

Radicales libres y desarrollo embrionario

Omar Camargo R. MVZ, MSc.¹, José L. Ramírez C. MD, MSc.²
y Martha Olivera Angel. MV, Dr. Sci. Agr.¹

¹Grupo BIOGENESIS- Biotecnología y ² Genética Médica,
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia.

(Recibido: 3 Mayo, 98; aceptado: 5 Abril, 99)

Resumen

*El estudio de la biología del desarrollo en mamíferos y la aplicación práctica del conocimiento obtenido a través de la fertilización **in vitro** y la transferencia de embriones, han tenido como obstáculo importante la alteración del desarrollo embrionario observado con frecuencia durante su cultivo y del cual la producción incontrolada de especies reactivas de oxígeno -EROs- (estrés oxidativo) parece ser una de las causas. Aunque la identificación inequívoca de las fuentes de EROs es difícil, se reconoce que la composición de gas atmosférico así como el metabolismo embrionario juegan un papel importante. La evidencia se basa en el incremento de las tasas de desarrollo en presencia de varios limpiadores (scavengers) de radicales libres o reducidas concentraciones de oxígeno en el medio de cultivo. Tales resultados sugerirían que el ambiente **in vivo** cuenta con mecanismos para destruir o limpiar radicales libres, o que la EROs no se generan allí debido a la limitada disponibilidad de oxígeno. Los efectos de los EROs **in vitro** podrían ser controlados si identificamos sus fuentes y mecanismos de acción.*

Introducción

En 1894, Wilhelm Roux inicia la publicación Archivos para los mecanismos del desarrollo y anuncia un nuevo programa para la investigación en embriología basado en la experimentación. Roux, exhorta a los jóvenes biólogos a realizar experimentación relacionada con los procesos de desarrollo a fin de descubrir las leyes que rigen la diferenciación y la organización de las células, tejidos y órganos (1)

Hoy, un siglo más tarde, la biología del desarrollo está en la mitad de otra gran revolución por los notables avances en áreas como la fertilización *in-vitro*, la clonación, los transgénicos y la terapia génica. El rápido progreso de la genética en los últimos 20 años es el resultado del desarrollo de nuevos métodos para análisis y manipulación del genoma. Estos avances técnicos, han tenido gran importancia, no solamente sobre

la genética en sí, sino también en diferentes áreas de la biología pura y aplicada. Sin embargo, muchos de tales avances, particularmente en la genética de mamíferos, dependen de la habilidad para manipular los eventos iniciales de la embriogénesis. Los progresos recientes en campos tales como la transferencia de genes y la clonación no serían posibles sin el desarrollo paralelo de la embriología (2). La utilización de ratones de laboratorio en experimentación muestra grandes ventajas y permite conocer mejor su desarrollo embrionario, además de constituir los primeros mamíferos cuyos embriones es posible cultivar *in-vitro* en forma exitosa. Muchos sistemas de cultivo que actualmente se utilizan para embriones bovinos por ejemplo, son modificaciones de protocolos diseñados originalmente para embriones murinos (3). Por esta razón algunos procedimientos experimentales son difíciles de reproducir en especies diferentes al ratón. Debe tenerse en cuenta que los embriones de mamíferos

euterianos son similares en muchos aspectos, pero existen diferencias significativas en los algunos detalles de su desarrollo embrionario (4).

No obstante haber superado aspectos tan críticos como mantener una correcta osmolaridad, el balance iónico y una adecuada fuente de energía entre otros, aun se siguen presentando dificultades en la selección del medio de cultivo óptimo, lo cual impide que se genere el material biológico que requiere la ciencia y la industria animal en este caso (5).

Actualmente, el principal problema que se observa durante la producción *in-vitro* de embriones, es el bloqueo de su desarrollo, el cual se refiere a una detención o retardo del mismo. Estos tienden a detenerse en una etapa determinada para cada una de las especies hasta ahora examinadas, la cual corresponde al momento en el que el control sobre el desarrollo embrionario pasa de un control exclusivamente materno a un control embrionario (transición materno-embriónal). Este momento coincide también con el comienzo del metabolismo de la glucosa (4-6).

Un problema subyacente que dificulta el estudio de las causas que inducen a la alteración del desarrollo embrionario *in vitro* consiste, con muy pocas excepciones, en que dicho estudio ha sido realizado bajo una amplia variedad de condiciones. Adicionalmente, aunque la importancia de la relación entre la composición del medio de cultivo y el desarrollo embrionario es bien conocida, esta no está bien caracterizada. De ahí que componentes conocidos y no conocidos de los medios de cultivo como la presencia de metales, su pH y la tensión de oxígeno atmosférico (factores exógenos), así como la activación del genoma embrionario, el comienzo del metabolismo de la glucosa, la disminución de la fosforilación oxidativa, la alteración de la distribución y estructura mitocondrial e incluso la luz visible (factores endógenos) sean algunos de los factores que se han asociado, de acuerdo a como haya sido conducido el experimento, con la frecuente alteración del desarrollo embrionario registrada *in vitro* (7-9).

En la presente revisión examinaremos el papel que los radicales libres de oxígeno -EROs- pueden estar jugando en el retardo o la detención del desarrollo embrionario *in vitro* y su posible relación con los factores mencionados, haciendo especial referencia a la especie bovina. Se aludirán con frecuencia la especie murina, por representar el modelo básico de referen-

cia, y otras especies, incluida la humana, solo cuando sea necesario.

