



VNIVERSITAT [Q 大]
DE VALÈNCIA
Facultat de Medicina i Odontologia

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA,
OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO: 3139 MEDICINA

ESTUDIO DEL CONTENIDO Y DEL ESTADO MITOCONDRIAL EN EL BLASTOCISTO HUMANO

Autora:
Marta Pérez Sánchez

Directores:
Antonio Pellicer Martínez
María José de los Santos Molina

Octubre/2021, Valencia (España)





VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA 
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Programa de Doctorado: 3139 MEDICINA

**Estudio del contenido y del estado mitocondrial en el blastocisto
humano**

Autora:

Marta Pérez Sánchez

Directores:

Antonio Pellicer Martínez

María José de los Santos Molina

Octubre/2021, Valencia (España)

D/Dña. **Antonio Pellicer Martínez**, Catedrático de pediatría, obstetricia y ginecología de la Universidad de Valencia y presidente de IVIRMA Global.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

“Estudio del contenido y del estado mitocondrial en el blastocisto humano”

Ha sido realizado íntegramente por Dña. **Marta Pérez Sánchez**, bajo mi dirección y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación, en Valencia (España) a 20 de octubre de 2021.

Fdo.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Antonio Pellicer Martínez', written over a horizontal line.

Antonio Pellicer Martínez

NIF. 19979620-A

D/Dña. **María José de los Santos Molina**, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia y directora del Laboratorio de Fecundación In-vitro del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVIRMA Global, Valencia, España)

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado:

“Estudio del contenido y del estado mitocondrial en el blastocisto humano”

Ha sido realizado íntegramente por Dña. **Marta Pérez Sánchez**, bajo mi dirección y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación, en Valencia (España) a 20 de octubre de 2021.

Fdo.

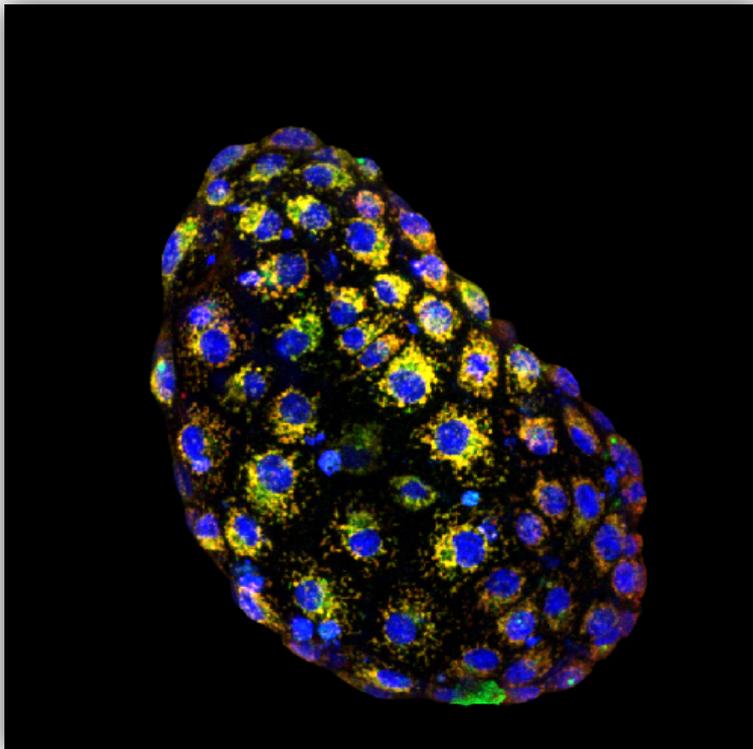


María José de los Santos Molina

NIF. 52703307-A

“Si quieres encontrar los secretos del universo, piensa en términos de energía...”

Nikola Tesla



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a mis directores de tesis, el Dr. Pellicer y la Dra. de los Santos, porque sin ellos no habría sido posible llevar a cabo este proyecto que tanto me ha cambiado a nivel personal y profesional.

María José, siempre recordaré tu imagen en el vestuario ofreciéndome una de las oportunidades más importantes de mi vida. No tengo palabras para expresarte mi gratitud. Para empezar, ha sido para mí un verdadero privilegio aprender un pedacito de toda tu experiencia. Siempre llevaré en mi corazón nuestras reuniones súper productivas, de las que siempre salía con ansia por seguir investigando. Gracias por tu implicación todos estos años; por tu rapidez para contestarme cualquier cosa; por confiar tantísimo en mí, teniendo en cuenta siempre mi punto de vista de forma valiosa; por ayudarme a enfrentar todas mis inseguridades; y por ser siempre tan humana. Junto a ti he descubierto lo que significa la investigación. Te admiro y te aprecio muchísimo.

A mis padres. Aunque es imposible agradecerlos tanto con palabras. Solo vosotros tenéis el superpoder de hacerme sentir cuidada desde tanta distancia. Gracias por recorreros tantísimos Km durante estos años, por recargarme las pilas cada vez que algo se hacía cuesta arriba y por guiarme siempre en la vida. Sin duda, tenéis mucho que ver en el resultado de este trabajo. Me siento muy feliz por todos los momentos que he podido vivir con vosotros en esta etapa. Os quiero como a nadie.

También a mis hermanos, a mi Mar, que como no puede ser de otra manera, han estado para mí siempre que los he necesitado. Gracias por todo el apoyo estos años, por las videollamadas 24 horas al día, por cuidarme y por sentirlos siempre tan orgullosos de mí. A Manuel. Empezamos esta aventura con la idea de estar en Valencia solo un año y medio y al final hemos pasado los cinco años de mayor aprendizaje de nuestra vida. Desde que nos conocimos, nos hemos convertido en científicos y hemos madurado juntos. Gracias por ser mis manos y mis pies, por ser el mejor apoyo que existe, por empujarme siempre a tomar las decisiones en frío, por todo lo que hemos superado juntos los dos solos a tanta distancia de nuestras familias y por hacerme tan feliz. Que nunca se acaben nuestros debates de ciencia y todos tus consejos que tanto me han inspirado y ayudado a tomar muchas decisiones estos años, tú también tienes mucho

que ver en el resultado de esta tesis. Eres un referente para mí como persona y como investigador. En definitiva, gracias por ser mi compañero de aventuras estos 5 años. Siempre decíamos que iba a valer la pena todo el esfuerzo y lo ha superado con creces. Valencia siempre será nuestra segunda casa, te quiero al máximo Gor.

A mis compañeros del alma. Estos cinco años ya habrían merecido por sí solos la pena por haberos conocido. Hemos hecho el mejor equipo que podía imaginar, hemos aprendido infinidad los unos de los otros, hemos resuelto juntos todo lo que se nos ha presentado sin excepción y hemos estado ahí para apoyarnos y animarnos incondicionalmente. Sois inspiración y la definición de compañerismo para mí. Esta etapa se queda en mi corazón para siempre. Soy muy feliz de que la distancia no haya hecho ni un poquito de mella en nuestra amistad.

Raquel, gracias por ser mi polo opuesto y empujarme siempre para que no le tuviera miedo nunca a nada. Nos conocimos en una situación límite como no podía ser de otra forma, pero a partir de ahí ya todos los contratiempos se convirtieron en memes. Gracias por haber estado estos años y por estar siempre para CUALQUIER cosa, no sé qué habría hecho sin ti. Eres única, una inspiración como profesional y una persona esencial para mí. Te quiero mucho amiga.

Lorena, trabajar contigo es un privilegio. Eres un ejemplo a seguir para mí. No hay reto Excel que se nos resista ni a Km de distancia. ¡Quién me iba a decir que la cabecita pelirroja que vi un día pasar por la ventana del lab se iba a convertir en una persona tan especial! Gracias por haberme aportado tanta calma y por ser un apoyo fundamental. Por todas las “lagrimitas fáciles” que hemos derramado, por todos nuestros “consejos de sabias” para resolver cualquier tema, y por ser igual de genial tanto de compañera como de amiga. Te quiero mucho.

Ángel, eres otra línea más de agradecimiento a M^a José. Llegaste para traerme a Valencia un trocito de Cádiz y hacerme sentir que la distancia no era tan trascendental. Me siento muy afortunada de la conexión que hemos tenido, de la forma que tenemos tan similar de ver las cosas y de lo bien que trabajamos juntos. Desde que llegaste, los percances pasaron de ser agobios a ser motivos de risa al día siguiente. Te quiero mucho. Nuria, Ana e Irene. Gracias por ser otro apoyo valiosísimo, por todas las risas, por nuestra complicidad y nuestros ánimos siempre que coincidíamos. Por todas las experiencias

que hemos compartido que se quedan en mi corazón para siempre. Sois unas grandes profesionales. Estoy segura de que Valencia será nuestro punto de encuentro. Os quiero.

A Alicia y Paco de fundación. Terminamos el experimento de RNA-seq el día que declararon pandemia mundial, como no podía ser de otra forma. Gracias por enseñarme a tener paciencia cuando un experimento se “atasca” y por todo lo que he aprendido de vosotros.

A Amparo Mifsud, por ser mi guía durante el primer año de tesis. Siempre te agradeceré todo lo que me enseñaste, todo lo que me ayudaste y lo mucho que siempre te has interesado por mí.

A Diana, muchísimas gracias por ser mi conexión con el laboratorio de FIV. Por poder contar contigo para cualquier cosa y ayudarme con imprevistos.

A Antonio Díez-Juan y a todo el equipo de IVIRMA Valencia, Fundación IVI e IVI Learning Center. Muchísimas gracias a todas esas personas que durante estos años me han prestado su ayuda de cualquier tipo o han tenido un gesto amable conmigo. A veces, gestos que creemos insignificantes cambian mucho el día a una persona.

A mis amigas Ali, María y Laura. No hay distancia para nosotras. Gracias por ser más que amigas de toda la vida, por ser hermanas para mí. Por vuestro apoyo infinito estos años, por estar ahí sin tener que pedíroslo, por hacerme sentir lo orgullosas que estáis de mí, y por quererme de la misma forma que yo a vosotras.

A mis suegros, a mis cuñados, a mi prima, mis vecinas (mis otras hermanas) y, en definitiva, a mi familia. Por apoyarme tanto estos años, estar ahí siempre para animarme y hacer de las vueltas a casa momentos emocionantes. Miguelito y María, que no caigan nunca en el olvido las 1000 anécdotas que nos llevamos de vuestros viajes a Valencia por favor.

A Mario. Para que cuando seas mayor sepas que tu tatum escribió gran parte de su tesis rodeada de coches y con tu compañía escandalosa de fondo.

Por último, a los que, aunque no estén, se que están muy orgullosos de mí y me dan fuerzas.

Índice

Abreviaturas.....	I
Resumen.....	V
Parte I. Prólogo.....	1
Introducción: la mitocondria.....	4
Descripción y estructura mitocondrial.....	4
Genoma mitocondrial.....	10
Funciones mitocondriales.....	11
La mitocondria en el embrión humano.....	20
Uso del contenido de ADN mitocondrial como indicador de la competencia embrionaria.....	28
Justificación.....	31
Objetivos.....	33
Procedimientos y técnicas de análisis.....	35
Estimulación ovárica.....	35
Recuperación de óvulos, inyección intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI) y condiciones de cultivo embrionario.....	35
Vitrificación y desvitrificación embrionaria.....	36
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).....	36
Secuenciación de ácido ribonucleico (RNA-seq).....	38
Microscopía confocal.....	41
a) Análisis del contenido de mitocondrias totales y activas mediante tinción en blastocistos.....	41
b) Análisis del estado redox en blastocistos.....	52
Microscopía electrónica de transmisión.....	56
Parte II. Descripción de estudios.....	57
Objetivo específico 1. Caracterizar el contenido y el patrón de distribución del ADN mitocondrial durante el desarrollo embrionario humano preimplantacional.....	59

Propósito.....	59
Materiales y métodos específicos.....	59
Resultados.....	61
Discusión de resultados.....	68
 Objetivo específico 2. Describir el contenido de ADN mitocondrial y el estado mitocondrial en embriones humanos bajo condiciones de estrés.....	 73
Propósito.....	73
Materiales y métodos específicos.....	73
Resultados.....	79
Discusión de resultados.....	100
 Objetivo específico 3. Identificar la relación existente entre el contenido de ADN mitocondrial por célula y la masa y la actividad mitocondrial en el blastocisto humano.....	 111
Propósito.....	111
Materiales y métodos específicos.....	111
Resultados.....	115
Discusión de resultados	122
 Parte III. Epílogo.....	 127
Consecución de objetivos y relevancia científica.....	129
Perspectivas futuras.....	133
Conclusiones.....	135
 Material suplementario.....	 137
Contribuciones científicas.....	139
Figuras suplementarias.....	143
Tablas suplementarias.....	155
 Bibliografía.....	 163

ABREVIATURAS

Abreviaturas

Δ Ct	Incremento de Ct
$\Delta\Delta$ Ct	Incremento del incremento de Ct
μ m	Micrómetros
μ M	Micromolar
μ l	Microlitros
μ g	Microgramos
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADNn	Ácido desoxirribonucleico nuclear
ADP+Pi	Adenosín difosfato + fosfato inorgánico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
ATP	Adenosín trifosfato
CNRHA	Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	Umbral de ciclo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil sulfóxido
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
FADH ₂	Dinucleótido de flavina y adenina reducido
FF	Fallo de fecundación
FIV	Fecundación in-vitro
g	Gramos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GO	Gene Ontology
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IVIRMA	Instituto valenciano de infertilidad-Reproductive Medicine Associates
Kb	Kilobases
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L	Litros
LGA	Grande para la edad gestacional
M	Molar
MII	Metafase II
MCI	Masa celular interna

mg	Miligramos
Mitoscore®	Contenido de ADNmt por célula
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
N	Tamaño muestral
N ₂	Nitrógeno
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
nm	Nanometros
nM	Nanomolar
O ₂	Oxígeno
Padj	P-valor ajustado
Pb	Pares de bases
PB	Tampón fosfato
PCA	Análisis bidimensional de componentes principales
Pg	Picogramos
PGT-A	Prueba genética preimplantacional para aneuploidías
pM	Picomolar
PM	Peso molecular
PBS	Tampón fosfato salino
RA	Reproducción asistida
RE	Retículo endoplasmático
RNA-seq	Secuenciación de ARN
ROS	Especie reactiva de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
TFAM	Factor de transcripción A
TRA	Técnicas de reproducción asistida
UPR	Respuesta a proteína desplegada
UPR ^{mt}	Respuesta mitocondrial a proteína desplegada
Vs	Versus

RESUMEN

Resumen

El contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (ADNmt) por célula como marcador de viabilidad embrionaria se propuso como una estrategia muy innovadora para la priorización en la selección de embriones humanos en los tratamientos reproducción asistida, siendo los embriones con menor contenido mitocondrial por célula los candidatos a ser transferidos. La hipótesis de partida se basaba en que dichos embriones presentarían un estado metabólico más apropiado y un menor estrés celular, los cuales se traducirían en una mayor probabilidad de implantación.

La elevada expectación inicialmente generada alrededor de este marcador, vino acompañada de publicaciones con resultados contradictorios en cuanto a su relación con distintos parámetros de éxito clínico, lo que ha desembocado en una falta de consenso sobre la relevancia clínica de su uso. Una hipótesis posible, que explique esta falta de consenso, podría ser que el abordaje del uso del contenido de ADNmt se ha realizado sin conocimientos suficientes sobre aspectos clave como son el significado del contenido del ADNmt durante el desarrollo embrionario o la asociación entre el contenido de ADNmt y el contenido y estado de actividad mitocondrial.

El presente trabajo de tesis doctoral trata de profundizar, mediante el análisis del contenido y del estado mitocondrial en el blastocisto, sobre los aspectos moleculares en los que se sustenta esta hipótesis. Este estudio se realizará para determinar si existen factores que expliquen la disparidad de resultados difundidos sobre este tema.

Para ello, se establecieron tres objetivos específicos con el fin de abordar el análisis mitocondrial mediante distintas aproximaciones:

Objetivo específico 1. Caracterizar el contenido y el patrón de distribución del ADN mitocondrial durante el desarrollo embrionario humano preimplantacional.

Objetivo específico 2. Describir el contenido de ADN mitocondrial y el estado mitocondrial en embriones humanos bajo condiciones de estrés.

Objetivo específico 3. Identificar la relación existente entre el contenido de ADN mitocondrial por célula y la masa y la actividad mitocondrial en el blastocisto humano.

Gracias a la consecución de estos objetivos se ha llegado a la conclusión de que el contenido de ADNmt por célula es capaz de verse modulado en cuestión de pocas horas en situaciones de estrés respecto al cultivo in-vitro normal, y no es representativo del contenido de mitocondrias y de la actividad mitocondrial en un momento que sería cercano a la transferencia embrionaria. No obstante, se ha demostrado una importante relación entre los valores altos de contenido de ADNmt y el estrés celular.

Estos hallazgos pueden explicar, en parte, la falta de consenso que existe en cuanto al uso del contenido de ADNmt por célula como marcador de competencia embrionaria, y pueden ser útiles para establecer la base molecular necesaria que respalde, en un futuro, su uso como un indicador adicional para la priorización de la transferencia embrionaria.

PRÓLOGO

Prólogo

I

El trabajo de esta tesis doctoral está dividido en tres partes principales: el prólogo, que cuenta con la justificación y los objetivos del estudio además de una introducción general sobre la mitocondria y la descripción de las técnicas experimentales usadas; una exposición de los estudios realizados para alcanzar los objetivos, dividida en tres objetivos específicos; y un epílogo, en el cual se describen la consecución de los diferentes objetivos y la relevancia de los resultados, los nuevos horizontes de investigación y las conclusiones finales. Finalmente se incluye al final del documento, un apartado de contribuciones científicas, figuras y tablas suplementarias y la lista de referencias bibliográficas en la que se ha apoyado la presente tesis doctoral.

Dentro del apartado de estudios, el objetivo específico 1 se basa en la descripción del contenido de ADNmt durante todo el desarrollo embrionario humano in-vitro, desde el ovocito maduro metafase II (MII) hasta la etapa de blastocisto. En este apartado se profundizará también en la descripción de la variabilidad en el contenido de ADNmt de los ovocitos maduros MII y ovocitos que han tenido fallo de fecundación (FF), analizando la influencia de la edad materna y del cultivo in-vitro. Además, se analizarán de forma independiente los blastocistos para evaluar la influencia de la calidad embrionaria o el día de desarrollo en el contenido de ADNmt.

En el objetivo específico 2 se realizará un extenso estudio para evaluar la influencia de condiciones externas y situaciones asociadas al cultivo in-vitro, tales como el bloqueo embrionario o el proceso de vitrificación/desvitrificación, sobre el contenido de ADNmt y el estado mitocondrial. Para ello, en los dos supuestos, se realizará un estudio con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para establecer la carga de ADNmt, un subanálisis del estado redox con microscopía confocal y del contenido mitocondrial mediante microscopía electrónica de transmisión en blastocistos en recuperación tras la desvitrificación, y un análisis de expresión génica mediante secuenciación de ARN (RNA-Seq) para determinar perfiles de expresión en general y relacionados con rutas mitocondriales y de estrés celular.

El tercer y último objetivo específico se centra en el estudio de la representatividad del contenido de ADNmt respecto al contenido de mitocondrias totales y activas en el blastocisto. Para ello, se realizarán aproximaciones con microscopía confocal y RNA-seq para determinar si el valor de contenido de ADNmt por célula puede estar correlacionado o no con el número de mitocondrias totales y activas, y para analizar las diferencias a nivel de expresión génica entre embriones de alto y bajo contenido de ADNmt por célula.

Introducción: la mitocondria

Descripción y estructura mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo celular con genoma propio que tuvo su origen, según la teoría endosimbiótica, hace más de 1,5-2 billones de años debido a la integración de una alfa-proteobacteria en una célula hospedadora (Kurland and Andersson, 2000; Zimorski *et al.*, 2014; Roger *et al.*, 2017). Forma parte de casi todas las células eucariotas, exceptuando los arqueozoos (Brinkmann and Philippe, 2007).

Su estructura, desde su zona más exterior a su zona más interior, consiste en una membrana externa, un espacio intermembrana y una membrana interna. En conjunto, estas estructuras se organizan en forma de crestas rodeando una matriz en la que se encuentran varias copias de su genoma y las diferentes enzimas que actúan en las reacciones metabólicas mitocondriales (figura 1) (Van Der Bliet *et al.*, 2017).

Su membrana externa tiene un papel protector y permite la difusión de pequeñas moléculas e iones, sin embargo, su membrana interna es impermeable a los iones, son las proteínas transportadoras selectivas las que se encargan de este tipo de transporte facilitando que se cree un potencial de membrana esencial para el metabolismo mitocondrial (Pernas and Scorrano, 2016; Van Der Bliet *et al.*, 2017).

La mitocondria es un orgánulo móvil que se traslada a regiones específicas dentro de la célula e interacciona con distintos orgánulos celulares como son el retículo endoplasmático (RE) y los ribosomas, además de con el núcleo, los microtúbulos y

los filamentos citoesqueléticos. Estas interacciones facilitan las cascadas de señalización e intervienen en procesos como la segregación cromosómica, la citocinesis, la especificación del linaje o la epigenética (Van Blerkom *et al.*, 2000; Detmer and Chan, 2007; Lewis *et al.*, 2016; Pernas and Scorrano, 2016; Harvey, 2019).

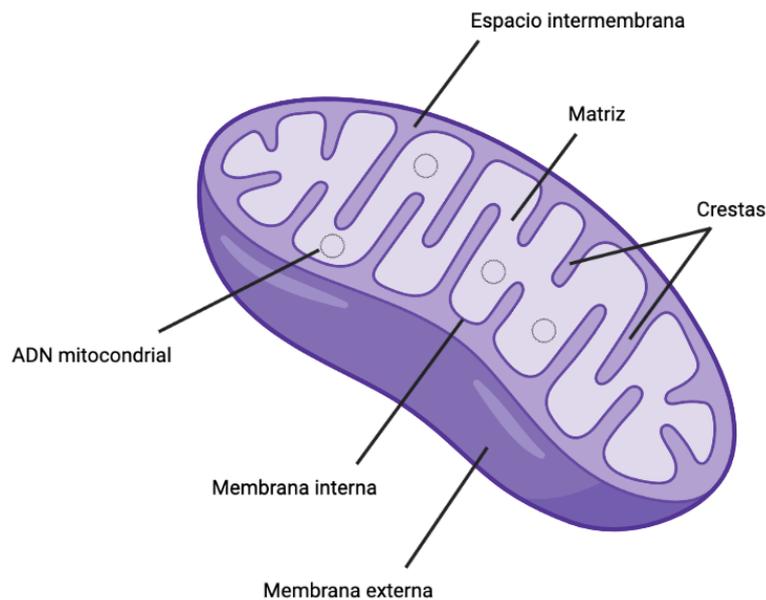


Figura 1. Estructura general de la mitocondria (elaboración propia).

Por otro lado, la mitocondria es un orgánulo muy dinámico, en cuestión de pocos minutos es capaz de fusionarse formando redes mitocondriales y fisionarse con el objetivo de adaptarse a los requisitos celulares y llevar a cabo su especialización subcelular. Asimismo, la morfología de las mitocondrias individuales puede variar según el estado metabólico de la célula gracias a la remodelación de sus crestas (Twig *et al.*, 2008; Archer, 2013; Chappel, 2013; Kaneko, 2016; Pernas and Scorrano, 2016; Herst *et al.*, 2017; Meyer *et al.*, 2017).

Además de la fusión, la fisión y la remodelación de crestas, encontramos dentro de la dinámica mitocondrial la biogénesis y la degradación de componentes mitocondriales. Todos en conjunto regulan procesos como la homeostasis o la remodelación de volumen

y forma, además de formar parte de la respuesta celular al estrés (Ashrafi and Schwarz, 2013; Pernas and Scorrano, 2016; Meyer *et al.*, 2017).

A continuación, se detallan los aspectos más importantes de la dinámica mitocondrial:

- **Fusión mitocondrial:** es la unión de membranas (internas y externas) entre mitocondrias sanas o mitocondrias sanas con mitocondrias específicas dañadas, ordenada por el citoplasma según las necesidades celulares (figura 2). En humanos este proceso se produce gracias a la acción de guanosina trifosfatasa (GTPasa) en la membrana mitocondrial interna (OPA1, proteína de atrofia óptica 1) y externa (MFN1 y MFN2, mitofusinas 1 y 2). La fusión de la membrana interna es dependiente del potencial de membrana (Osellame *et al.*, 2012; Lee and Yoon, 2016; Pernas and Scorrano, 2016; Meyer *et al.*, 2017).
En condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (estrés a bajo nivel, respuesta adaptativa), la fusión mitocondrial organiza una red que promueve el metabolismo mitocondrial (Meyer *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). Además, la fusión mitocondrial permite el intercambio de información gracias a la transferencia de ADNmt, proteínas, lípidos y metabolitos y la dilución de especies tóxicas de superóxido y ADNmt mutante (Chappel, 2013; Pernas and Scorrano, 2016).
- **Fisión mitocondrial:** es una división mitocondrial que se impone mediante señales citosólicas y da como resultado mitocondrias hijas asimétricas que adquieren diferente número de copias de ADNmt (figura 2) (Twig *et al.*, 2008; Gottlieb and Bernstein, 2016; Pernas and Scorrano, 2016). La fisión mitocondrial no requiere potencial de membrana y está mediada por varias proteínas, pero la GTPasa dinamina relacionada con proteína 1 (DRP1) parece ser la más central en el proceso (Twig *et al.*, 2008; Lee and Yoon, 2016; Meyer *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020). En las primeras etapas de este proceso intervienen los túbulos del RE, que se envuelven alrededor de las mitocondrias en zonas de la matriz en las que desencadena la replicación del ADNmt y marca los sitios de división mitocondrial (Friedman and Nunnari, 2014; Meyer *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020; Kleele *et al.*, 2021). No obstante, no se requiere necesariamente la replicación del ADNmt para la fisión (Kleele *et al.*, 2021).

La fisión mitocondrial permite tanto la biogénesis de nuevas mitocondrias como la eliminación de mitocondrias disfuncionales por mitofagia, tal y como se explicará más adelante. Este destino parece depender de la zona donde se produzca la fisión. La fisión periférica, sin contacto con el RE, parece estar relacionada con la formación de mitocondrias esféricas pequeñas con bajo potencial de membrana que “secuestran” componentes dañados. Esta disminución en el potencial de membrana en la zona que formará parte de la nueva mitocondria ocurre en forma de gradiente antes de la constricción que produce DRP1 (Kleele *et al.*, 2021).

En condiciones de exceso de nutrientes o alto estrés, la fisión produce mitocondrias esféricas de menor tamaño y con baja actividad metabólica que podrían proteger de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y conducir a la liberación del citocromo C de la membrana interna, procesos que facilitan la mitofagia de mitocondrias disfuncionales o con ADNmt mutado y la apoptosis. Además, la fisión facilita otros procesos como la distribución de mitocondrias a lo largo de la célula y la distribución del ADNmt recién replicado (Molina *et al.*, 2009; Arciuch *et al.*, 2012; Frank *et al.*, 2012; Dominy and Puigserver, 2013; Lewis *et al.*, 2016; Meyer *et al.*, 2017).

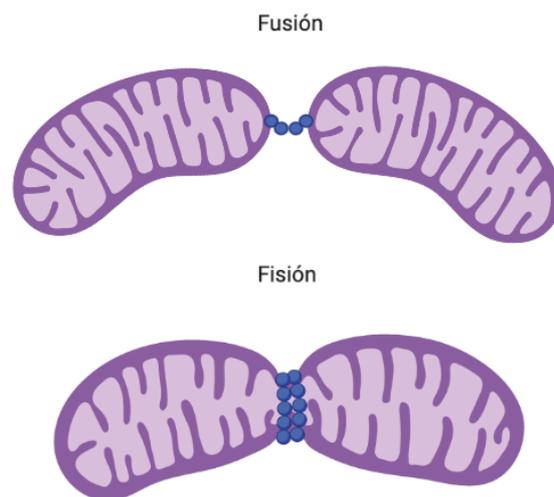


Figura 2. Procesos de fusión y fisión esquematizados (elaboración propia).

- **Remodelación de crestas:** las crestas mitocondriales pueden aumentar en número y modificar su estrechamiento o la apertura de su base. Parece ser que OPA1 es la principal proteína encargada de la remodelación de esta estructura (Pernas and Scorrano, 2016). El aumento del número de crestas está asociado con el incremento de la capacidad metabólica. Una menor capacidad metabólica se asocia con una configuración mitocondrial condensada, con poca formación de crestas, un mayor espacio intermembrana, y una matriz condensada; mientras que una capacidad metabólica mitocondrial eficiente se asocia con una configuración mitocondrial ortodoxa, que se caracteriza por una matriz menos condensada, un menor espacio intermembrana y crestas alargadas y plegadas (figura 3). Además, el estrechamiento y la apertura de las bases de las crestas regulan la liberación de moléculas apoptóticas (Hackenbrock, 1968; Archer, 2013; Chappel, 2013; Kaneko, 2016; Pernas and Scorrano, 2016).

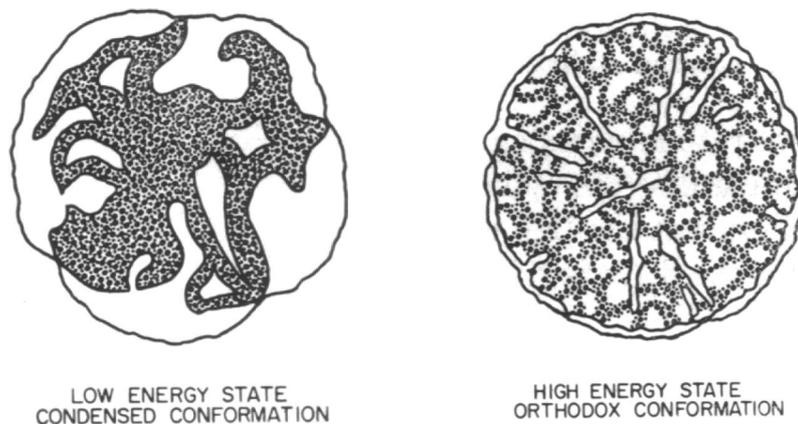


Figura 3. Configuración mitocondrial condensada y ortodoxa (Hackenbrock, 1968).

- **Biogénesis mitocondrial:** la biogénesis mitocondrial se define como el crecimiento y la división de las mitocondrias preexistentes (Jornayvaz and Shulman, 2010). Es un proceso de control de la masa mitocondrial dependiente del potencial de membrana (Dominy and Puigserver, 2013; Popov, 2020) que además es modelado en respuesta a la demanda de energía celular, a la disponibilidad de nutrientes, a las señales de desarrollo, a los estímulos ambientales (Arciuch *et al.*, 2012; Zhang and Xu, 2016), al

contenido de copias de ADNmt y su ratio de contenido respecto al ADN nuclear (ADNn) y al nivel de expresión génica mitocondrial (Popov, 2020). Por ejemplo, está influenciada por el estrés ambiental, en el que se incluye el ejercicio, la restricción calórica, la baja temperatura o el estrés oxidativo, entre otros (Jornayvaz and Shulman, 2010).

Parece que el objetivo de este proceso es el aumento de la capacidad metabólica mitocondrial, la disminución del estrés oxidativo patológico y la reparación de disfunciones mitocondriales.

El proceso implica la coordinación entre los genomas mitocondrial y nuclear. Por un lado, se produce la replicación y la transcripción del ADNmt gracias a una familia de proteínas reguladoras cuyo principal regulador es el coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PGC-1 α). Estos activadores integran la expresión de genes en el núcleo y las mitocondrias a través de una cascada reguladora, que implica la activación secuencial de factores de transcripción (ERR alpha, NRF1, NRF2, factor de transcripción A (TFAM), etc.) (Ryan and Hoogenraad, 2007; Li *et al.*, 2017; Popov, 2020). Posteriormente, tiene lugar la traducción de los genes codificados por el ADNmt en proteínas, con la ayuda de factores de traducción específicos codificados por el núcleo. Finalmente, fosfolípidos y preproteínas sintetizadas en el citosol se dirigen hacia la mitocondria y se ensamblan para la generación de las nuevas mitocondrias (Gohil and Greenberg, 2009; Popov, 2020).

- **Degradación de componentes mitocondriales:** la calidad de las mitocondrias se mantiene mediante los procesos comentados anteriormente y la eliminación de componentes o mitocondrias dañadas.

Dentro de este mecanismo se encuentran tres vías principales: la degradación de las proteínas mal plegadas de la membrana mitocondrial mediante dos complejos de proteasas AAA en la membrana interna; la degradación de proteínas mitocondriales mediante transferencia a lisosomas; y por último la mitofagia, que implica el marcaje y la inclusión, a través de adaptadores y receptores de cadena liviana 3 (LC3), de una mitocondria completa dañada y despolarizada o de mitocondrias espermáticas durante la fecundación dentro de una vesícula de doble membrana denominada

autofagosoma. Posteriormente, este autofagosoma se fusiona con un lisosoma (Ding and Yin, 2012; Ashrafi and Schwarz, 2013; Yoo and Jung, 2018).

Tanto la biogénesis como la mitofagia son procesos altamente regulados. La precisa y aún desconocida coordinación de estos procesos promueve la longevidad y la resistencia al estrés, mientras que la interrupción de su equilibrio acelera el envejecimiento conduciendo a la muerte celular (Ploumi *et al.*, 2017).

Genoma mitocondrial

El ADNmt humano consiste en un ADN circular de doble cadena de aproximadamente 16,5 Kb (figura 4). Este ADN está altamente empaquetado en estructuras denominadas nucleoides (de aproximadamente 100 nm de diámetro), las cuales están compuestas por ADNmt y proteínas. La cadena pesada (hebra H) es rica en el nucleótido guanina y la cadena ligera (hebra L) es rica en el nucleótido citosina. La hebra H codifica 28 genes y la hebra L codifica 9 genes, sumando un total de 37 genes. Estos 37 genes codifican 13 proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (una pequeña parte del total de proteínas que la componen), dos ácidos ribonucleicos (ARN) ribosomales (12S y 16S), y 22 ARNs transferentes (NASS and NASS, 1963; Seli, 2016; Lee and Han, 2017).

El ADNmt contiene una alta densidad génica y no posee intrones, exceptuando un fragmento regulador no codificante de ~ 1 kb (D-loop). Además, es más vulnerable al estrés oxidativo porque no está asociado con histonas protectoras (Chappel, 2013; Lee and Han, 2017).

Los nucleoides son esféricos y contienen más de una copia de ADNmt. Estas estructuras tienen un papel protector además de un rol en el control del metabolismo mitocondrial en respuesta a las demandas celulares (Alán *et al.*, 2016; Lee and Han, 2017).

El número de copias de ADNmt es específico según el tipo de tejido. Puede variar desde 2-10 copias por mitocondria (Xia *et al.*, 2017) y de 100-10.000 copias por célula (Zhang *et al.*, 2017b). Su vida media documentada varía desde días hasta meses y parece ser influenciada por los requerimientos específicos del tejido (Li *et al.*, 2019).

Se replica independientemente del ciclo celular y la replicación del ADNn, aunque las proteínas involucradas en la replicación del ADNmt están codificadas por ADNn, por lo que tiene una estrecha comunicación con el núcleo. La replicación y la transcripción del

ADNmt se producen a través de la actividad de la polimerasa y mitocondrial (POLG), la helicasa Twinkle, la proteína de unión al ADN monocatenario mitocondrial (mtSSB), el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) y la ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT) (Lee and Han, 2017).

