar el área de estudio se realizaron secciones gruesas de las muestras, las cuales fueron teñidas con azul de toluidina para ser observadas por microscopía de luz (Zeiss, Axioscop, Alemania). Las secciones ultrafinas fueron colocadas en rejillas y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Posteriormente se realizó el análisis de las secciones ultrafinas a través del microscopio electrónico de transmisión (Jeol, JEM-1010, Akishima, Japón). Finalmente las imágenes se procesaron digitalmente mediante el programa Adobe Photoshop CS Ver 8.0 [17]. Los datos obtenidos fueron registrados y tabulados adecuadamente para sus análisis.

### Análisis estadístico

En la presente investigación, las alteraciones ultraestructurales reportadas en embriones de desarrollo temprano y de desarrollo tardío fueron analizadas con la ayuda del paquete estadístico SAS [36], utilizando la prueba de "t" test no pareado. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando la  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

Un total de 149 embriones fueron incluidos en este estudio para el análisis con el MET e identificar las alteraciones ultraestructurales, 63 se observaron divididos en dos células a las 24 hpi y 11 continuaron su división a estadios de tres a seis células a las 48 hpi clasificándose como embriones de desarrollo temprano. Teniendo en cuenta que los 52 embriones restantes detuvieron su división en dos células fueron clasificados como embriones de desarrollo tardío; a éstos se suman 86 embriones divididos en dos células observados a las 48 hpi, teniendo un total de 138 embriones de desarrollo tardío.

En esta investigación, la tasa de división fue de 11,72%, inferior al 62,2% obtenida en un estudio de ovocitos bovinos madurados y fecundados *in vitro* y obtenidos a partir de hembras mestizas [7]. Se ha reportado que la tasa de producción de embriones puede verse a las 48 hpi, donde la evaluación del número de embriones y su estadio representan un estimado de la eficiencia y calidad de los procesos de maduración y fecundación en los primeros días de cultivo [39]. Una razón por la cual se obtuvo una baja tasa de desarrollo podría ser la selección de los COC's previo a la maduración, etapa en la cual se debería ejercer una estricta evaluación sobre la calidad morfológica, tanto de las células del cúmulus como en el ovoplasma [35].

### Evaluación en microscopía óptica y ultraestructural

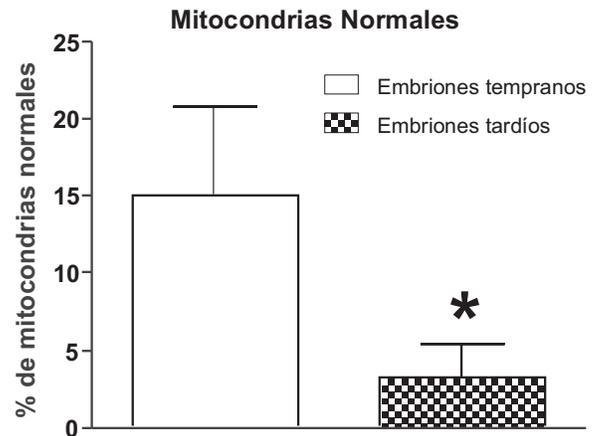
Se evaluaron 15 embriones, tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica, de los cuales siete correspondieron al grupo de desarrollo temprano y ocho, el tardío. Todos los embriones observados por microscopía óptica presentaron blastómeras definidas y sin ruptura de la membrana celular, sin embargo, al ser sometidos a la evaluación en mi-

croscopio electrónico, los 15 embriones presentaron alteraciones ultraestructurales. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por Aguilar y col. [5], al estudiar parámetros morfológicos relacionados con viabilidad, a nivel estructural y ultraestructural en embriones bovinos *in vivo*, se observaron pocas alteraciones a nivel del microscopio óptico, pero varias alteraciones ultraestructurales, sugiriendo que el estudio ultraestructural es más confiable en la evaluación de embriones.

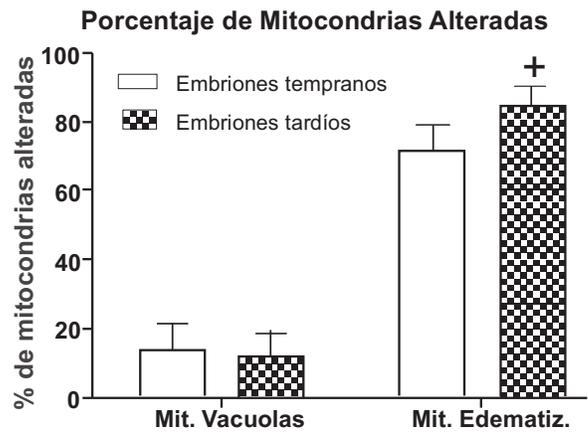
Las principales alteraciones ultraestructurales encontradas fueron a nivel mitocondrial. Se encontró disminución del porcentaje de mitocondrias normales en los embriones tardíos, con aumento de mitocondrias alteradas representadas por mitocondrias edematizadas y específicamente en grados avanzados de edematización (grado IV) (FIGS. 1 y 2). Estas alteraciones posiblemente afectan notablemente el desarrollo temprano del embrión, ya que las mitocondrias son las responsables del suministro de energía utilizada en el metabolismo celular [12].