Especies reactivas de oxígeno, radicales libres y estrés oxidativo

Es bien sabido que los electrones se disponen alrededor de los núcleos de los átomos en capas perfectamente definidas que se denominan orbitales. Cada orbital tiene un máximo de dos electrones, que se hallan apareados, es decir, tienen espines opuestos. La mayoría de las sustancias presentes en el organismo contienen solo electrones apareados y suelen ser, por tanto, químicamente estables. Los radicales son especies químicas -moléculas o átomos- que contienen electrones no apareados en su orbital más externo y pueden tener carga o no. Estos electrones desapareados confieren al radical una enorme reactividad química, que le conducirá a actuar rápidamente con otras moléculas con las que entre en contacto (10).

El ejemplo más sencillo de esta interacción nos lo proporciona el hidrógeno. Sus átomos sólo contienen un electrón que, por tanto, está no apareado. Cuando se encuentran dos átomos de hidrógeno se unen rápidamente para formar hidrógeno molecular. Ambos átomos comparten sus electrones y establecen así un enlace covalente, que proporciona a la molécula gran estabilidad. Ello explica que la vida media de los radicales libres en solución sea tan corta (10-12).

Sin embargo, los radicales no siempre acaban interactuando con otros radicales, también pueden hacerlo con una especie química estable. El radical puede en este caso cederle su electrón no apareado (radical reductor), tomar uno de la molécula estable para aparear su electrón (radical oxidante), o bien, unirse a esta molécula estable. En cualquiera de los tres casos la situación resultante es la generación de otro radical químicamente agresivo. Muchos radicales libres presentes en el organismo se comportan pues como el rey Midas, ya que convierten en radicales -en vez de oro- todo lo que tocan (11).

En la literatura científica, un grupo de términos relacionados son usados para referirse a los radicales libres. Estos incluyen oxiradicales, radicales libres de oxígeno y varias combinaciones y permutaciones de esta palabras. Actualmente se prefiere el término "especies reactivas de oxígeno" (EROs), debido a que el oxígeno simple, el peróxido de hidrógeno, el peróxido y el ácido hipocloroso, el hidroperóxido y los metabolitos

de epóxido, cuentan con grupos funcionales que contienen oxígeno químicamente activo, pero no son radicales y no necesariamente interactúan con los tejidos a través de reacciones radicales. Además, debe ser recordado que el radical superóxido es una especie más reductora que oxidante. Por lo tanto, referirse a las EROs como agentes oxidantes es erróneo (11-13).

Los radicales que tienen mayor importancia en patología humana y animal son aquellos derivados de la molécula de oxígeno. No obstante ser parte de procesos fisiológicos normales como el envejecimiento, la inflamación y las defensas antibacterianas, estos también hacen parte de la etiología de un amplísimo listado de síndromes y enfermedades (10-11).

Una vez un radical libre interactúa con un tejido, muchos cambios pueden ocurrir. Dichos cambios pueden ser definidos en términos de daño u otras respuestas más generales. El término "estrés oxidativo", fue creado para denotar una alteración en el balance prooxidante/antioxidante a favor del primero. Esta definición no dice nada acerca del efecto dañino de tales cambios sobre la función de un tejido, ni indica si esta alteración resulta de un incremento en la producción de EROs o una reducción de las respuestas homeostática del tejido. Otros investigadores han definido el estrés oxidativo como un incremento en la producción de EROs y han aceptado implícitamente este término como sinónimo de daño. El daño causado por el estrés oxidativo es la consecuencia lógica de una alteración en el estado redox de una célula a causa de la acción del oxígeno reactivo u otra especie de radical libre. Sin embargo, los cambios tisulares que abarcan la definición "estrés oxidativo", también pueden originarse por falla en las defensas antioxidantes o en los sistemas de reparación normalmente utilizados por las células. Lo anterior, ha conducido a que se definiera el estrés oxidativo como "alteración prooxidante-antioxidante a favor del primero, conduciendo a daño potencial" (13).

De otra parte, se sabe que dependiendo del sistema celular bajo estudio, variará el blanco primario del excesivo estrés oxidativo. El ADN se convierte en un blanco inmediato por parte de las EROs cuando el H_2O_2 es adicionado a células mamíferas. El daño excesivo del ADN está asociado con un agotamiento de ATP y NAD^+ , una reducción en la proporción GSH/GSSH y un incremento en los iones de calcio libre intracelular $[Ca^{++}]_i$ (10).

Radicales libres más comunes

La prevalencia del oxígeno en los sistemas biológicos significa que los radicales basadas en oxígeno son los más comunes. No obstante, las moléculas orgánicas contienen otros átomos que pueden existir como radicales libres y éstas también pueden jugar un papel en el daño tisular. Los radicales "thil" están basados en sulfuro y pueden ser formadas a partir de compuestos thiol endógenos como el glutatión o como consecuencia del clivaje homolítico de los puentes disulfuro de las proteínas. Estos radicales son totalmente reactivos y pueden combinarse con el oxígeno para producir radicales adicionales. Otros radicales encontrados en los sistemas biológicos incluyen los basados en carbono, los cuales pueden originarse después de la abstracción de hidrógenos presentes en puentes insaturados de ácidos grasos durante la peroxidación lipídica o el metabolismo de xenobióticos tales como el tetracloruro de carbono. Radicales basados en nitrógeno y fósforo también han sido descritos (10-11).

Entre los radicales derivados del oxígeno, los más importantes son: el radical superóxido (O_2^-) el cual es altamente reactivo en ambientes hidrofóbicos, pero pobremente reactivo en soluciones acuosas. No obstante un sistema acuoso generador de O_2^- *in vitro* puede hacer considerable daño a las estructuras biológicas, por sí mismo el O_2^- puede atacar pocas moléculas. Por ejemplo, O_2^- puede inactivar la glutatión peroxidasa y parcialmente la catalasa. Su reactividad química directa no puede explicar los efectos tóxicos producidos por la mayoría de los sistemas acuosos generadores de O_2^- *in vitro* (14).