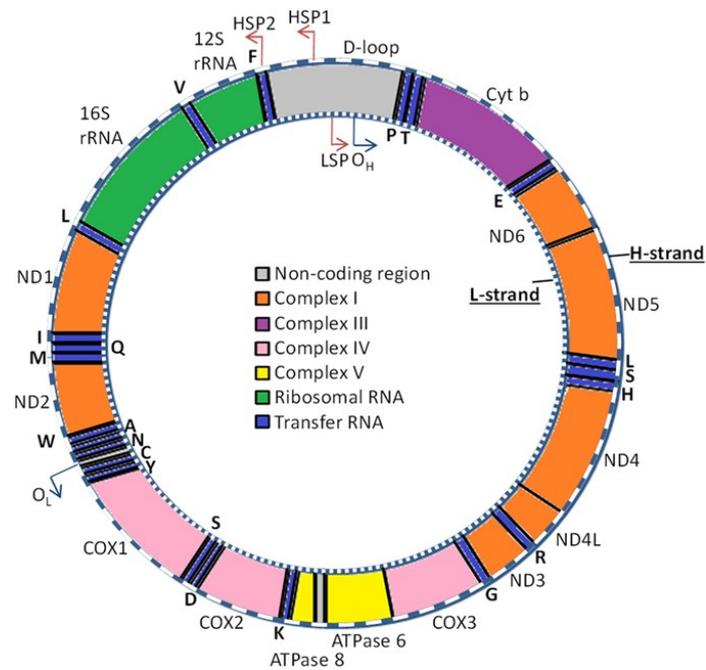


Figura 4. Genoma mitocondrial (Van Der Wijst et al., 2017).

Funciones mitocondriales

La función principal de la mitocondria es la producción de la mayor parte de energía que consume la célula (Korla and Mitra, 2014; Van Der Bliet *et al.*, 2017). No obstante, es responsable de otros numerosos procesos vitales.

a) La mitocondria: principal generador de energía en la célula:

La producción mitocondrial de energía propiamente dicha se realiza a través del ciclo de Krebs (figura 5) y la fosforilación oxidativa, procesos que ocurren en la matriz y en la membrana interna mitocondrial (figura 6) (Korla and Mitra, 2014).

No obstante, el proceso de producción de energía comienza fuera de la mitocondria, en el citoplasma de la célula (figura 6). Es allí donde se lleva a cabo la **glucólisis**, en la que una molécula de **glucosa** pasa a formar 2 moléculas de **piruvato**, produciéndose además moléculas de **dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido (NADH)** y 2 moléculas de **adenosín trifosfato (ATP)** (Lunt and Vander Heiden, 2011; Gray *et al.*, 2014).

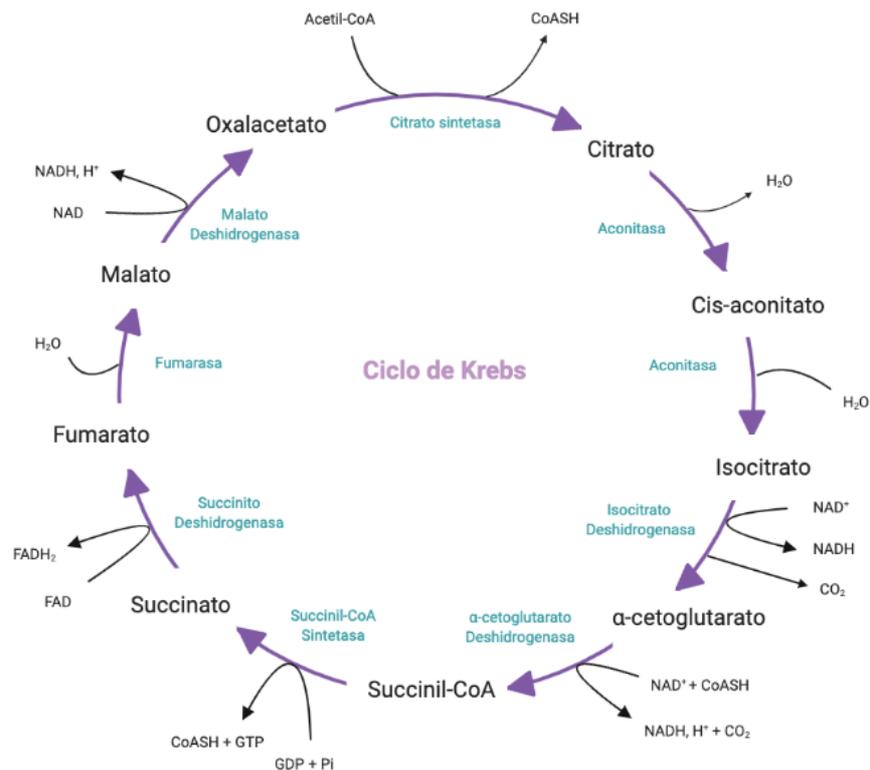


Figura 5. Ciclo de Krebs esquematizado (Robinson and Srere, 1985; Raimundo *et al.*, 2011; Korla and Mitra, 2014).

Este piruvato ingresa a la matriz mitocondrial gracias a una proteína transportadora (portador de piruvato mitocondrial, MPC) en la membrana interna mitocondrial (Bader *et al.*, 2019) y se transforma en acetil-CoA gracias a la enzima coenzima-A.

Además del piruvato, **los ácidos grasos** se transforman en la membrana interna mitocondrial en acil coenzima A gracias a la acil-CoA sintetasa y también son transportados hacia la matriz, en este caso gracias al transportador carnitina. Este acil coA es oxidado a acetil-CoA en un proceso denominado beta-oxidación.

El acetil-CoA procedente de ambas fuentes se incorpora al ciclo de Krebs.

Del ciclo de Krebs por un lado se obtiene dióxido de carbono (CO_2), que sale fuera de la mitocondria; y 3 moléculas de NADH y 1 molécula de dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH_2), que cederán sus electrones a la cadena transportadora de electrones en la membrana interna (Akram, 2014; Korla and Mitra, 2014; Adeva-Andany *et al.*, 2019; Karp, 2019).

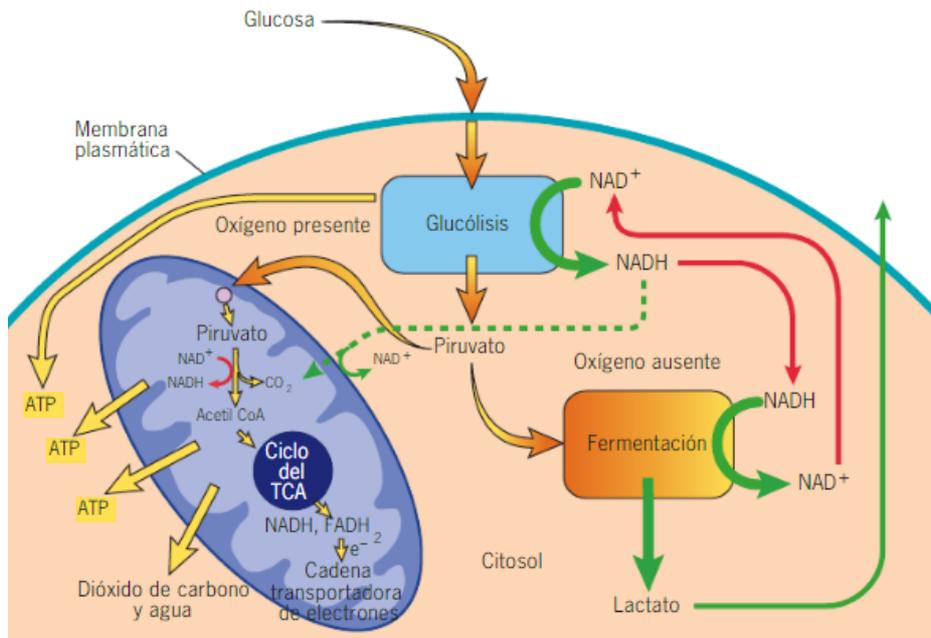


Figura 6. Respiración aerobia y anaerobia esquematizadas (Karp, 2019).

La cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna está formada por cuatro complejos más la ATP sintetasa (tabla 1) (Werner, 2008).

Complejos	Nomenclatura alternativa
I	NADH-ubiquinona oxidoreductasa
II	Succinato-ubiquinona oxidoreductasa
III	Ubiquinol-citocromo C oxidoreductasa
IV	Citocromo C oxidasa

Tabla 1. Nomenclatura de los complejos de la cadena transportadora de electrones (Kennaway *et al.*, 1990).

Además de los complejos, existen dos componentes móviles que actúan como co-sustratos para la transferencia de electrones: la ubiquinona, también denominada coenzima Q (dentro de la bicapa mitocondrial) y el citocromo C (en la superficie externa de la membrana interna) (Lobo-Jarne and Ugalde, 2018).

Los principales complejos en este proceso son el complejo I, III y IV. Aunque los tres funcionan bien de forma aislada, se organizan en conjuntos supramoleculares asociados de forma débil conocidos como supercomplejos (figura 7). El respirasoma es un supercomplejo que contiene los complejos I, III y IV más los portadores móviles de electrones, constituyendo la entidad más simple con capacidad de producir la respiración. Se cree que esta asociación ocurre para conferir ventajas funcionales sobre el sistema respiratorio (Hirst, 2018).

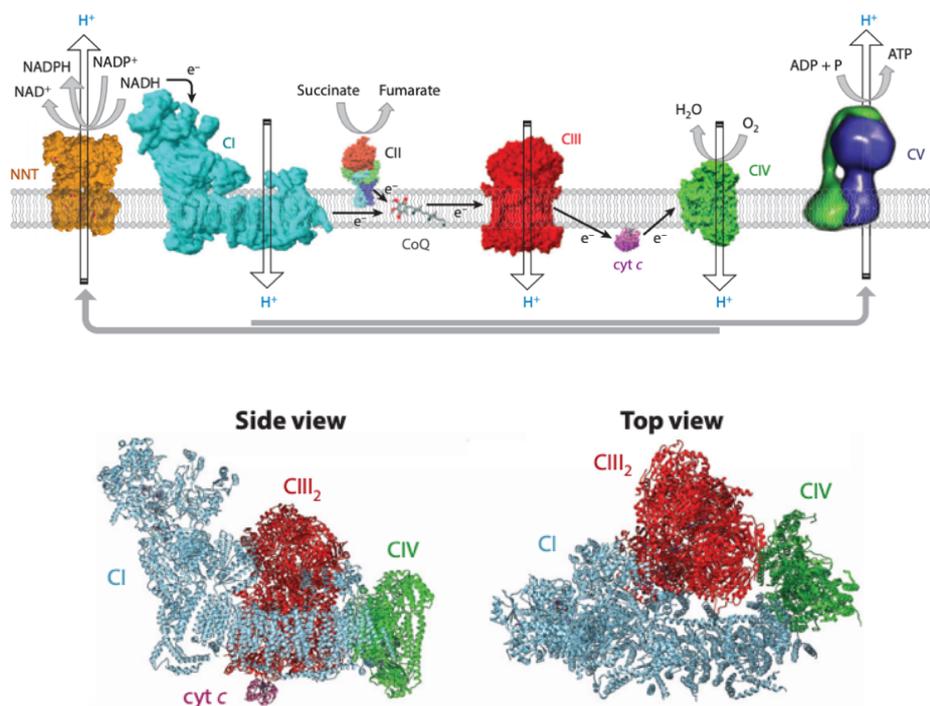


Figura 7. Complejos de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna (Enríquez, 2016).

El NADH y el FADH₂, transfieren sus electrones al complejo I y II (oxidación), respectivamente (Lobo-Jarne and Ugalde, 2018). El coenzima Q absorbe los electrones de ambas fuentes y los transfiere al complejo III, después pasan al citocromo C y finalmente pasan al complejo IV (Chen and Zweier, 2014). El aceptor final es el oxígeno

(O₂) que entra dentro de la mitocondria, recibe los electrones (reducción) y forma dos moléculas de agua por cada cuatro electrones recibidos (Chen and Zweier, 2014; Enríquez, 2016).

Este flujo de electrones está acoplado a una bomba de protones que hace que se genere un gradiente electroquímico desde la matriz al espacio intermembrana, proporcionando la energía libre necesaria para que la ATP sintetasa forme las moléculas de ATP a través de un proceso de fosforilación oxidativa. Durante este proceso, los protones intermembrana salen por la ATP sintetasa hacia la matriz mitocondrial y hacen que el adenosín difosfato y el fosfato inorgánico (ADP+Pi) se conviertan en ATP, el cual sale de la mitocondria (Alberts, 2014; Enríquez, 2016), obteniéndose así un balance final de aproximadamente 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa (Tarasov *et al.*, 2012). Toda esta energía producida es usada en vitales procesos biológicos como la contracción de los músculos, el impulso nervioso, la muerte celular programada, la inmunidad innata, la respuesta al estrés celular, entre muchos otros (Manoli *et al.*, 2007; Dard *et al.*, 2020).

En condiciones anaerobias (falta de oxígeno), no se produce fosforilación oxidativa y el NADH que se produce a partir del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺) en la glucólisis se acumula disminuyendo así el NAD⁺ disponible. Por ello, la célula oxida este NADH acumulado fuera de la mitocondria transformando el piruvato en lactato, reponiendo así el NAD⁺ necesario para la glucólisis (figura 6). Por tanto, el piruvato no pasa al ciclo de Krebs, pero se consigue de esta forma que se continúe la glucólisis y se produzca algo de ATP gracias a ella (Granchi *et al.*, 2010; Karp, 2019).

b) Otras funciones mitocondriales:

Las mitocondrias están involucradas en otros eventos biológicos de equiparable relevancia a la producción energética. A través de su capacidad para regular mediadores de señalización clave como las ROS y otras moléculas, y a través de su interacción con el RE y otras estructuras celulares, las mitocondrias son capaces de controlar muchos procesos de señalización. Dentro de estos procesos se encuentran el envejecimiento y el cáncer pero también la especificación del linaje o la epigenética (Tait and Green, 2012; Harvey, 2019).

Entre sus funciones más importantes destacan la generación de ROS, la regulación térmica, el transporte de calcio, la respuesta inmune, la biosíntesis de moléculas y hormonas, la respuesta al estrés y la muerte celular. A continuación, se describen brevemente cada una de ellas:

- **Producción de ROS:** la mayoría de las ROS celulares son formas parcialmente reducidas de O₂ molecular y sus derivados, que se originan por reducción enzimática de O₂ molecular o como consecuencia de un proceso de reducción incompleto por la fuga de electrones en la cadena transportadora de electrones. Estas ROS son esenciales para una amplia variedad de procesos biológicos dependientes de señalización redox como la regulación de la biogénesis mitocondrial, la adaptación a la hipoxia, la autofagia, la inmunidad y la diferenciación celular. Sin embargo, cuando hay una producción excesiva de ROS y un fallo del equilibrio de los sistemas de enzimas antioxidantes (como la enzima superóxido dismutasa, que transforma estas ROS a peróxido de hidrógeno + O₂) se produce estrés oxidativo (desequilibrio del estado redox) contribuyéndose a la destrucción de estructuras celulares y a una serie de procesos patológicos que incluyen, el envejecimiento o la apoptosis (Handy and Loscalzo, 2012; Injury *et al.*, 2012; Papa *et al.*, 2012; Islam, 2017; Dard *et al.*, 2020). Además, las mitocondrias dañadas por ROS tienden a producir más ROS (Handy and Loscalzo, 2012).
- **Regulación térmica:** la capacidad de las mitocondrias de generar calor se atribuye entre otros mecanismos a la proteína transmembrana mitocondrial desacoplante-1 (UCP1). Se trata de un portador de iones que, usando ácidos grasos libres como sustrato, desacopla la respiración de la síntesis de ATP. En este proceso una pequeña cantidad de protones no pasan por la ATP sintetasa y se produce una fuga de protones hacia la matriz mitocondrial sin la generación de ATP. Esto hace que parte de la energía liberada por la fosforilación oxidativa se libere en forma de calor (Hofmann *et al.*, 2001; Dard *et al.*, 2020).

- **Transporte de calcio:** la señalización de calcio regula varios procesos fisiológicos, como la contracción muscular o la secreción y la migración celular, y es esencial para mantener la función y supervivencia celular y el metabolismo mitocondrial. El RE y las mitocondrias son las principales reservas de calcio. Las mitocondrias absorben y liberan calcio dependiendo de sus necesidades metabólicas, siendo el gradiente electroquímico en la membrana interna la fuerza impulsora del transporte del calcio a través de esta.

En condiciones patológicas de sobrecarga de calcio, las mitocondrias pueden absorber grandes cantidades de calcio, lo que conduce a la producción de ROS y a la muerte celular a través de la necrosis (Romero-Garcia and Prado-Garcia, 2019; Dard *et al.*, 2020; Gibhardt *et al.*, 2020).

- **Respuesta inmune:** las mitocondrias pueden regular la activación, la diferenciación y la supervivencia de las células inmunes a través de señales de ADNmt, de ROS, de metabolismo o de dinámica mitocondrial. Además, actúan como mediadores clave de procesos inmunes innatos y adaptativos.

Las alteraciones en la actividad mitocondrial y los cambios transcripcionales adjudican diferentes roles a las células inmunes. Además, las mitocondrias son capaces de activar la respuesta inflamatoria y, a través de la fisión y la fusión, pueden influir en las funciones inmunitarias.

Por último, su asociación con el RE puede influir de igual forma en el metabolismo de las células inmunes (Koch *et al.*, 2017; Angajala *et al.*, 2018; Dard *et al.*, 2020).

- **Participación en biosíntesis de grupos hemo, hormonas esteroideas y aminoácidos:** los grupos hemo son tetrapirroles que desempeñan papeles esenciales, ya que sirven como grupos prostéticos de proteínas involucradas en procesos biológicos redox (Dard *et al.*, 2020).

Por otro lado, las hormonas esteroides (como glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos y andrógenos, entre otros), están formadas a partir de colesterol mediante vías biosintéticas en las que participan enzimas mitocondriales (Dard *et al.*, 2020).

Además, las mitocondrias desempeñan un papel central en la homeostasis de los aminoácidos (Johnson *et al.*, 2014).

- **Respuesta celular al estrés:** en las células se produce un equilibrio de parámetros intracelulares que se ve constantemente alterado por factores internos y externos (factores estresantes). Estos estresores son, por ejemplo, alteraciones en genes mitocondriales y nucleares, privación o exceso de nutrientes, alteraciones en la homeostasis del calcio, aumento de ROS o toxinas, etc. La respuesta al estrés es el proceso, desencadenado por estresores, que se produce para restaurar la homeostasis.

Estos sistemas de respuesta requieren de un alto aporte energético, en gran parte proporcionado por las mitocondrias (Eisner *et al.*, 2018; Picard and McEwen, 2018; Picard *et al.*, 2018). La dinámica mitocondrial y el contenido de ADNmt, entre otros, están involucrados en estos procesos (Dorn *et al.*, 2015; Picard and McEwen, 2018; Picard *et al.*, 2018; Valera-Alberni and Canto, 2018). Además, las mitocondrias también están involucradas en el estrés dirigido a otros componentes celulares, lo que refleja su papel clave en la supervivencia y adaptación celular (Lee and Wei, 2005; Eisner *et al.*, 2018; Picard and McEwen, 2018; Picard *et al.*, 2018).

Por otro lado, la interacción de las mitocondrias con otros orgánulos (como el RE) y el núcleo también juegan un papel importante.

Los factores externos e internos que afectan negativamente al RE, la síntesis de proteínas y el procesamiento de proteínas, producen un estrés denominado estrés del RE, que hace que las proteínas mal plegadas se acumulen en el RE. Ante esto, las células tienen un sistema de restauración de la función normal del RE que comprende mecanismos como la respuesta a proteína desplegada (UPR) y la autofagia y la biogénesis mitocondrial, entre otros. La actividad concertada de todos estos procesos determina el grado de estrés y decreta si las células restablecerán la homeostasis o activarán los programas de muerte celular. En ovocitos y embriones, esto puede conducir a un paro del desarrollo y cambios epigenéticos (Stack *et al.*, 2008; Latham, 2017).

Asimismo, las mitocondrias también tienen un sistema de respuesta transcripcional propio denominado respuesta mitocondrial a proteína desplegada (UPR^{mt}). Esta

respuesta se produce por múltiples formas de disfunción mitocondrial y está regulada por la comunicación mitocondria-núcleo. La UPR^{mt} promueve la supervivencia celular y la recuperación mitocondrial a través de adaptaciones metabólicas y de la biogénesis mitocondrial con el fin de asegurar una función celular óptima. Sin embargo, una activación prolongada de la UPR^{mt} puede conducir a la propagación de genomas mitocondriales deletéreos y daño mitocondrial que pueden contribuir al deterioro orgánico asociado a la edad (Shpilka and Haynes, 2018).

Otro mecanismo de respuesta a estrés controlado por la comunicación entre la mitocondria y el núcleo es la epigenética. La producción de metabolitos mitocondriales regula la acetilación de histonas y la metilación del ADN nuclear. Estos procesos crean marcas epigenéticas que regulan la expresión de los genes con el objetivo de ajustar la homeostasis celular en respuesta a los requerimientos energéticos. Sin embargo, estos cambios epigenéticos pueden ser útiles a corto plazo para superar el estrés (asociado al cultivo in-vitro por ejemplo), pero pueden tener consecuencias a largo plazo (Cagnone and Sirard, 2016).

- **Muerte celular:** las mitocondrias tienen un papel central en la muerte celular por apoptosis, aunque también están involucradas en otros mecanismos de muerte celular como la necrosis.

Existen dos principales vías de señalización apoptóticas: la vía extrínseca, que funciona mediante receptores; y la vía intrínseca, o mitocondrial. Ambas señalizaciones se producen vía caspasas (Bock and Tait, 2020; Dard *et al.*, 2020).

El evento desencadenante en la apoptosis mediada por mitocondrias es la permeabilización de la membrana externa (Dard *et al.*, 2020). Esta permeabilización es impulsada por miembros efectores proapoptóticos de la familia de proteínas BCL-2 (BAX y BAK). Durante la permeabilización de la membrana externa se liberan proteínas solubles del espacio intermembrana mitocondrial. Una de ellas es el citocromo C que se une al factor activador de proteasa apoptótica 1 (APAF1), formando un complejo llamado apoptosoma. Este apoptosoma, activa la vía de caspasas lo que conduce a la muerte celular. Normalmente, la permeabilización de la membrana externa es efectiva incluso en ausencia de actividad caspasa por lo que

se considera un punto sin retorno en la ejecución de la apoptosis (Bock and Tait, 2020; Dard *et al.*, 2020).

La mitocondria en el embrión humano

La mitocondria tiene una herencia uniparental vía materna. Las mitocondrias paternas son ubiquitinizadas y degradadas después de su entrada en el ovocito. Se piensa que esto ocurre para proteger al embrión de mutaciones causadas por la alta exposición a ROS durante la espermatogénesis (Sutovsky *et al.*, 2000) o para evitar altos niveles de heteroplasmia en el ovocito (Babayev and Seli, 2015).

La mayoría de los estudios en embriones de mamíferos concluyen que no hay aumento del contenido mitocondrial (considerando el ADNmt como representación del número de mitocondrias) hasta la etapa de blastocisto o que al menos la relación entre síntesis y degradación se mantiene durante el desarrollo preimplantacional (figura 8).

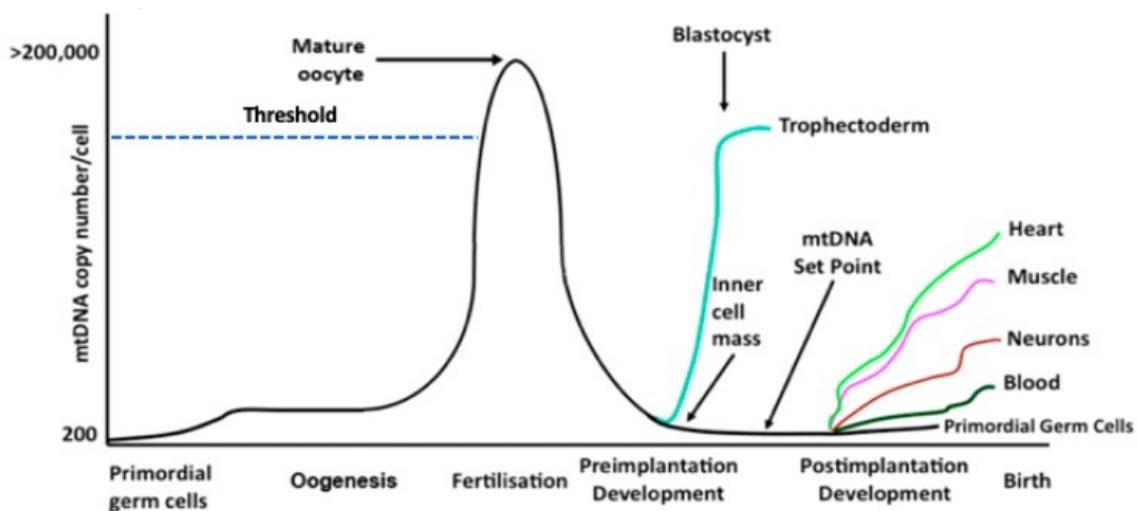


Figura 8. Contenido de ADNmt por célula durante el desarrollo embrionario preimplantacional y posimplantacional (St John, 2019).

Por lo tanto, el ovocito parece ser la fuente principal de mitocondrias para todo el desarrollo embrionario previo a la implantación, dividiendo su contenido mitocondrial

de forma asimétrica entre las nuevas células a lo largo de las divisiones embrionarias y definiendo la capacidad bioenergética que tendrá el embrión para desarrollarse correctamente tras la fecundación (Pikó and Taylor, 1987; May-Panloup *et al.*, 2005; Thundathil *et al.*, 2005; El Shourbagy *et al.*, 2006; Spikings *et al.*, 2007; Van Blerkom, 2009; Hashimoto *et al.*, 2017).

El ovocito humano es la célula que contiene un mayor número de mitocondrias (Bayram *et al.*, 2017). Las oogonias contienen aproximadamente 200 mitocondrias (Seli, 2016). Este número aumenta a 10.000 en los ovocitos primordiales (Harvey, 2019), alcanzándose unas 100.000 mitocondrias en el ovocito maduro MII (un número alto para los bajos requisitos de ATP al inicio del desarrollo embrionario). Además, el número de copias de ADNmt por ovocito varía intra- e inter- paciente con intervalos reportados de 20.000-1.550.000 (Gardner *et al.*, 2000; Barritt *et al.*, 2002; Chiaratti *et al.*, 2010; Seli, 2016; Harvey, 2019).

Hay estudios que indican que la replicación del ADNmt de los ovocitos se completa en la etapa de vesícula germinal (Barritt *et al.*, 2002). Durante la producción de ovocitos primarios el contenido de ADNmt se reduce drásticamente, mientras que la maduración del ovocito está asociada con una rápida replicación de esta población de ADNmt. Este evento de restricción-amplificación, denominado cuello de botella, varía entre especies y aun no está del todo descifrado, pero parece que ocurre para transmitir un contenido de ADNmt homoplásmico de mayor calidad y además produce una reducción o amplificación accidental de la tasa de mutaciones puntuales que se transmite a la descendencia (Taylor and Turnbull, 2005; May-Panloup *et al.*, 2007; Chappel, 2013; Zhang *et al.*, 2018).

Es importante destacar que la mayoría de los estudios realizados hasta ahora sobre el contenido de ADNmt de ovocitos humanos se han realizado en ovocitos desechados y/o con un cultivo in-vitro extendido, por lo que solo se dispone de datos limitados con respecto a especímenes no envejecidos in-vitro y de buena calidad morfológica (Steuerwald *et al.*, 2000; Reynier *et al.*, 2001; Barritt *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2006; May-Panloup *et al.*, 2007).

Se ha comprobado que los ovocitos con buena calidad, que contienen un número óptimo de mitocondrias y niveles de ATP de al menos 2 pM, producen blastocistos de

mayor calidad (Chappel, 2013). Por tanto, es lógico pensar que se requiera un número mínimo y bastante alto de mitocondrias en el ovocito maduro para sustentar el aporte energético durante el desarrollo embrionario. No obstante, se ha propuesto que un número demasiado elevado de mitocondrias en el ovocito puede producir incapacidad de regular la oferta y la demanda energética y puede generar ROS a niveles tóxicos para el desarrollo tras la fecundación (Van Blerkom, 2004; Takeuchi *et al.*, 2005; Chappel, 2013; Babayev and Seli, 2015; Itami *et al.*, 2018).

La maduración del ovocito se produce por una maduración nuclear (extrusión del primer corpúsculo) y citoplasmática. Se cree que la actividad mitocondrial tiene un papel fundamental en el retraso de la maduración citoplasmática, el cual puede provocar una mayor tasa de aneuploidías y está directamente relacionado con una disminución en la tasa de embarazo (Wang *et al.*, 2009; Chappel, 2013).

Por otro lado, las mitocondrias en el ovocito están involucradas en la regulación de las oscilaciones de calcio durante la fecundación (Ajduk *et al.*, 2011; Dalton and Carroll, 2013). Se ha demostrado que el contenido de ADNmt es menor en los ovocitos que han sufrido un fallo de fecundación (Reynier *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006) y extremadamente bajo en ovocitos degenerados (Babayev and Seli, 2015). De hecho, existen datos que indican una disminución generalizada de la expresión de genes mitocondriales (ND2, COI, COII, ATPasa 6, COIII, ND3, ND6 y Cyt b) en ovocitos humanos con fallo de fecundación (May-Panloup *et al.*, 2007).

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, los embriones de mamífero expresan un nivel muy bajo o nulo de factores de replicación del ADNmt, por lo que se ha sugerido, como se comentó anteriormente, que el contenido de ADNmt se va repartiendo entre las células durante las divisiones (Thundathil *et al.*, 2005; El Shourbagy *et al.*, 2006; St. John *et al.*, 2010). Hasta ahora la aproximación en humanos solo ha sido abordada por Hashimoto *et al.* (2017). Los investigadores analizaron el contenido de ADNmt por espécimen y por célula en embriones humanos cultivados in-vitro. Observaron una disminución transitoria del contenido total de ADNmt por espécimen a lo largo de las divisiones durante el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto, estadio en el que observaron un importante aumento del contenido. Según los investigadores, este contenido de ADNmt se iba repartiendo entre las células que

componen el embrión a lo largo del desarrollo embrionario, incluyendo el cambio de estadio a blastocisto (figura 9).

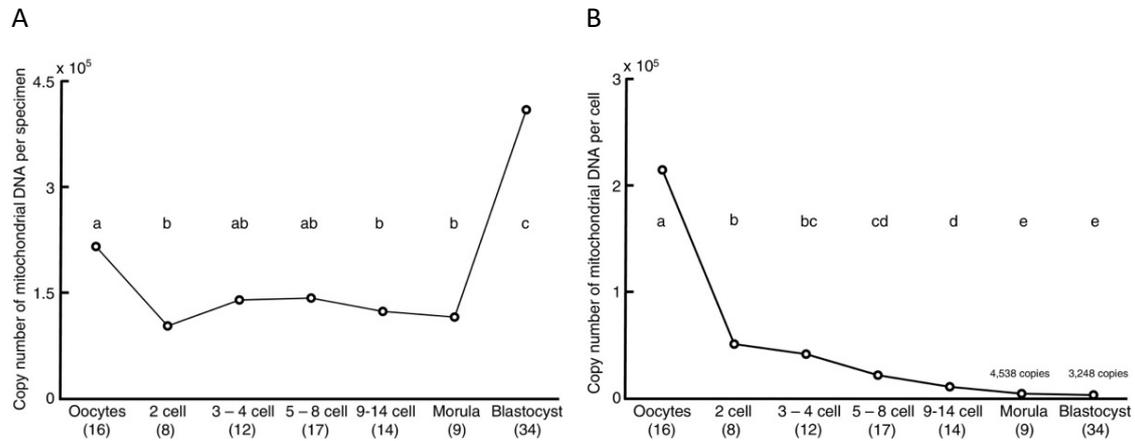


Figura 9. Contenido de ADNmt A) por espécimen y B) por célula durante el desarrollo embrionario humano (Hashimoto et al., 2017).

A pesar de que la literatura indica que en mamíferos en general no existe replicación de ADNmt durante el periodo preimplantacional, hay estudios que señalan la existencia de **variación en el contenido de ADNmt entre blastocistos individuales, sugiriendo también un posible inicio de replicación del ADNmt previo a la implantación.** La razón de esta **variación no está aún clara, pero puede que se deba a que el inicio de la replicación de ADNmt comience antes en algunos blastocistos por diferencias en el contenido de factores codificados por el núcleo requeridos para la replicación del ADNmt** (Thundathil et al., 2005).

Lo que parece claro es que el contenido mitocondrial en el ovocito constituye la dote mitocondrial necesaria para las primeras etapas del desarrollo embrionario. A pesar de que su contenido no varíe, la dinámica mitocondrial permite que las mitocondrias se adapten a los requerimientos energéticos de cada etapa de desarrollo.

Los requerimientos energéticos del **ovocito durante su estancia en el folículo** son mínimos, allí se encuentra en un **ambiente anóxico y la energía que necesita es abastecida por glucólisis o importada de células de la granulosa a través de uniones tipo gap** (Van Blerkom, 2004).

En los ovocitos las mitocondrias están subdesarrolladas estructuralmente y, por lo general, tienen una apariencia esférica pequeña (< 0,5 μm de diámetro), con una matriz densa de electrones y crestas con escasa penetración en la matriz (figura 10). A pesar de tener esta configuración, tienen capacidad de producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (Van Blerkom, 2004, 2011; Sugimura *et al.*, 2012; Folmes and Terzic, 2015), pero esta actividad energética se considera relativamente débil con una baja producción de ATP. Además, las mitocondrias presentan un nivel de transcripción silenciado para mantener un número bajo de mutaciones en el ADNmt (Babayev and Seli, 2015).

Después de la fecundación, en las primeras etapas de desarrollo, predomina el consumo de piruvato, lactato y aminoácidos como sustratos para la obtención de energía (glucólisis). En este periodo embrionario predomina un perfil transcriptómico silenciado, con niveles de ARN mensajeros (ARNm) mitocondriales constantes, hasta la etapa de 4-8 células. En este estadio se produce una aceleración de la activación del genoma cigótico, que se asocia con la transición materno-embionaria en la que el embrión toma el control de su propio desarrollo (May-Panloup *et al.*, 2007; Cagnone and Sirard, 2016; Jukam *et al.*, 2017).

A lo largo de las divisiones embrionarias las mitocondrias sufren cambios de forma y estructura. En humanos, en el cambio de estadio de mórula a blastocisto, las mitocondrias cambian progresivamente su forma de esférica a elíptica con un aumento del número de crestas y una menor densidad de la matriz, alcanzándose en la etapa de blastocisto una configuración mitocondrial ortodoxa (figuras 3 y 10) (Sturmey *et al.*, 2008; Van Blerkom, 2011; Guerif *et al.*, 2013; Hashimoto *et al.*, 2017). Esta nueva configuración coincide con un aumento de la fosforilación oxidativa pero también con un metabolismo de la glucosa por glucólisis aerobia como medida complementaria para la producción energética a baja tensión de oxígeno (Sathananthan and Trounson, 2000; May-Panloup *et al.*, 2007, 2021; Wilding *et al.*, 2009; Chiaratti *et al.*, 2010; Krisher and Prather, 2012; Harvey, 2019).

A este metabolismo de glucólisis aerobia (similar al del cáncer) se le denomina efecto Warburg (Al-Azzam, 2020) y se basa en utilización de la glucosa para producir lactato a pesar de que exista una presencia suficiente de oxígeno en el útero (Gardner *et al.*, 2000). Este tipo de metabolismo de glucólisis aerobia proporciona componentes para el

anabolismo y limita la producción de ROS en el embrión. No obstante, a pesar de que tras la activación del genoma embrionario este tipo de glucólisis aeróbica es necesaria, una sobreexpresión debido a una perturbación mitocondrial durante el cultivo podría comprometer la respuesta al estrés del embrión (Cagnone and Sirard, 2016).

En la etapa de blastocisto expandido, las mitocondrias en el trofoectodermo tienen una estructura y una capacidad energética totalmente desarrollada (Sathananthan and Trounson, 2000). Por lo tanto, a partir de la activación metabólica, el blastocisto se vuelve más dependiente de la actividad mitocondrial. De hecho, según los estudios derivados de ratón, el 85% del todo el ATP producido en el blastocisto es generado por las mitocondrias (Van Blerkom, 2004).