Como se ha señalado, las mitocondrias presentaron diversos grados de alteración relacionados con la posible infiltración de fluidos en el organelo, partiendo del estado vacuolar al de edematización total con solo vestigios de crestas mitocondriales (FIGS. 2, 3 y 4). La razón de este hallazgo no está clara. Se ha demostrado en estudios previos que el cultivo de embriones en medios que contienen suero originan aumento en el número de vacuolas lipídicas en el citoplasma [4] y alteración mitocondrial (mitocondrias inmaduras acompañadas de función mitocondrial alterada). Se cree que las vacuolas lipídicas están relacionadas con el daño mitocondrial y la alteración de la viabilidad de los embriones originados *in vitro* [1]. Los hallazgos obtenidos difieren de los de estos investigadores, dado que se encontraron alteraciones mitocondriales sin un importante acúmulo de inclusiones lipídicas sugiriendo que existen otros mecanismos involucrados en la alteración mitocondrial en los embriones *in vitro*. Además, los hallazgos ultraestructurales de las mitocondrias en el trabajo de Abe y Hoshi [1], no revelaron asociación entre mitocondrias vacuoladas o edematizadas con la presencia de las vacuolas lipídicas. También se ha relacionado la alteración mitocondrial con el estrés calórico [43, 44]. Los estudios ultraestructurales de incremento en mitocondrias vacuoladas y edematizadas acompañado de incremento en vacuolas citoplasmáticas son muy similares a lo reportado por Rivera y col. [32], tanto embriones bovinos producidos *in vivo* como *in vitro* son sometidos a temperaturas superiores a 38,5°C (41 y 43°C). En el presente estudio, los embriones no fueron sometidos al estrés calórico sugiriendo que el incremento de la temperatura no estuvo vinculado a los hallazgos. Además se encontró diferencias en el grado de afectación mitocondrial entre los embriones tempranos y tardíos sometidos a las mismas condiciones de cultivo.

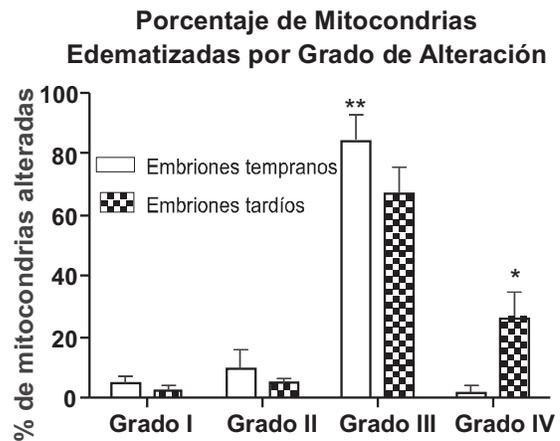
Se ha sugerido que las especies están relacionadas con la susceptibilidad de la mitocondria a sufrir alteraciones. A este respecto, estudios previos relacionados con las diferencias en