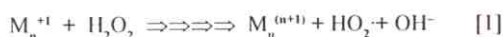
El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aunque no contiene electrones desapareados y por lo tanto no puede ser considerado como un radical libre, químicamente se comporta como oxidante. Es producido *in vivo* y aunque es también pobremente reactivo en solución acuosa a concentraciones fisiológicas, puede atravesar las membranas biológicas, siendo identificado como un "agente citotóxico" sobre la base que la superóxido dismutasa (SOD) no protege el tejido, mientras la catalasa sí lo hace (14).

Pero si las reacciones químicas directas de O_2^- no causan la mayoría de los daños hechos por sistemas acuosos de generación de O_2^- , entonces, quién lo hace? El oxígeno simple es un candidato improbable debido a que no hay evidencia de su producción en cantidad

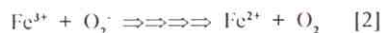
por parte de sistemas enzimáticos generadores de O_2^- . La forma protonada del O_2^- , el HO_2^- , es una posibilidad. A pH 7.4, solamente alrededor del 0.25% del O_2^- generado existirá como HO_2^- , pero en estrecha proximidad a las membranas el pH puede ser considerablemente más bajo. Aun no hay pruebas de que el HO_2^- juegue un papel citotóxico en un sistema dado, pero su potencial importancia está relacionada no solamente con su elevada reactividad, sino también con su decrecida polaridad, lo cual lo capacita para atravesar membranas biológicas de una manera tan efectiva como la hace el H_2O_2 . La atribución del daño al radical HO_2^- no explica sin embargo el efecto protector mostrado por la catalasa en muchos sistemas generadores de O_2^- (10,14).

Esto deja al radical hidroxilo ($\cdot OH$) o cualquier especie oxidante altamente relacionada con él, producida mediante un reacción Fenton, como los principales candidatos causantes del daño celular.

Mientras la reactividad química del $\cdot OH$ usualmente ha sido estudiada en sistemas libres de radiación, se cree que la mayoría de los radicales $\cdot OH$ generados *in vivo*, proviene de una reducción de H_2O_2 dependiente de metales, excepto durante la exposición anormal a radiación ionizante.



In vitro, puede ser el M_n^{+1} , Ti (III), Cu (I), Fe (II) o Co (II), pero los mejores candidatos para promover la formación de radicales $\cdot OH$ *in vivo* parecen ser el hierro y a menor escala el cobre. La formulación clásica de la reacción Haber-Weiss es:



⊕ Catalisis por Fe

En esta reacción [4], el propósito de los radicales superóxido (O_2^-), es simplemente mantener el metal de transición, normalmente el hierro, en estado reducido (Fe^{2+}). Si los iones ferrosos o un agente reductor alternativo, como el ascorbato, están disponibles, entonces el radical $\cdot OH$ puede ser generado directamente a partir de H_2O_2 , como en la reacción [1] (10,14,15).

El $\cdot OH$ es el radical de vida media más corta y también el más reactivo que la química conoce, en cuanto entra en contacto con otra molécula vecina, lo que suele ocurrir en menos de un microsegundo, reacciona con ella y la altera. Por ejemplo, el radical $\cdot OH$ puede captar electrones de moléculas llamadas tioles, que contienen grupos SH, por lo que puede interactuar con las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) de las delicadas hebras de los ácidos nucleicos (ARN y ADN) y alterar la información genética de las células o bien estimular la denominada peroxidación lipídica, en la que el $\cdot OH$ ataca a los ácidos grasos -especialmente los polinsaturados- de las cadenas laterales de los fosfolípidos de las membranas, convirtiéndolos a su vez en oxidantes. Un solo radical $\cdot OH$, en una reacción en cadena muy difícil de contener, puede transformar cientos de moléculas de ácidos grasos en hidroperóxidos, que al descomponerse producen también otras especies tóxicas como los temibles aldehídos, auténticos venenos para las membranas celulares (11, 16, 17).

En resumen, la importancia de mantener los metales fuera del alcance de los oxidantes radicales en que el H_2O_2 y el O_2^- en presencia de un metal conducen a la modificación de bases dependiente de $\cdot OH$, al rompimiento de las cadenas de ADN, a la peroxidación de las membranas y al daño de proteínas y enzimas.

Origen de las EROs en embriones producidos in vitro

Se ha podido observar que con el uso de inhibidores de ciclo celular o inhibidores de la activación génica, no se evita la generación de EROs, lo cual significa que el aumento es independiente de estos dos eventos. El incremento en la generación de radicales libres requiere de la activación del oocito, ya sea por fertilización o por estímulo partenogénico, puesto que esto no se observa en oocitos que simplemente se dejan envejecer *in vitro*. Estos resultados sugieren que durante, o poco después de la fertilización, se activa un mecanismo periódico independientemente del ciclo nuclear, quizás involucrando una cascada de reacciones metabólicas, las cuales a través de interacciones con las condiciones ambientales externas promueven la generación de EROs (18).

Los embriones murinos cultivados *in vitro* muestran un incremento en los niveles de radicales peróxido y superóxido en la etapa de 2 blastómeras, restringido al período G2/M del ciclo celular, etapa del desarrollo

donde la detención espontánea del desarrollo ocurre *in-vitro* (19). Aunque la concentración de H_2O_2 es mayor en embriones desarrollados *in vitro* que los desarrollados *in vivo*, no se registran diferencias entre los embriones producidos *in vitro* que se alteran en su patrón de desarrollo y los que no lo hacen (20).