Esta diferencia morfológica y de actividad mitocondrial, probablemente refleja variaciones en la demanda de energía para el apoyo de actividades biosintéticas, la formación del blastocele, la eclosión de la zona pelúcida y la implantación, pero también puede desempeñar un papel en la regulación de la especificación celular a través de la regulación epigenética (Van Blerkom, 2004; Harvey, 2019).

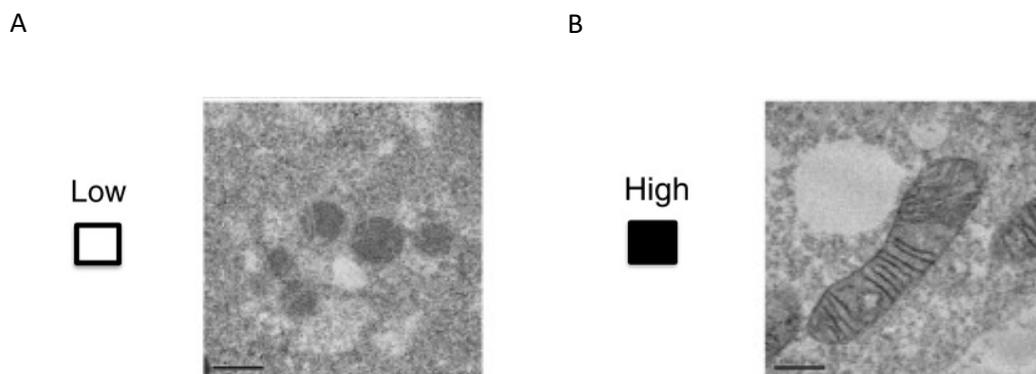


Figura 10. Morfología de mitocondrias con A) baja actividad metabólica (característica de ovocitos) y B) alta actividad metabólica (en mayor proporción en blastocistos). Microscopía electrónica de transmisión: aumentos = $\times 50.000$; barra escala = $0,5 \mu\text{m}$ (Hashimoto et al., 2017).

Es importante destacar que dentro del estadio de blastocisto la importancia de la función energética mitocondrial (respiración aeróbica) reside en las células del trofoectodermo. La masa celular interna (MCI) utiliza en menor medida el metabolismo oxidativo, protegiendo así la viabilidad del feto del estrés oxidativo y, usando en mayor

medida un metabolismo glucolítico (Gardner *et al.*, 2000; Van Blerkom *et al.*, 2002; Houghton, 2006; Leese *et al.*, 2008; Bause and Haigis, 2013; Zhao *et al.*, 2016; Hashimoto *et al.*, 2017). Además, se observa que existe un menor contenido de mitocondrias en la MCI en comparación con el trofoectodermo (Houghton, 2006), y parece que el trofoectodermo es el que adquiere en primer lugar la capacidad de replicar el ADNmt (figura 8). El contenido de ADNmt en la MCI es diluido durante las divisiones hasta que se reciben señales para la diferenciación a células específicas (Spikings *et al.*, 2007; St. John *et al.*, 2010; Hendriks *et al.*, 2019; St John, 2019).

La localización de las mitocondrias también cambia significativamente a lo largo del desarrollo embrionario. Esta movilidad depende de la actividad mitocondrial, así como de la integridad de la red citoesquelética. La movilidad mitocondrial sirve para cubrir los puntos de demanda de energía, facilitar la interacción con orgánulos y, debido al papel de los intermediarios metabólicos mitocondriales en la regulación del epigenoma, para mantener gradientes de señalización con el núcleo (Harvey, 2019). En los ovocitos humanos, las mitocondrias se agrupan homogéneamente en la etapa de vesícula germinal y heterogéneamente alrededor del huso meiótico en la corteza durante las meiosis. Finalmente, adquieren una distribución homogénea en la etapa de ovocito MII, la cual mantiene una regulación del calcio (dependiente de la actividad metabólica mitocondrial) y un aporte de ATP correctos durante la fecundación (Wang *et al.*, 2009; Ajduk *et al.*, 2011; Dalton and Carroll, 2013; Seli, 2016; Gibhardt *et al.*, 2020; Kirillova *et al.*, 2021).

Después de la fecundación, las mitocondrias se concentran alrededor de los pronúcleos para favorecer la singamia, garantizar una distribución uniforme de orgánulos entre las nuevas blastómeras y para sustentar energéticamente las divisiones celulares. Es en este punto donde las mitocondrias parecen intervenir, mediante comunicación nuclear y basándose en la disponibilidad de piruvato, en la regulación epigenética (Santos *et al.*, 2006; Harvey, 2019).

Tras cada división las mitocondrias se dispersan por el citoplasma, hasta que vuelven a reunirse alrededor del núcleo para la siguiente división (Santos *et al.*, 2006). La redistribución inadecuada de las mitocondrias puede afectar la correcta organización de

microtúbulos y el desarrollo del embrión por la ausencia de distribución de ATP alrededor del núcleo. De hecho, se ha demostrado que los embriones bloqueados tienen un número reducido de mitocondrias alrededor de los pronúcleos (May-Panloup *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009).

Debido a la relevancia de la mitocondria en todos estos aspectos, las disfunciones mitocondriales pueden contribuir a la activación de apoptosis en el desarrollo temprano (Van Blerkom, 2004). Por ejemplo, la ausencia de defectos en la mitocondria y su correcta función es crucial para el mantenimiento de la reserva ovárica y la calidad de los ovocitos. Varios estudios han demostrado que los defectos en las mitocondrias y, por lo tanto, en el suministro de ATP pueden estar asociados, como se ha apuntado anteriormente, con la maduración y el fracaso de la fecundación, así como con trastornos de segregación cromosómica, detención de la división celular, citocinesis anormal y fragmentación (May-Panloup *et al.*, 2007; Van Blerkom, 2011; Zhang *et al.*, 2019a, 2019b).

Además, la disfunción mitocondrial relacionada con el envejecimiento resulta en una energía celular ineficiente y puede afectar negativamente la viabilidad de los ovocitos y el desarrollo embrionario posterior (Igarashi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Se ha demostrado que los ovocitos de baja calidad tienen disfunciones mitocondriales propias de la edad materna avanzada, que incluyen la disminución del potencial de la membrana mitocondrial, el aumento de daño en el ADNmt, el aumento de aneuploidías cromosómicas, el aumento de la incidencia de apoptosis y cambios en la expresión génica mitocondrial. Esta afectación puede causar un alto nivel de retraso en el desarrollo y la detención de embriones (Wang *et al.*, 2009). Es por ello por lo que el estudio de las mitocondrias en mujeres de edad reproductiva avanzada ha sido de gran relevancia en los últimos años (Bentov *et al.*, 2011; Cimadomo *et al.*, 2018; Woods *et al.*, 2018).

Hay que señalar que, a pesar de que en el embrión coexisten la respiración anaerobia y aerobia, el embrión no puede depender de la respiración anaerobia en los casos en los que existe disfunción de la actividad mitocondrial, debido a la baja eficiencia de este

tipo de respiración y la inhibición que ejerce el producto final (Chappel, 2013). Por ello, se han estudiado y se encuentran en estudio distintas formas de mejorar la actividad mitocondrial sin resultados del todo concluyentes. Entre ellos están: a) la suplementación en la dieta con coenzima Q10 (portador de electrones), b) la transferencia de citoplasma de ovocitos sanos donados, c) la transferencia de huso meiótico, de pronúcleos o de corpúsculo polar a ovocitos sanos donados (Craven *et al.*, 2010; Chappel, 2013; Zhang *et al.*, 2017a, 2017c) y d) la transferencia a ovocitos de concentrados de mitocondrias de las células precursoras ovocitarias presentes en el tejido ovárico de la propia paciente (tecnología Augment) (Labarta *et al.*, 2019)..

En definitiva, todavía no se sabe en qué medida el contenido final de ADNmt en el embrión está condicionado por la masa mitocondrial inicial del ovocito y por su síntesis y degradación durante el desarrollo preimplantacional. Tampoco se conoce cómo estos parámetros pueden verse afectados por las condiciones de cultivo in-vitro.

A pesar de todas las dificultades de análisis y los hallazgos a veces desconcertantes respecto al papel de las mitocondrias en el desarrollo embrionario, se confía en que la importancia de este orgánulo en el embrión proporcionará respuestas a muchos procesos aún desconocidos y generará dianas terapéuticas o parámetros de uso clínico para mejorar los resultados relacionados con las técnicas de reproducción asistida (TRA).

Uso del contenido mitocondrial como indicador de la competencia embrionaria

A pesar de las muchas mejoras en las TRA, la tasa de embarazo después de los ciclos de fecundación in-vitro (FIV) sigue siendo baja, aproximadamente entre el 20% y el 30% (Zhang *et al.*, 2019c). Por lo tanto, en los últimos años, se han investigado varios marcadores que permiten la selección de embriones con un mayor potencial de implantación y viabilidad, con el objetivo de aumentar las tasas de éxito (Thompson *et al.*, 2016; Rosenwaks, 2017; May-Panloup *et al.*, 2021; Siristatidis *et al.*, 2021).

Uno de estos marcadores es el contenido de ADNmt por célula. Este parámetro (también denominado en algunos casos como Mitoscore®) puede ser cuantificado mediante RT-

PCR y otras técnicas como la hibridación de fluorescencia in situ (FISH) o la secuenciación de nueva generación (NGS) (Diez-Juan *et al.*, 2015; Viotti *et al.*, 2017).

La relevancia de la mitocondria en la célula en general y en el desarrollo embrionario en particular, fue la razón fundamental para centrarse en este orgánulo. Esto, junto con la relativa facilidad de medir su genoma a partir de las biopsias de trofoectodermo, hizo que se volvieran un objetivo clave dentro de la búsqueda de marcadores de selección embrionaria.

Con esta aproximación, numerosos grupos de investigación comenzaron a hacer estudios clínicos que correlacionaban el contenido de ADNmt con diferentes parámetros embrionarios y de éxito clínico (Tan *et al.*, 2014; Diez-Juan *et al.*, 2015; Fragouli, 2015; Fragouli *et al.*, 2016; Clément *et al.*, 2017; Treff *et al.*, 2017; Victor *et al.*, 2017; Viotti *et al.*, 2017; Wells and Ph, 2017; Ravichandran *et al.*, 2017; de los Santos *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2018; Klimczak *et al.*, 2018; Lledo *et al.*, 2018; Kim and Seli, 2019; Scott *et al.*, 2020).

Se observó que la tasa de implantación era mayor en embriones con contenido de ADNmt por célula más bajo, existiendo un umbral máximo de contenido de ADNmt por célula a partir del cual no se producía implantación embrionaria (embriones de día 3 de desarrollo con Mitoscore® > 160 y blastocistos de día 5 de desarrollo con Mitoscore® > 60) (Diez-Juan *et al.*, 2015).

En base a estos hallazgos se comenzó a tener en cuenta el contenido de ADNmt por célula para la priorización de embriones euploides en la transferencia embrionaria, seleccionándose así los de menor contenido de ADNmt por célula para transferir.

No obstante, el incremento de estudios similares dio lugar a resultados muy contradictorios y esto hizo que se comenzara a perder la confianza en este marcador. Había aproximaciones en las que los investigadores coincidían en mayor medida como la relación de los niveles altos de contenido de ADNmt y el estado aneuploide o la baja calidad embrionaria, sin embargo, se encontraron resultados contradictorios en lo relativo al contenido de ADNmt y la implantación evolutiva (tabla suplementaria 1).

La falta de estandarización en la cuantificación del contenido de ADNmt entre laboratorios y la escasez de nociones respecto al significado biológico de su contenido y

su representación del estado mitocondrial en el embrión humano, se postulan como posibles causas de las discrepancias encontradas entre estudios.

Justificación

La tecnología de FIV se ha convertido en una opción muy valiosa para muchas parejas infértiles.

Se estima que hay más de 8 millones de bebés nacidos con TRA (Adamson, 2018), con aproximadamente 400.000 nacimientos al año (Faddy *et al.*, 2018), aunque este número va en aumento.

A pesar de las muchas mejoras en las tecnologías de RA, la tasa de embarazo después de los ciclos de FIV sigue siendo baja, aproximadamente entre el 20% y el 30% (Zhang *et al.*, 2019c). Esta tasa depende de muchos factores, como la edad del ovocito, la reserva ovárica, el estilo de vida de los pacientes, etc.(O'Flynn, 2014), y su mejora se ha convertido en el objetivo de la comunidad científica especializada en este campo.

Por lo tanto, en los últimos años, se han investigado varios marcadores que permiten la selección de embriones con un mayor potencial de implantación y viabilidad, con el objetivo de aumentar las tasas de éxito (Thompson *et al.*, 2016; Rosenwaks, 2017; May-Panloup *et al.*, 2021; Siristatidis *et al.*, 2021).

Entre los marcadores estudiados, se encuentra el número de copias de ADNmt por célula, que se puede cuantificar mediante técnicas como la FISH, la RT-PCR o el NGS (Diez-Juan *et al.*, 2015; Viotti *et al.*, 2017).

Sin embargo, existe escasa información acerca del patrón del contenido de ADNmt durante el desarrollo embrionario, y sobre si este parámetro puede ser un indicador del contenido y del estado de actividad mitocondrial en los blastocistos humanos. Tampoco hay estudios que analicen específicamente si el contenido de ADNmt puede variar en el periodo previo a la implantación debido a factores externos. Estas cuestiones son básicas para mejorar el conocimiento sobre los requisitos embrionarios in-vitro y para poder establecer el alcance de la representatividad del ADNmt respecto al estado mitocondrial real en el embrión. Estos estudios son necesarios de cara a poder demostrar la fiabilidad del ADNmt como marcador de competencia embrionaria (Sanchez *et al.*, 2018).

El presente estudio es de tipo prospectivo observacional realizado con muestras obtenidas de pacientes que se realizaron un TRA con PGT-A y de pacientes donantes de ovocitos que se hicieron un tratamiento en el Instituto valenciano de infertilidad-Reproductive Medicine Associates (IVIRMA) Global de Valencia (España) entre 2017 y 2019.

Este estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida (CNRHA); la subdirección general de investigación, innovación, tecnología y calidad; y por el comité de revisión institucional, el comité de ética de investigación de la Clínica IVIRMA Valencia (código de estudio: 1606-VLC-047-MD/ IVIRMA Valencia, S.L), que cumple con la ley española sobre TRA (14/2006).

Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es analizar el contenido y el estado mitocondrial en el embrión humano para esclarecer las causas que expliquen la falta de consenso sobre el uso del contenido de ADNmt del blastocisto humano como marcador de competencia embrionaria.

Para ello, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1. Caracterizar el contenido y el patrón de distribución del ADN mitocondrial durante el desarrollo embrionario humano preimplantacional.

Objetivo específico 2. Describir el contenido de ADN mitocondrial y el estado mitocondrial en embriones humanos bajo condiciones de estrés.

Objetivo específico 3. Identificar la relación existente entre el contenido de ADN mitocondrial por célula y la masa y la actividad mitocondrial en el blastocisto humano.

Procedimientos y técnicas de análisis

Las características demográficas y clínicas de las pacientes se recogen en la tabla suplementaria 2.

Estimulación ovárica

Las donantes y las pacientes de FIV fueron tratadas en su mayoría con un protocolo de antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) utilizando hormona foliculoestimulante recombinante (FSH_r, Gonal-F, Serono o Puregon, Merck Sharp and Dohme, EEUU) combinada con gonadotropina menopáusica humana (hMG, Menopur, Ferring, Suiza). El antagonista de la GnRH (ganirelix, Orgalutran; Organon, Países bajos) se administró diariamente a partir del día 5 o 6 después de la administración de gonadotropina o cuando los folículos alcanzaron un diámetro de 14 mm. Cuando al menos tres folículos alcanzaron un tamaño medio de 18 mm, la ovulación se desencadenó mediante la administración de una dosis única de triptorelina (Decapeptyl, Ipsen Pharma, EEUU) o mediante el uso de gonadotropina coriónica humana (hCG, Ovitrelle, Serono Laboratories, Merck, Alemania).

Recuperación de ovocitos, inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y condiciones de cultivo embrionario

La recuperación de ovocitos se realizó bajo guía ecográfica 36 horas después de la inyección desencadenante. A continuación, se realizó el ICSI en los ovocitos metafase II, salvo en los que fueron analizados sin fecundar.

Los embriones se cultivaron individualmente con 6% de CO₂, 5% de O₂ y 89% de N₂ a 37 °C en gotas de 50 µl de Sydney IVF Cleavage Medium (Cook, EEUU) y Sydney IVF Blastocyst Medium (Cook, EEUU). El control de calidad se realizó diariamente con sondas externas verificadas para mediciones de CO₂, O₂ y temperatura siguiendo las normas de la International Organization for Standardization, 9001 (ISO 9001).

Vitrificación y desvitrificación embrionaria

Los procedimientos de vitrificación y desvitrificación se realizaron mediante el método de Kitazato (Japón) tal y como está descrito en la bibliografía (Cobo *et al.*, 2010). En resumen, los ovocitos y embriones se equilibraron a temperatura ambiente en 7,5% (volumen/volumen) de etilenglicol + 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) en medio de cultivo de tejidos M 199 (TCM199) + 20% de sustituto de suero sintético. Después de su reexpansión, los ovocitos y embriones se transfirieron a la solución de vitrificación que consiste en una solución igual a la anterior, pero con otras concentraciones: 15% de etilenglicol + 15% de DMSO + sacarosa 0,5 M. Después de 1 minuto en esta solución, se colocaron en el dispositivo Cryotop usando un volumen mínimo y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido.

Para la desvitrificación, el Cryotop se retiró del nitrógeno líquido y se colocó en una solución compuesta por sacarosa 1,0 M en medio TCM199 + 20% de sustituto de suero sintético, a 37 °C. Después de 1 minuto, los embriones se transfirieron a otra solución que contenía sacarosa 0,5 M en medio TCM199 + 20% de sustituto de suero sintético, a temperatura ambiente durante 3 minutos.

Finalmente, después de dos lavados de 5 y 1 minuto cada uno en medio TCM199 + 20% de sustituto de suero sintético, los embriones se cultivaron en las condiciones requeridas para cada experimento.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Para determinar el número de copias de ADNmt, las muestras se recogieron y se enviaron a Igenomix, S.L para su cuantificación por RT-PCR con el sistema de amplificación de ADN SurePlex (Illumina, San Diego, California, EEUU).

Un producto de PCR estándar externo (ATP8) de 120 pares de bases (pb) que comprende fragmentos de ADNmt (8441-8532 pb) se clonó en un vector PCr2.1-TOPO. El plásmido se purificó luego y se empleó una curva estándar usando un número de copias de plásmido definido para normalizar el número de copias de ADNmt. Para estandarizar la cuantificación de ADNmt después de la amplificación de ADN, se utilizó un control

genómico interno para la normalización. Se usaron diluciones en serie de ADN genómico humano (SureRef DNA, 415203; BlueGnome), calculando 6.6 pg por genoma humano diploide, y se utilizó la amplificación de β -actina para generar una curva estándar. Esta secuencia de β -actina no es única, aparece 22 veces en el genoma humano con una longitud del producto de 116 pb en todos los amplicones y en diferentes cromosomas. La RT-PCR se realizó por triplicado usando LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I (Roche, Suiza) en un LightCycler 480 (tabla 2) (Diez-Juan *et al.*, 2015).

Gen		Secuencia del primer
ATP8	Forward	CTAAAAATATTAAACACAAACTACCACCTACCTC
	Reverse	G TTCATTTTGGTTCTCAGGGTTTGTATAA
β -actina	Forward	AGCGGGAAATCGTGCGTGAC
	Reverse	AGGCAGCTCGTAGCTCTTCTC

Tabla 2. Descripción de los primers utilizados para la cuantificación de ADNmt por RT-PCR.

El contenido de ADNmt se calculó de dos maneras: el contenido total de ADNmt por espécimen se refiere a un valor del número de copias de ADNmt relativizado a la eficiencia de la RT-PCR después de la estandarización, y el contenido de ADNmt por célula se refiere a un valor de contenido de ADNmt normalizado utilizando la eficiencia de la RT-PCR en ADNmt y β -actina.

Por lo tanto, el contenido de ADNmt por espécimen y por célula no se puede comparar utilizando valores absolutos.

Secuenciación de ácido ribonucleico (RNA-seq)

El primer paso para la realización del experimento fue la recogida de las muestras (figura 12). Tras la desvitrificación se realizó la inclusión de las muestras en 2 µl de 10X Reaction Buffer del kit SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara Bio, EEUU) con las condiciones necesarias para evitar la degradación del ARN durante el proceso (radiación UV del material, mascarilla, guantes, etc.). Las muestras se almacenaron a -80 °C por un breve periodo de tiempo.

El paso de conversión de ARNm a ADN complementario (ADNc) se realizó siguiendo el protocolo de SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing que utiliza cebadores Oligo (dT). El ADNc se sintetizó con el 3'SMART-Seq CDS primer II (Clontech, EEUU) y se amplificó por PCR (17 ciclos) a partir de 10 pg de ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc amplificado se purificó usando esferas magnéticas AMPure XP (Illumina, EEUU) y se cuantificó con Qubit Fluorometric Quantification (ThermoFisher, EEUU). La integridad del ADNc se verificó con un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, EEUU, figura 11). A continuación, se fragmentó 1 ng de ADNc por muestra y, por último, se construyeron las librerías utilizando la preparación de muestras de ADN NexteraXT (Illumina, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

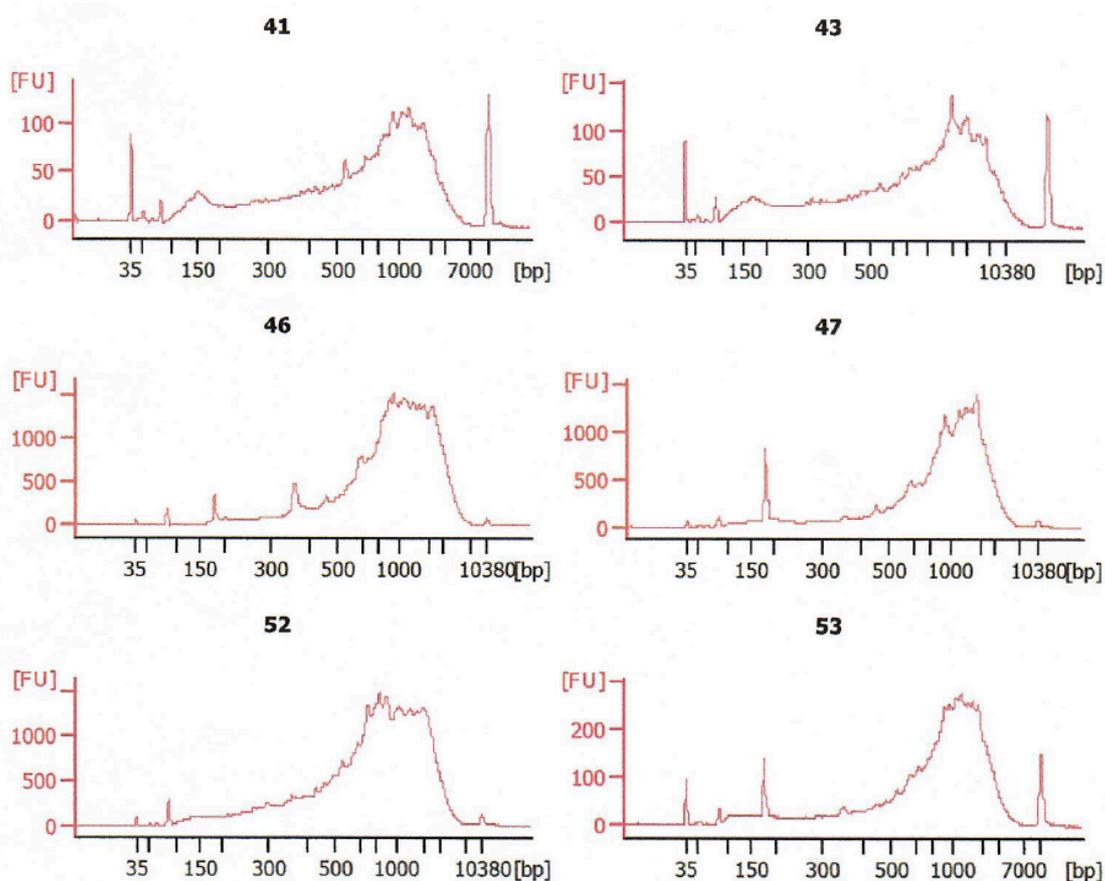


Figura 11. Ejemplos del perfil de integridad del ADNc en varias muestras antes de la creación de las librerías (bioanalizador 2100). Se observan fragmentos de aproximadamente 1000 pb con suficiente integridad en todas las muestras.

Se incluyeron códigos de barras y adaptadores en las librerías para secuenciar e identificar todas las muestras. Las muestras se cuantificaron con Qubit y se volvió a analizar la integridad utilizando un bioanalizador 2100. Se generaron dos pools de ARN con la misma concentración de ARN por muestra (5 nM) y se analizó la integridad de ambos con un bioanalizador 2100 (tabla 3). Posteriormente fueron enviados a un servicio de secuenciación (Imegen, S.L).

Pool	Cuantificación ADNc (Qubit)	Tamaño medio
1	1,87 ng/μl	534 pb
2	1,72 ng/μl	547 pb

Tabla 3. Cuantificación y análisis de integridad del ADNc en los dos pools creados para la secuenciación de ARN de todas las muestras (Qubit y bioanalizador 2100).

La secuenciación se realizó por duplicado, con un total de cuatro ejecuciones utilizando un equipo Illumina NextSeq 500 (Illumina, EEUU) con una longitud de lectura de 300 nt en un diseño paired-end (fragmentos de 150 pb). Se utilizó FastQC para comprobar la calidad de los datos de secuencia sin procesar. Los fragmentos que no cumplían con los requisitos de calidad se filtraron con Trimmomatic.

La alineación y la cuantificación se realizaron con el algoritmo de Salmon (genoma de referencia GRCh38).



Figura 12. Diagrama de flujo del proceso de RNA-seq.

Todos los datos de secuenciación sin procesar se enviaron al repositorio Gene Expression Omnibus (GEO) con el número de acceso GSE185322, como prueba de la calidad científica del análisis transcriptómico.

Microscopía confocal

a) Análisis del contenido de mitocondrias totales y activas mediante tinción en blastocistos:

Para determinar los marcadores fluorescentes más adecuados para la tinción del núcleo celular y las mitocondrias totales y activas, se realizó un análisis bibliográfico. Se probaron distintos tintes y algunos se descartaron por la dificultad de tinción del tipo celular de estudio. Finalmente se seleccionaron los siguientes marcadores:

- 4',6-diamidino-2-fenilindol (Dapi) (Sigma-Aldrich, EEUU): marcador fluorescente que se une a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN (Kapuscinski, 1979). Sólo se usó para facilitar la identificación de las células.
- Nonil-naranja de acridina (Invitrogen™, EEUU): marcador para la tinción de las mitocondrias totales ya que se une a las cardiolipinas en la membrana interna de todas las mitocondrias independientemente de su estado de activación energética (Maftah *et al.*, 1989).
- MitoTracker Deep Red (Invitrogen™, EEUU): marcador a base de carbocianina que se une a los grupos tioles en la mitocondria y fluoresce en su ambiente activo. Solo representa el número de mitocondrias activas, su intensidad de fluorescencia no representa el nivel de actividad de cada mitocondria (Thermo Fisher Scientific, 2010; Greene *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2018; Chandramouleeswaran *et al.*, 2020).

Una vez seleccionados los tintes, se realizó una búsqueda bibliográfica de las concentraciones y tiempos de incubación más adecuados para las pruebas de puesta a

punto del protocolo de tinción. Estas pruebas se llevaron a cabo usando un microscopio de epifluorescencia olympus AX70 y consistieron en realizar una aproximación de las concentraciones y tiempos de incubación necesarios para una correcta tinción, un control de la citotoxicidad, además de una comprobación de los tiempos de fading antes de la realización de pruebas con microscopía confocal.

Una vez ajustadas todas las aproximaciones gracias a la microscopía de epifluorescencia, se realizó una optimización de las condiciones experimentales durante el proceso de formación en microscopía confocal. Tras todas estas etapas de pruebas, se concretaron las condiciones de tinción que se usaron durante todo el experimento.

Se determinó usar las siguientes concentraciones de los distintos marcadores fluorescentes disolviéndolos en medio de cultivo Blast (Origio, Dinamarca):

<p style="text-align: center;">Concentraciones</p> <p style="text-align: center;">150 µM Dapi + 200 nM Nonil-naranja de acridina + 500 nM MitoTracker Deep Red</p> <p style="text-align: center;">Tiempo incubación</p> <p style="text-align: center;">15 minutos</p>

- **Dapi**

En primer lugar, se diluyó el contenido del vial (1mg, peso molecular (PM)= 350,25 g/mol) en 1 ml de agua desionizada tal y como indicaba el fabricante.

Se calculó la concentración nM de Dapi de stock:

$$\frac{1 \text{ mg}}{\text{ml}} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} * \frac{1 \text{ mol}}{350,25 \text{ g}} * \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} * \frac{1 \times 10^9 \text{ nmoles}}{1 \text{ mol}} = 2,85 \times 10^6 \text{ nM}$$

Como se necesitaba una concentración de trabajo de 150.000 nM, se calcularon los volúmenes para realizar la dilución correspondiente.

$$\text{Volumen} * 2,85 \times 10^6 \text{ nM} = 1000 \mu\text{l} * 150.000 \text{ nM}$$

Volumen = 52 µl de Dapi (solución stock)

Por tanto, la dilución de trabajo se consiguió diluyendo 52 µl de solución de stock de Dapi junto al volumen calculado para el resto de los tintes hasta un volumen final de 1000 µl con medio Blast.

- **Nonil-naranja de acridina**

Se partió de un vial con 100 µg liofilizados (PM= 472,51 g/mol) y se diluyeron 10 mg de este en 2,5 ml de medio de cultivo Blast. Se calculó la concentración de la disolución tal y como se indica a continuación:

$$\frac{10 \text{ mg}}{2,5 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ g}}{1.000 \text{ mg}} * \frac{1 \text{ mol}}{472,51 \text{ g}} * \frac{1.000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} * \frac{1.000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 8,46 \text{ mM}$$

Se realizó una dilución intermedia suponiendo un volumen inicial de 5 µl:

$$5 \text{ µl} * 8,46 \times 10^6 \text{ nM} = 1.000 \text{ µl} * X$$
$$X = 42.300 \text{ nM}$$

Por tanto, para realizar la dilución intermedia se diluyeron 5 µl de solución stock de Nonil-naranja de acridina en 995 µl de medio Blast.

Como se necesitaba una dilución de trabajo a 200 nM se hicieron los cálculos como se indica a continuación:

$$\text{Volumen} * 42.300 \text{ nM} = 1.000 \text{ µl} * 200 \text{ nM}$$
$$X = 4,72 \text{ µl de dilución intermedia Nonil-naranja de acridina}$$

Por tanto, la dilución de trabajo se consiguió diluyendo 4,72 µl de dilución intermedia junto al volumen calculado para el resto de los tintes hasta un volumen final de 1000 µl con medio Blast.

- **MitoTracker Deep Red**

El fabricante indicaba que la dilución de stock debía ser de 1 mM en DMSO.

Se partió de un vial con 50 µg liofilizados (PM= 543,58 g/mol) y se usó DMSO para la dilución inicial (Sigma-aldrich, EEUU).

El volumen necesario de DMSO se calculó como se indica a continuación:

$$50 \mu\text{g} * \frac{1 \text{ g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}} * \frac{1 \text{ mol}}{543,58 \text{ g}} * \frac{1.000 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} * \frac{1 \text{ L}}{1 \text{ mmol}} * \frac{1 \times 10^6 \mu\text{l}}{1 \text{ L}} = 91,98 \mu\text{l de DMSO}$$

Una vez obtenida la dilución de stock, se realizó una dilución intermedia suponiendo un volumen inicial de 5 µl:

$$5 \mu\text{l} * 10^6 \text{ nM} = 1.000 \mu\text{l} * X$$

$$X = 5.000 \text{ nM}$$

Por tanto, para realizar la dilución intermedia de concentración 5.000 nM, se diluyeron 5 µl de solución stock de MitoTracker Deep Red en 995 µl de medio Blast.

Para conseguir una dilución de trabajo a 500 nM, se calculó el volumen necesario de dilución intermedia como se indica a continuación:

$$\text{Volumen} * 5.000 \text{ nM} = 1.000 \mu\text{l} * 500 \text{ nM}$$

$$\text{Volumen} = 100 \mu\text{l de dilución intermedia MitoTracker Deep Red}$$

Por tanto, la dilución de trabajo final se consiguió diluyendo 100 µl de dilución intermedia de MitoTracker Deep Red junto al volumen calculado para el resto de los tintes hasta un volumen final de 1000 µl con medio Blast.

Finalmente, la composición de la dilución de trabajo quedó compuesta por los siguientes volúmenes:

Dilución de trabajo

52 µl Dapi + 4,7 µl Nonil-naranja de acridina + 100 µl MitoTracker Deep Red + 843,3 µl medio Blast

Tras las pruebas realizadas en microscopía confocal, se diseñó una estrategia de análisis de las muestras y se redactó un protocolo de trabajo. A continuación, se describen los pasos seguidos para el análisis del contenido de mitocondrias totales y activas en blastocistos mediante microscopía confocal:

1. Los blastocistos se desvitrificaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el apartado "*Vitrificación y desvitrificación*".
2. Tras mantenerlos aproximadamente 2 horas en cultivo in-vitro para su recuperación, fueron cultivados 15 minutos a 37 ° C, con 6% O₂ y 6% CO₂ en 40 µl de la dilución de trabajo con los marcadores fluorescentes (previamente calentada a 37 ° C durante 20 minutos) cubiertos con aceite mineral FertiCult Mineral oil (Fertipro, Bélgica). Por último, los blastocistos se lavaron en 40 µl de medio Blast.
3. Seguidamente fueron transportados al servicio de microscopía confocal de la Universidad de Valencia en un incubador portátil y cultivados a 37 ° C y 5-6% CO₂ en 400 µl de medio Blast cubiertos con 400 µl de aceite mineral (gaseado durante toda la noche). El tiempo total en cultivo desde la desvitrificación hasta el análisis por microscopía confocal fue de aproximadamente 6 horas.
4. En el servicio de microscopía confocal, los embriones se añadieron en gotas de 20 µl de medio tamponado Sydney IVF Gamete Buffer cubiertas con aceite mineral en placas especiales para análisis de fluorescencia GWST-5040 (Willco Wells, Ámsterdam).
5. Se adaptó la temperatura del microscopio a 37 ° C sin ajuste de CO₂ ya que los embriones estaban incluidos en medio tamponado.
6. Se usó el objetivo 40X de inmersión en aceite para el análisis de las muestras.
7. Se ajustaron las condiciones del microscopio para el análisis de fluorescencia.

8. Se realizaron fotos de tres planos focales para cada embrión, tomando como referencia inicial la primera señal de emisión de fluorescencia del embrión (figura 13). La razón de que se analizaran solo tres planos focales es que los más alejados de la fuente de luz no recibían el total de la señal de láser. Al analizar solo los primeros planos del embrión, los más cercanos a la fuente de luz, se obtiene un dato más preciso, pero menos representativo del resto del embrión.