**A** \* P < 0,0002 vs. embriones tempranos

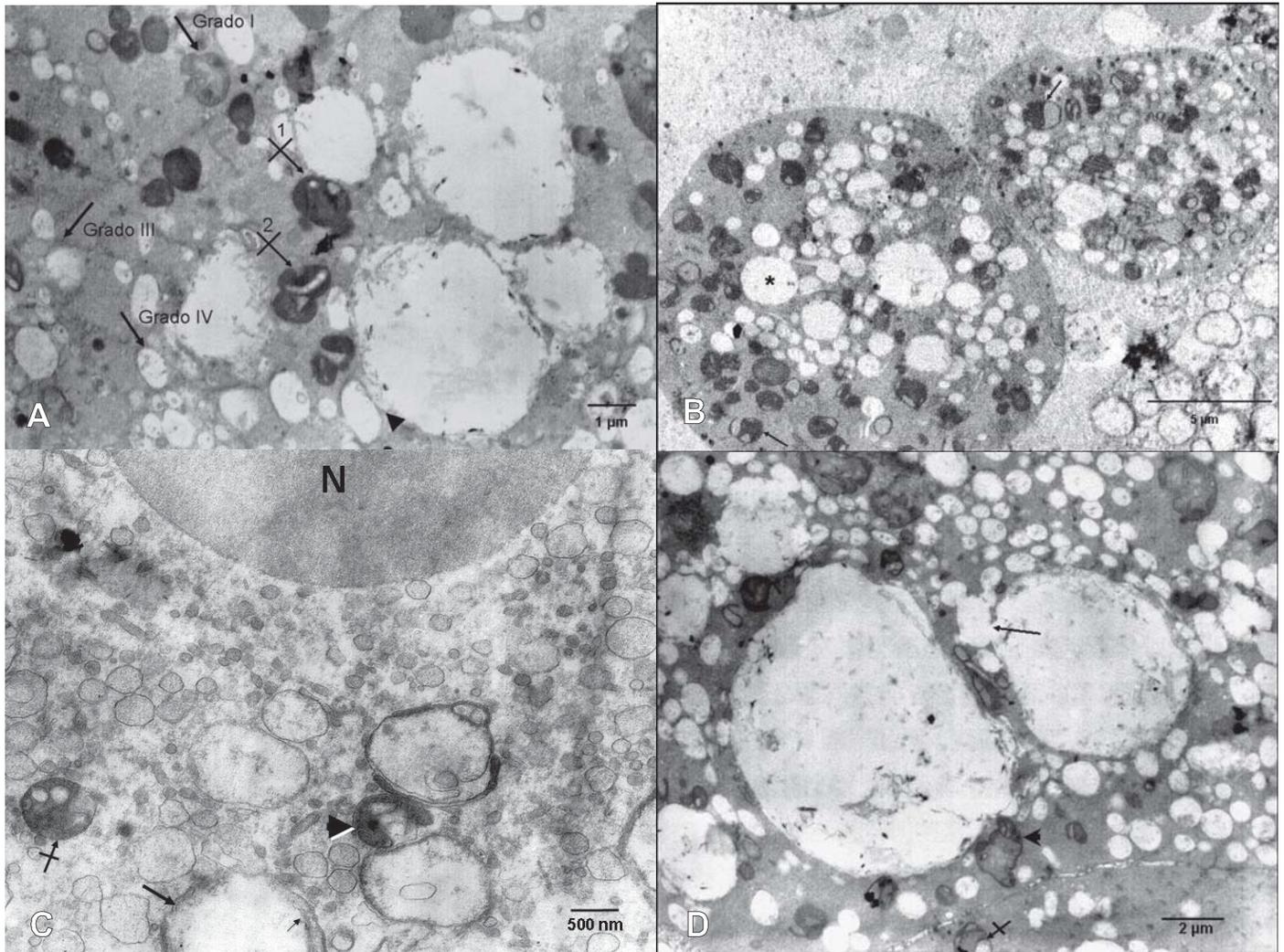


**B** + P < 0,0026 vs. tempranos



**C** \* P < 0,0001 vs. tempranos  
\*\* P < 0,001 vs. tardíos

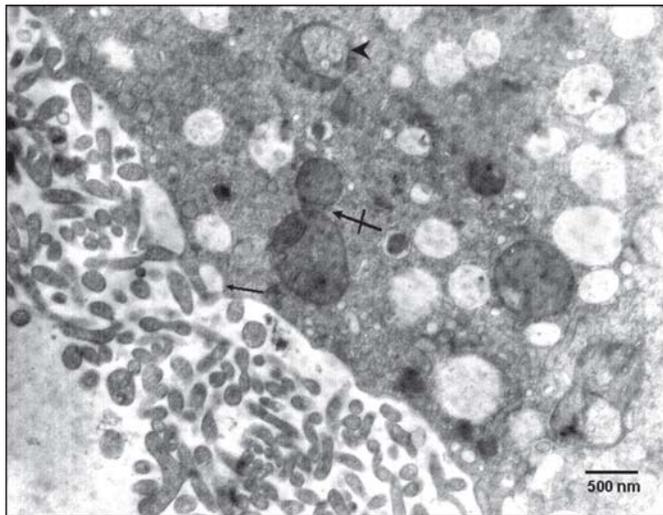
**FIGURA 1. EVALUACIÓN MITOCONDRIAL. A) PORCENTAJE DE MITOCONDRIAS NORMALES EN EMBRIONES TARDÍOS. B) MITOCONDRIAS ALTERADAS POR EDEMATIZACIÓN EN EMBRIONES TARDÍOS. C) GRADOS DE ALTERACIÓN MITOCONDRIAL.**



**FIGURA 2. EMBRIONES TEMPRANOS. A) GRADOS DE DEGENERACIÓN MITOCONDRIAL. MITOCONDRIAS VACUOLADAS (FLECHA EN CRUZ 1 Y 2) Y GRADOS DE EDEMATIZACIÓN MITOCONDRIAL (FLECHAS; CORRESPONDIENTES A LOS GRADOS I, III Y IV DE EDEMATIZACIÓN MITOCONDRIAL, RESPECTIVAMENTE). LA CABEZA DE FLECHA MUESTRA FUSIONÁNDOSE UNA VACUOLA CON OTRA MAYOR, PARA FORMAR EL EXTENSO SISTEMA VACUOLAR QUE SE OBSERVA EN ESTAS CÉLULAS. (6.000X). B) PANORÁMICA DONDE SE APRECIA DISTRIBUCIÓN UNIFORME DE LAS VACUOLAS, LIMITADA FUSIÓN VACUOLAR Y MITOCONDRIAS CON ALTERACIÓN DE LA FORMA (FLECHAS). SE OBSERVA UNA IMAGEN SUGERENTE DE UNA CÉLULA NECRÓTICA EN EL ÁNGULO INFERIOR DERECHO DE LA MICROFOTOGRAFÍA. (1.500X). C) SE APRECIA UNA MITOCONDRIA EDEMATIZADA GRADO III; SE OBSERVAN RESTOS DE LA DOBLE MEMBRANA (FLECHA) Y POSIBLES RESTOS DE CRESTAS MITOCONDRIALES EN SU INTERIOR (FLECHA DELGADA). MITOCONDRIA VACUOLADA (FLECHA EN CRUZ) Y MITOCONDRIA CON ALTERACIÓN DE LA FORMA (CABEZA DE FLECHA). NÚCLEO (N). (10.000X). D) FORMACIÓN DE GRANDES VACUOLAS MEDIANTE LA FUSIÓN DE VACUOLAS MÁS PEQUEÑAS, POSIBLEMENTE DE ORIGEN ENDOCÍTICO. MITOCONDRIA CON VACUOLA (FLECHA EN CRUZ). SE OBSERVAN VARIAS MITOCONDRIAS CON ALTERACIONES DE LA FORMA (CABEZA DE FLECHA). (8.000X).**