Por su parte, mientras que Crosby y colaboradores (21), afirman que los embriones de las especies bovina y ovina son particularmente susceptibles al daño oxidativo en el estadio de 8 blastómeras, cuando el genoma embrionario comienza a transcribir, Van Langendonck halló que los embriones bovinos entre 9 y 16 células son más resistentes a un estrés oxidativo causado por H_2O_2 que los cigotos tempranos o los blastocistos (22).

Oxígeno

Es aceptado que la composición de gas atmosférico juega un importante papel en la regulación del desarrollo embrionario temprano *in vitro* (5,21,23). También, se ha sugerido que la hipoxia además de intervenir de manera importante en la regulación metabólica también, lo estaría haciendo sobre otras actividades celulares tales como la regulación de la transcripción de los ARNm de factores de crecimiento (24) y apoptosis (25). Se ha demostrado que bajo condiciones hipóxicas (<10% O_2) los embriones en estado preimplantatorio cultivados *in vitro* se desarrollan mejor que aquellos expuestos al oxígeno atmosférico (20%) (9,26-28), lo cual podría ser una condición relativamente tóxica comparada con el 8% de oxígeno en la luz de los órganos reproductivos femeninos (26). Las alteraciones en el desarrollo embrionario pueden ser significativamente reducidas si un limpiador de radicales libres (superóxido dismutasa -SOD-, glutatión, catalasa, etc.) o un antioxidante (vitamina E, α -tocoferol, etc.), es adicionado al medio de cultivo (6,23,26,29-32). Aunque en murinos se ha demostrado que combinando bajas concentraciones de oxígeno con un limpiador de radicales libres (SOD o tioredoxina) se obtienen efectos protectores aditivos (26), esto no sucedió en modelos bovinos utilizando SOD (31).

En relación con la influencia que el co-cultivo con células somáticas ejerce sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*, se acepta, en general, que el cocultivo no promueve el desarrollo- o incluso lo afectan, cuando la concentración de oxígeno es baja (5%), contrario a lo que sucede cuando se cultiva bajo condiciones de oxígeno atmosférico (20%),

presumiblemente debido a que las células somáticas no se mantienen viables bajo ambientes hipóxicos. Nagao y colaboradores (32), encontraron que la presión de oxígeno en un medio cultivado con células epiteliales del oviducto bovino (CEOB) bajo tensión atmosférica de oxígeno, fue menor que las que se cultivaron sin dichas células. Se sugiere entonces que el efecto benéfico sobre el desarrollo embrionario ejercido por el co-cultivo se debe a que las células somáticas reducen la concentración de oxígeno en el medio.

Metabolismo

Como en la mayoría de las especies mamíferas, la utilización de los carbohidratos generalmente incrementa con el desarrollo. En embriones bovinos la toma y el metabolismo de la glucosa aumenta desde el estado de 2 células hasta el estado de blastocisto de una manera no lineal, es decir en pasos, con un primer marcado incremento cerca del tiempo de la activación del genoma embrionario lo cual refleja los requerimientos de muchos procesos sintéticos consumidores de energía, entre ellos, la síntesis de glicoproteínas. El segundo y más importante aumento se registra con el comienzo de la compactación debido a la alta demanda de energía requerida por la $ATPase Na^+, K^+$ para la formación de la cavidad del blastocelo (33).

La suplementación con D-glucosa de los medios de cultivo de embriones bovinos los primeros 3 a 4 días de cultivo, no solo no promueve el desarrollo sino que lo inhibe. Después de este tiempo la suplementación con glucosa promueve el desarrollo (6,7,33-35). La glucosa absorbida por el embrión en cultivo es casi totalmente convertida a lactato. Sin embargo, esta ineficiencia en la oxidación de la glucosa -vía ciclo de Krebs- puede ser un artefacto inducido por las altas tensiones de oxígeno (7).

De otro lado, mientras que para algunos autores la presencia de adecuadas concentraciones de fosfato (0.35mM) en medios de cultivo químicamente definidos, libres de proteína y de glucosa son necesarias para el desarrollo de embriones bovinos hasta el estado de morula/blastocisto (34), para otros tiene ningún efecto y para un tercer grupo es perjudicial (36); en lo que sí hay consenso es en que la glucosa junto con el fosfato inhiben el desarrollo embrionario bovino hasta el estado de blastocisto (*ver figura 2*) (6,7,33-35), al igual que como se registra en el hamster (37).

Via Embden-Meyerhof: La energía derivada de la glucosa se origina de la glicólisis anaerobia ya que la

fosforilación oxidativa decrece en los embriones bovinos una vez comienza la compactación. Durante el desarrollo, especialmente antes de la compactación, los embriones bovinos son dependientes de la fosforilación oxidativa para la generación de ATP. Esto puede ser deducido por los datos del grado de piruvato y glutatión utilizado así como del oxígeno consumido. Estas evidencias sugieren que el desarrollo bien podría ser influenciado por un cambio en la concentración de oxígeno, con un estado de post-compactación requiriendo quizá menos oxígeno que el estado de post-compactación (7,33,35). Una evidencia que apuntaría a respaldar dicha hipótesis la proporcionaron Pinyopummintr y Bavister (38) después de un estudio sobre el microambiente atmosférico óptimo para la maduración y la fertilización in vitro de oocitos bovinos, en donde concluyeron que una concentración de oxígeno baja (5%) es perjudicial para estos dos eventos y que las condiciones atmosféricas óptimas para tales efectos son de 2.5% ó 5.0% de CO₂ y 20% de oxígeno. No obstante, van der Westerlaken y su grupo (39), encontraron que una baja tensión de oxígeno (5%) durante la maduración o la fertilización no tiene un

efecto significativo sobre las tasas de fertilización pero sí mejora las tasas de clivaje y contrariamente a lo que reportan los primeros autores, una baja tensión de oxígeno durante el desarrollo –cocultivo con CEOB– reduce significativamente las tasas de clivaje y desarrollo.