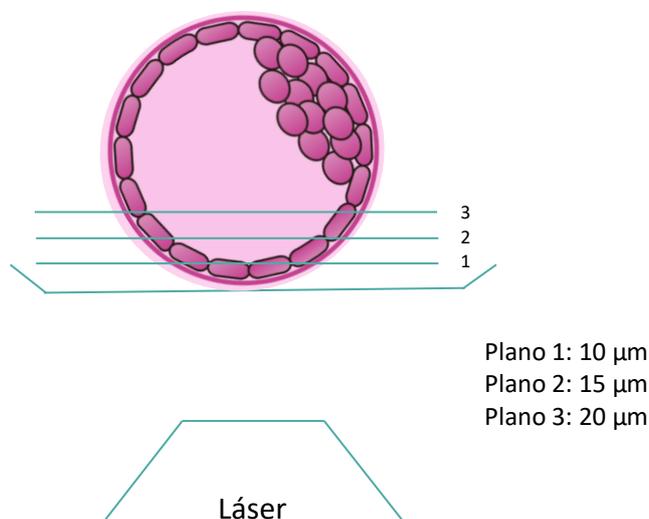
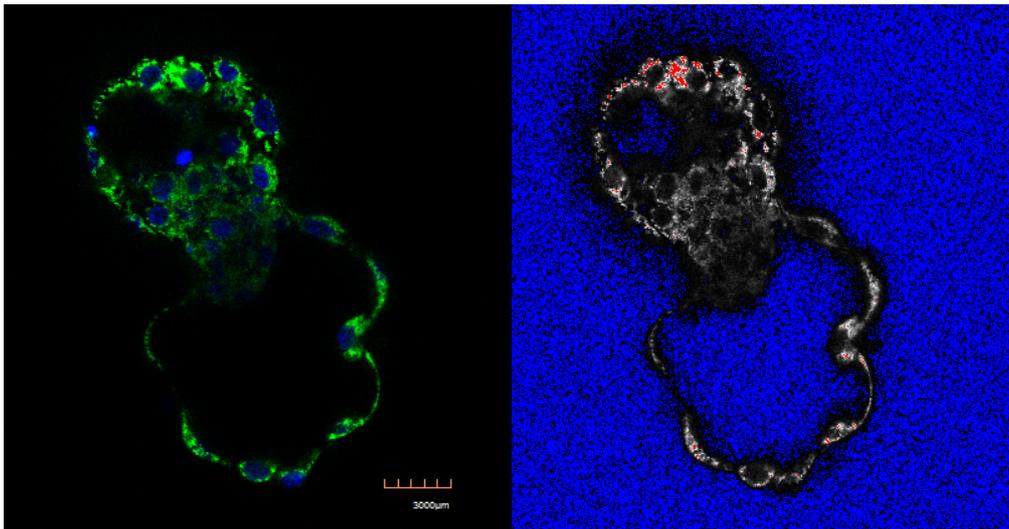


Figura 13. Esquema de los planos focales capturados por imagen para el análisis de blastocistos mediante microscopía confocal.

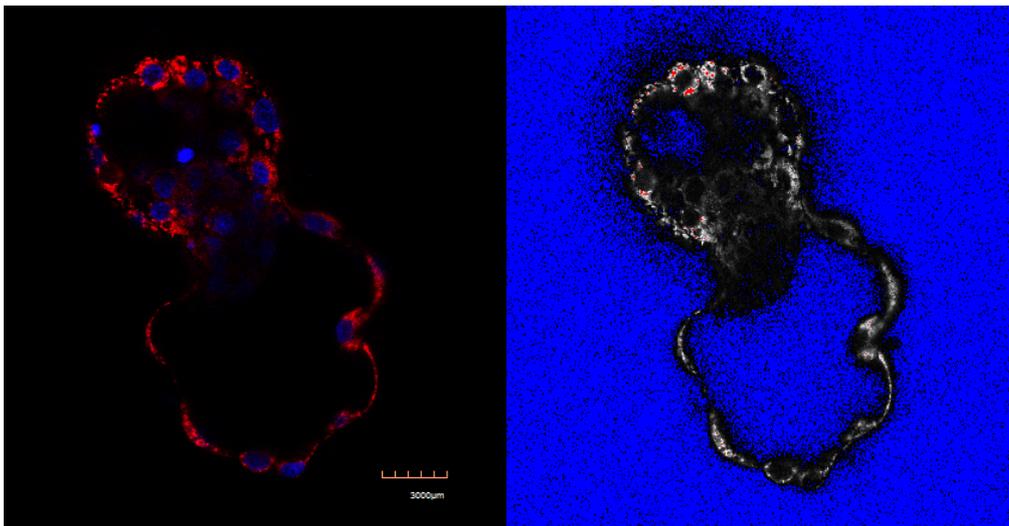
Se utilizaron tres láseres diferentes: láser de longitud de onda de 405 nm para la excitación de Dapi, láser de longitud de onda de 488 nm para la excitación de Nonilnaranja de acridina y láser de longitud de onda de 556 nm para la excitación de MitoTracker Deep Red (figura 14 y tabla 4).

A

Mitocondrias totales



Mitocondrias activas



Unión e intersección

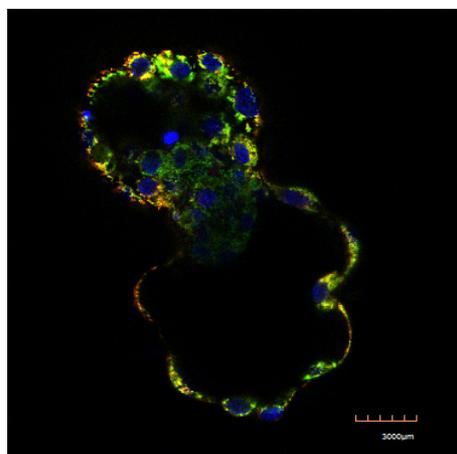


Figura 14. Análisis de cuantificación de fluorescencia mitocondrial mediante microscopía confocal. Blastocisto con tinción del núcleo celular (azul), del contenido mitocondrial total (verde) y del contenido mitocondrial activo (rojo). Se puede observar un menor contenido mitocondrial activo en la masa celular interna. Barra escala= 3.000 μm .

Marcador	Láser	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Excitación láser (nm)	Filtro detección(nm)
Dapi	Dapi	358	461	405	425 - 475
Nonil-naranja de acridina	Alexa Fluor 488	495	522	488	500 - 600
MitoTracker Deep Red	Alexa Fluor 556	644	665	556	655-755

Tabla 4. Longitudes de onda de excitación y emisión y filtros de detección de los distintos marcadores fluorescentes y de los respectivos láseres utilizados.

Cada día de análisis, las posibles variaciones de intensidad de los láseres se controlaron utilizando esferas de fluorescencia constante (FocalCheck Fluorencent Test Slides, Molecular Probes, EEUU), ajustando diariamente el láser para las longitudes de onda de Dapi, Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 556 (figura 15).

Para ello, usando el objetivo 40X de inmersión en aceite, se ajustó cada láser en los tres canales de imagen de forma que la fluorescencia de las esferas quedara justo por debajo de su máximo de saturación sin manipular las ganancias del fotomultiplicador (ganancia canal Dapi= 565; ganancia canal Alexa Fluor 488= 510; ganancia canal Alexa fluor 647= 410). Este procedimiento se realizó durante todo el experimento, de manera que **cada día, antes de analizar los blastocistos, se visualizaron las esferas y se corrigieron los tres láseres sin manipular las ganancias hasta que la saturación quedara ajustada.**

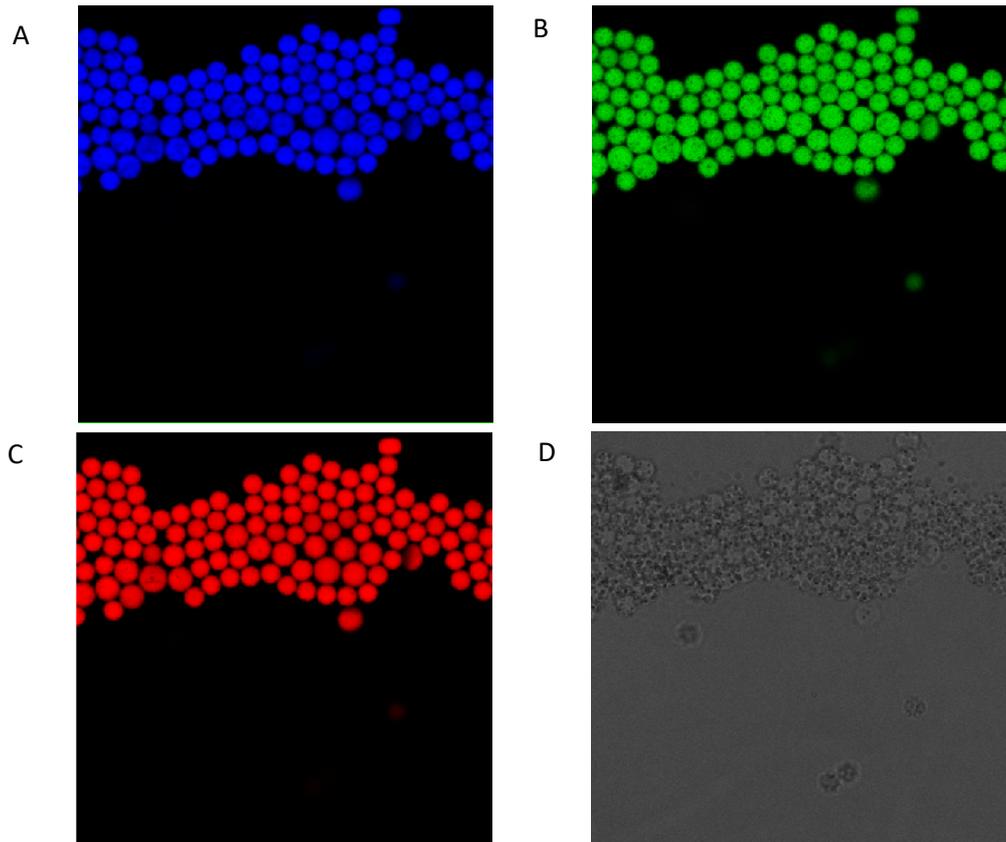


Figura 15. Esferas de fluorescencia constante usadas para el control de las variaciones de intensidad de los láseres de microscopía confocal. A) Canal de Dapi, B) canal de Alexa Fluor 488, C) canal de Alexa Fluor 556 y D) canal de luz natural.

Antes de comenzar con la obtención de datos, la falta de señal de autofluorescencia se verificó previamente en blastocistos no teñidos con las mismas condiciones experimentales.

Para la cuantificación de la fluorescencia se diseñaron dos metodologías de análisis: I) metodología de fluorescencia fija y II) metodología de valores de ganancia de fotomultiplicador fijos. El objetivo de esta estrategia fue comprobar la consistencia de los resultados con dos metodologías distintas.

- I) Con el método de fluorescencia fija, se estableció visualmente la misma intensidad de fluorescencia para cada embrión (y para cada tinte) a través del ajuste y corrección manual de la saturación de fluorescencia (figura 16).

Para ello, se aumentaron o se disminuyeron los valores de ganancia del fotomultiplicador para cada tinte hasta que la fluorescencia quedara justo por debajo de su máximo de saturación. Por lo tanto, las diferencias observadas entre blastocistos se midieron en términos de valores de ganancia de fotomultiplicador requeridos para obtener el valor de fluorescencia ajustado.

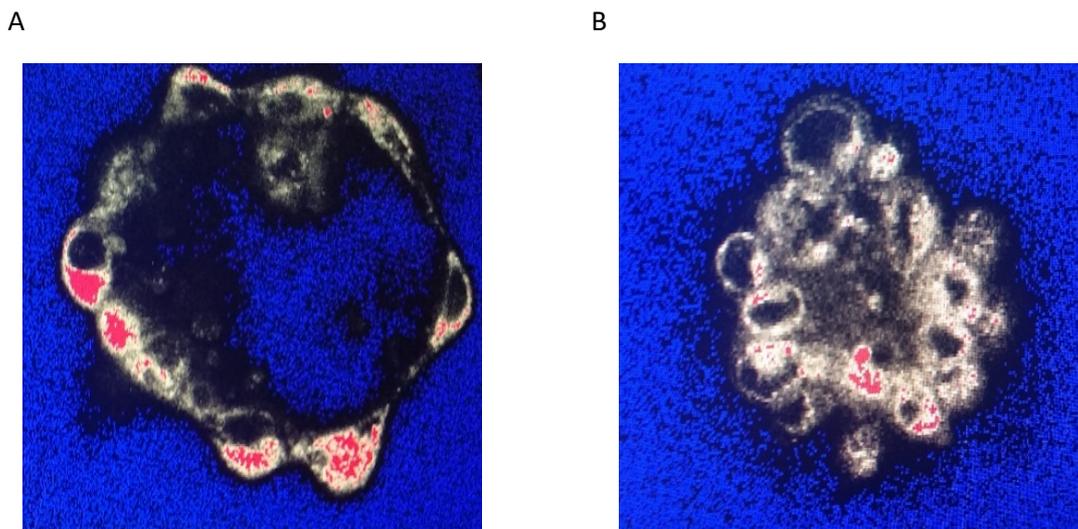


Figura 16. Ejemplo de corrección de la saturación de fluorescencia en microscopía confocal. A) Blastocisto con saturación de fluorescencia para uno de los marcadores fluorescentes y B) blastocisto con ajuste de la saturación de fluorescencia para uno de los marcadores fluorescentes.

- II) Con el método de valores de ganancia de fotomultiplicador fijos, se estableció en todos los blastocistos para cada tinte un valor de ganancia de fotomultiplicador específico (valor de ganancia de Nonil-naranja de acridina = 630 y valor de ganancia de MitoTracker Deep Red = 565). Por lo tanto, las diferencias observadas entre los blastocistos para cada marcador fluorescente se midieron en términos de fluorescencia emitida (cuantificada con el software Image J).

El valor de estas ganancias se fijó en función de las ganancias de los blastocistos analizados durante las pruebas de puesta a punto de la técnica,

eligiéndose valores de ganancias que aseguraban un rango de operatividad con niveles de fluorescencia sin saturación ni baja intensidad.

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software Image J. Se analizó, para cada embrión, el promedio de intensidad de fluorescencia de tres células diferentes del trofoectodermo en cada imagen de plano focal capturada.

La intensidad de fluorescencia o media de fluorescencia (mean) se corresponde con el valor medio de gris (brillo de píxel) dentro de la selección. Es decir, es la suma de los valores de gris de todos los píxeles de la selección dividida por el número de píxeles (figura 17).

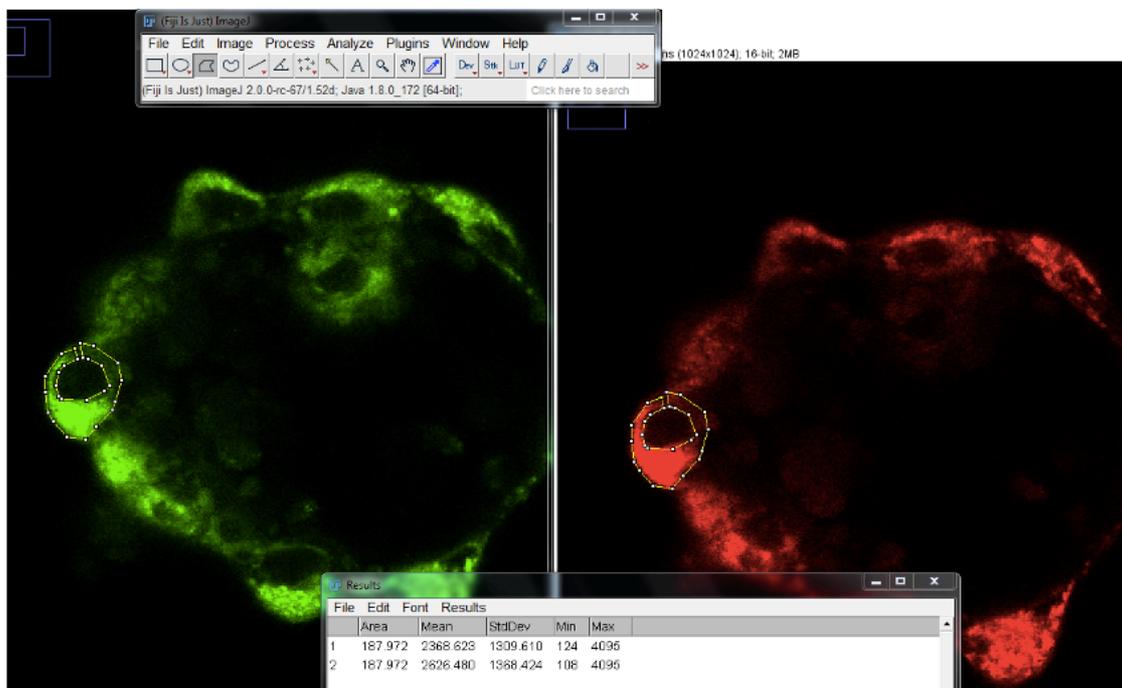


Figura 17. Ejemplo de cuantificación de fluorescencia en uno de los planos focales de un blastocisto mediante el software Image J. Nonil-naranja de acridina= verde; MitoTracker Deep Red= rojo.

En el caso de la metodología de fluorescencia fija, el software se usó para comprobar que la corrección manual de la saturación de fluorescencia se hizo correctamente, es

decir, que la intensidad de fluorescencia para ambos marcadores fluorescentes fuera similar en todos los blastocistos (tabla suplementaria 3).

En el caso de la metodología de valores de ganancia de fotomultiplicador fijos, el software se usó para cuantificar, en cada marcador fluorescente, las diferencias de intensidad de fluorescencia entre los blastocistos.

b) Análisis del estado redox en blastocistos:

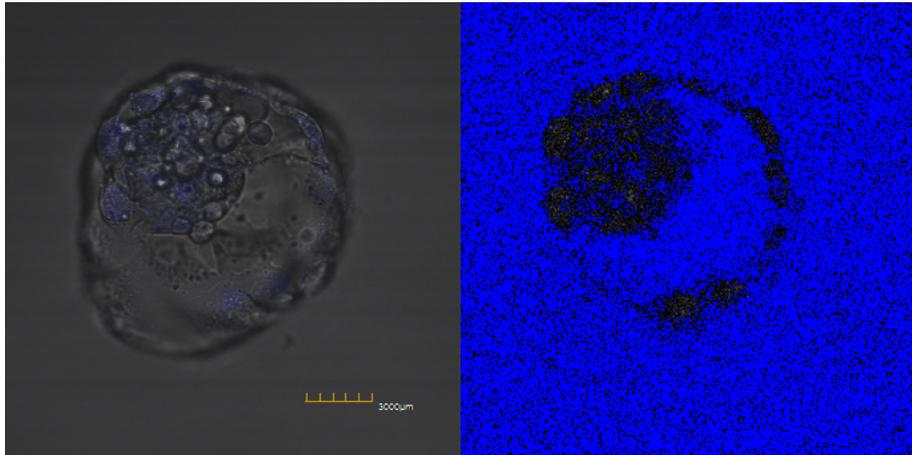
El análisis por microscopía confocal también sirvió para determinar la ratio redox en blastocistos. Para ello, las muestras se sometieron a análisis de la autofluorescencia de NADH y de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) con un objetivo 40X de inmersión en aceite (figura 18).

A continuación, se describen los pasos seguidos para el análisis del estado redox en blastocistos mediante microscopía confocal:

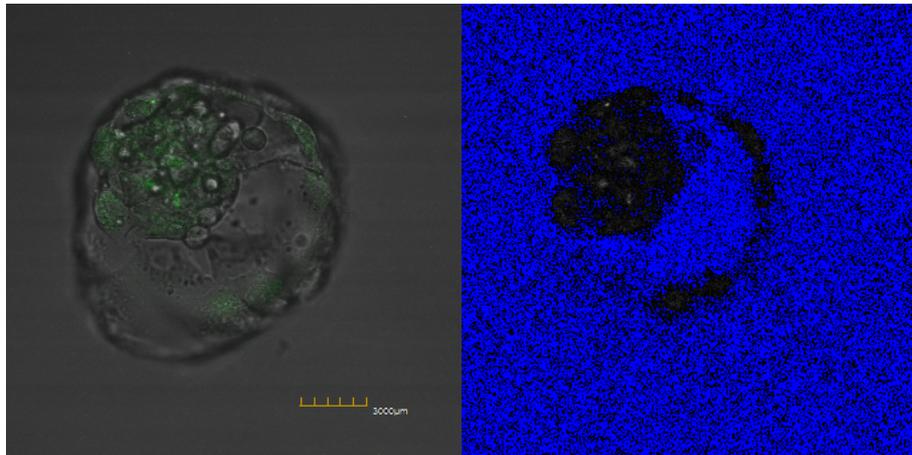
1. Los blastocistos se desvitrificaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el apartado "*Vitrificación y desvitrificación*".
2. Tras la desvitrificación fueron cultivados según los tiempos requeridos para el experimento a 37 ° C, con 6% O₂ y 6% CO₂ en 50 µl de medio Blast cubiertos con aceite mineral.
3. Seguidamente fueron transportados al servicio de microscopía confocal de la Universidad de Valencia en un incubador portátil y cultivados a 37 ° C y 5-6% CO₂ en 400 µl de medio Blast cubiertos con 400 µl de aceite mineral (gaseado durante toda la noche).
4. En el servicio de microscopía confocal, los embriones se añadieron en gotas de 20 µl de medio tamponado Sydney IVF Gamete Buffer cubiertas con aceite mineral en placas especiales para análisis de fluorescencia GWST-5040.

5. Se adaptó la temperatura del microscopio a 37 ° C sin ajuste de CO₂ ya que los embriones estaban incluidos en medio tamponado.
6. Se usó el objetivo 40X de inmersión en aceite para el análisis de las muestras.
7. Se ajustaron las condiciones del microscopio para el análisis de fluorescencia.
9. Se realizaron fotos de tres planos focales para cada embrión, tomando como referencia inicial la primera señal de emisión de fluorescencia del embrión (figura 13). La razón de que se analizaran solo tres planos focales es que los más alejados de la fuente de luz no recibían el total de la señal de láser. Al analizar solo los primeros planos del embrión, los más cercanos a la fuente de luz, se obtiene un dato más preciso, pero menos representativo del resto del embrión.

Autofluorescencia de NADH



Autofluorescencia de FAD



Unión e intersección

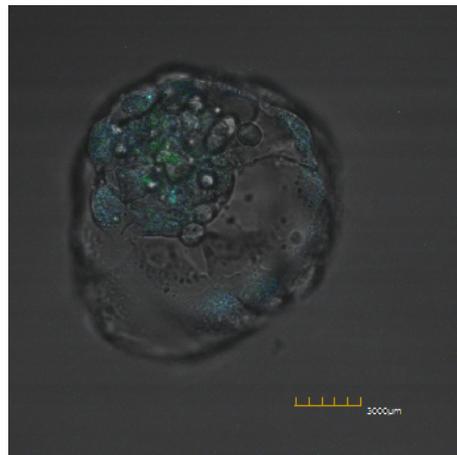


Figura 18. Autofluorescencia de NADH y FAD en un blastocisto humano. Barra escala= 3.000 μm .

La autofluorescencia azul emitida por NADH se excitó a 405 nm y la autofluorescencia verde de FAD se excitó a 488 nm (tabla 5). Dado que tal fluorescencia endógena era bastante débil, se aumentó la apertura del pinhole del microscopio (pinhole = 350).

Molécula	Láser	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Excitación láser (nm)	Filtro detección (nm)
NADH	Dapi	335-350	440-470	405	425 - 475
FAD	Alexa Fluor 488	450	535	488	500 - 600

Tabla 5. Longitudes de onda de excitación y emisión y filtros de detección de las distintas moléculas autofluorescentes analizadas y de los respectivos láseres utilizados (Ramanujam, 2014; Rehman et al., 2017).

Para la cuantificación de la fluorescencia de los tres planos focales capturados por blastocisto, se utilizó la metodología de valores de ganancia de fotomultiplicador fijos tal y como se describe en el apartado a). Se eligió esta forma de análisis por ser una metodología que requiere menor intervención manual. Se estableció para cada molécula un valor de ganancia de fotomultiplicador específico (NADH= 900 y FAD= 800). Por tanto, las diferencias observadas entre los blastocistos para ambas moléculas se midieron en términos de fluorescencia emitida.

El valor de estas ganancias se fijó en función de las ganancias de los blastocistos analizados durante las pruebas de puesta a punto de la técnica, eligiéndose valores de ganancias que aseguraban un rango de operatividad con niveles de fluorescencia sin baja intensidad.

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software Image J (figura 17). Se cuantificó, para cada embrión, el promedio de intensidad de fluorescencia de tres células de trofoectodermo por imagen de plano focal capturada tal y como se describe en el apartado *a*). La relación NADH/FAD, descrita como "ratio redox" (Wu *et al.*, 2018), se calculó dividiendo la intensidad de fluorescencia de NADH por la intensidad de fluorescencia de FAD.

Microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis por microscopía electrónica de transmisión, los embriones se desvitrificaron y se cultivaron según los tiempos requeridos para el experimento. Luego se incubaron en 400 μ l de fijador Karnovsky (glutaraldehído 2,5% y paraformaldehído 0,5%) a 4 ° C durante 2 horas. Pasado el tiempo de incubación, los embriones se lavaron dos veces en 400 μ l de tampón fosfato (PB) 0,1 M (pH 7,3) a 4 ° C para eliminar los restos de solución fijadora. Posteriormente los embriones se mantuvieron a 4 ° C en solución PB fría durante un mínimo de 10-15 minutos hasta el paso de la encapsulación del embrión en solución de agar al 2%. Una vez encapsulados en agar, las gotas solidificadas se cubrieron con PB acidificado 0,1 M (pH 7,3).

Posteriormente, las muestras se enviaron al servicio de microscopía electrónica de la Universidad de Valencia donde pasaron por un proceso de fijación con glutaraldehído al 2,5% y un proceso de post-fijación con osmio al 2%. A continuación, las muestras se incrustaron en resina LR-White y se cortaron con un grosor aproximado de 60 nm en un ultramicrotomo Leica UC7 con una hoja de diamante Diatome. Las rejillas se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y plomo.

Finalmente, las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 operado entre 40 y 100Kv. Para cada blastocisto, se obtuvo un recuento mitocondrial promedio del corte de tres células de trofoectodermo en las que se observó también la configuración mitocondrial. Las observaciones se hicieron por triplicado.

DESCRIPCIÓN DE ESTUDIOS

Descripción de estudios

II

Objetivo específico 1. Caracterizar el contenido y el patrón de distribución del ADN mitocondrial durante el desarrollo embrionario humano preimplantacional.

Propósito

El contenido de ADNmt se ha investigado como un marcador de viabilidad embrionaria sin profundizar sobre su variabilidad en ovocitos no descartados y sin envejecimiento in-vitro, y con pocos datos sobre su contenido a lo largo de los diferentes estadios preimplantacionales humanos.

El objetivo de este estudio ha sido I) evaluar la carga y la variación de ADNmt en los ovocitos MII humanos y comparar y contrastar con la de los ovocitos que no fecundaron correctamente; y II) estudiar el cambio gradual en el contenido de ADNmt durante el desarrollo humano previo a la implantación analizando su correlación con factores como la edad materna y el grado de desarrollo embrionario.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio prospectivo de cohortes con un total de 154 muestras donadas a investigación de 50 pacientes y 11 donantes de ovocitos que fueron tratadas en IVIRMA Global (Valencia, España).

Todas las participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito.

Estimulación ovárica y obtención y cultivo de especímenes

La estimulación ovárica y la obtención y el cultivo de especímenes se llevo a cabo según lo explicado en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

Cuantificación de ADNmt por RT-PCR

El conjunto de muestras constaba de: 36 ovocitos MII de donantes recogidos el día de la aspiración folicular, que consistieron en algunos de los ovocitos MII de la cohorte de donantes, cuyos ovocitos no cumplieron con los requisitos para la donación ya que se obtuvo un bajo número después de la aspiración folicular; 34 ovocitos con FF que se recogieron tras 19-22 horas post-ICSI (ovocitos con FF); 31 ovocitos con FF que se recogieron tras 5 ó 6 días post-ICSI (ovocitos con FF envejecidos); 21 embriones vitrificados no bloqueados en estadio temprano de desarrollo (denominados de ahora en adelante como “en etapa de división”) recogidos inmediatamente tras la desvitrificación; y 32 blastocitos aneuploides vitrificados y recogidos inmediatamente tras la desvitrificación.

Todas las muestras se incluyeron individualmente en tubos de PCR con 2,5 µl de tampón fosfato salino (PBS) y se conservaron a -80 °C hasta el momento del análisis.

Para determinar el número de copias de ADNmt para cada muestra, las muestras se sometieron a cuantificación por RT-PCR con el sistema de amplificación de ADN SurePlex de Illumina según lo explicado en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

Análisis estadístico

Se realizó una transformación logarítmica de los datos para estabilizar la varianza (Huber *et al.*, 2002; Durbin and Rocke, 2004) y se aplicó la prueba de Shapiro para evaluar si los datos tenían una distribución normal (Shapiro and Wilk, 1965; Royston, 1982).

Se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) con comparación múltiple por pares (Tukey post-hoc) para contrastar el contenido de ADNmt en ovocitos MII entre donantes con edades similares, el contenido de ADNmt entre las diferentes etapas embrionarias y el contenido de ADNmt entre los distintos tipos de ovocitos con FF. Además, se utilizó

la prueba ANOVA para analizar el contenido de ADNmt en los blastocistos con relación al día de desarrollo embrionario, la calidad del embrión y el tipo de aneuploidía. Finalmente, la relación del contenido de ADNmt con la edad materna se evaluó por análisis de correlación.

Los datos se consideraron estadísticamente significativos si el P-valor era inferior a 0,05. La distribución de datos determinada por la prueba de Shapiro dio como resultado una distribución normal ($P > 0,05$).

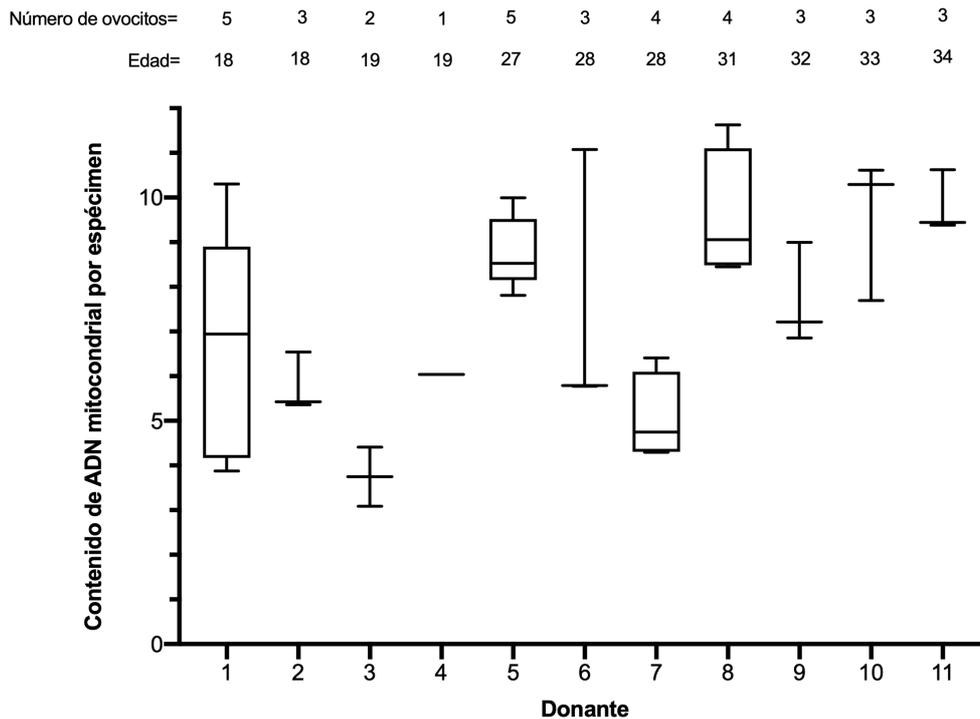
Resultados

Contenido de ADNmt en ovocitos MII de donantes

La distribución del contenido de ADNmt medido en los ovocitos MII de donantes individuales se muestra en la figura 19A. La cantidad de ADNmt de los ovocitos varía entre las diferentes donantes y entre los ovocitos de cada donante individual.

Estas variaciones en el contenido de ADNmt de los ovocitos MII persisten después de agruparlos por pertenecer a donantes con edad similar ($P < 0,05$) (figura 19B).

A



B

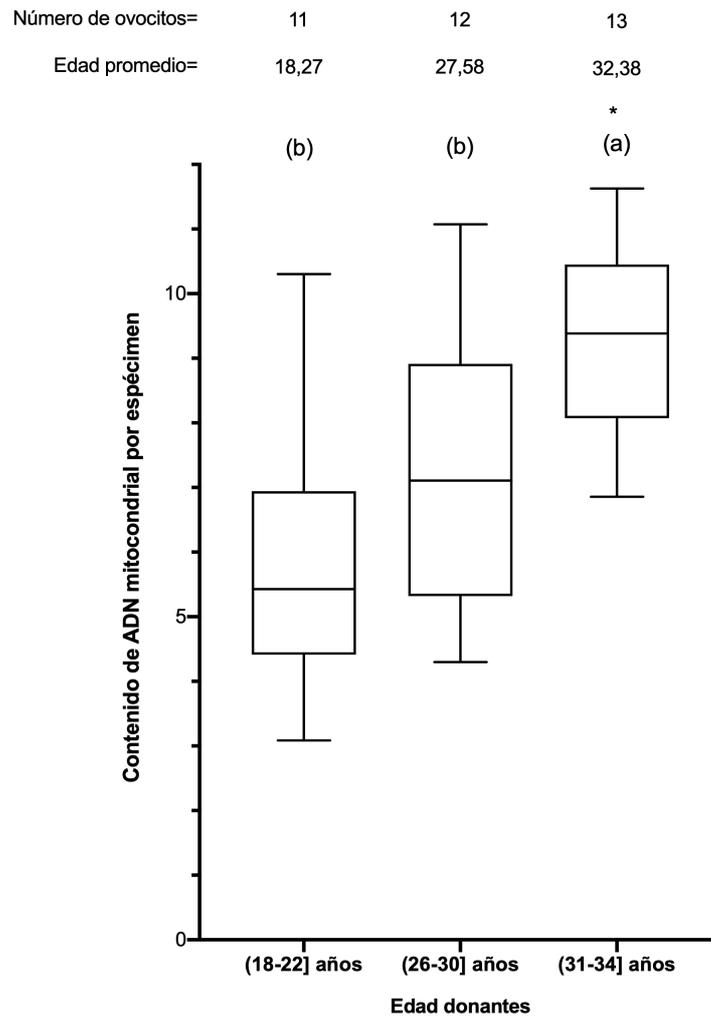


Figura 19. Análisis del contenido de ADNmt en ovocitos MII de donantes donados a investigación. A) Contenido de ADNmt observado en las cohortes de ovocitos de 11 donantes de ovocitos. B) Contenido de ADNmt en ovocitos donados agrupados por pertenecer a donantes con edad similar.

* Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, ($P < 0,05$).

** Edad en años.

Contenido de ADNmt durante el desarrollo embrionario in-vitro

Hay una disminución significativa en términos de número de copias de ADNmt por espécimen y por célula durante el desarrollo embrionario previo a la implantación. Se observa que los ovocitos MII de donantes tienen un número de copias de ADNmt por espécimen significativamente mayor en comparación con los embriones no bloqueados en etapa de división ($P < 0,05$). De manera similar, los embriones no bloqueados en etapa de división tienen un número de copias de ADNmt por espécimen y por célula más alto en comparación con los blastocistos ($P < 0,05$) (figura 20).