los parámetros de calidad, desarrollo y ultraestructura de embriones bovinos y ovinos (*Ovis aries*) demostraron diferencias de especies en la susceptibilidad de las mitocondrias para presentar alteraciones ultraestructurales, y la presencia de áreas electrolúcidas en el interior mitocondrial en células de ovinos y bovinos [33]. Estos hallazgos en conjunto posiblemente le den una preponderancia a la susceptibilidad de la especie a sufrir alteraciones mitocondriales a través de agentes no estudiados en este reporte por el efecto tóxico de los lípidos o estrés calórico.

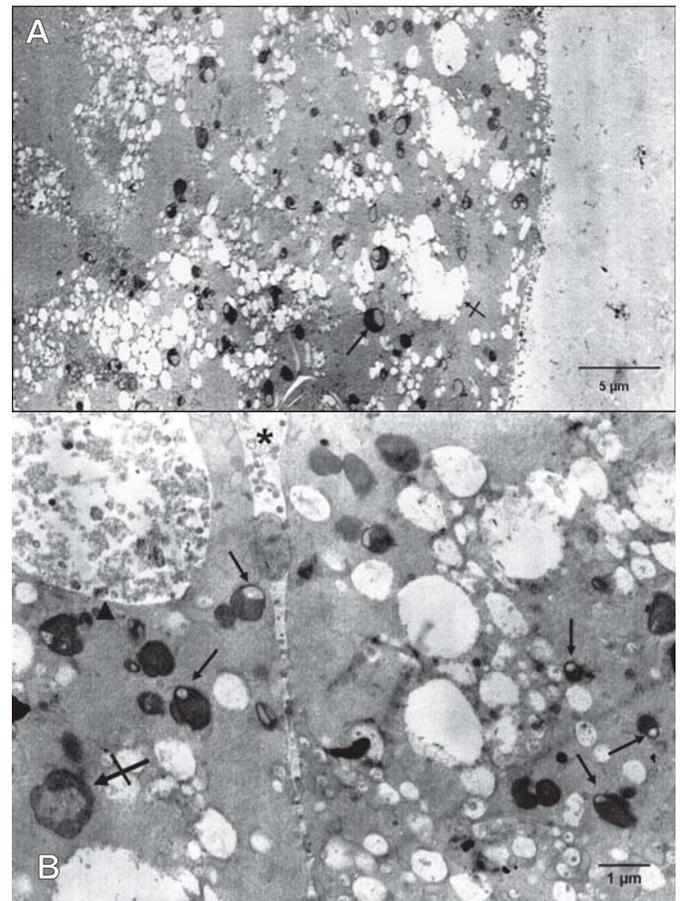
En un estudio realizado por Crosier y col. [9] donde se cuantifica el número de mitocondrias vacuoladas se observa que, existe un mayor número de éstas en los embriones bovinos obtenidos *in vivo*, al compararlos con los obtenidos *in vitro* en diferentes medios de cultivos. Resultados obtenidos en este estudio, si bien, no se hizo la comparación con embriones obtenidos *in vivo*, si se describen alteraciones mitocondriales en los embriones *in vitro* que fueron evolucionando de vacuolización a edematización mitocondrial.



**FIGURA 3. EMBRIÓN TEMPRANO. SE APRECIAN FIGURAS DE ENDOCITOSIS (FLECHA), IMAGEN DE DIVISIÓN MITOCONDRIAL (FLECHA EN CRUZ) Y MITOCONDRIA CON ALTERACIÓN DE LA FORMA (CABEZA DE FLECHA). (10.000X).**