La elevada producción de lactato por esta vía ha sido considerada por algunos autores como un síntoma de descompensación del metabolismo embrionario causadas por las inapropiadas condiciones de cultivo. Se desconoce si el lactato al igual que el amonio derivado del metabolismo de la glutamina y otros aminoácidos, son desechos orgánicos o tienen alguna función regulatoria, como la regulación de pH (7).

Vía pentosa fosfato: El metabolismo de la glucosa durante el período pre-implantación también se relaciona con la vía pentosa-fosfato (33) la cual juega un papel clave en la síntesis de nucleótidos (a través de la ribosa 5-fosfato) y el suministro de equivalentes reductores para la síntesis de lípidos y otras macromoléculas como el (NADPH) (ver figura 1).

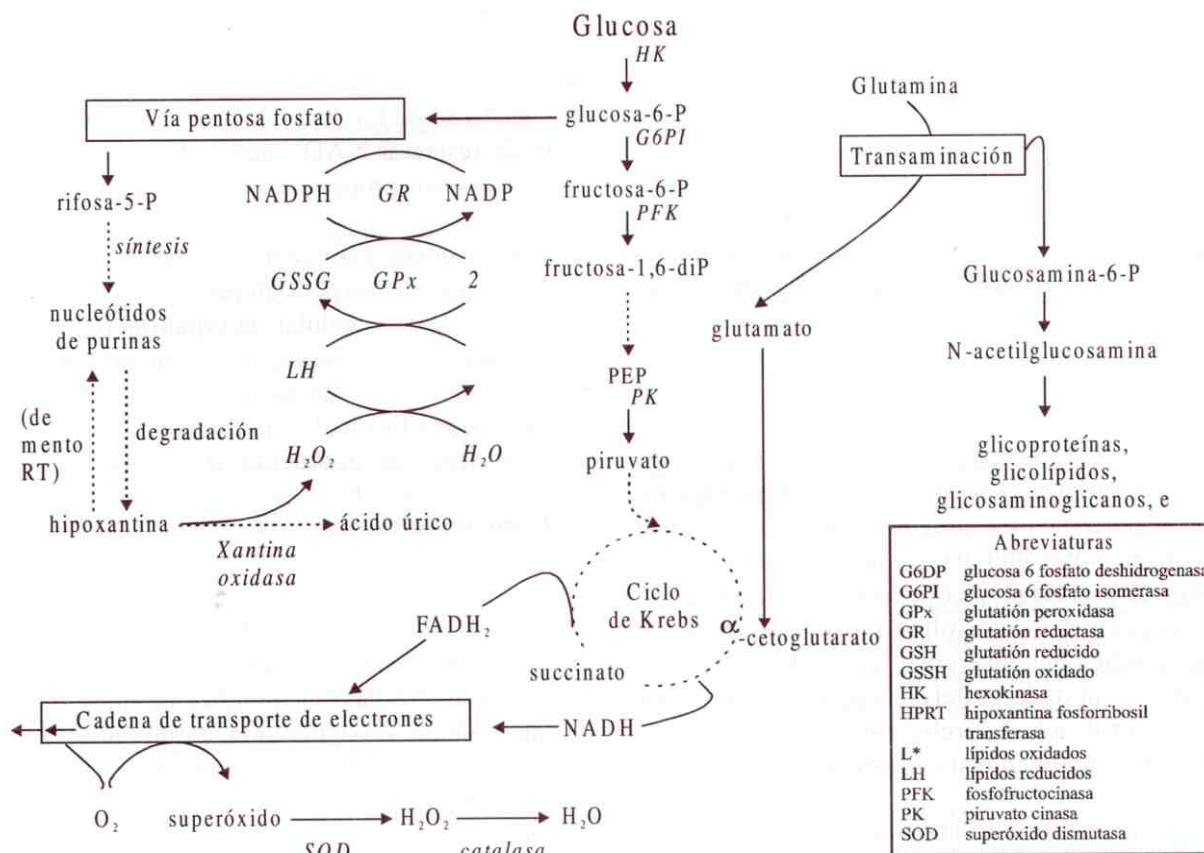


Figura 1 Esquema simplificado sobre algunos aspectos del metabolismo energético

Debido a que se ha encontrado que las mitocondrias de los embriones bovinos producidos *in vitro*, así como de otras especies, son diferentes en estructura y distribución a aquellas observadas en los embriones producidos *in vivo* (48) se genera la duda de si el cambio en la preferencia de piruvato (oxidado a través del ciclo de Krebs) a glucosa (convertida a lactato) antes de la compactación, ocurre también *in vivo* o es un artificio de los medios de cultivo (7).

Durante el desarrollo normal de embriones de hamster, mitocondrias activas se agrupan en la región perinuclear del embrión, mientras que bajo condiciones que inducen al bloqueo del desarrollo, p.e. presencia de glucosa y fosfato, esta localización es alterada en un patrón más disperso. Estos datos preliminares generan la intrigante posibilidad de que la función mitocondrial, p.e. producción de energía por la respiración/fosforilación oxidativa, sea perturbada cuando los embriones son cultivados bajo condiciones subóptimas (7,48).

El estrés oxidativo puede dañar las enzimas que normalmente mantienen el calcio intracelular $-[Ca^{2+}]_i$ – bajo como por ejemplo los sistemas de extrusión de Ca^{2+} propios de la membrana plasmática y las bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP del retículo endoplásmico, probablemente por oxidación de los grupos SH esenciales de las proteínas. Son varios los oxidantes que provocan la liberación de Ca^{2+} a partir de la mitocondria. Los aumentos en el $[Ca^{2+}]_i$ pueden conducir a un aumento en la disponibilidad de los iones metálicos de transición debido a que la digestión de las metaloproteínas por parte de las proteasas estimuladas por Ca^{++} , conllevando al ciclo más $[Ca^{2+}]_i$, mas ERO's, mas daño (10).