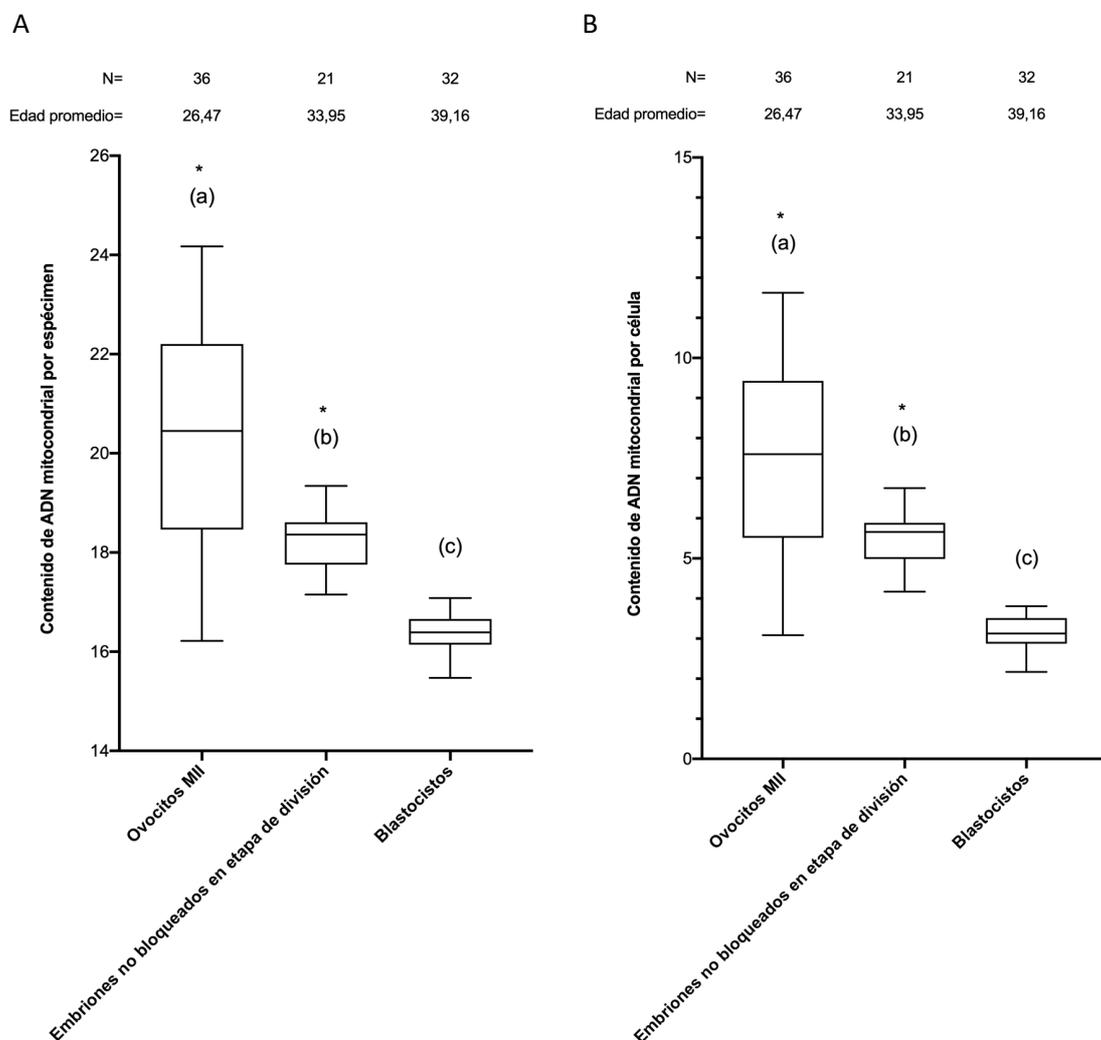


Figura 20. Análisis del contenido de ADNmt durante el desarrollo embrionario humano in-vitro. A) Contenido de ADNmt por espécimen en ovocitos MII de donantes, embriones no bloqueados

en etapa de división y blastocistos. B) Contenido de ADNmt por célula en ovocitos MII de donantes, embriones no bloqueados en etapa de división y blastocistos.

* Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, ($P < 0,05$).

** Edad en años.

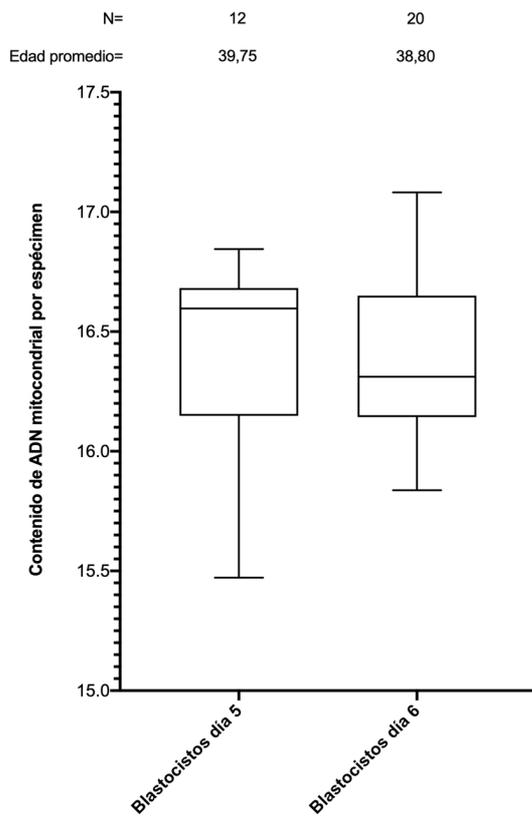
Por otro lado, existe una correlación positiva ($P < 0,05$) entre el contenido de ADNmt y la edad materna en los ovocitos MII de donantes (figura suplementaria 1A). También se observa una correlación positiva ($P < 0,05$) entre el contenido por espécimen y por célula de ADNmt y la edad materna en los embriones no bloqueados en etapa de división (figuras suplementarias 1B y 1C). Sin embargo, no hay ningún tipo de correlación significativa ($P > 0,05$) entre el contenido de ADNmt por espécimen y por célula y la edad materna en los blastocistos (figuras suplementarias 1D y 1E).

Contenido de ADNmt en embriones en estadio de blastocisto

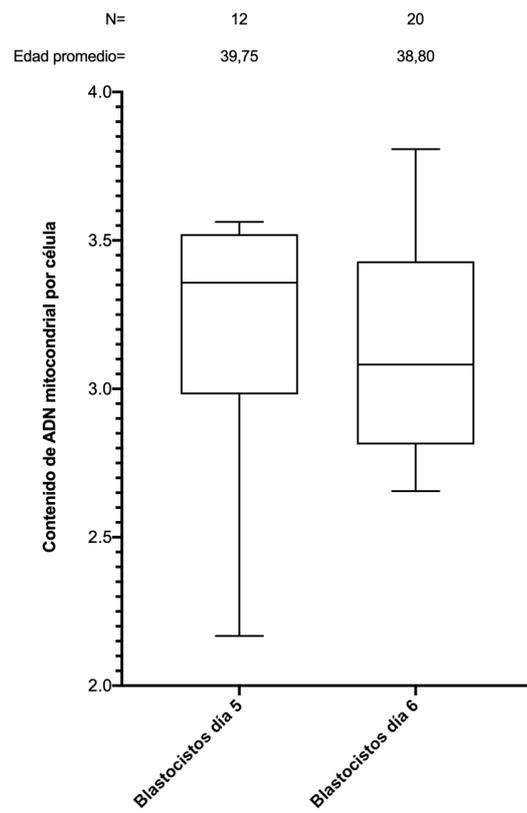
No hay diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los blastocistos de día 5 y día 6 de desarrollo en términos de contenido de ADNmt por espécimen y por célula (figuras 21A y 21B).

Además, no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) en el contenido de ADNmt por espécimen y por célula al agrupar a los blastocistos por calidad (figuras 21C y 21D), utilizando los criterios de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) para la clasificación de embriones.

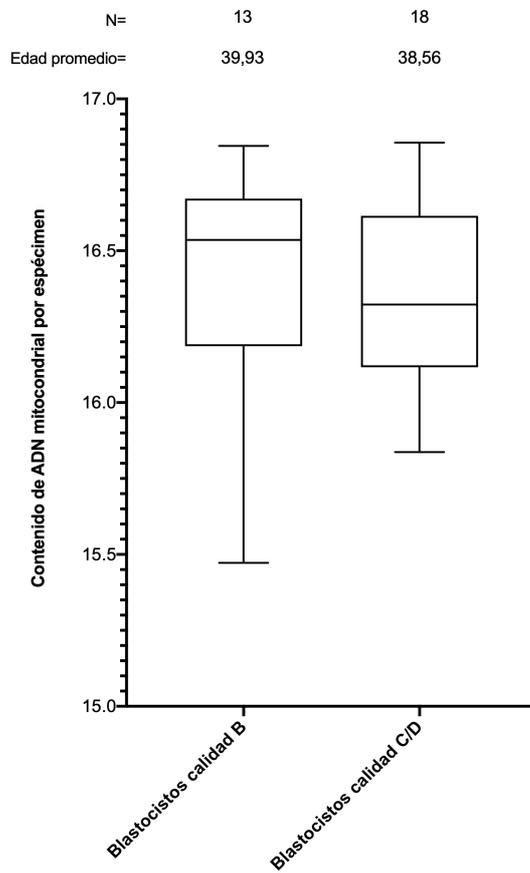
A



B



C



D

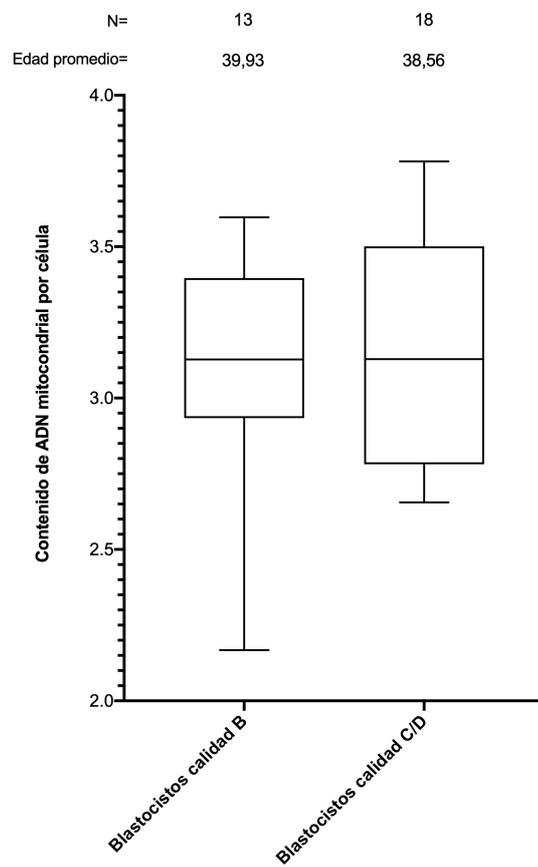


Figura 21. Análisis del contenido de ADNmt en blastocistos. A) Contenido de ADNmt por espécimen en blastocistos agrupados por día de desarrollo. B) Contenido de ADNmt por célula en blastocistos agrupados por día de desarrollo. C) Contenido de ADNmt por espécimen en blastocistos agrupados por calidad embrionaria*. D) Contenido de ADNmt por célula en blastocistos agrupados por calidad embrionaria*.

* Criterios de clasificación de la calidad embrionaria de ASEBIR.

** Edad en años.

Además, no se encuentran diferencias significativas en cuanto al contenido de ADNmt por espécimen y por célula ($P > 0,05$) al agrupar a los blastocistos por el tipo de aneuploidía: embrión caótico (más de una aneuploidía), monosomías o trisomías (figura 22).

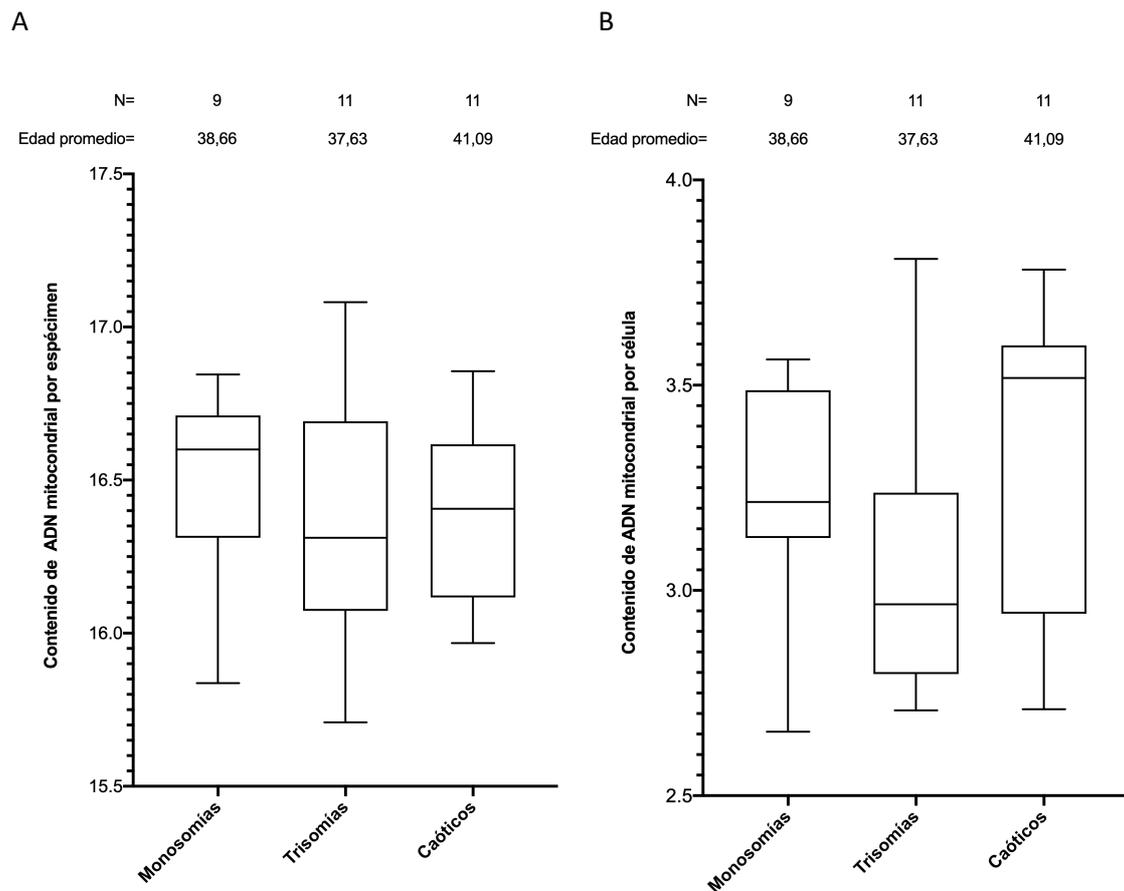


Figura 22. Análisis del contenido de ADNmt según los diferentes tipos de aneuploidías de los blastocistos de estudio. A) Contenido de ADNmt por espécimen según el tipo de aneuploidía embrionaria. B) Contenido de ADNmt por célula según el tipo de aneuploidía embrionaria.

* Edad en años.

Contenido de ADNmt en ovocitos con FF

El contenido de ADNmt en todos los ovocitos con FF es significativamente menor ($P < 0,05$) en comparación con los ovocitos MII de donantes no inseminados (figura 23A). Los ovocitos con FF que se mantuvieron in-vitro durante 5 o 6 días (envejecidos in-vitro) no experimentan ningún cambio en el contenido final de copias de ADNmt respecto a los ovocitos con FF que se recogieron al día siguiente del ICSI ($P > 0,05$, figura 23A).

Debido a que se observó en el apartado anterior que la edad materna tiene una correlación positiva con el contenido de ADNmt en los ovocitos, se analizó si el menor contenido de ADNmt observado en los ovocitos con FF se debía en parte a la edad, comparando solo los ovocitos MII de donantes no inseminados y los ovocitos con FF de ≤ 35 años (de donantes). Al hacer esta comparación se obtienen resultados idénticos ($P < 0,05$), (figura 23B).

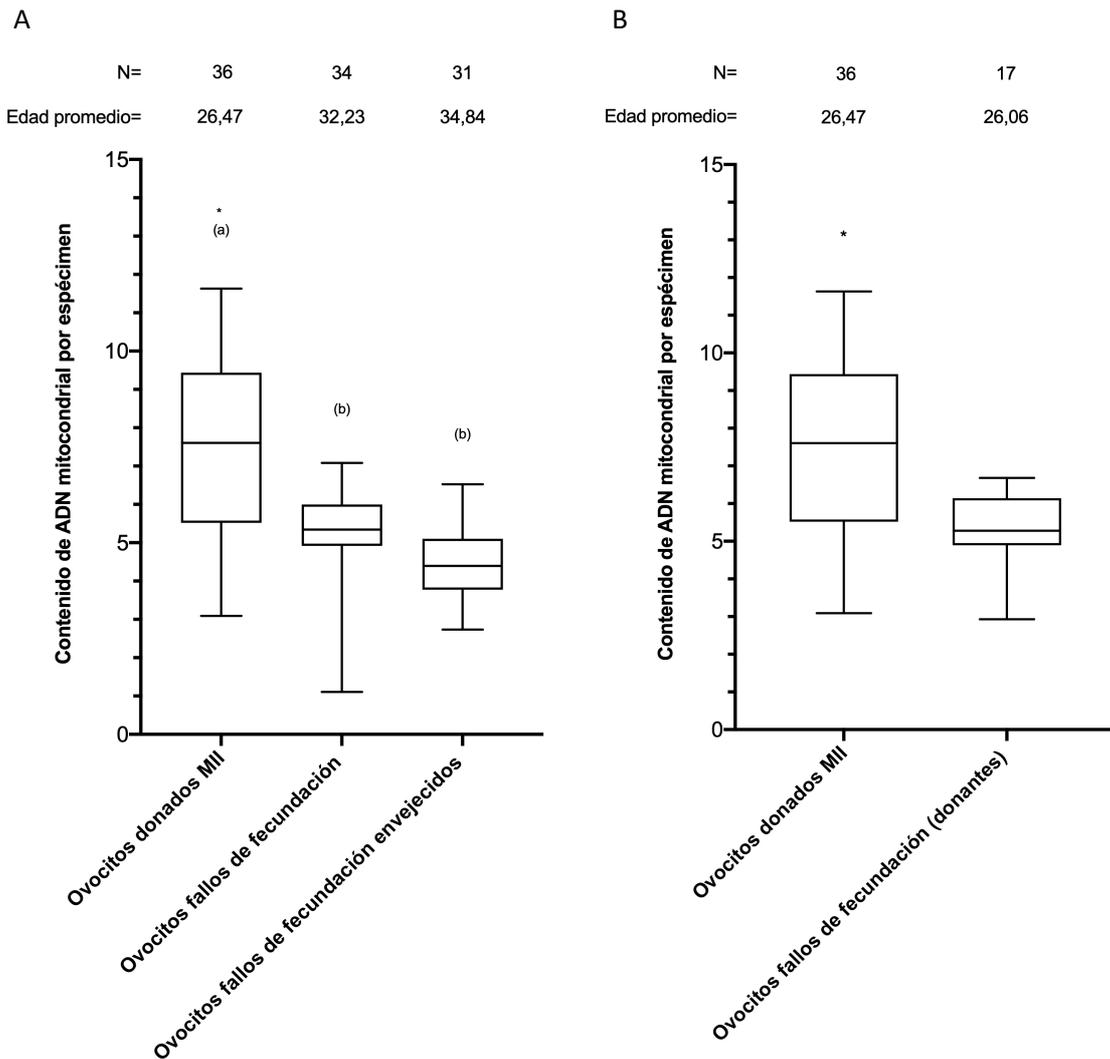


Figura 23. Análisis del contenido de ADNmt en ovocitos con FF. A) Contenido de ADNmt en ovocitos donados MII, ovocitos con FF y ovocitos con FF envejecidos in-vitro. B) Contenido de ADNmt en ovocitos donados MII y ovocitos con FF de ≤ 35 años (donantes).

* Prueba de comparaciones múltiples de Tukey; ($P < 0,05$).

** Edad en años.

Discusión de resultados

Según los estudios realizados en varios modelos de mamíferos, como el ratón y el cerdo, no se produce replicación del ADNmt entre la maduración de los ovocitos y la formación de los blastocistos antes de la implantación (Thundathil *et al.*, 2005; El Shourbagy *et al.*, 2006).

Así como existen numerosos estudios acerca del contenido de ADNmt según el estado madurativo del ovocito, con relación al FF o con relación a la edad materna, los estudios que hacen referencia a su evolución a lo largo del desarrollo embrionario son mucho más limitados. Sin embargo, investigar la dinámica del ADNmt antes de la implantación en humanos es importante para la evaluación del contenido de ADNmt como indicador de viabilidad embrionaria.

En cuanto al contenido de ADNmt al inicio del desarrollo, en la etapa de ovocito MII maduro no solo se ha observado gráficamente que hay una distribución variada del contenido de ADNmt dentro de la cohorte de ovocitos de una misma donante, sino que cuando se agrupan los ovocitos por pertenecer a donantes con edad similar, también existen diferencias que son estadísticamente significativas. Estos hallazgos son consistentes con informes anteriores (Barritt *et al.*, 2002) y parecen explicarse por la existencia de diferentes niveles de maduración citoplasmática (May-Panloup *et al.*, 2007). Además, el presente estudio ha demostrado que esta alta variabilidad ocurre independientemente del tiempo en cultivo in-vitro del ovocito, ya que los ovocitos se recogieron el día de la aspiración folicular.

También se encontró que el contenido de ADNmt de los ovocitos con FF es significativamente menor en comparación con los ovocitos MII no inseminados, y que esta diferencia es independiente de la edad materna. Además, se ha demostrado que es poco probable que la disminución en el contenido de ADNmt observada en los ovocitos con FF pueda deberse a una degradación del ADNmt en cultivo, ya que se observó un contenido de ADNmt similar al comparar los ovocitos con FF y los ovocitos con FF envejecidos in-vitro. Como la mayoría de los estudios previos que abordan esta cuestión se realizaron en ovocitos desechados que se cultivaron in-vitro durante varios días, fue fundamental establecer la falta de impacto del cultivo in-vitro en general sobre el contenido de ADNmt (Reynier *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006). Estos hallazgos sugieren firmemente que el fracaso de la fecundación se asocia con un menor contenido de ADNmt en los ovocitos.

Por otro lado, los resultados obtenidos indican que existe una disminución significativa, no solo en términos de contenido de ADNmt por célula, sino también en términos de

contenido de ADNmt por espécimen durante el desarrollo del embrión humano in-vitro, incluida la etapa de blastocisto.

Según el presente estudio, una vez que tiene lugar la fecundación, el contenido de ADNmt por célula disminuye durante las divisiones embrionarias, alcanzando el nivel mínimo en la etapa de blastocisto. Además, lo mismo ocurre con el contenido total de ADNmt por embrión. Esto, junto con el hecho de que no parece existir degradación de ADNmt debido al cultivo in-vitro, como se mencionó anteriormente en el caso de los ovocitos con FF, sugiere que hay una degradación activa del contenido de ADNmt a lo largo del tiempo durante el desarrollo del embrión. Puede que esta dilución del ADNmt durante el desarrollo embrionario ofrezca protección contra el daño que producen los niveles altos de ROS en el ADNmt (Aiken *et al.*, 2008).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Hashimoto *et al.* en un estudio previo realizado también en humanos (Hashimoto *et al.*, 2017). Sin embargo, al contrario de lo que se observó en ese estudio, no se aprecia un aumento en el contenido de ADNmt por espécimen en la etapa de blastocisto preimplantacional. De hecho, es conocido que la expresión de muchos genes clave involucrados en la biogénesis mitocondrial y la replicación del ADNmt aumenta significativamente durante la implantación (Ren *et al.*, 2017). No obstante, las diferencias entre los resultados de la figura 20 y los de Hashimoto *et al.* al podrían deberse al hecho de que los especímenes en este último se cultivaron durante varias horas tras la desvitrificación, mientras que en el presente estudio los ovocitos no fueron vitrificados y el resto de las muestras se recogieron inmediatamente tras la desvitrificación. Esto indicaría quizás una limitación por la posible influencia del proceso de vitrificación/desvitrificación en el contenido de ADNmt. Esta cuestión se abordará en el Objetivo específico 2.

Otra posible limitación del estudio a destacar es el hecho de que los blastocistos analizados son aneuploides, por lo tanto, no se sabe cuáles serían los resultados con blastocistos euploides. Sin embargo, resulta interesante destacar que, con respecto al estado de la ploidía, la mayoría de los estudios coinciden en que existen niveles más altos de ADNmt en los embriones aneuploides en comparación con los embriones euploides (tabla suplementaria 1). En consecuencia, se podría estimar que el contenido

de ADNmt en los blastocistos euploides probablemente sea incluso más bajo que en los blastocistos aneuploides del estudio.

Por otro lado, la alta variabilidad en términos de contenido de ADNmt en los ovocitos en comparación con la distribución menos variable en el desarrollo embrionario lleva a reflexionar sobre el pequeño impacto que la masa mitocondrial inicial encontrada en los ovocitos puede tener sobre las cantidades finales de ADNmt en los blastocistos.

En cuanto a la correlación del contenido de ADNmt con la edad materna, varios estudios han llegado a conclusiones muy diferentes. Algunos de ellos observaron que no hay correlación con la edad materna y otros estudios demostraron correlaciones positivas y negativas (tabla suplementaria 1). En este caso, se ha observado una correlación positiva con la edad materna en los ovocitos MII y los embriones no bloqueados en etapa de división, pero no en los blastocistos. La falta de consenso podría deberse al rango de edad incluido en cada estudio.

Particularmente en los blastocistos, varios estudios han alcanzado resultados opuestos sobre el contenido de ADNmt según el día de desarrollo (tabla suplementaria 1). Algunos de ellos concluyen que el contenido de ADNmt es menor en el día 6 de desarrollo, mientras que otros investigadores no observan diferencias significativas, como es el caso de este estudio. Sin embargo, en la mayoría de estas publicaciones, la carga de ADNmt por célula se dedujo a partir de las células del trofoectodermo después de la biopsia del blastocisto, mientras que, en este estudio, se analizó el blastocisto completo. Por tanto, se debe esperar una mayor precisión ya que los datos son la verdadera representación del contenido de ADNmt por embrión.

El contenido de ADNmt en el blastocisto según la calidad del blastocisto también arroja resultados dispares (tabla suplementaria 1). Algunos estudios mostraron que el contenido de ADNmt fue mayor en embriones de baja calidad, mientras que otros no observan diferencias significativas, al igual que en el presente análisis. Una vez más, estas discrepancias pueden deberse al hecho de que algunas de las mediciones de ADNmt se hicieron a partir de las células del trofoectodermo y los cálculos se realizaron por célula, no por blastocisto. En este sentido, el trofoectodermo de baja calidad, que equivale a un bajo número de células, puede contener más ADNmt por célula que las

células de un blastocisto de muy buena calidad, en las que el contenido de ADNmt está más diluido.

En resumen, se han aportado nuevos resultados que apoyan la existencia de una alta variabilidad en el contenido de ADNmt en ovocitos intra- e inter- paciente, y se ha demostrado una asociación entre el bajo contenido de ADNmt y el FF independientemente de la edad materna y el tiempo de cultivo in-vitro. Además, se ha demostrado una degradación del contenido de ADNmt y un reparto del mismo entre las células durante las divisiones embrionarias a lo largo del desarrollo, incluyendo la etapa de blastocisto, así como la falta de influencia de la calidad o del día de desarrollo del blastocisto sobre su contenido de ADNmt.

Finalmente, el contraste con resultados previos sobre el contenido de ADNmt durante el desarrollo embrionario humano crea nuevos interrogantes acerca de la posible influencia de factores externos al cultivo in-vitro normal sobre la modulación del contenido de ADNmt antes de la implantación.

Objetivo específico 2. Describir el contenido de ADN mitocondrial y el estado mitocondrial en embriones humanos bajo condiciones de estrés.

Propósito

Parece claro que el estrés celular en general tiene influencia sobre el contenido de ADNmt (Sage and Knight, 2013; Vishnyakova *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018a). Sin embargo, aún no se ha demostrado si este fenómeno ocurre en embriones estresados ni tampoco se ha indagado sobre las causas que determinan que un embrión sobreviva o no tras sufrir una situación de estrés.

Este estudio es la primera evaluación directa de la influencia de la perturbación durante el cultivo in-vitro sobre el contenido de ADNmt y el perfil de expresión génica en el embrión humano. Este asunto se abordará mediante el análisis de embriones que han sufrido algún tipo de estrés como son los blastocistos tras un proceso de vitrificación/desvitrificación y los embriones bloqueados en etapa de división.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo con un total de 180 muestras donadas a investigación, procedentes de 81 pacientes y 5 donantes de ovocitos que fueron tratadas en IVIRMA Global (Valencia, España).

Todas las participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito.

Las muestras incluyeron 11 ovocitos MII, que consistieron en algunos de los ovocitos MII de la cohorte de donantes cuyos ovocitos no cumplieron con los requisitos para la donación, ya que se obtuvo un bajo número después de la aspiración folicular; 31 embriones no bloqueados en etapa de división; 32 embriones bloqueados en etapa de división; y 106 blastocistos aneuploides (figura 24).

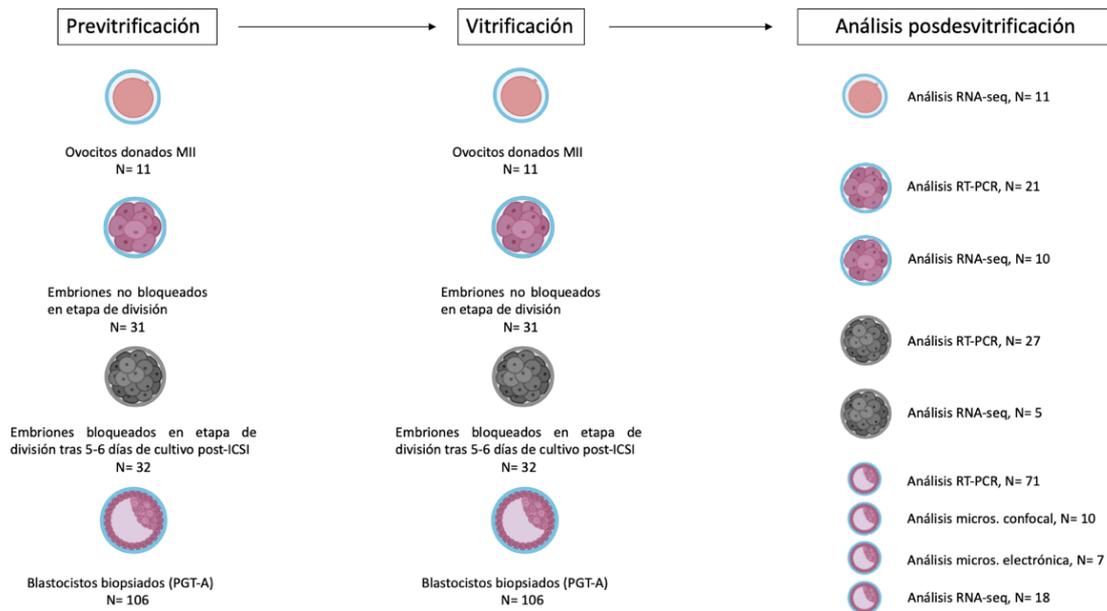


Figura 24. Esquema de las condiciones experimentales.

Estimulación ovárica y obtención y cultivo de especímenes

La estimulación ovárica y la obtención y el cultivo de especímenes se llevo a cabo según lo explicado en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

Cuantificación de ADNmt por RT-PCR

Se desvitrificaron y se recogieron de inmediato 21 embriones no bloqueados en etapa de división (día 3 de desarrollo) y se recogieron 27 embriones bloqueados en etapa de división tras 5 ó 6 días de cultivo después del ICSI. Además, se desvitrificaron un total de 73 blastocistos aneuploides y se recogieron para el análisis en diferentes puntos de tiempo entre 0 y 6 horas tras la desvitrificación. Específicamente, se recogieron 32 blastocistos aneuploides inmediatamente después de la desvitrificación (cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación), 10 blastocistos aneuploides cultivados durante 1-2 horas tras la desvitrificación, 13 blastocistos aneuploides cultivados durante 2-3

horas tras la desvitrificación, 7 blastocistos aneuploides cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación, y 9 blastocistos aneuploides cultivados durante 5-6 horas tras la desvitrificación. Todos los embriones se incluyeron completos en tubos de PCR con 2,5 µl de PBS y se conservaron a -80 ° C hasta el análisis por RT-PCR.

Para determinar el número de copias de ADNmt total y por célula, las muestras se cuantificaron mediante RT-PCR utilizando el sistema de amplificación de ADN SurePlex de Illumina según lo explicado en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

También se contaba con la información del contenido de ADNmt por célula antes de la vitrificación de casi todos los grupos de blastocistos. Este dato se determinó antes del presente estudio mediante NGS a partir de la biopsia de trofoectodermo utilizada para el análisis por PGT-A (Igenomix, S.L). **A pesar de que los contenidos de ADNmt por célula previtrificación y posdesvitrificación se midieron con técnicas diferentes, los datos son comparables, tal y como se muestra en las gráficas cedidas de la figura suplementaria 2.**

Se aplicó la prueba de Shapiro (Shapiro and Wilk, 1965; Royston, 1982) para evaluar si los datos siguieron una distribución normal.

Los datos se consideraron estadísticamente significativos si el P-valor era inferior a 0,05. La distribución de datos dio como resultado una distribución normal ($P > 0,05$).

Análisis de la ratio redox por microscopía confocal en blastocistos en recuperación tras el proceso de vitrificación/desvitrificación

Se analizaron 10 blastocistos aneuploides: 5 blastocistos se cultivaron durante 0 horas después de la desvitrificación y 5 blastocistos se cultivaron durante 4-5 horas después de la desvitrificación.

Para determinar la ratio redox, se cuantificó la autofluorescencia de NADH y la autofluorescencia de FAD de las muestras mediante microscopía confocal, tal y como se indica en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

Recuento de mitocondrias por microscopía electrónica de transmisión en blastocistos en recuperación tras el proceso de vitrificación/desvitrificación

Se incluyeron 7 blastocistos aneuploides: 4 blastocistos aneuploides cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación y 3 blastocistos aneuploides cultivados durante 5 horas tras la desvitrificación.

Los embriones se procesaron y se analizaron según lo explicado en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

Perfiles de expresión génica: construcción de librerías y RNA-seq

Se incluyeron 44 muestras vitrificadas para el análisis de RNA-seq: 11 ovocitos donados MII recogidos inmediatamente tras la desvitrificación, 10 embriones no bloqueados en etapa de división recogidos inmediatamente tras la desvitrificación, 5 embriones bloqueados en etapa de división vitrificados tras 5 o 6 días después del ICSI y recogidos inmediatamente tras la desvitrificación, 8 blastocistos aneuploides cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación y 10 blastocistos aneuploides cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación.

Todos los especímenes se incluyeron completos de forma individual en tubos de PCR con 2 µl de tampón de reacción 10X del kit SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing y se conservaron a -80 ° C hasta la preparación para el análisis.

El ARNm se transformó a ADNc y se crearon las librerías genómicas según lo explicado en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

Se secuenció un promedio de 37.030.006 lecturas por muestra, y alrededor del 81,64% se mapearon con éxito. Los recuentos brutos se utilizaron directamente para el análisis de la expresión génica diferencial.

Para comprender mejor la identidad de los embriones durante el desarrollo embrionario in-vitro normal y de los embriones bajo situación de estrés durante el cultivo in-vitro, se realizó un análisis de expresión génica diferencial para cinco comparaciones diferentes:

- 1) Ovocitos MII (N=11) versus (vs) embriones no bloqueados en etapa de división (N=10).
- 2) Embriones no bloqueados en etapa de división (N=10) vs blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación (N=8).
- 3) Blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación (n= 10) vs blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación (n= 8).
- 4) Embriones bloqueados en etapa de división (n= 5) vs embriones no bloqueados en etapa de división (n= 10).
- 5) Embriones bloqueados en etapa de división (n = 5) vs blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación (n= 8). Para esta comparación, se descartaron las vías expresadas diferencialmente de forma significativa que coincidían con las vías significativas asociadas al cambio de estadio embrionario (comparación de embriones no bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación).