Un estudio previo ha demostrado que, las mitocondrias pueden jugar un papel importante en el desarrollo del oocito bovino maduro regulando el potencial para llegar a la etapa de blastocisto [38]. La alteración ultraestructural mitocondrial encontrada en este estudio puede estar relacionada con efectos deletéreos que conlleven al detrimento en el desarrollo del embrión. La vacuolización y edematización mitocondrial puede ocurrir en diferentes situaciones de estrés biológico, como la sobrecarga de calcio [15, 18], el estrés oxidativo [15, 21], la isquemia/reperfusión [26], la exposición crónica al etanol [23] y la hipertermia [32], entre otras. Se ha hipotetizado que la edematización mitocondrial resulta en cambios de la permeabilidad en el tránsito de la membrana mitocondrial causado por la apertura de los poros de alta conductancia de la membrana interna mitocondrial con el consecuente flujo no selectivo de solutos [18]. Bajo estas condiciones, la mitocondria no puede mantener el gradiente de protones [40] y la síntesis de ATP; esto, acompañado de desplegamiento de las crestas mitocondriales y la posible liberación de varios factores iniciadores de apoptosis como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis [18, 37], puede inducir trastornos del desarrollo embrionario. Sin embargo como mecanismo más probable de muerte celular, la necrosis pudiese ser más probable que la apoptosis, en vista que previas publicaciones han demostrado que el déficit de ATP intracelular esta ligado a la inducción de necrosis y al bloqueo de la señalización de la apoptosis [41].

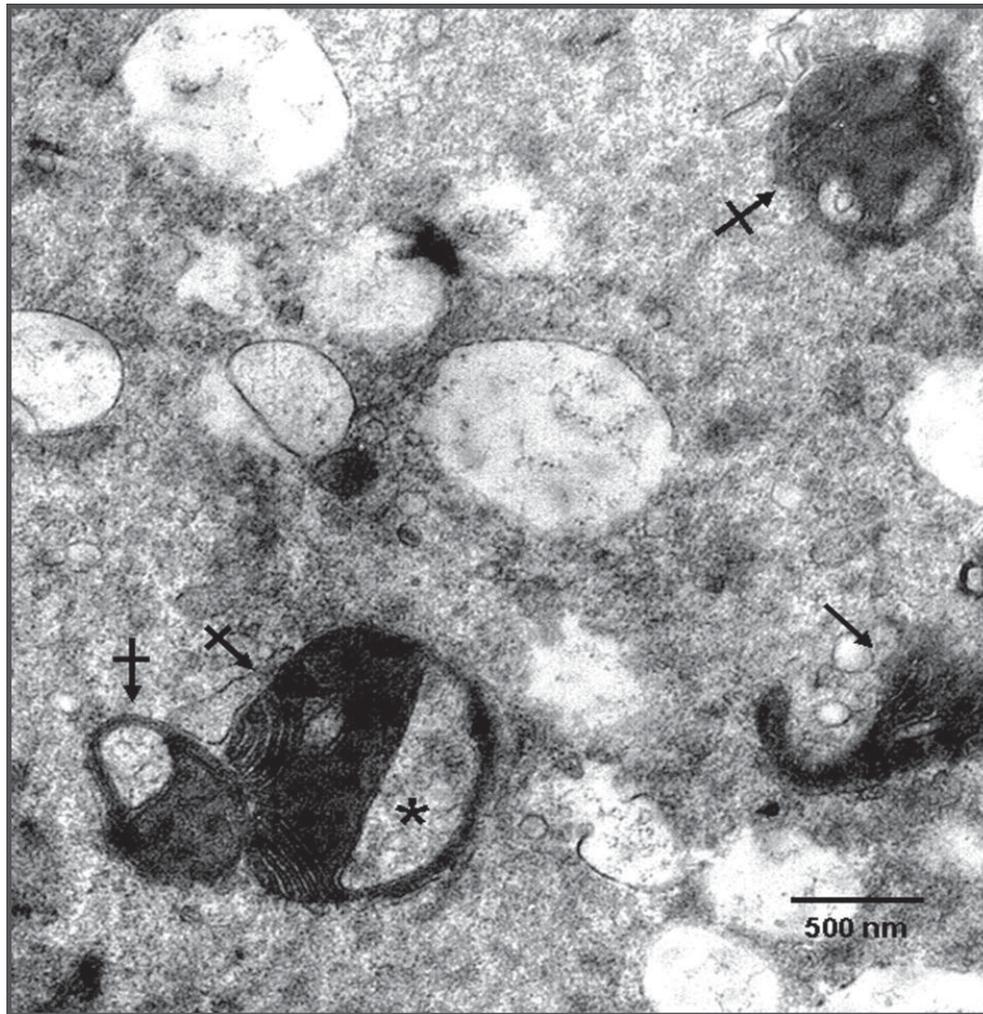
Como dato interesante, gran número de mitocondrias presentaron alteraciones en la forma, adoptando formas alargadas que de acuerdo al corte en la sección del tejido aparecen como presentando contenido citoplasmático (FIGS. 3, 4 y 5). No se tiene una clara explicación para este fenómeno.