Finalmente y con respecto a la discutida participación mitocondrial en el desarrollo embrionario temprano se han generado otras preguntas, entre ellas: 1) si el metabolismo mitocondrial no es importante para el suministro de energía para el período pre-implantación entonces por qué el desarrollo es severamente afectado bajo condiciones anaerobias?, 2) si el desarrollo es detenido por inhibidores del ciclo de Krebs y si la glucosa no entra al ciclo de Krebs, entonces qué substrato está entrando realmente al ciclo de Krebs? (7).

En resumen, los embriones producidos *in vitro*, presentan una glicólisis incrementada, actividad mitocondrial disminuida, potencial redox alterado y una

incrementada producción de lactato la cual conduce a una dismunución de pH debido a que el lactato es un efectivo donador de protones.

La hipótesis

Entre las hipótesis propuestas en relación con el origen y los efectos de los radicales libres sobre el desarrollo embrionario, la más consistente, de acuerdo con la información disponible la plantean Barnett y Bavister (7) de la siguiente manera: las condiciones de cultivo afectan directamente la mitocondria (por daño estructural o alteración funcional) por movilización de Ca^{2+} y/o por la producción de EROs, lo cual conlleva a una alteración en la producción de ATP. Los efectos adversos de la elevación de Ca^{2+} pueden ser exacerbados por la presencia de fosfatos inorgánicos, daños en membrana mitocondrial o desacople de la fosforilación oxidativa. Los EROs pueden dañar la membrana mitocondrial. Aquí sería importante enfatizar que una vez se inicia el daño por EROs, este mismo puede ser autocatalítico, por ejemplo alterando las membranas mitocondriales y así exacerbando el problema por generación de nuevas fuentes de EROs. Cualquiera que sea la causa del daño, la responsabilidad por la producción de energía es delegada al metabolismo citosólico (a la glicólisis). Los mecanismos productores de equivalentes reductores (NADH) en la mitocondria, son inactivados. La producción de lactato incrementa a fin de restaurar NAD^+ , pero esto deprime el pH, afectando otros procesos celulares (ver figura 2).

Sin considerar los eventos iniciales, las alteraciones del metabolismo podrían perturbar drásticamente el control del ciclo celular, la organización celular y citoesquelética, las propiedades de membrana o la liberación de Ca^{2+} . Esto se refleja en las diferencias morfológicas y fisiológicas entre los embriones producidos *in vitro* y los producidos *in vivo* (49).

Conclusiones

Las investigaciones adelantadas en relación con el efecto de los radicales libres de oxígeno sobre el desarrollo de embriones producidos *in vitro*, además de haber sido realizadas bajo condiciones muy variadas, se han limitado, en su mayoría, a estudiar los efectos benéficos que podrían tener algunas sustancias antioxidantes.

Hoy no podemos concluir más allá de lo concluido una década atrás: los factores ambientales,

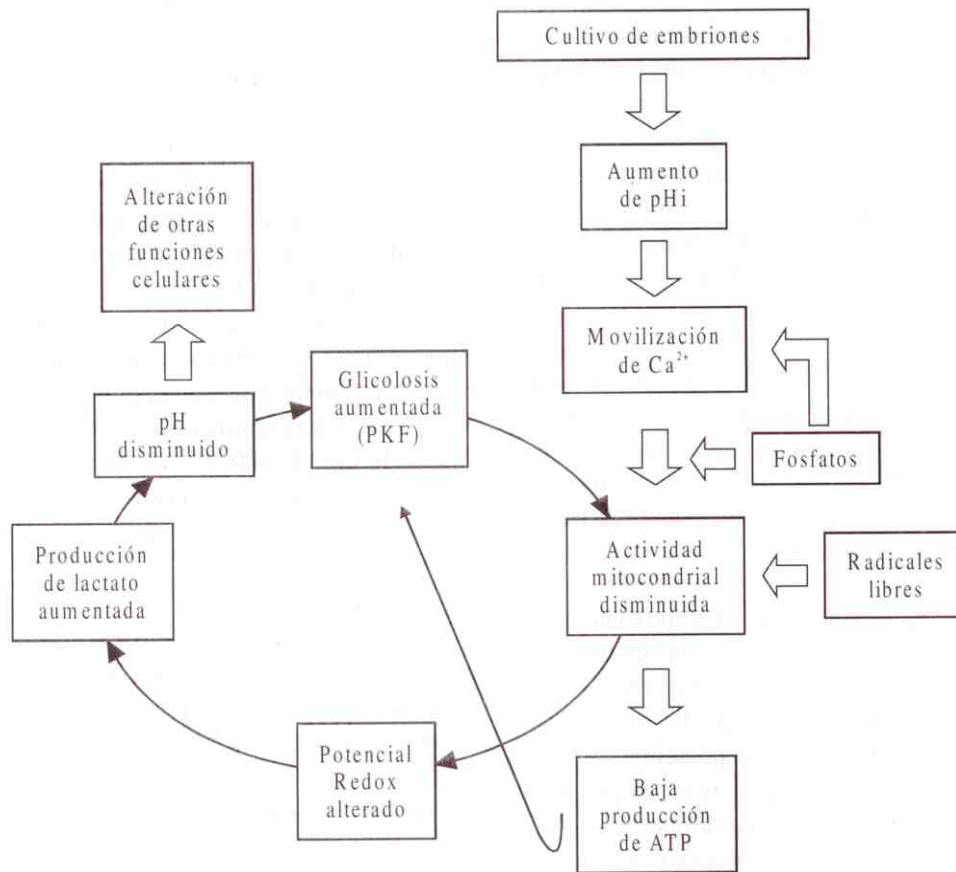


Figura 2. Modelo de la hipótesis que explica cómo las condiciones de cultivo pueden inducir un metabolismo anormal en embriones en estado preimplantación.