Validación de RNA-seq

Para corroborar los resultados del análisis de RNA-seq, las muestras de ADNc de dos grupos de comparación se analizaron mediante RT-PCR en un sistema StepOnePlus (Applied Biosystems, EEUU) con Power-Up SYBR green (ThermoFisher, EEUU), para determinar los niveles de expresión génica de varios genes. Estos genes se seleccionaron entre los principales genes diferencialmente expresados en función de su importancia y su inclusión dentro de funciones significativamente enriquecidas (las descripciones de los primers se proporcionan en la tabla suplementaria 4). Estos genes se sobreexpresan o infraexpresan en el primer factor de comparación de los siguientes grupos de análisis:

- 1) Blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación vs blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación: histonolisin N-metiltransferasa 2 (EHMT2; Fold change= 24,77; P < 0,05) y

sulfotransferasa 1A4 (SULT1A4; Fold change= -2,92; P < 0,05).

- 2) Embriones bloqueados en etapa de división vs embriones no bloqueados en etapa de división: locus 1 de la subunidad C de membrana de la ATP sintasa (ATP5MC1; Fold change= 2,91; P < 0,05) y proteína 1 expresada en derivados de la cresta neural y cardíaca (HAND1; Fold change= -8,34; P < 0,05).

Estos genes están relacionados con estrés celular (EHMT2), procesos metabólicos (SULT1A4), producción de ATP (ATP5MC1) y desarrollo de blastocistos (HAND1).

Los niveles de expresión génica se normalizaron al gen housekeeping gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se cuantificaron mediante el método $\Delta\Delta CT$. El fold change se calculó como la expresión génica normalizada ($2^{-\Delta CT}$) en cada muestra dividida por la expresión génica normalizada ($2^{-\Delta CT}$) en una muestra de referencia aleatoria.

Análisis estadístico

Para estabilizar la varianza, se realizó una transformación logarítmica de los datos de RT-PCR (Huber *et al.*, 2002; Durbin and Rocke, 2004).

El contenido de ADNmt se comparó entre los grupos mediante ANOVA con análisis de comparación múltiple de Tukey o t-test según correspondiera. El análisis del contenido de ADNmt con respecto al nivel de desarrollo en embriones bloqueados en etapa de división se llevó a cabo mediante estudio de correlación. Los valores de P < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Las diferencias de ratio redox y recuento de mitocondrias según las horas de cultivo de los blastocistos tras la desvitrificación se analizaron mediante t-test. La configuración mitocondrial se observó por microscopia confocal de forma meramente descriptiva.

El análisis de RNA-seq, los estudios de correlación, el análisis de componentes principales y el análisis de expresión génica diferencial se realizaron con el paquete DESeq2. Los análisis de expresión génica diferencial se realizaron utilizando la prueba paramétrica de Wald con corrección de prueba múltiple de Benjamini-Hochberg (P-valor ajustado, padj). Los genes con un padj de $< 0,01$ y un fold change de \log_2 de ± 2 se consideraron expresados de forma significativa. El algoritmo fgsea se utilizó para el análisis de enriquecimiento funcional con las categorías de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y de Gene Ontology (GO) (procesos biológicos). Los datos de la validación se analizaron aplicando t-test.

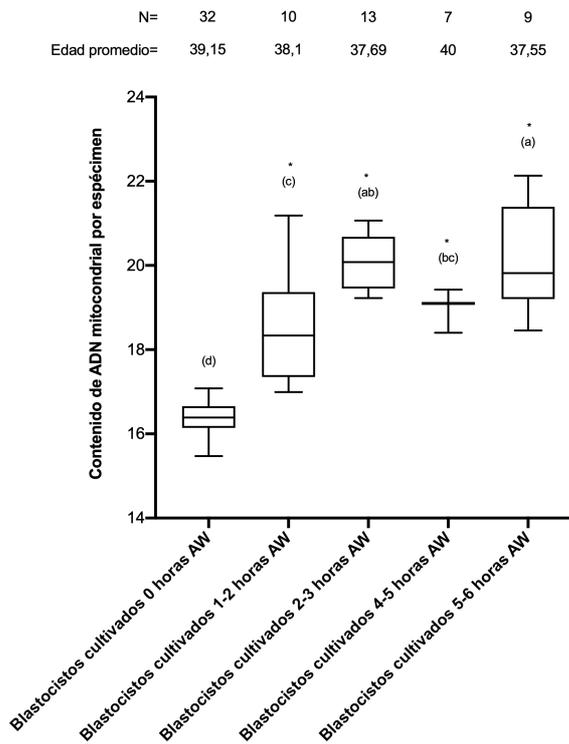
Resultados

Contenido de ADNmt después de la desvitrificación en blastocistos

Se observa un aumento significativo ($P < 0,05$) en el contenido de ADNmt total por blastocisto a partir de las 1-2 horas de cultivo tras la desvitrificación, alcanzándose una meseta tras 2-3 horas de cultivo que se mantiene hasta las 5-6 horas de cultivo tras la desvitrificación. Además, no hay indicios de que el incremento de ADNmt tienda a disminuir a partir de las 5-6 horas de cultivo (figura 25A).

Respecto al contenido de ADNmt por célula, en este caso el incremento significativo ($P < 0,05$) de ADNmt se comienza a observar a partir de las 2 horas de cultivo tras la desvitrificación. Este contenido se mantiene estable hasta las 5-6 horas tras la desvitrificación y tampoco muestra indicios de que tienda a disminuir a partir de este momento (figura 25B).

A



B

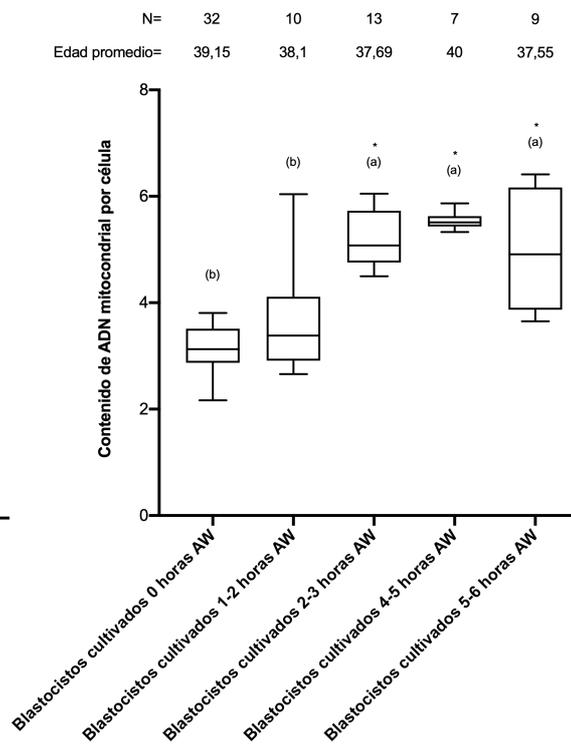


Figura 25. Análisis del contenido de ADNmt después de la desvitrificación en blastocistos. A) Contenido de ADNmt total por espécimen observado en blastocistos cultivados durante diferentes períodos de tiempo después de la desvitrificación (after warming, AW). B) Contenido de ADNmt por célula observado en blastocistos cultivados durante diferentes períodos de tiempo AW.

* Prueba de comparaciones múltiples de Tukey, ($P < 0,05$).

** Edad en años.

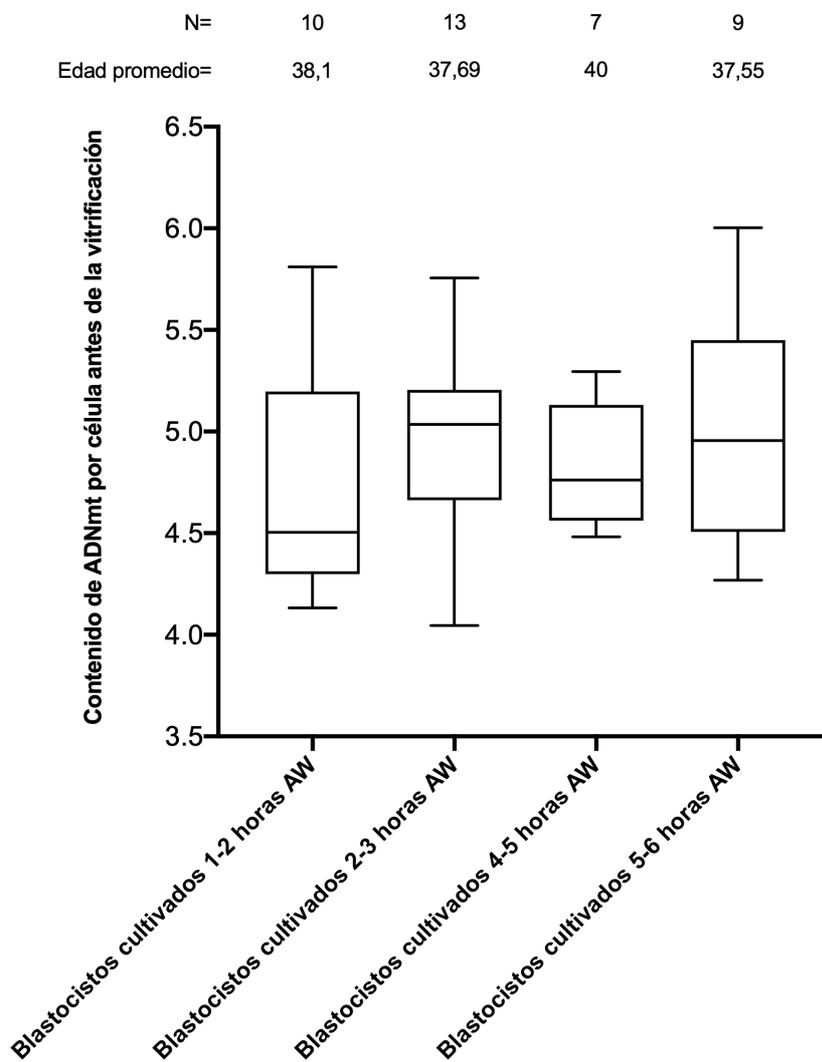
Con respecto a las diferencias en el contenido de ADNmt por célula antes de la vitrificación, se observan varias cuestiones:

Por un lado, no hay diferencias significativas en términos de contenido de ADNmt por célula ($P > 0,05$) entre los grupos de blastocistos que tenían datos conocidos antes de la vitrificación (figura 26A).

Además, los valores de ADNmt por célula antes de la vitrificación se usaron para comparar, dentro de cada grupo de blastocistos, el contenido de ADNmt por célula antes y después de la vitrificación/desvitrificación. Se observa que, poco después tras la desvitrificación (a las 1-2 horas de cultivo), existe una disminución significativa ($P < 0,05$)

del contenido de ADNmt por célula con respecto al contenido que tenían los blastocistos antes de la vitrificación y, a medida que pasan las horas de cultivo (a las 4-5 horas de cultivo), el contenido de ADNmt por célula aumenta y sobrepasa significativamente ($P < 0,05$) el contenido que había antes de la vitrificación. Finalmente, estos valores de ADNmt acaban volviendo a su nivel inicial previo a la vitrificación a las 5-6 horas de cultivo (figura 26B).

A



B

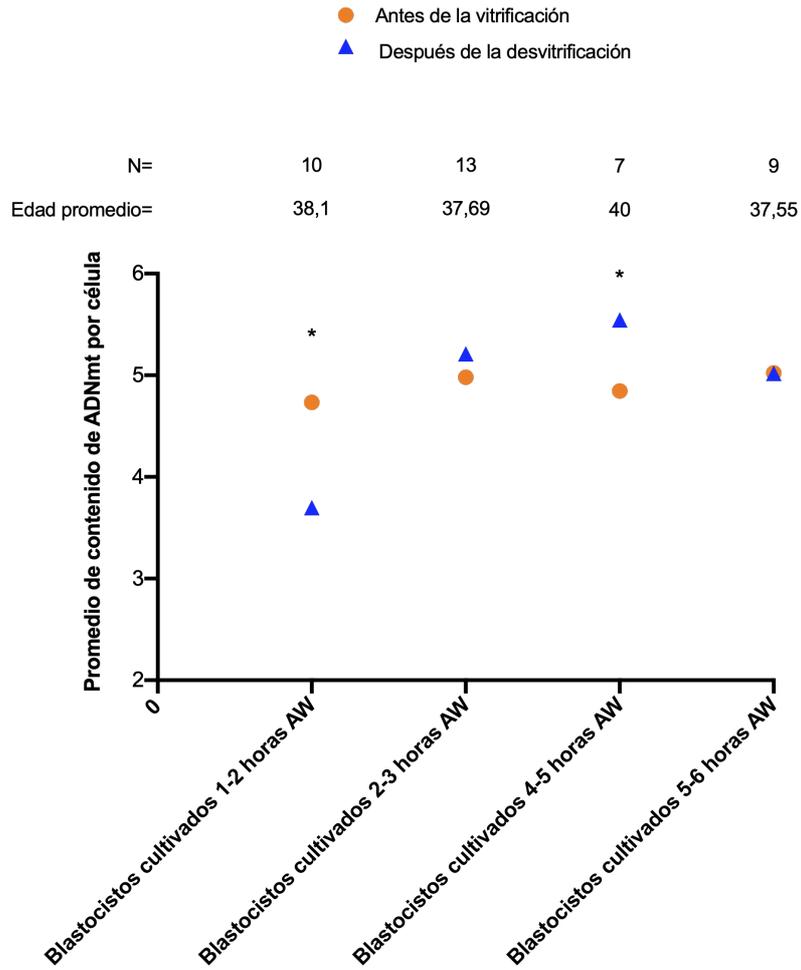


Figura 26. Análisis del contenido de ADNmt por célula previtrificación y posdesvitrificación.

A) Contenido de ADNmt por célula medido antes de la vitrificación en blastocistos cultivados durante diferentes períodos de tiempo después de la desvitrificación (after warming, AW). B) Promedio del contenido de ADNmt por célula antes de la vitrificación y después de la desvitrificación en blastocistos cultivados durante diferentes períodos de tiempo AW.

* Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el contenido de ADNmt por célula previtrificación y posdesvitrificación.

** Edad en años.

Ratio redox analizada por microscopía confocal en blastocistos en recuperación tras el proceso de vitrificación/desvitrificación

El análisis de cuantificación de fluorescencia no arroja diferencias significativas en cuanto a la ratio redox entre los blastocistos recién desvitrificados (0 horas tras la desvitrificación, ratio redox medio= 1,37) y los blastocistos que se recuperan tras la desvitrificación (cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación, ratio redox medio= 1,38) (figura 27).

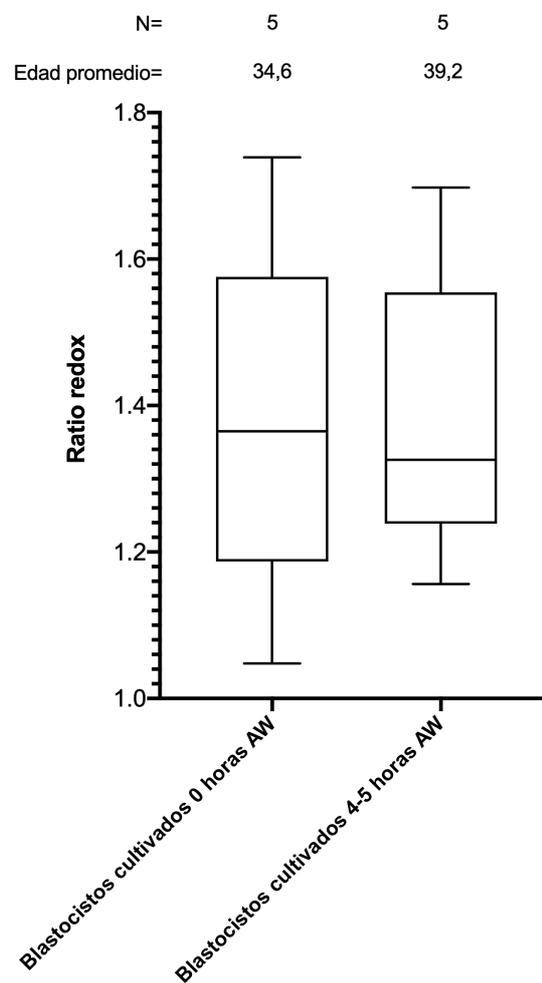


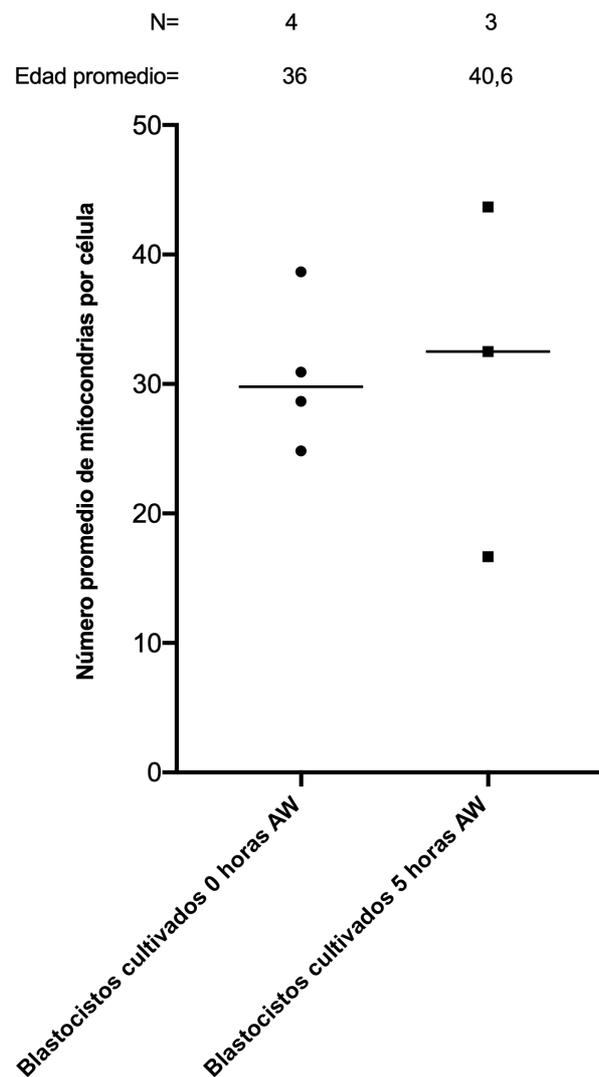
Figura 27. Ratio redox (intensidad de fluorescencia de NADH/ intensidad de fluorescencia de FAD) medida con microscopía confocal en blastocistos cultivados durante 0 y 4-5 horas después de la desvitrificación (after warming, AW).

* Edad en años.

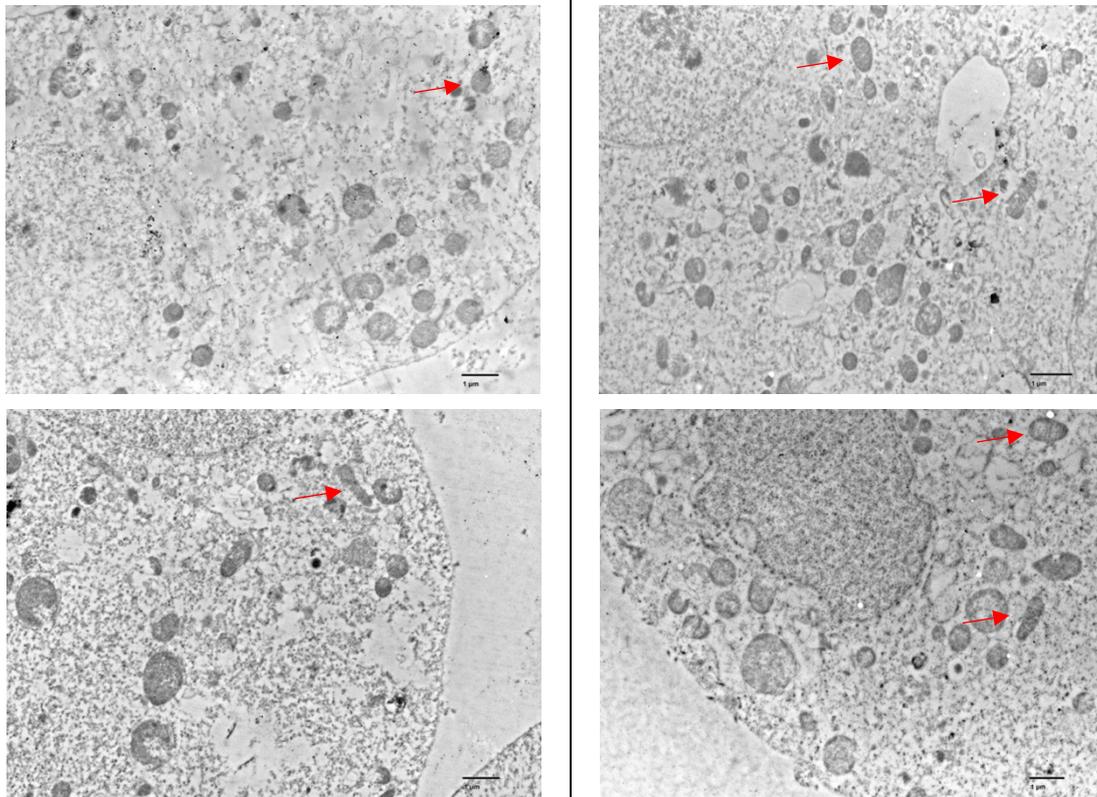
Recuento de mitocondrias por microscopía electrónica de transmisión en blastocistos en recuperación tras el proceso de vitrificación/desvitrificación

Con respecto al recuento mitocondrial, no se observan diferencias significativas en el número promedio de mitocondrias por célula entre los grupos. Los blastocistos recién desvitrificados (0 horas de cultivo tras la desvitrificación) tienen un valor promedio de mitocondrias por célula de 30,77, mientras que los blastocistos cultivados durante 5 horas después de la desvitrificación tienen un valor promedio de mitocondrias por célula de 30,94 (figura 28A). Además, no se aprecian diferencias visuales en la configuración de la matriz mitocondrial que indiquen variaciones en el nivel de actividad mitocondrial entre los grupos (figura 28B).

A



B



Blastocistos cultivados durante 0 horas AW

Blastocistos cultivados durante 5 horas AW

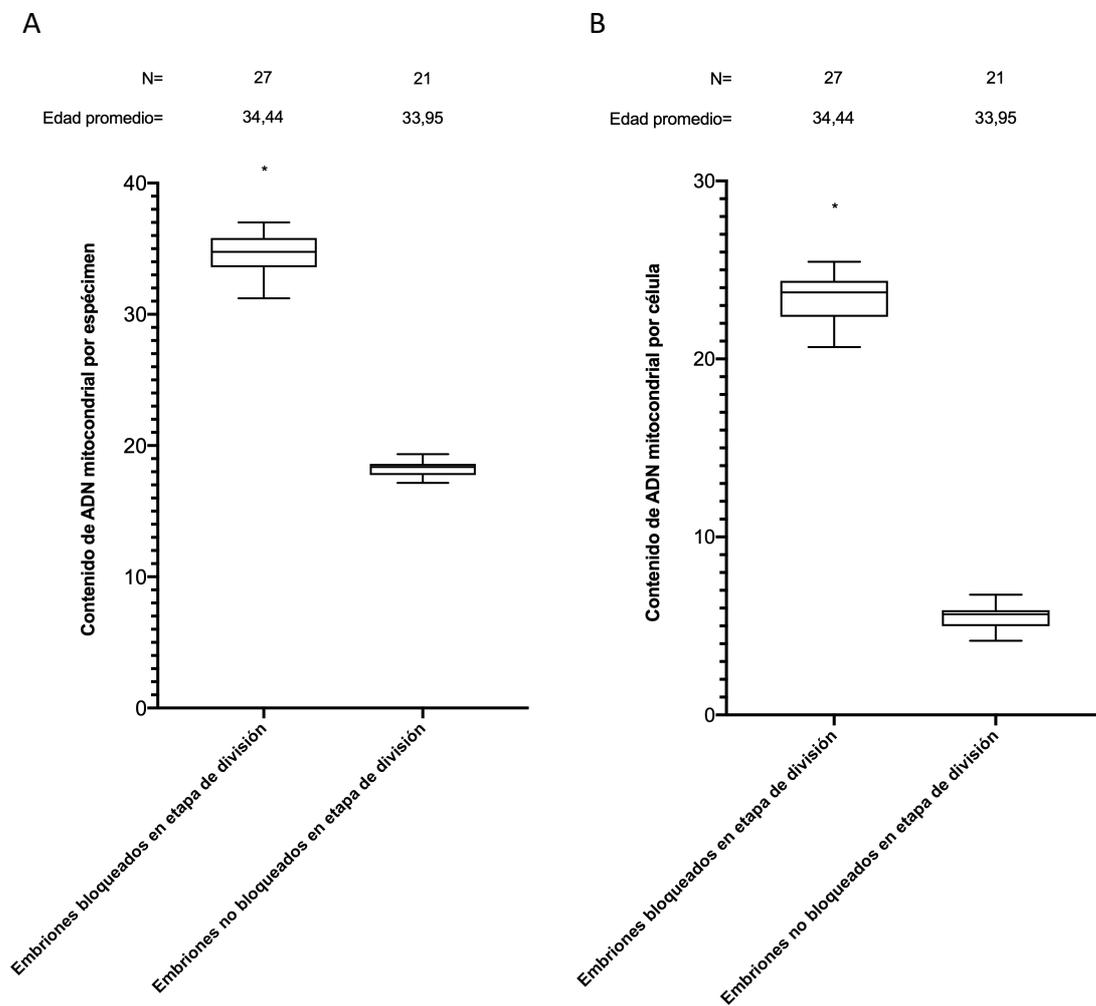
Figura 28. Análisis mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión en blastocistos en recuperación tras un proceso de vitrificación/desvitrificación. A) Recuento promedio de mitocondrias por célula entre blastocistos cultivados durante 0 y 5 horas después de la desvitrificación (after warming, AW). B) Observación de la configuración mitocondrial entre blastocistos cultivados durante 0 y 5 horas AW (x2500). Barra escala= 1 µm.

* Las flechas rojas señalan ejemplos de mitocondrias.

** Edad en años.

Contenido de ADNmt por célula en embriones bloqueados en etapa de división

Los embriones bloqueados en etapa de división muestran un contenido de ADNmt total y por célula significativamente mayor que el de los embriones no bloqueados en etapa de división ($P < 0,05$; figuras 29A y 29B). Además, hay una correlación positiva ($P < 0,05$) entre el contenido de ADNmt total y por célula y el estado de desarrollo (número de células) alcanzado antes de la detención embrionaria (figuras 29C y 29D).



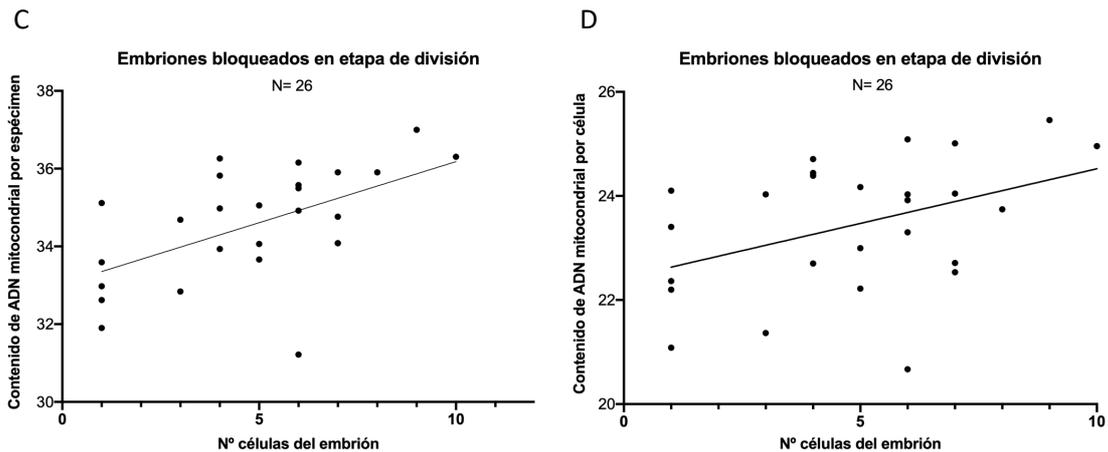


Figura 29. Contenido de ADN mitocondrial (ADNmt) en embriones bloqueados en etapa de división. A) Contenido de ADNmt total por embrión observado en embriones bloqueados y no bloqueados en etapa de división. B) Contenido de ADNmt por célula observado en embriones bloqueados y no bloqueados en etapa de división. C) Contenido de ADNmt total por embrión en embriones bloqueados en etapa de división según su nivel de desarrollo. D) Contenido de ADNmt por célula en embriones bloqueados en etapa de división según su nivel de desarrollo.

* $P < 0,05$.

** Edad en años.

Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para el estudio de la desvitrificación de blastocistos y el bloqueo de embriones en etapa de división

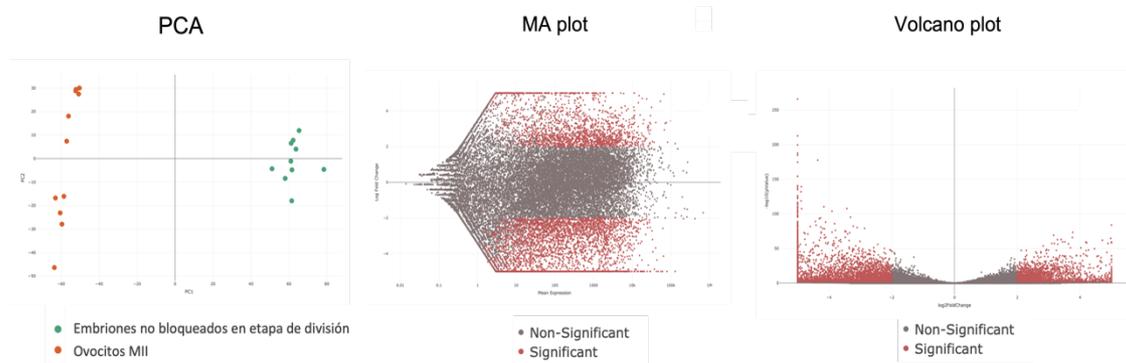
Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para identificar las vías sobre- e infra-expresadas significativamente entre los grupos de comparación ($P < 0,05$; tabla suplementaria 5).

Se observa una separación total en el análisis bidimensional de componentes principales (PCA) para las comparaciones que abarcan el desarrollo embrionario natural in-vitro (ovocitos MII vs embriones no bloqueados en etapa de división y embriones no bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación), indicando un alto grado de expresión génica diferencial entre los grupos (figuras 30A y 30B).

Al analizar las situaciones de estrés, en términos generales, casi no hay diferencias en la expresión génica entre los blastocistos cultivados durante 4-5 y 0 horas después de la desvitrificación, aunque el PCA indica cierto grado de separación (figura 30C y tabla suplementaria 6). Sin embargo, se observan diferencias marcadas entre embriones bloqueados y no bloqueados en etapa de división (figura 30D).

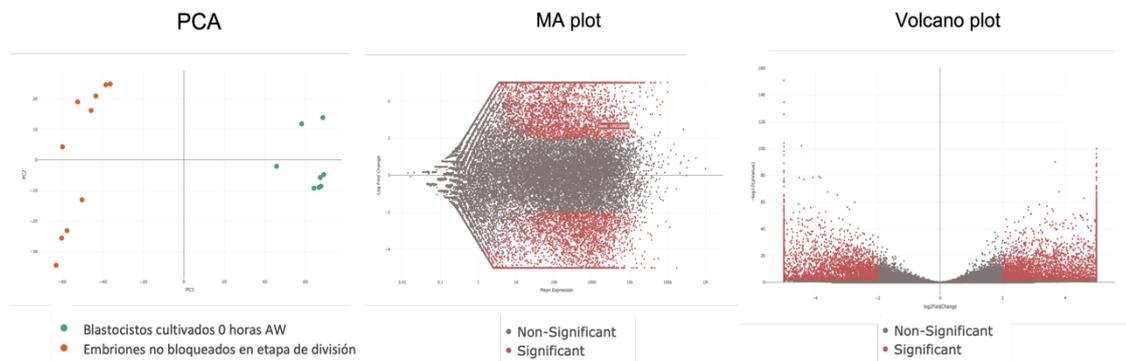
A

Ovocitos MII vs embriones no bloqueados en etapa de división



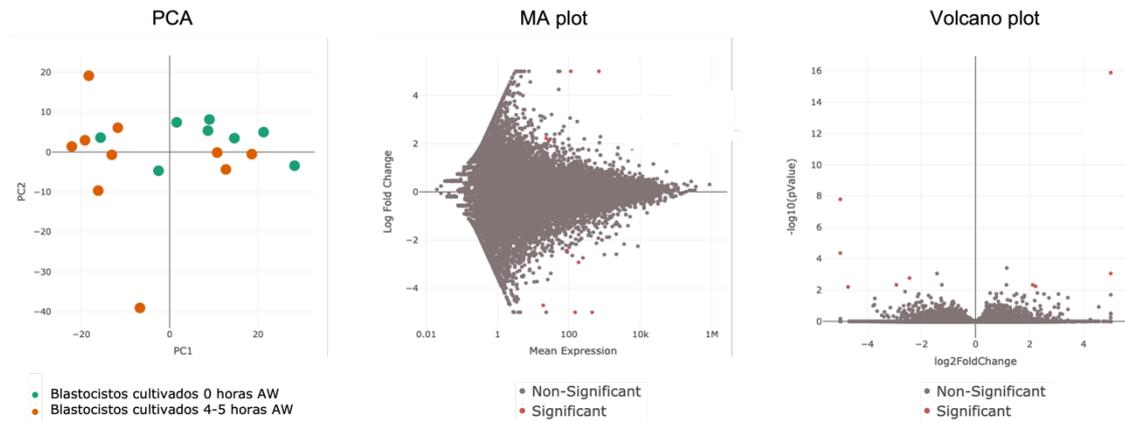
B

Embriones no bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados 0 horas AW



C

Blastocistos cultivados 4-5 horas AW vs blastocistos cultivados 0 horas AW



D

Embriones bloqueados en etapa de división vs embriones no bloqueados en etapa de división

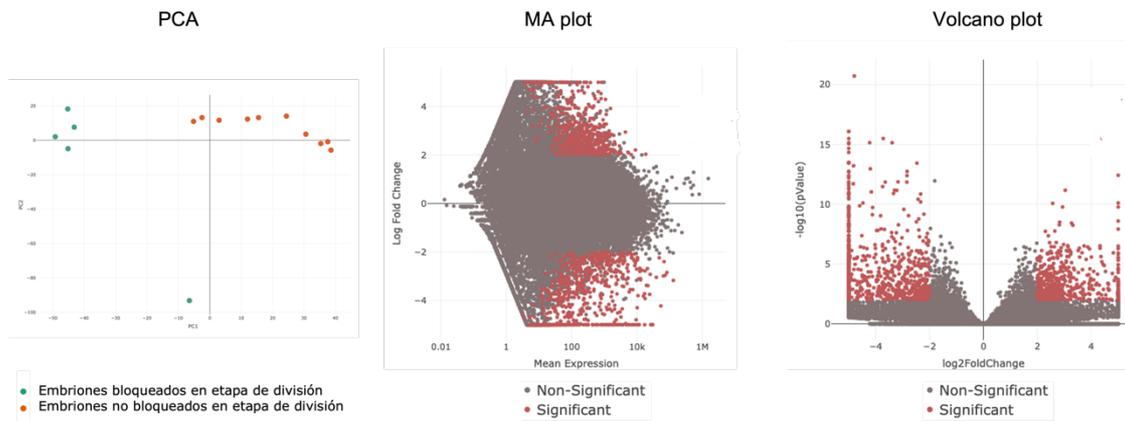


Figura 30. Análisis bidimensional de componentes principales (PCA), MA plot y volcano plot de cuatro comparaciones de estudio: A) Ovocitos MII vs embriones no bloqueados en etapa de división; B) embriones no bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación (after warming, AW); C) blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW; D) embriones bloqueados en etapa de división vs embriones no bloqueados en etapa de división.