**FIGURA 4. EMBRIONES TARDÍO. A) PANORÁMICA MOSTRANDO MITOCONDRIAS VACUOLADAS (FLECHA), GRANDES VACUOLAS (FLECHA EN CRUZ) FORMADAS POR LA FUSIÓN DE PEQUEÑAS VACUOLAS, POSIBLEMENTE DE ORIGEN ENDOCÍTICO. (1.500X). B) LA CABEZA DE FLECHA MUESTRA UNA VACUOLA CON CONTENIDO SIMILAR AL ESPACIO INTERCELULAR (ASTERISCO). LAS FLECHAS EN CRUZ MUESTRAN ALTERACIÓN DE LA FORMA MITOCONDRIAL Y LAS FLECHAS MUESTRAN VARIAS MITOCONDRIAS VACUOLADAS (5.000X).**

En este estudio, también se observaron varias mitocondrias en forma alargadas, que de acuerdo al corte en el tejido pueden aparentar contenido citoplasmático dentro de la mitocondria (FIG. 5). Sin embargo, los diferentes grados de vacuolización y edematización constituyen una respuesta de la mitocondria a la agresión [42].

La presencia de vacuolas fue abundante en embriones de desarrollo temprano y embriones de desarrollo tardío (FIGS. 2 y 4). Se han reportado vacuolas citoplasmáticas en células de primates [10], así como en embriones producidos *in vitro* e *in vivo* en la especie bovina [34]. Las vacuolas por lo general contienen componentes electrodensos producto del metabolismo (desechos resultantes de la autofagia o la ingestión de fragmentos de células embrionarias) que son indicadores del retrasado o anormal embrionario, lo que conllevaría a una disminución de preñez [10]. En estos estudios se observa-



**FIGURA 5. EMBRIONES TARDÍOS. MITOCONDRIA CON ALTERACIÓN DE LA FORMA (FLECHAS EN CRUZ) OBSERVADAS EN CORTE TRANSVERSAL, MOSTRANDO ESPACIOS SEMEJANTES A VACUOLAS (\*) CORRESPONDIENTES AL CITOPLASMA ADYACENTE. LA FLECHA SIMPLE MUESTRA UN CORTE LONGITUDINAL DE UNA MITOCONDRIA ELONGADA (10.000X).**

ron gran cantidad de vacuolas citoplasmáticas electrolúcidas, con diferente tamaño no asociadas a vacuolas lipídicas, hallazgo muy semejante al reportado en embriones sometidos a estrés calórico [32], y a las reportadas en los embriones en los periodos tempranos y tardíos procedentes de oocitos bovinos fecundados *in vitro* por espermatozoides separados por sexo [28].

Se han reportado vacuolas en cantidad y ultraestructura semejante a las del presente estudio pero asociadas a inclusiones lipídicas en estudios en embriones bovinos procedentes de fecundación *in vitro* [9]. Es interesante resaltar que el incremento de inclusiones lipídicas está relacionado con la presencia de suero en el medio de cultivo [3, 4], sin embargo, se presentan también en cultivos con fluido oviductal sintético modificado [9]. Este hallazgo no fue encontrado en este estudio, donde a pesar de que el medio fue SFB, no se apreció un significativo número de inclusiones lipídicas. Este tipo de inclusiones han sido encontradas en embriones, tanto bovinos [24,

30] como ovinos [13] producidos *in vivo* y disminuyen de número a medida que progresa el desarrollo embrional. En el presente estudio, los embriones fueron originados *in vitro*, lo que sugiere que la modalidad de fecundación (*in vivo* o *in vitro*) no es un factor para el desarrollo de estas vacuolas. Sin embargo, la función y origen de estas vacuolas en las células embrionarias no está del todo clara. Estas vacuolas pueden funcionar como almacenadoras de glicógeno en oocitos bovinos [14]. Alternativamente pueden ser el producto de fagocitosis de material extracelular o endocelular como ocurre en blastocitos bovinos [24] y de primates [11] producidos *in vivo*. Estas vacuolas pueden originarse, además como expresión de estadios tardíos de edematización mitocondrial. Independientemente de su origen, los hallazgos ultraestructurales sugieren la fusión de estas vacuolas para formar vacuolas con mayores dimensiones que ocupan grandes espacios de la célula (FIGS. 2 y 4). Consistentemente con este hallazgo, la fusión

de vacuolas en el citoplasma se ha reportado en embriones bovinos sometidos a impulsos eléctricos [29].

Según los resultados obtenidos en esta investigación, también fue posible la observación de estructuras intracelulares como el aparato de Golgi, núcleo, microvellosidades de la membrana celular y zona pelúcida, todas de apariencia normal y características de viabilidad celular. Al respecto, estudios ultraestructurales en mórulas de bovinos *in vitro* demuestran que la electrodensidad y características ultraestructurales difieren entre mórulas clasificadas como de excelente y buena calidad en comparación a mórulas clasificadas como de regular o baja calidad [2]. Además observaron que las mórulas de buena calidad presentaron un citoplasma claro y abundantes mitocondrias, microvellosidades en la membrana celular y aparato de Golgi normal; a diferencia de mórulas de baja calidad, caracterizadas por presentar un citoplasma oscuro y disminución de organelas en la célula [2].

Los embriones bovinos obtenidos *in vivo* se caracterizan ultraestructuralmente por presentar gran cantidad de microvellosidades orientadas hacia la zona pelúcida y distribución uniforme por toda la membrana celular; al respecto, la presencia de microvellosidades de los embriones estudiados en este estudio se encontró en condiciones óptimas.