principalmente la tensión de oxígeno atmosférico y la luz visible, al igual que los componentes conocidos y no conocidos de los medios de cultivo, condicionantes directos del metabolismo, afectan el desarrollo embrionario de una manera aún no caracterizada. No obstante el lento avance, la confusión, la disparidad e incluso la contradicción de resultados en las investigaciones, se han generado nuevos conceptos y han aparecido nuevos protagonistas que paradójicamente hacen más complejo lo que esperaba aclararse.

El papel mitocondrial en la generación de ERO's además de la redistribución de estas organelas observada únicamente en embriones producidos *in vitro*, también se ha sugerido una correlación entre la liberación de Ca^{2+} mitocondrial y el incremento en la disponibilidad de iones metálicos catalíticamente activos, proceso mediado a través del aumento del $[Ca^{2+}]_i$.

La depresión del pHi, mediada por la sobreproducción de lactato como consecuencia del aumento en la

actividad glicolítica y la depresión de la oxidativa (mitocondrial), lo cual estaría generando el ambiente propicio para la generación de ERO's.

La aleatoriedad y relatividad del daño biológico efectuado por los radicales O_2^- o H_2O_2 , mediado por la formación de $\cdot OH$, toda vez que este dependería de la localización del complejo metálico catalítico en la reacción (la molécula a la cual estén unidos).

La compartimentalización del oocito que va más allá de la conocida dualidad núcleo citoplasma y las propiedades bioquímicas de estos compartimientos citoplasmáticos formados en relación con la distribución de las organelas, que varían de uno a otro.

Algunos componentes de los medios de cultivo (como el fosfato por ejemplo) que son perjudiciales dependiendo de su concentración mientras que otros (como la glucosa por ejemplo) lo son dependiendo de la presencias de terceros.

La composición genética del oocito y su asociación con la variación que existe entre individuos, cepas y especies para contrarrestar el daño ejercido por las ERO's.

El entendimiento de los mecanismos se hace una tarea aún más difícil si a lo anterior se suman la multiplicidad de vías celulares secundarias a través de las cuales es contrarrestado o amplificado el daño oxidativo.

El camino propuesto a seguir consiste en hacer una disección inicial de cinco aspectos macro, implicados en la técnica de producción *in vitro* de embriones: las condiciones medioambientales, los medios de cultivo, el metabolismo, la composición genética del embrión y la manipulación de los gametos.

Dentro de las condiciones ambientales entre las principales variables a considerar estarían la tensión de oxígeno y la luz visible. En relación con los medios de cultivo se debe trabajar sobre el desarrollo de un medio químicamente definido, libre de proteína del que conozcamos los componentes, lo cual no es posible cuando suero, albúmina o células somáticas son adicionadas al medio de cultivo (variables de confusión).

En cuanto al metabolismo (sobre todo el energético y dentro de este, el de la función mitocondrial), un procedimiento que aclararía muchos interrogantes tiene que ver con el estudio del metabolismo del embrión *in vivo*, difícil tarea de cuyos resultados podríamos infe-

rir qué tanto depende el éxito del desarrollo embrionario de su metabolismo, de su genética y qué tanto del medio y las manipulaciones.

Otro aspecto importante que merece ser objeto de mayor atención tiene que ver con los efectos de la manipulación de los gametos (50) sobre el posterior desarrollo del embrión: los efectos de la regulación endocrina, la prolongación artificial de la dominancia folicular durante la inducción de la superovulación y la adquisición de la competencia por parte de oocito extraídos de folículos muy pequeños (51). El daño ejercido por la sobreproducción de ERO's que no solamente alteran el ADN (52) sino también estructuras no genómicas del espermatozoide que se manifiesta "en diferido", alterando el desarrollo embrionario temprano (53).

Adicional a esto, sería también conveniente investigar más sobre los efectos benéficos de la generación controlada de ERO's sobre la fisiología de los gametos y el embrión (54,55).

Por último, se tendrá que reevaluar el concepto de desarrollo normal *in vitro*, el cual debe ir más allá del solo registro de eventos tales como la singamia, el clivaje, la activación del genoma, la compactación y la formación del blastocelo. Se debe incluir la evaluación de la competencia, definida como la capacidad del embrión para producir una descendencia viable después de su transferencia.

Summary

Until now, the study of mammalian development, as well as practical applications of information obtained from in vitro fertilization and embryo transfer, have both been hampered by changes in embryonic development frequently observed during culture. One of the causes of these changes seems to be the uncontrolled production of oxygen reactive species (ORSs). Although it is difficult to pinpoint the sources of ORSs, two factors are known to play an important role—the composition of atmospheric gas and embryonic metabolism. The evidence is based on increased rates of development in the presence of either various scavengers of free radicals or reduced concentrations of oxygen in the culture medium. These results suggest that in vivo environment includes mechanisms which, in the former case, destroy or remove free radicals or, in the second, that ORSs are not produced there due to the limited availability of oxygen if we could definitively identify the sources and pathways of the ORSs, their effects could be productively controlled.