*Las gráficas que corresponden a la comparación “Embriones bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW” no se adjuntan ya que incluyen las diferencias debidas al cambio de estadio, y por tanto no son datos representativos.

Analizando las primeras divisiones embrionarias, no se observan rutas asociadas a actividad mitocondrial sobre- o infra- expresadas significativamente ($P > 0,05$) entre ovocitos MII y embriones no bloqueados en etapa de división con las categorías de GO (figura 31) y KEGG (figura suplementaria 3).



Figura 31. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de ovocitos MII vs embriones no bloqueados en etapa de división. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de GO significativas ($P < 0,05$).

* Las barras azules indican sobreexpresión en ovocitos MII; las barras naranjas indican infraexpresión en ovocitos MII.

Sin embargo, al comparar embriones no bloqueados en etapa de división y blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación, se observan numerosas rutas relacionadas con producción y consumo de ATP y formación de crestas mitocondriales sobreexpresadas significativamente ($P < 0,05$) en los blastocistos en comparación con los embriones en etapa de división (figura 32 y figura suplementaria 4). Este marcado cambio coincide con la activación metabólica documentada en el estadio de blastocisto. Además, también se observan rutas de regulación epigenética, de diferenciación de células madre y algunas rutas de estrés celular (liberación del citocromo C, respuesta al estrés del RE, respuesta al factor de necrosis tumoral, etc.) sobreexpresadas ($P < 0,05$) en este cambio de estadio (figura 32).



Figura 32. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de embriones no bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitricación (after warming, AW). Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de GO significativas ($P < 0,05$) de interés.

* Las barras azules indican sobreexpresión en embriones no bloqueados en etapa de división; las barras naranjas indican infraexpresión en embriones no bloqueados en etapa de división.

Cuando se analizan las situaciones de perturbación en el cultivo in-vitro o del desarrollo embrionario normal se observan varias cuestiones:

En los blastocistos cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación, se observan varias vías sobreexpresadas significativamente ($P < 0,05$) como la apoptosis, vías relacionadas con cáncer y vías relacionadas con la detención celular, en comparación con los blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación. Estas vías metabólicas, entre otras, actúan como vías sensoras del estrés celular (Ljungman, 2000; Liebermann and Hoffman, 2008; Fimia and Piacentini, 2009; Simmons *et al.*, 2009; Fulda *et al.*, 2010; Muralidharan and Mandrekar, 2013; Chircop and Speidel, 2014). En concreto, se observa en blastocistos cultivados durante 4-5 horas, una sobreexpresión significativa ($P < 0,05$) de las vías de señalización de apoptosis intrínseca y extrínseca, de respuesta al daño del ADN con transducción de señales, de regulación de la transducción de señales por el regulador p53, de senescencia celular, de detención del ciclo celular, de control del ciclo celular y de control de la integridad celular durante la mitosis, entre otras (figura 33).

Las rutas de desarrollo embrionario también se ven afectadas en blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación en comparación con los blastocistos recién desvitrificados. Concretamente, con las categorías de GO, rutas asociadas al establecimiento de la polaridad celular, a la regulación de la epigenética, al desarrollo de blastocistos y al crecimiento en útero se sobreexpresan significativamente ($P < 0,05$) en blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación. Además, no se encuentran diferencias en cuanto a rutas de actividad mitocondrial entre ambos tipos de blastocistos ($P > 0,05$; figura 33).

Con las categorías de KEGG, se identifican varias vías relacionadas con cáncer que se sobreexpresan significativamente ($P < 0,05$) en los blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación en comparación con los blastocistos recién desvitrificados ($P < 0,05$; figura suplementaria 5).

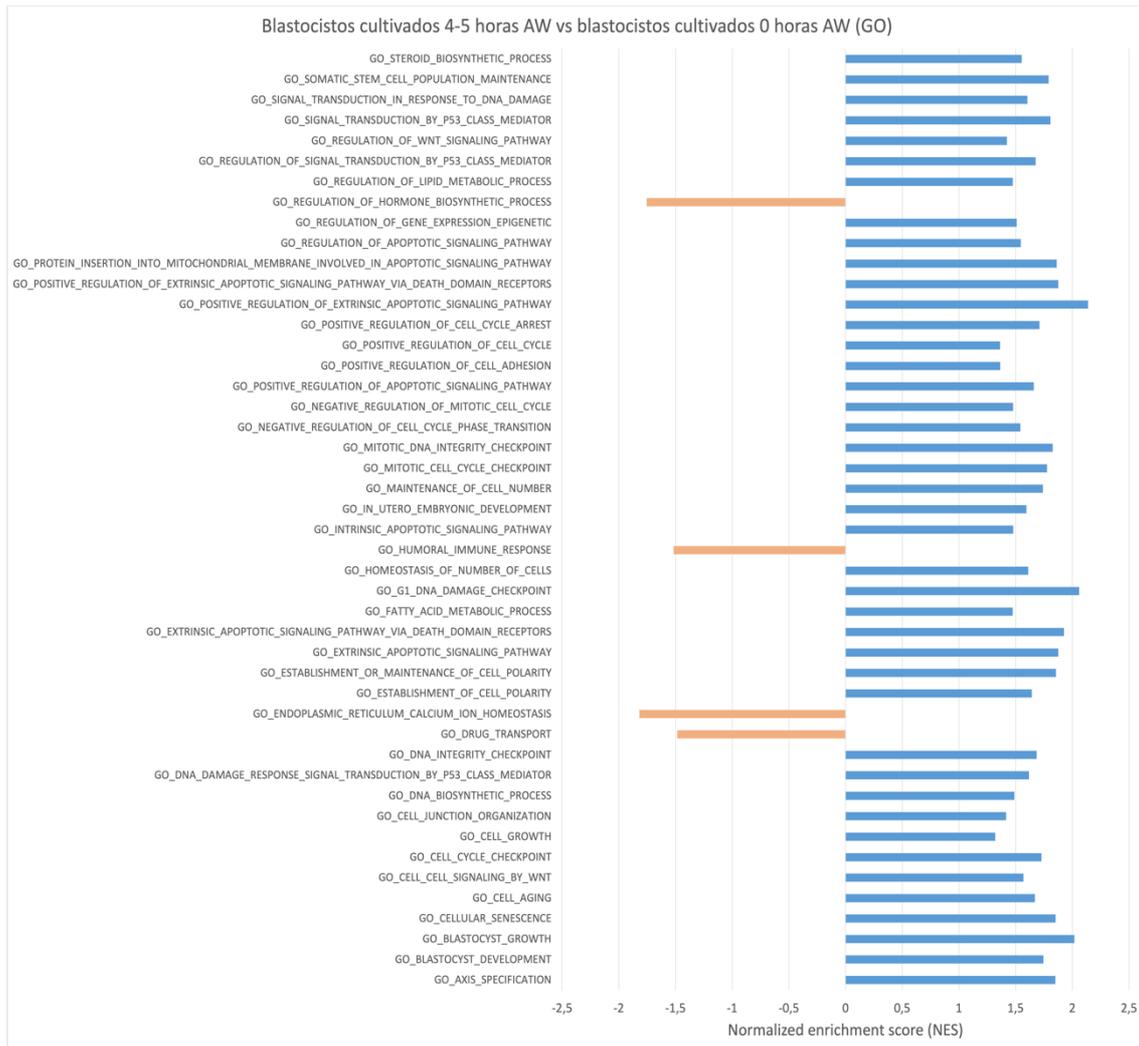


Figura 33. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación (after warming, AW) vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de GO significativas ($P < 0,05$) de interés. * Las barras azules indican sobreexpresión en blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW; las barras naranjas indican infraexpresión en blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW.

En cuanto al bloqueo embrionario, se observa con las categorías de GO una sobreexpresión significativa ($P < 0,05$) de varias vías de producción de ATP y estrés celular en embriones bloqueados en etapa de división en comparación con embriones no bloqueados en etapa de división. Específicamente, los embriones bloqueados sobreexpresan vías relacionadas con el estrés asociado al RE, con la apoptosis relacionada con mitocondrias y con la actividad mitocondrial (ej., formación de crestas,

traducción de la membrana mitocondrial, transporte, ensamblaje y organización transmembrana, síntesis de ATP, etc.). Además, los embriones bloqueados muestran una infraexpresión significativa ($P < 0,05$) de vías relacionadas con la segregación cromosómica, los procesos de especificación de patrones y la división mitótica (figura 34).

Con las categorías de KEGG, se observa una sobreexpresión significativa ($P < 0,05$) de la fosforilación oxidativa en los embriones bloqueados en etapa de división en comparación con el control no bloqueado (figura suplementaria 6).

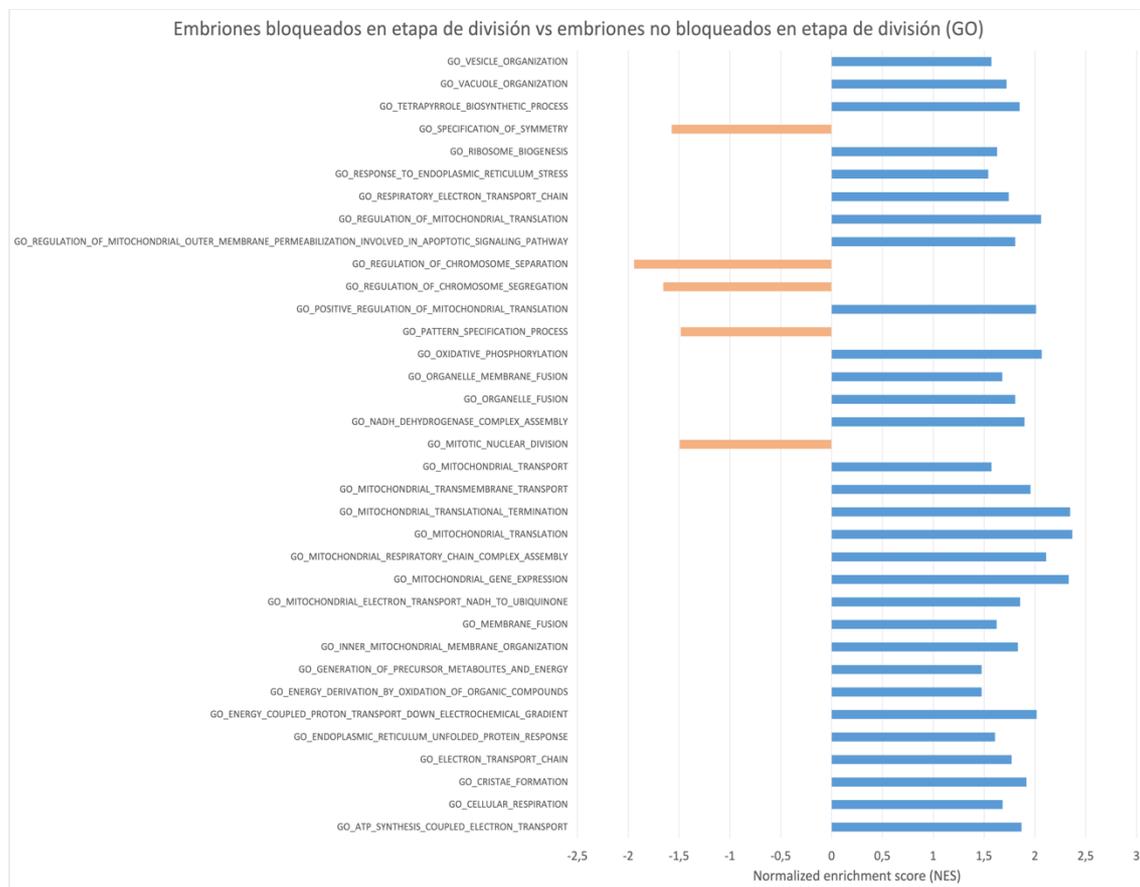


Figura 34. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de embriones bloqueados en etapa de división vs embriones no bloqueados en etapa de división. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de GO significativas ($P < 0,05$) de interés.

* Las barras azules indican sobreexpresión en embriones bloqueados en etapa de división; las barras naranjas indican infraexpresión en embriones bloqueados en etapa de división.

Al comparar los dos escenarios en los que se observaron incrementos de ADNmt significativos, es decir, el bloqueo embrionario y la recuperación del proceso de vitrificación/desvitrificación, se aprecian, con las categorías de GO, varias rutas relacionadas con la regulación de la respuesta al estrés (como respuesta al daño del ADN, regulación de la apoptosis y la respuesta inflamatoria, etc.) y rutas de capacidad de desarrollo embrionario (como el desarrollo embrionario en útero, el desarrollo de placenta, vías de señalización WNT, etc.) sobreexpresadas significativamente ($P < 0,05$) en blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación en comparación con embriones bloqueados en etapa de división (figura 35).

Además, con las categorías de KEGG se observa que el metabolismo del piruvato y vías relacionadas con el cáncer también se sobreexpresan significativamente ($P < 0,05$) en blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación en comparación con los embriones bloqueados en etapa de división (figura suplementaria 7).

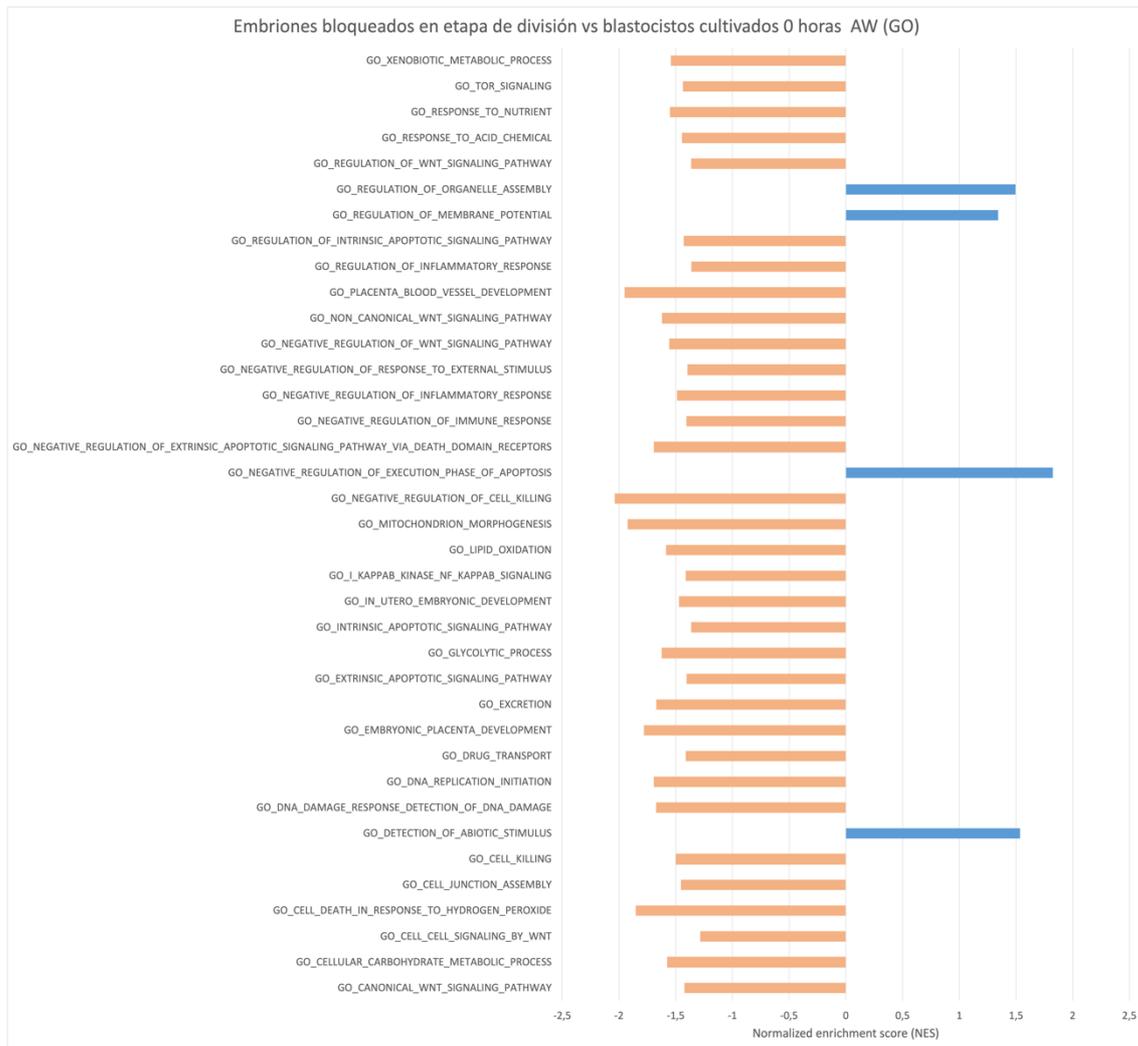


Figura 35. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de dos condiciones de estrés embrionario diferentes: embriones bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación (AW). Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de GO significativas ($P < 0,05$) de interés.

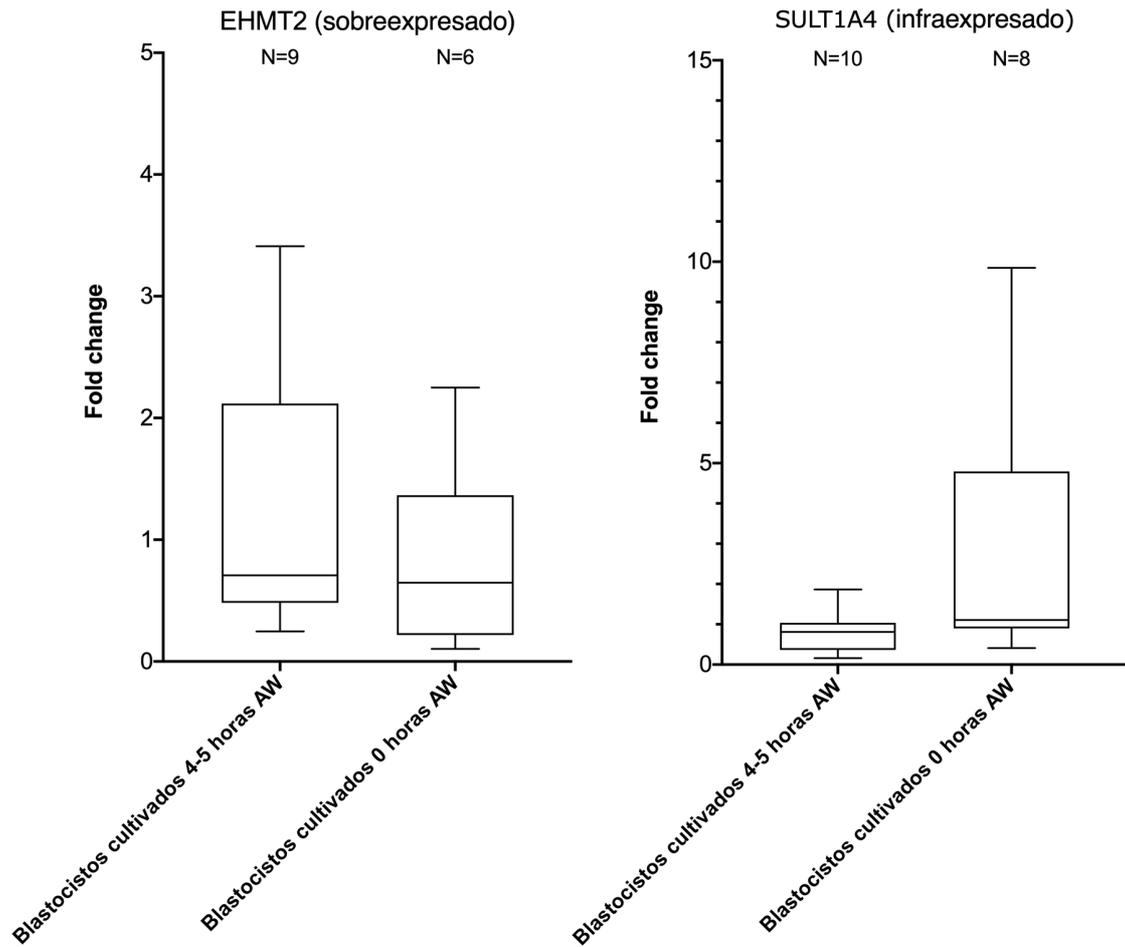
* Las barras azules indican sobreexpresión en embriones bloqueados en etapa de división; las barras naranjas indican infraexpresión en embriones bloqueados en etapa de división.

Validación de RNA-seq

Para validar los resultados de RNA-seq, todos los genes seleccionados (EHMT2, SULT1A4, ATP5MC1 y HAND1) se analizaron mediante RT-PCR a partir de las mismas

muestras de cDNA de dos de los grupos examinados por RNA-seq. Los resultados de RT-PCR corroboran la expresión génica diferencial observada por RNA-seq en los grupos de comparación (figura 36), aunque esta expresión no es estadísticamente significativa debido a la alta variabilidad entre las muestras.

A



B

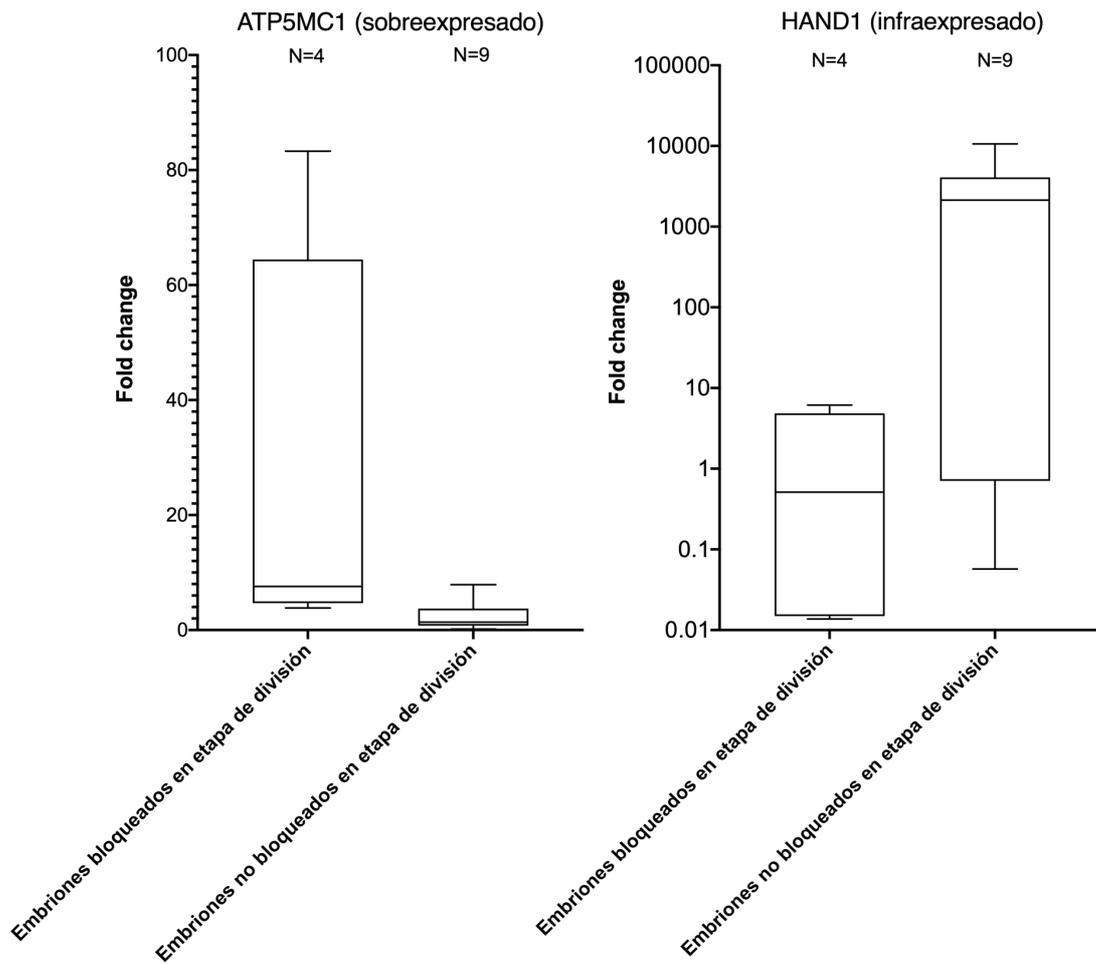


Figura 36. Validación de datos de secuenciación de RNA-seq en dos grupos de comparación. A) Niveles de expresión de genes relacionados con estrés celular (EHMT2) y procesos metabólicos (SULT1A4) en blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación (after warming, AW) vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW y B) niveles de expresión de genes relacionados con producción de ATP (ATP5MC1) y desarrollo de blastocistos (HAND1) en embriones bloqueados en etapa de división vs embriones no bloqueados en etapa de división (eje Y para HAND1 en escala logarítmica).

Los cambios en la expresión génica se validaron mediante RT-PCR, se cuantificaron mediante el método $\Delta\Delta CT$ y se expresaron como fold change.

Discusión de resultados

Los embriones humanos que sufren estrés inducido por factores internos o externos pueden desencadenar una respuesta al estrés para restaurar la homeostasis (Lee and Wei, 2005; Eisner *et al.*, 2018; Picard and McEwen, 2018).

La etapa preimplantacional es un período importante de sensibilidad ambiental debido a la reprogramación epigenética (Chason *et al.*, 2011), y las condiciones subóptimas durante las TRA o los procesos relacionados (como la vitrificación), pueden tener efectos generalizados sobre el metabolismo, influir en la viabilidad del embrión y desencadenar la inducción de respuestas de estrés embrionario (McConnell and Petrie, 2004; Chason *et al.*, 2011; Feuer and Rinaudo, 2012; Breton-Larrivée *et al.*, 2019; Ramos-Ibeas *et al.*, 2019).

Antes de la activación génica embrionaria existe una mayor sensibilidad al estrés producido por el cultivo in-vitro en comparación con las siguientes etapas preimplantacionales. Tras esta activación, y junto a la aparición de uniones tipo gap entre las células durante la compactación, se da una mejor transmisión de señales y las células adquieren cierta capacidad de respuesta a las condiciones externas. No obstante, hay embriones que no tienen una activación del todo eficiente y pueden verse comprometidos para la adaptación al entorno in-vitro (Cagnone and Sirard, 2016).

A pesar de que durante el cultivo in-vitro las mitocondrias y el metabolismo están en relativo reposo, se encuentran más alterados en comparación con la situación in-vivo. Todos los factores asociados al cultivo in-vitro que perturban a las mitocondrias pueden hacer que se produzca una menor fosforilación oxidativa y que el embrión deba adaptarse para superar el déficit energético (Cagnone and Sirard, 2016).

Dentro de este marco, es importante señalar el efecto Warburg en los blastocistos (Al-Azzam, 2020). Este metabolismo necesario de glucólisis aerobia es complementario a la producción energética oxidativa, y se basa en utilización de la glucosa para producir lactato a pesar de que exista una presencia suficiente de oxígeno en el útero (Gardner *et al.*, 2000; Cagnone and Sirard, 2016). No obstante, una sobreexpresión de este efecto, debida a una perturbación mitocondrial durante el cultivo, podría comprometer la

respuesta al estrés. En este contexto, la alteración mitocondrial que provoca el cultivo in-vitro en las primeras etapas de desarrollo se ve compensada por una intensificación de la glucólisis aerobia (efecto Warburg), la cual crea un desequilibrio metabólico y reduce la calidad del embrión, pudiendo además producir modificaciones epigenéticas en el feto que podrían ser la causa de la aparición de algunos síndromes. Además, la sobreexpresión de un metabolismo similar al del cáncer puede afectar al reconocimiento materno-embionario ya que el endometrio puede evitar la invasión de células descontroladas metabólicamente (Cagnone and Sirard, 2016).

El contenido de ADNmt parece que puede verse afectado por las situaciones de estrés. De hecho, se ha informado sobre variaciones en el número de copias de ADNmt como mecanismo involucrado en la respuesta mitocondrial al estrés (Lee and Wei, 2005; Sage and Knight, 2013; Vishnyakova *et al.*, 2016; Picard and McEwen, 2018; Wang *et al.*, 2018a).

No obstante, la posibilidad de que factores externos o procesos como la detención del desarrollo embrionario produzcan algún tipo de modulación en el contenido de ADNmt como adaptación a los nuevos requerimientos energéticos, no ha habido sido ampliamente explorada hasta ahora. Sin embargo, este fenómeno es de especial interés para el estudio del contenido de ADNmt por célula como marcador de competencia embrionaria.

Uno de los factores externos que perturba el cultivo in-vitro normal es la criopreservación. La criopreservación está ganando un uso cada vez mayor en RA (Bosch *et al.*, 2020). Según el último informe de seguimiento europeo (De Geyter *et al.*, 2020), cerca de la mitad de los ciclos de FIV se basan en transferencias de embriones congelados. Este tipo de transferencias ayudan a gestionar muchas situaciones clínicas en las que no se recomiendan las transferencias de embriones frescos (Bosch *et al.*, 2020) y aumentan la incidencia acumulada de embarazo en un 10% (Yurchuk *et al.*, 2018). Sin embargo, el uso de transferencias de blastocistos vitrificados, ha dado lugar a algunos resultados neonatales adversos, como un mayor riesgo de bebés grandes para la edad gestacional (LGA) y macrosomía (Ernstad *et al.*, 2019; Elias *et al.*, 2020). Curiosamente, tanto la restricción del crecimiento intrauterino como la macrosomía están asociadas con la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (Perez *et al.*, 2019).

No obstante, aún se está investigando si este resultado está relacionado con el medio endometrial (la preparación endometrial artificial puede aumentar el riesgo en comparación con los ciclos naturales (Wang *et al.*, 2020)) o si se debe a la vitrificación del blastocisto.

De hecho, el estado redox de los ovocitos humanos puede verse afectado por el proceso de vitrificación, y la exposición a crioprotectores provoca un aumento del calcio intracelular, una pérdida de potencial de membrana, una disminución del contenido de ATP y la liberación del citocromo C, procesos que puede culminar en daño al ADN y apoptosis (Nohales-Córcoles *et al.*, 2016; Gualtieri *et al.*, 2021). Aunque la plasticidad del desarrollo puede permitir que los embriones humanos superen condiciones estresantes (Ramos-Ibeas *et al.*, 2019; Garcia-Dominguez *et al.*, 2020), el riesgo residual sigue ahí y merece ser explorado.

Para investigar esta posibilidad en embriones humanos, en el presente objetivo específico se han medido diferentes parámetros mitocondriales, como el contenido de ADNmt, el estado redox, el recuento mitoncrial y los perfiles de expresión génica, en embriones durante su desarrollo embrionario in-vitro normal y en embriones bajo procesos de estrés como son la vitrificación/desvitrificación y el bloqueo embrionario en etapa de división.

El presente estudio ha demostrado que existe una modulación del contenido de ADNmt total y por célula durante el período de recuperación después de la desvitrificación, el cual es representativo del tiempo de recuperación que suele concederse antes de la transferencia embrionaria. En concreto, se observa como el contenido de ADNmt por célula en el blastocisto tras la desvitrificación disminuye en comparación con su contenido antes de la vitrificación y va aumentando en cuestión de pocas horas durante el cultivo in-vitro, sobrepasando en primer lugar su nivel de contenido previo a la vitrificación, para después restablecerlo. La disminución del contenido de ADNmt tras el proceso de vitrificación y su capacidad de recuperación en respuesta a una depleción mitocondrial han sido reportadas previamente en otros modelos animales (Chiaratti *et al.*, 2010; Amoushahi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021).

Además, es importante señalar que no se observan diferencias significativas en el contenido de ADNmt por célula medido antes de la desvitrificación entre los blastocistos

analizados, lo que indica que las diferencias observadas tras los diferentes tiempos de cultivo después de la desvitrificación no se deben a diferencias en el contenido de ADNmt inicial por célula entre los grupos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los valores de ADNmt por célula pueden variar en las diferentes zonas del trofoectodermo embrionario, y su contenido antes de la vitrificación se evalúa mediante una sola biopsia del trofoectodermo, constituyendo una limitación.

No obstante, el incremento en el número de copias de ADNmt debido al proceso de vitrificación/desvitrificación fue mucho menos abrupto que el incremento observado en los embriones bloqueados en etapa de división en comparación con su control no bloqueado. De hecho, se ha observado que cuanto más tarde ocurre la detención del embrión (es decir, cuanto más desarrollado está el embrión), mayor es el aumento en el contenido de ADNmt, lo que indica quizás, un esfuerzo final por parte del embrión para continuar su desarrollo aumentando la actividad mitocondrial y, por lo tanto, un desafío al metabolismo silencioso que se asocia a los embriones en etapa de división evolutivos (Leese *et al.*, 2007).

Por tanto, aunque se propuso que el ADNmt no se modulaba antes de la implantación del embrión (Thundathil *et al.*, 2005; El Shourbagy *et al.*, 2006), en el presente estudio se observa un aumento significativo en el contenido de ADNmt en dos escenarios diferentes de estrés embrionario. Además, en la literatura se encuentran otros escenarios clínicos de incremento del contenido de ADNmt preimplantacional, como en los estudios realizados en blastocistos según su ploidía (tabla suplementaria 1). Por otro lado, también se ha observado que los embriones de pacientes con acidosis láctica y episodios semejantes a apoplejías (MELAS), pueden replicar el ADNmt para mantener el desarrollo embrionario y compensar el defecto de la cadena respiratoria (Monnot *et al.*, 2013). Por lo tanto, el aumento en el número de copias de ADNmt que se observa durante el proceso de recuperación del blastocisto desvitrificado y en embriones bloqueados podría indicar que los embriones humanos modulan su contenido de ADNmt antes de la implantación como mecanismo de respuesta al estrés.

En consecuencia, se realizó un estudio de RNA-seq para encontrar patrones de expresión génica que pudieran arrojar luz sobre estas cuestiones, tanto en embriones durante un

cultivo in-vitro normal como en embriones bajo situación de estrés, como son los blastocistos que se recuperan de la desvitrificación y los embriones bloqueados en etapa de división.

En primer lugar, se ha observado durante el desarrollo embrionario in-vitro normal un aumento de la expresión rutas de actividad mitocondrial a partir del estadio de blastocisto, que coincide con la activación metabólica propia de esta etapa de desarrollo (Sathananthan and Trounson, 2000; Wilding *et al.*, 2009; Chiaratti *et al.*, 2010; Krisher and Prather, 2012; Harvey, 2019; May-Panloup *et al.*, 2021).

Al analizar las condiciones de estrés, se observan distintos resultados: Por un lado, se ha observado una sobreexpresión significativa en varios procesos clave relacionados con la respuesta al estrés celular y vías de desarrollo embrionario en blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación en comparación con blastocistos cultivados durante 0 horas después de la desvitrificación; sin embargo, no hubo diferencias en la expresión de rutas relacionadas con la actividad mitocondrial a pesar del aumento en el contenido de ADNmt observado entre ambas condiciones.

De hecho, no se observa en blastocistos cultivados varias horas tras la desvitrificación un consecuente aumento o disminución ni del número de mitocondrias ni de la ratio redox en comparación con blastocistos recién desvitrificados. Analizando visualmente la configuración mitocondrial por microscopía electrónica de transmisión tampoco se observan diferencias a grandes rasgos entre blastocistos recién desvitrificados y cultivados 5 horas tras la desvitrificación, aunque el nivel de aumentos con el que se han hecho las observaciones para el recuento mitocondrial limita considerablemente este tipo de análisis. De hecho, se desconoce si las tres células elegidas por blastocisto para el recuento de mitocondrias son una representación aproximada del contenido total por célula del blastocisto.