En general, los resultados obtenidos en esta investigación ratifican que los embriones bovinos producidos *in vitro* deben ser evaluados al nivel ultraestructural por medio de MET para comprender mejor o explicar como el CIV afecta su calidad y por consiguiente su viabilidad.

## CONCLUSIONES

Se demuestra la presencia de alteraciones ultraestructurales representadas por vacuolización y edema mitocondrial y vacuolas citoplasmáticas.

El mayor grado de alteración mitocondrial fue encontrado en los embriones de desarrollo tardío, representado por edematización mitocondrial grado IV.

La alteración mitocondrial puede ser la responsable de la falta de progresión del embrión.

Las alteraciones ultraestructurales encontradas en las mitocondrias podrían estar asociadas a un funcionamiento inadecuado de esos organelos, lo cual podría afectar el proceso de producción de ATP.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced high performance serum- free media. **J. Reprod. Develop.** 49:193-202. 2003.
- [2] ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morule classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenol.** 57: 1273-1283. 2001.
- [3] ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. 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. Develop** 53:325-335. 1999.
- [4] CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced *in vivo* or *in vitro*. Department of Animal Science, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695-7621, ETATS-UNIS, (editor) Society for the Study of Reproduction, Madison, WI, **ETATS-UNIS.** 64 (5):1375-1385. 2001.
- [5] AGUILAR, M.; GALINA, C.; MERCHANT, H.; MONTIEL, F.; CANSECO, R.; MARQUEZ, Y. Comparison of Stereoscropy, Light Microscopy and Ultrastructural Methods for Evaluation of Bovine Embryos. **Reprod. Dom. Anim.** 37, 341-346. 2002.
- [6] BÁEZ, F.; HERNÁNDEZ, L.; VILLAMEDIANA, P. Estudio estructural del huso meiótico de ovocitos bovinos vitrificados. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVIII(3):253-268. 2004.
- [7] BÁEZ, F.J.; LANDINEZ, J.A.; HERNÁNDEZ, H.J.; VILLAMEDIANA, P.C. Capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos criopreservados obtenidos a partir de hembras mestizas. **Rev. Fac. Agron. LUZ.** 27:460-478. 2010.
- [8] CHÁVEZ, A. Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancias fenotípicas de las especies *Bos taurus* y *Bos indicus*. Universidad del Zulia. Departamento de Biología. Tesis de Grado. 49 pp. 2008.
- [9] CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced *In vivo* or *in vitro*. **Biol. Reprod.** 64: 1375-1385. 2001.
- [10] ENDERS, A.C.; HENDRICKS, A.G.; BINKERD, P.E. Adnormal development of blastocysts and blastomeres in the thesus monkey. **Biol. Reprod.** 26:353-366. 1990.
- [11] ENDERS, A.C.; SCHLAFKE, S. Differentiation of the blastocyst of the rhesus monkey. **Am. J. Anat.** 162:1-21. 1981.
- [12] FERREIRA, E.; VIREQUE, A.; ADONA, P.; MEIRELLES, F.; FERRIANI, R. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenol.** 71:836-848. 2009.
- [13] FERRER, F.; GARCIA, C.; VILLAR, J.; ARIAS, M. Ultrastructural study of the early development of the sheep embryo. **Anat. Histol. Embryol.** 24:191-196. 1995.