Referencias

1. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *BioEssays* 1994; 16:259-267.
2. Alexiou M, Lesse HJ. Purine utilization *de novo* synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos. *Development* 1992; 114:185-192.
3. Barnett DK, Bavister BD. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol Reprod Devel* 1995; 43:105-133.
4. Barquinero J. Radicales libres: los enemigos más diminutos. *En: GSH System. Glutación: el eje de la defensa antioxidante. Excerpta Médica. Amsterdám* 1992; p.9-15.
5. Betteridge KJ. Phylogeny, ontogeny and embryo transfer. *Theriogenol* 1995; 44:1061-1098.
6. Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997; 18:454-460.
7. Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. Control of protein synthesis during cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fert* 1988; 82:769-775.
8. Chun YS, Kim JH, Lee HT, Chung KS. Effect of superoxide dismutase on the development of preimplantation mouse embryos. *Theriogenol* 1994; 41:511-520.
9. Dows SM, Dow MPD. Hypoxanthine maintained two-cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. *Biol Reprod* 1991; 44:1025-1059.
10. Falanga V, Martin TA, Takagi H, et al. Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (i) procollagen in human dermal fibroblast. *J Cell Phys* 1993; 157:408-412.
11. Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. *J Anim Sci* 1997; 75:483-489.
12. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 4 ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts: 1994.
13. Goto Y, Noda, Y, Narimoto K, et al. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radical Biol Med* 1992; 13:47-53.
14. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986; 246:501-514.
15. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2 ed. Oxford University Press Inc. New York, 1996.
16. Herold M, Spiteller G. Enzymatic production of hydroperoxides of unsaturated fatty acids by injury of mammalian cells. *Chemistry and Physics of Lipids* 1996; 79:113-121.
17. Hjorth P. Current state of production, research and use of transgenic laboratory animals. *Scand J Lab Anim* 1995; 22:87-96.
18. Javed MH, Wright RW Jr. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenol* 1991; 35:1029-1036.
19. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *BioEssays* 1994; 1:31-38.
20. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993; 23:21-48.
21. Khurana NK, Wales RG. Effects of oxygen concentration on the metabolism of [U-14C] glucose by mouse morula and early blastocysts. *Reprod. Fert. Devel.* 1989; 1:99-106.
22. Kim JH, Niwa K, Lim JM, et al.. Effects of phosphate, substrates energy, and amino acids on development of in vitro-maturated, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined protein-free culture medium. *Biol Reprod* 1993; 48:1320-1325.
23. Kita M, Imai H. Hypoxanthin phosphoribosyltransferase activity in bovine embryos during the early embryonic development. *Theriogenol* 1993; 40:357-364.
24. Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenol* 1998; 49:103-114.
25. Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2:48-54.
26. Legge M, Sellens MH. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Human Reprod* 1991; 6:867-871.
27. Lonergan P. Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta Vet Scand* 1994; 35:307-320.
28. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, et al. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:896-900.
29. Manes C. Cyanide-resistant reduction of nitroblue tetrazolium and hydrogen peroxide production by the rabbit blastocyst. *Mol Reprod Devel* 1992; 31:114-121.
30. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987; 46:2402-2406.
31. Mieusset R. Spermatozoa and embryonic development. *Front Endocrinol* 1995; 105:105-128.
32. Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Kainuma H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenol* 1994; 41:681-687.
33. Nagao Y, Saeki K and Nagai M. Effects of embryo density, oxygen concentration and medium composition on in vitro development of bovine early embryos. *Theriogenol* 1998; 49:?(abstract).

34. Nakayama T, Noda Y, Goto Y, Mori T. Effects of visible light and other environmental factors on the production of oxygen radicals by hamster embryos. *Theriogenol* 1994; 41:499-510.
35. Nars-Esfahani MH, Aitken RJ, Johnson MH. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development* 1990; 109:501-507.
36. Nars-Esfahani MH, Johnson MH. The origin of reactive oxygen species in mouse cultured *in vitro*. *Development* 1991; 113:551-560.
37. Nars-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH. Effects of glucose, glutamine ethylenediaminetetracetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1992; 96:219-231.
38. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, et al. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 1991; 28:356-360.
39. O'fallon JV, Wright RW. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation embryos. *Biol Reprod* 1996; 34:58-64
40. Pabon WE, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 1989; 9:99-102.
41. Pinyopummintr T, Bavister BD. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenol* 1995; 44:471-477
42. Ramón JR. GSH system. Glutathión: el eje de la defensa antioxidante. *En: GSH System. Glutathión: el eje de la defensa antioxidante. Excerpta Médica. Amsterdam* 1992; p.5-6.
43. Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1996; 106:39-47.
44. Rieger D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenol* 1992; 1:75-93.
45. Schini SA, Bavister BD. Two cell block development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 1988; 39:1183-1192.
46. Sies H. El stress oxidativo: de la investigación básica a la aplicación clínica. *En: GSH System Glutathión: el eje de la defensa antioxidante Excerpta Médica. Amsterdam* 1992; 48-64.
47. Stephanelli C, Staić I, Bonavita F, et al. Oxygen tension influences DNA fragmentation and cell death in glucocorticoid-treated thymocytes. *Biochem Biophys Res Comm.* 1995; 212:300-306.
48. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, et al. Effects of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fert* 1990; 89:573-578.
49. Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenol* 1996; 45:27-40.
50. Twig J, Irwin DS, Houston P, et al., Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:439-445.
51. Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Molec Reprod Devel* 1992; 31:28-33.
52. Van Langendonk A, Morales H, Massip A, Dessy F. Effect of hydrogen peroxide on *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenol* 1998; 49:221 (abstract).
53. Van der Westerlaken LA, Van der Vlugt JJ, de Wit AAC, Van der Schans A. The effect of oxygen tension on *in vitro*-fertilization and embryonic development. *Theriogenol* 1992; 37:312 (abstract).
Wright RW, Ellington J. Morphological and physiological differences between *in vivo*- and *in vitro*-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenol* 1995; 44:1189-1195