- [14] FLEMING, W.N.; SAACKE, R.G. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **J. Reprod. Fertil.** 29:203-213. 1972.
- [15] HALESTRAP, A.P.; MCSTAY, G.P.; CLARKE, S.J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochim.** 84:153-166. 2002.
- [16] HERNÁNDEZ-FONSECA, H. Fertilización *in vitro*. **Reproducción Bovina**. Carlos González Stagnaro (Ed). Fundación Girarz. Maracaibo - Venezuela. Pp. 413-425. 2001.
- [17] HERNANDEZ-FONSECA, J.P.; RINCON, J.; PEDRE-AÑEZ, A.; VIERA, N.; ARCAAYA, J.; CARRIZO, E.; MOSQUERA, M. Structural and Ultrastructural Analysis of Cerebral Cortex, Cerebellum, and Hypothalamus from Diabetic Rats. **Experim. Diabet. Res.** 2009:1-12. 2009.
- [18] ICHAS, F.; MAZAT, J.P. From calcium to cell death: two conformations of the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low to high-conductance state. **Biochim. Biophys. Acta.** 1366:33-50. 1998.
- [19] KABAYASHI, K.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on *in vitro* maturation of cumulus enclosed-cell bovine oocyte in a defined medium. **J. Reprod. Fertil.** 100: 439-446. 1994.
- [20] KUZMINA, T.J.; ALM, H.; DENISENKO, V.; TUCHSCHERER, A.; KANITZ, W.; TORNER, H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence *in vitro*. **J. Reprod. Develop.** 53:309-316. 2007.
- [21] LEMASTERS, J.J. The mitochondrial permeability transition and the calcium, oxygen and pH paradoxes: one paradox after another. **Cardiovasc. Res.** 44:470-473. 1999.
- [22] LAROCCA, C.; FILA, D.; KMAID, S.; FERNÁNDEZ, A.; LAGO, I.; ROSES, G. Viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro* congelados-descongelados en dos medios de cultivo con  $\beta$ -mercaptoetanol. Laboratorio de Trasplante de Embriones y Biotecnología. Facultad de Veterinaria. **Arch. Zoot.** 47:3-10. 1998.
- [23] LI, H.S.; ZHANG, J.Y.; THOMPSON, B.S.; DENG, X.Y.; FORD, M.E.; WOOD, P.G.; STOLZ, D.B.; EAGON, P.K.; WHITCOMB, D.C. Rat mitochondrial ATP synthase ATP5G3: cloning and upregulation in pancreas after chronic ethanol feeding. **Physiol. Genom.** 6:91-98. 2001.
- [24] LINARES, T.; PLOEN, L. On the ultrastructure of seven day old normal (blastocysts) and abnormal bovine embryos. **Zentralbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.** 10:212-226. 1981.
- [25] LÓPEZ, A.; OLIVERA, A.; TARAZONA, A. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. **Revista MVZ Córdoba**, 12(2):1061-1067. 2007.
- [26] OOIE, T.; TAKAHASHI, N.; SAIKAWA, T.; NAWATA, T.; ARIKAWA, M.; YAMANAKA, K.; HARA, M.; SHIMADA, T.; SAKATA, T. Single dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/ reperfusion injury in rat heart. **Circulat.** 104:1837-1843. 2001.
- [27] PALMA, G. Evaluación morfológica de los embriones bovinos. **Biotecnología de la Reproducción**. Ediciones INTA. Pp 125-131. 2001.
- [28] PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMULLER, C.H.; SINOWATZ, F. Effects of Sex-sorted Spermatozoa on the Efficiency of *in vitro* Fertilization and Ultrastructure of *in vitro* Produced Bovine Blastocysts. **Anat. Histol. Embryol.** 37:67-73. 2008.
- [29] PIVKO, J.; LANDA, V.; KUBOVIĚOVÁ, E.; KUPOVÁ, A.; GRAFENAU, P.; MAKAREVICH, A.V.; ZIBRÍN, M. Ultrastructural Morphometry of Precompacted Bovine Embryos Produced *in vivo* and *in vitro* After Activation by Electric Pulse AC/DC. **Gen. Physiol. Biophys.** 23:101-112. 2004.
- [30] PLANTE, L.; KING, W.A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. **J. Assist. Reprod. Genet.** 11:515-529. 1994.
- [31] RIVERA, R.M.; AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Short communication: Seasonal effects on development of bovine embryos produced by *in vitro* fertilization in a hot environment. **J. Dairy Sci.** 83:305-307. 2000.
- [32] RIVERA, R.M.; KELLEY, K.L.; ERDOS, G.W.; HANSEN, P.J. Alterations in Ultrastructural Morphology of Two-Cell Bovine Embryos Produced *in vitro* and *in vivo* Following a Physiologically Relevant Heat Shock. **Biol. Reprod.** 69:2068-2077. 2003.
- [33] RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Developmental, Qualitative, and Ultrastructural Differences Between Ovine and Bovine Embryos Produced *In vivo* or *in vitro*. **Mol. Reprod. Develop.** 62:320-327. 2002.
- [34] SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional coculture with oviduct epithelial cells. **J. Vet. Med.** 41:307-316. 1994.
- [35] SIRARD, M.C.; BLONDIN, P. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenol.** 65:126-136. 1996.

- [36] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide. V.8.2. 2001.
- [37] SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta.** 1366:151-165. 1998.
- [38] TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in Vitro. **Reprod. Dom. Anim.** 41:5-11. 2006.
- [39] URDANETA, A. Utilización de compuestos tiol en la producción *in vitro* de embriones a partir de ovocitos de cabras prepuberes. Universidad autónoma de Barcelona. Facultad de veterinaria. Tesis Doctoral. Pp 6-15. 2005.
- [40] WILLIS, W.T.; JACKMAN, M.R.; BIZEAU, M.E.; PAGLIASSOTTI, M.J.; HAZEL, J.R. Hyperthermia impairs liver mitochondrial function *in vitro*. **Am J Physiol** 278:R1240-R1246. 2000.
- [41] EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer. Res.** 57:1835-1840. 1997.
- [42] FINOL, H.J.; MONDRAGON, D.D.; GONZALEZ, Y.M.; MARQUEZ, A.; GONZALEZ, N.; PARADISI, C. Hepatocyte ultrastructural alterations in cocaine users. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 32:111-116. 2000.
- [43] HANSEN, P.J.; ARECHIGA, C.F. Strategies for managing the heat-stressed Dairy cow. **J. Anim. Sc.** 77:36-50. 1997.
- [44] HANSEN, P.J.; DROST, M.; RIVERA, R.; PAULALOPES, F.F.; AL-KATANANI, Y.M.; KRININGER, C.E.; CHASE, C.C. Adverse impact of the heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenol.** 55:91-103. 2001.