Específicamente, los blastocistos cultivados durante 4-5 horas después de la desvitrificación revelaron una sobreexpresión de rutas involucradas en el desarrollo del embrión, como la polaridad celular, el desarrollo del blastocisto y el crecimiento del embrión intrauterino en comparación con los blastocistos cultivados 0 horas tras la desvitrificación. La polaridad celular es de hecho clave para la asignación y especificación celular antes de la implantación (Shahbazi *et al.*, 2016). Además, también

sobreexpresaron vías como la apoptosis (vías de señalización apoptótica extrínseca e intrínseca, vía de señalización apoptótica extrínseca a través de receptores de dominio de muerte y senescencia celular) y procesos relacionados con el cáncer (regulación positiva de la detención del ciclo celular, transducción de señales por regulador P53, transducción de señales en respuesta al daño del ADN, etc). De hecho, el aumento del número de copias de ADNmt se había reportado anteriormente como mecanismo de protección contra la apoptosis temprana (Mei *et al.*, 2015, 2020), no obstante deben estudiarse más a fondo las posibles consecuencias a largo plazo de las alteraciones en la expresión de estas vías.

Como se comentó anteriormente, estudios realizados con ovocitos frescos vs vitrificados de diferentes especies indican que el proceso de vitrificación/desvitrificación puede disminuir el contenido de ADNmt y afectar el metabolismo de la membrana mitocondrial y su capacidad metabólica (Zhao *et al.*, 2011; Amoushahi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021). Uno de estos estudios (Zhao *et al.*, 2011) analizó el nivel de actividad mitocondrial de ovocitos frescos vs ovocitos desvitrificados que se cultivaron durante diferentes periodos de tiempo tras la desvitrificación (0, 4 y 8 horas), y concluyó que la actividad mitocondrial aumentaba a lo largo de las horas de cultivo tras la desvitrificación pero no alcanzaba el nivel de actividad mitocondrial del control fresco. Por tanto, parece demostrado que el proceso de vitrificación afecta la actividad mitocondrial, y que los ovocitos y embriones activan mecanismos para intentar alcanzar el estado mitocondrial que poseían antes de la vitrificación.

Según los presentes resultados, en los blastocistos humanos desvitrificados también se observa una disminución del contenido de ADNmt por célula debido al proceso de vitrificación/desvitrificación. No obstante, el aumento en el contenido de ADNmt que se produce a lo largo de las horas de cultivo para restablecer su contenido inicial está relacionado con el estrés celular y el crecimiento embrionario, pero no con un aumento de la actividad metabólica mitocondrial. Para interpretar estos resultados, por un lado hay que tener en cuenta que el proceso de apoptosis (vinculado al estrés celular) está relacionado con la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Mei *et al.*, 2015). No obstante, esto también podría significar que, en este escenario, el aumento en el contenido de ADNmt tenga otro propósito diferente al de simplemente proporcionar

energía. De hecho, a pesar de observarse en el objetivo específico 1 una disminución del contenido de ADNmt en el blastocisto en comparación con el embrión no bloqueado en etapa de división, se ha detectado mediante RNA-seq un aumento de la actividad mitocondrial en el blastocisto. Esto indica que la actividad mitocondrial puede ocurrir independientemente del nivel de ADNmt. Además, se ha sugerido que son los mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, en lugar de la dosis del gen, los que determinan la expresión del genoma mitocondrial (Wiesner *et al.*, 1992; Reznik *et al.*, 2016). También es posible que el tiempo en cultivo in-vitro hasta el análisis de RNA-seq haya podido enmascarar la sobreexpresión de estas vías, y que estas hayan tenido lugar antes de la secuenciación.

Finalmente, los blastocistos analizados en el presente estudio son aneuploides. Los blastocistos aneuploides, en comparación con los blastocistos euploides, demuestran una sobreexpresión génica vinculada a la función de la membrana mitocondrial, que afecta a proteínas como la ATP sintetasa, la subunidad 6C del citocromo o los complejos RAGULATOR. También demuestran una infraexpresión del gen MT-ND5, que proporciona instrucciones para producir NADH deshidrogenasa 5 (complejo I) (Groff *et al.*, 2019), pudiendo inducir alteraciones en el perfil metabólico y quizás afectar las respuestas a la vitrificación. Por lo tanto, no está claro cómo se verían afectados los resultados con blastocistos euploides.

Por otro lado, se observa que los embriones bloqueados en etapa de división demostraron una sobreexpresión de vías compatibles con la producción de ATP y con apoptosis relacionada con mitocondrias en comparación con los embriones no bloqueados en etapa de división.

Por tanto, los embriones bloqueados en etapa de división exceden el nivel de actividad mitocondrial de su control no bloqueado, y se plantea que esto pueda ocurrir potencialmente como mecanismo para continuar su desarrollo. Puede que el aumento abrupto en el contenido de ADNmt por célula en embriones bloqueados esté relacionado con un estado de estrés celular irreversible (una respuesta de estrés menos controlada) en un intento fallido de continuar el desarrollo, mientras que los blastocistos desvitrificados, que son capaces de continuar el desarrollo, pueden tener una regulación

mitocondrial más eficiente. De hecho, tal y como se comentó al inicio de esta sección, los embriones antes de la activación génica tienen menos capacidad de respuesta al estrés ambiental. Además, analizando el PCA en ambos tipos de estrés, se observa que los embriones bloqueados tienen una entidad completamente diferente a la de su control no bloqueado, mientras que las diferencias de expresión entre blastocistos cultivados y no cultivados tras la desvitrificación son menores. Por otro lado, se sabe que la exposición aguda al estrés se asocia con un aumento de la actividad de la cadena respiratoria en respuesta a la demanda de energía celular. La producción controlada de ROS y el inicio de la apoptosis sirven como mecanismos protectores contra el daño celular. Sin embargo, la exposición aguda excesiva o prolongada al estrés puede provocar una disminución de la producción de ATP y necrosis celular, entre otras consecuencias (Manoli *et al.*, 2007).

Es importante tener en cuenta que en el estudio de RT-PCR los embriones en etapa de división no bloqueados estaban vitrificados y los bloqueados se recogieron en fresco. Es posible que el contenido de ADNmt en los embriones no bloqueados se viera en parte reducido por el proceso de vitrificación tal y como se comentó anteriormente y, por tanto, es posible que la diferencia real entre ambos grupos sea un poco menor, aunque siga siendo abrupta. No obstante, en el estudio de RNA-seq en el que se observa una clara sobreexpresión de la actividad mitocondrial en los embriones bloqueados, ambos tipos de especímenes fueron vitrificados y desvitrificados.

Además, es importante señalar que es más probable que los embriones humanos bloqueados en etapa de división sean aneuploides (Márquez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2007; Fragouli *et al.*, 2013; Maurer *et al.*, 2015). Las anomalías cromosómicas también pueden conducir a anomalías en el control de los genes nucleares que gobiernan la replicación del ADNmt (Wallace, 1999). La propia aneuploidía modula la expresión génica desencadenando no solo un efecto cis y trans, sino también respuestas de estrés terciario (Starosti *et al.*, 2020). Un estudio de análisis funcional reveló que una variedad de vías, como las relacionadas con vacuolas y lisosomas y el metabolismo de la membrana también están sobreexpresadas en modelos aneuploides humanos (Stingele *et al.*, 2012). De hecho, en comparación con los embriones no bloqueados, se ha comprobado que los embriones bloqueados muestran sobreexpresión de algunas de las

respuestas anteriores, por ejemplo, de las vías de permeabilización de la membrana externa mitocondrial, del transporte y la organización de la membrana mitocondrial o de la organización de vesículas. Por tanto, las diferencias en los perfiles de expresión génica que se observan pueden deberse, al menos en parte, a la condición de aneuploidía de los embriones. Además, el cultivo extendido de los embriones bloqueados hasta su recogida para análisis podría influir en la detección del perfil de expresión génica y constituiría otra limitación a considerar. De hecho, la ausencia de diferencias en la expresión génica relacionadas con la replicación del ADNmt en los grupos de comparación en los que se había observado un aumento en el contenido del ADNmt, podría deberse a que la sobreexpresión de estos genes ocurriera y dejara de detectarse durante el cultivo in-vitro antes de la recogida de las muestras para el análisis de RNA-seq.

Todos estos resultados sugieren que quizás las situaciones que provoquen una alta variación del patrón normal de contenido de ADNmt durante el desarrollo embrionario in-vitro, pueden ser una condición inusual y estresante. Teniendo en cuenta el papel energético de las mitocondrias, este razonamiento estaría de acuerdo con la “hipótesis silenciosa” de Henry Leese. Esta hipótesis sostiene que el embrión viable es aquel que tiene un consumo energético moderado-bajo porque no necesita utilizar un extra de energía para adaptarse al medio ambiente (Leese, 2002). Por tanto, los embriones en determinadas condiciones estresantes demandarían más energía en un intento de compensar el daño molecular (Leese *et al.*, 2008).

En definitiva, se considera que este es el primer estudio que I) demuestra cómo los embriones responden al estrés modulando el contenido de ADNmt durante el período preimplantacional; y II) proporciona información sobre la expresión de las vías que coinciden con este fenómeno.

Los resultados que se presentan sirven principalmente para demostrar que el contenido de ADNmt puede verse modulado en cuestión de pocas horas en respuesta a factores del cultivo in-vitro, pero además arrojan luz sobre otras cuestiones. Por ejemplo, podrían abrir una tímida ventana para debatir sobre si algunas de estas vías activadas, como el aumento del contenido de ADNmt, la apoptosis, el daño del ADN, el crecimiento

de embriones o el desarrollo embrionario intra-uterino, pueden afectar los resultados neonatales después de la transferencia de blastocistos vitrificados, generando un mayor riesgo de LGA y macrosomía (Ernstad *et al.*, 2019; Elias *et al.*, 2020), así como una hipotética predisposición a disfunciones del equilibrio energético y enfermedades crónicas en etapas posteriores de la vida (Garcia-Dominguez *et al.*, 2018; Barberet *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2021).

Objetivo específico 3. Identificar la relación existente entre el contenido de ADN mitocondrial por célula y la masa y la actividad mitocondrial en el blastocisto humano.

Propósito

Algunos estudios concuerdan en que un bajo contenido de ADNmt por célula está relacionado con una mayor calidad embrionaria y mejores resultados de éxito clínico (tabla suplementaria 1), mientras que se ha sugerido una asociación entre un alto contenido de ADNmt por célula y estrés metabólico (Diez-Juan *et al.*, 2015). No obstante, se desconoce el significado biológico que tienen estos valores de ADNmt por célula en el embrión y si son representativos de su estado mitocondrial.

El propósito de este estudio es describir si existe una relación entre el contenido de ADNmt por célula y el número de mitocondrias totales y activas en blastocistos humanos, para analizar su nivel de representatividad respecto a estos parámetros. Además, se analizarán a nivel de expresión génica las diferencias entre blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo para evaluar si se obtienen resultados que apoyen su correlación positiva con el estrés.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de cohorte prospectivo con un total de 47 blastocistos donados a investigación de 35 pacientes que fueron tratadas en IVIRMA Global (Valencia, España). Todas las participantes proporcionaron su consentimiento informado por escrito.

Estimulación ovárica y obtención y cultivo de especímenes

La estimulación ovárica y la obtención y el cultivo de especímenes se llevo a cabo según lo explicado en el apartado "*Procedimientos y técnicas*".

Cuantificación del contenido de mitocondrias totales y activas por microscopía confocal

Se incluyeron un total de 34 blastocistos aneuploides con datos conocidos de contenido de ADNmt por célula antes de la vitrificación. El contenido de ADNmt por célula en los blastocistos se determinó mediante NGS antes del estudio, a partir de la biopsia de trofoectodermo utilizada para la prueba PGT-A (Igenomix, S.L).

Como el contenido de ADNmt por célula tiene una distribución no normal (de los Santos *et al.*, 2018), se seleccionaron los blastocistos con valores de contenido de ADNmt por célula por encima (alto contenido) y por debajo (bajo contenido) de la mediana de los datos de toda la población de estudio de la presente tesis (mediana = 32,14).

Aproximadamente la mitad de los datos de alto contenido de ADNmt por célula estaban por encima del tercer cuartil, mientras que aproximadamente la mitad de los datos de bajo contenido de ADNmt por célula estaban por debajo del percentil 25.

Los blastocistos se desvitrificaron, se tiñeron y se analizaron tras un total aproximado de 6 horas de cultivo, tal y como se explica en el apartado "*Procedimientos y técnicas*". Para cuantificar la masa y la actividad mitocondrial, las muestras se analizaron mediante microscopía confocal tal y como se explica en el apartado "*Procedimientos y técnicas*". Se analizaron 12 blastocistos con la metodología de fluorescencia fija y 22 blastocistos con la metodología de valores de ganancia de fotomultiplicador fijos.

Perfil de expresión génica: construcción de librerías y RNA-seq

Para esta aproximación, se analizaron 6 blastocistos aneuploides con información conocida del contenido de ADNmt por célula antes de la vitrificación. De estos blastocistos, 3 tenían valores altos de contenido de ADNmt por célula y 3 tenían valores bajos de contenido de ADNmt por célula. Estos valores se seleccionaron por estar por encima y por debajo de los datos de la población de estudio de la presente tesis (mediana = 32,14).

Estos 6 blastocistos forman parte de los blastocistos analizados por RNA-seq en el objetivo específico 2, por lo que están cultivados durante distinto número de horas tras

la desvitrificación. Fueron seleccionados por ser los de mayor y menor contenido de ADNmt por célula independientemente de su tiempo de cultivo tras la desvitrificación. Por tanto, el análisis comparativo se realizó teniendo en cuenta esta característica. Para ello, se realizó un subanálisis comparativo de la expresión génica en blastocistos del objetivo específico 2 con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo, separándolos en grupos según sus tiempos de cultivo tras la desvitrificación (0 y 4-5 horas), con la intención de comprobar si esta característica influía en los resultados.

Por lo tanto, el análisis de expresión génica diferencial se realizó para 3 comparaciones:

1) Blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula (N= 3, valores de contenido de ADNmt por célula= 51,51; 54,04 y 59,12) vs blastocistos con bajo contenido de ADNmt por célula (N=3, valores de contenido de ADNmt por célula= 25,00; 25,32 y 26,04), **independientemente de las horas de cultivo in-vitro tras la desvitrificación.**

2) Blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula (N=2, valores de contenido de ADNmt por célula= 34,7 y 54,04) vs blastocistos con bajo contenido de ADNmt por célula (N=4, valores de contenido de ADNmt por célula= 26,55; 26,04; 25,32 y 27,53), **cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación.**

3) Blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula (N=3, valores de contenido de ADNmt por célula= 59,12; 39,68 y 51,51) vs blastocistos con bajo contenido de ADNmt por célula (N=4, valores de contenido de ADNmt por célula= 30,91; 27,2; 31,88 y 25), **cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación.**

Más de la mitad de los datos de alto contenido de ADNmt por célula estaban por encima del percentil 90, lo que constituiría unos valores extremos de contenido de ADNmt por célula. La mayoría de los datos de bajo contenido de ADNmt por célula estaban entre el primer y el segundo cuartil.

Todos los blastocistos se desvitrificaron, se incluyeron completos de forma individual en tubos de PCR con 2 µl de tampón de reacción 10X del kit SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing y se conservaron a -80 ° C hasta su preparación para el análisis.

El paso de ARNm a ADNc y la creación de librerías se realizaron según lo explicado en el apartado “*Procedimientos y técnicas*”.

Se secuenció un promedio de 33.489.036 lecturas por muestra y alrededor del 87,12 % se mapearon con éxito. Los recuentos brutos se utilizaron directamente para el análisis de la expresión diferencial de genes.

Validación de RNA-seq

Para corroborar los resultados del análisis de RNA-seq, las muestras de cDNA del primer grupo de comparación se analizaron mediante RT-PCR en un sistema StepOnePlus con Power-Up SYBR green para determinar los niveles de expresión de dos genes (las descripciones de los primers se proporcionan en la tabla suplementaria 7).

Estos genes se seleccionaron entre los principales genes diferencialmente expresados en función de su importancia y su inclusión dentro de funciones significativamente enriquecidas. Se sobreexpresaron o infraexpresaron en los blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación: Proteína de dedo de zinc 1, dominio PR (PRDM1; fold change= 2,87; P < 0,05) e Isocitrato deshidrogenasa mitocondrial (IDH2; fold change= -2,20; P < 0,05).

Estos genes están relacionados con la respuesta inmune (PRDM1) y el metabolismo energético (IDH2).

Los niveles de expresión génica se normalizaron para el gen housekeeping GAPDH y se cuantificaron mediante el método $\Delta\Delta Ct$. Posteriormente, el fold change se calculó como la expresión génica normalizada ($2^{\Delta(-\Delta Ct)}$) en cada muestra dividida por la expresión génica normalizada ($2^{\Delta(-\Delta Ct)}$) en una muestra de referencia aleatoria.

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Shapiro (Shapiro and Wilk, 1965; Royston, 1982) para evaluar si los datos de microscopia confocal tenían una distribución normal.

Se utilizaron estudios de correlación y t-test para analizar los datos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el P-valor era menor de 0,05.

La distribución de datos determinada por la prueba de Shapiro dio como resultado una distribución normal ($P > 0,05$).

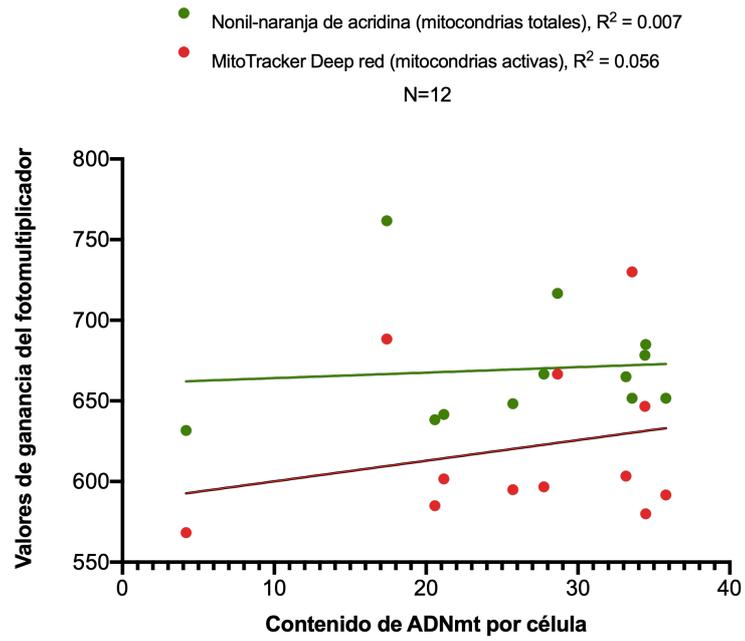
Para el análisis de RNA-seq, se realizaron estudios de correlación, análisis de PCA y análisis de expresión génica diferencial utilizando el paquete DESeq2. Los análisis de expresión génica diferencial se realizaron utilizando la prueba paramétrica de Wald con corrección de prueba múltiple de Benjamini-Hochberg (p_{adj}). Los genes con un $p_{adj} < 0,01$ y un fold change de \log_2 de ± 2 se consideraron diferencialmente expresados de forma significativa. El algoritmo fgsea se utilizó para el análisis de enriquecimiento funcional con las categorías de KEGG y de GO (procesos biológicos). Los datos de la validación se analizaron mediante t-test.

Resultados

Análisis de correlación entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas por microscopía confocal

Con la metodología de fluorescencia fija, no se observa una correlación significativa ($P > 0,05$) entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas en los blastocistos (figura 37A). Al agrupar a los blastocistos según tengan un contenido de ADNmt por célula alto o bajo, tampoco se observan diferencias significativas ($P > 0,05$) con respecto al contenido mitocondrial total y activo (figura 37B).

A



B

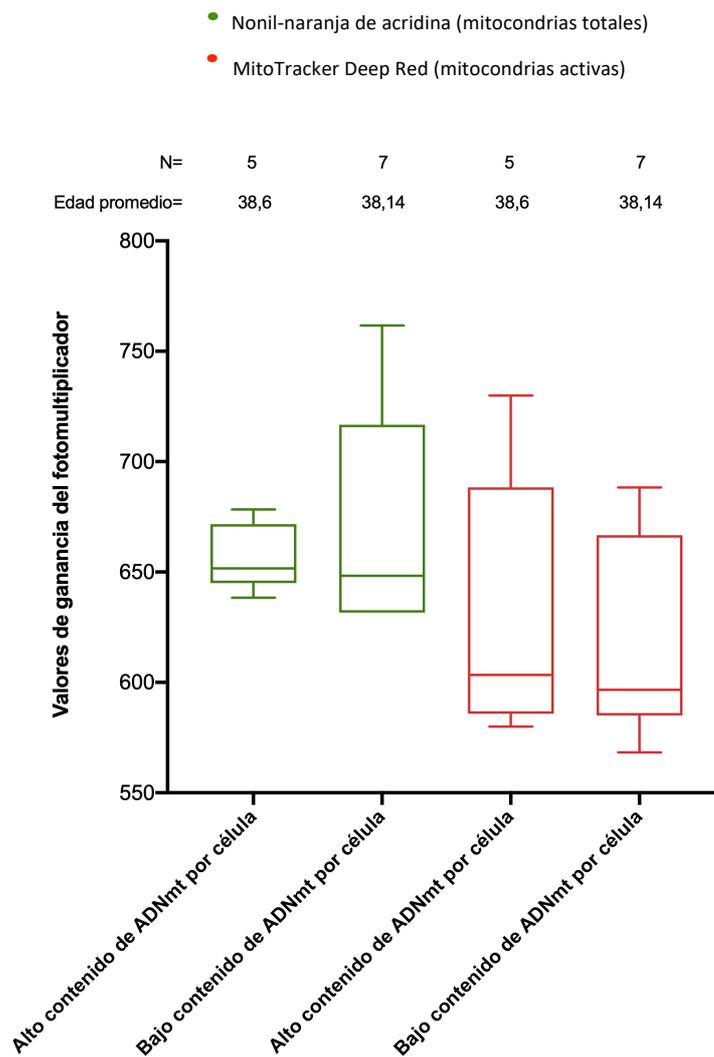


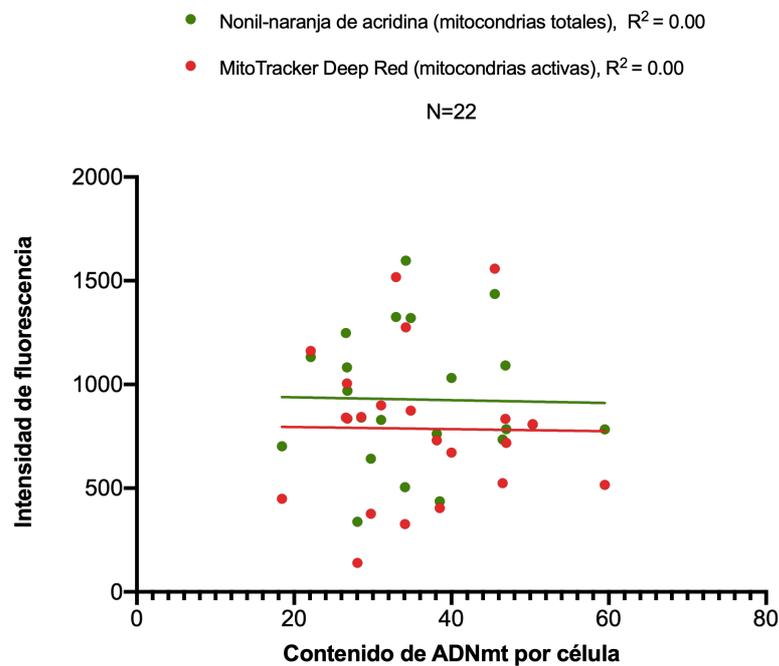
Figura 37. Metodología de fluorescencia fija. A) Análisis de correlación entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas. B) Análisis de diferencias en el contenido de mitocondrias totales y activas entre blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto y bajo.

* Edad en años.

**Promedio del contenido alto de ADNmt por célula= 34,28; Promedio del contenido bajo de ADNmt por célula= 22,41.

El mismo resultado se observa con la metodología de valores de ganancia de fotomultiplicador fijos. No se aprecia una correlación significativa entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas ($P > 0,05$; figura 38A), ni tampoco diferencias al agrupar a los blastocistos según si su contenido de ADNmt por célula es alto o bajo ($P > 0,05$; figura 38B).

A



B

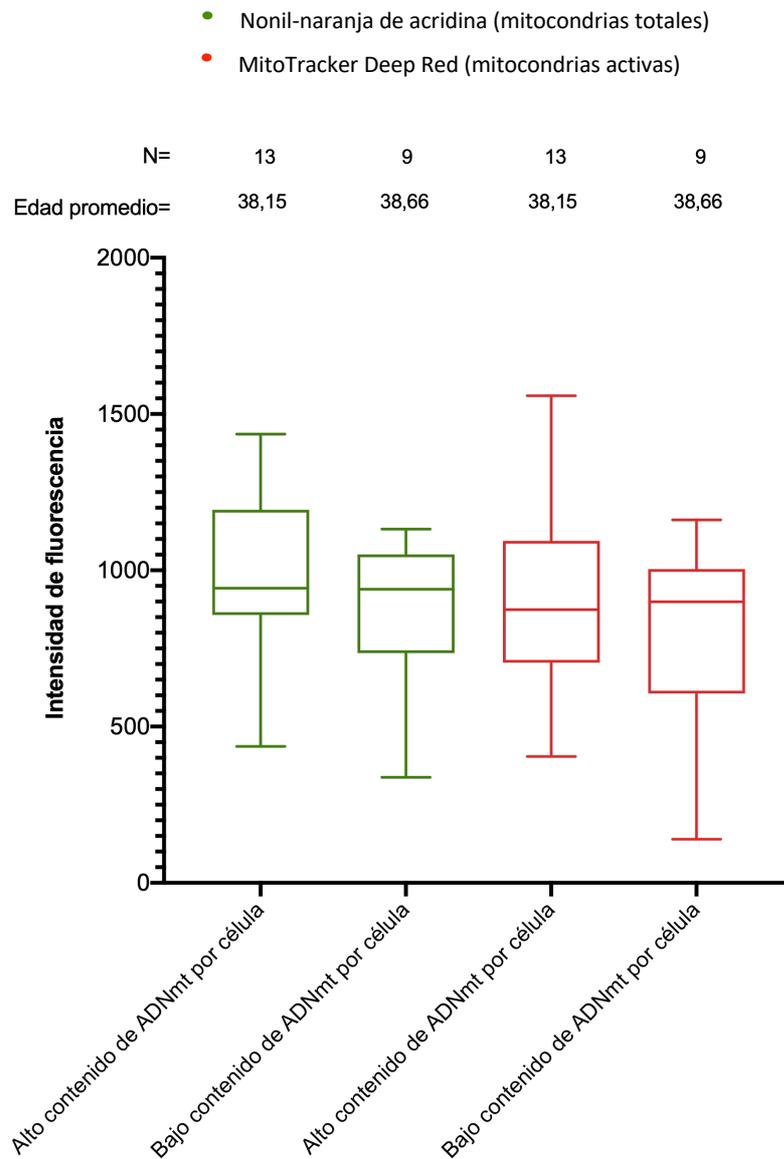


Figura 38. Metodología de valores de ganancia del fotomultiplicador fijos. A) Análisis de correlación entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas. B) Análisis de diferencias en el contenido de mitocondrias totales y activas entre blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto y bajo.

* Edad en años.

**Promedio del contenido alto de ADNmt por célula= 42,18; Promedio del contenido bajo de ADNmt por célula= 26,44.

*** La intensidad de fluorescencia se mide en valores medios de gris.

Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para blastocistos con contenido de ADNmt alto vs bajo

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para identificar vías sobre- o infra-expresadas significativamente ($P < 0,05$) entre los grupos de blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación (tabla suplementaria 8). En términos generales, casi no se observan diferencias en la expresión génica entre los grupos, aunque el PCA indica cierto grado de separación (figura 39).

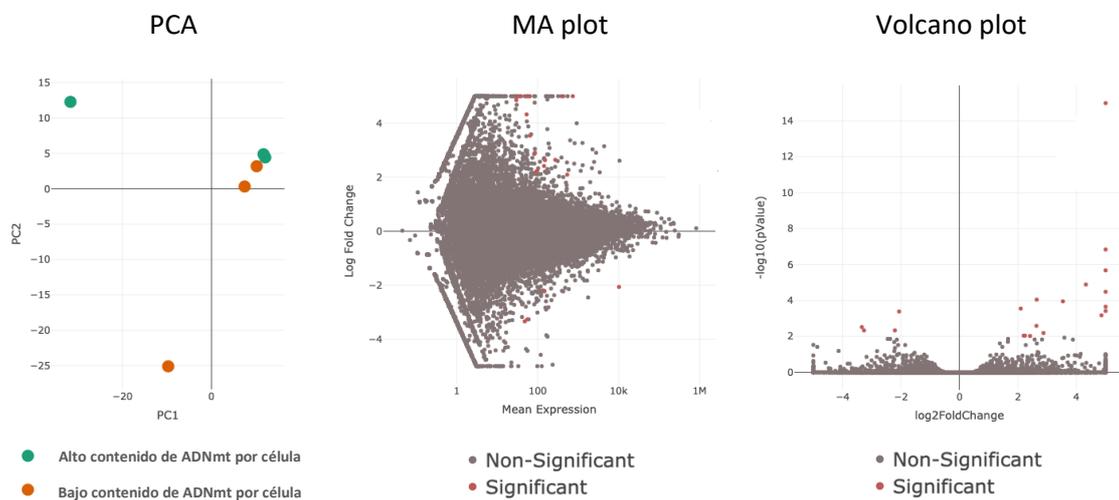


Figura 39. PCA, MA plot y Volcano plot para la comparación de blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación.

Con las categorías de GO y de KEGG no se observan diferencias significativas ($P > 0,05$) en términos de producción mitocondrial de energía entre ambos grupos, a pesar de encontrarse sobreexpresión ($P < 0,05$) de la expresión génica mitocondrial en blastocistos con valores altos de contenido de ADNmt por célula. No obstante, se observan vías de estrés celular, como la detención del ciclo celular, la transcripción de ADN en respuesta al estrés, la respuesta al estrés del RE, la regulación de la apoptosis o la transducción de señales en respuesta al daño del ADN y mediadas por el regulador

p53, sobreexpresadas ($P < 0,05$) en blastocistos con valores de contenido de ADNmt por célula más altos.

Además, se observa una infraexpresión ($P < 0,05$) de rutas relacionadas con el ensamblaje de uniones celulares en blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula (figura 40 y figura suplementaria 8).

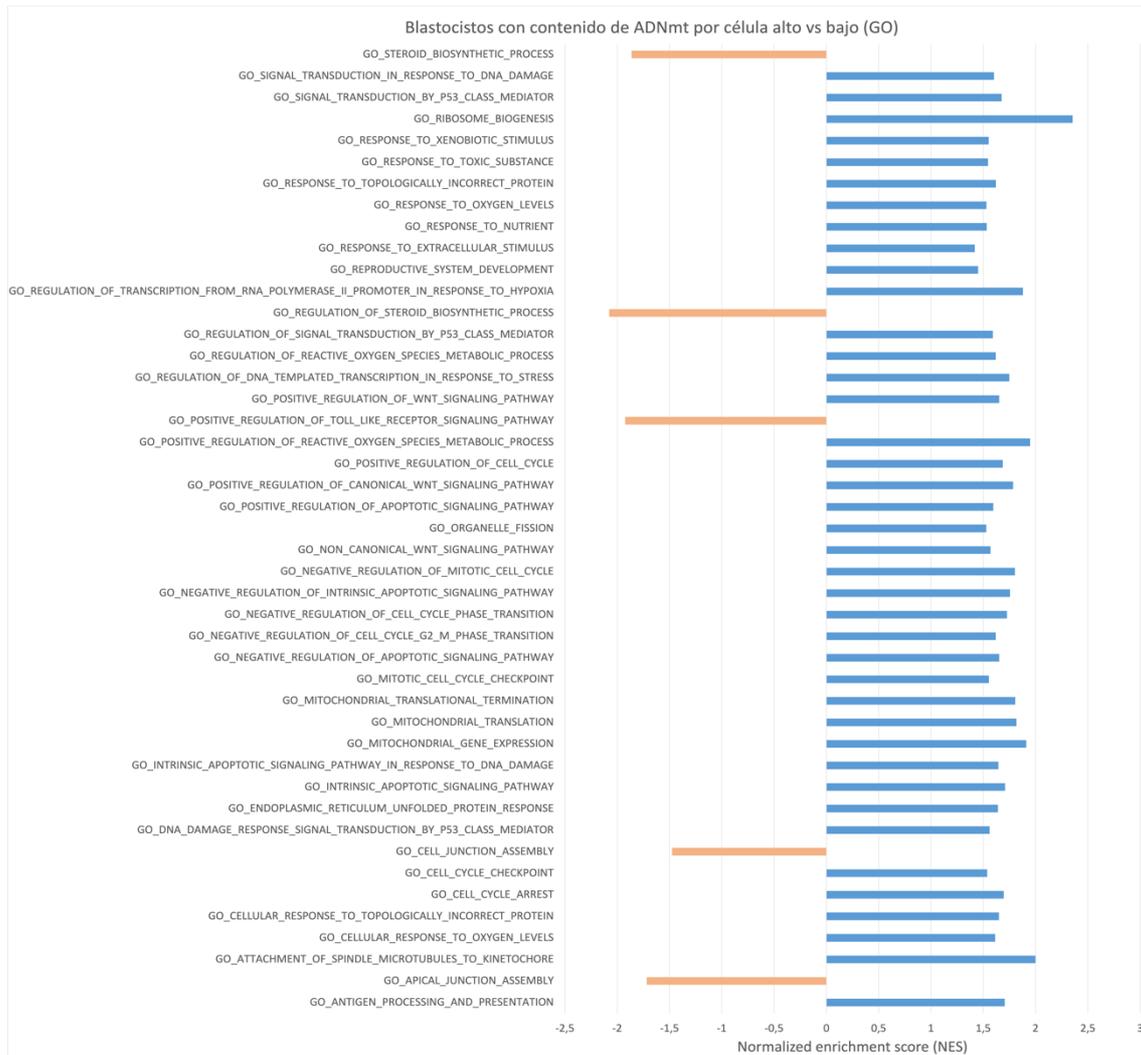


Figura 40. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de GO significativas ($P < 0,05$) de interés.

* Las barras azules indican sobreexpresión en blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto; las barras naranjas indican infraexpresión en blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto.

Tras analizar las rutas metabólicas diferencialmente expresadas entre blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto y con contenido de ADNmt por célula bajo teniendo en cuenta las horas de cultivo tras la desvitrificación, se obtienen resultados similares. No se observan diferencias en la expresión de rutas relacionadas con la producción de energía entre blastocistos con alto y bajo contenido de ADNmt por célula ni a las 0 horas de cultivo tras la desvitrificación ni a las 4-5 horas de cultivo tras la desvitrificación. Por otro lado, en ambas condiciones se observa que los blastocistos con alto contenido de ADNmt antes de la vitrificación sobreexpresan ($P < 0,05$) rutas de estrés celular en comparación con los de bajo contenido. No obstante, parece que el nivel de sobreexpresión de estas rutas relacionadas con estrés se da en menor medida a las 4-5 horas tras la desvitrificación en comparación con los blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación (figuras suplementarias 9, 10 y 11 y tabla suplementaria 9).

Validación de RNA-seq

Para validar los resultados de RNA-seq, los genes seleccionados (PRDM1 e IDH2) se analizaron mediante RT-PCR a partir de las mismas muestras de ADNc de la primera comparación de estudio de RNA-seq (blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación). Los resultados de RT-PCR corroboran la expresión génica diferencial observada por RNA-seq (figura 41), aunque las diferencias en la expresión génica no son estadísticamente significativas por RT-PCR debido a la alta variabilidad entre muestras.

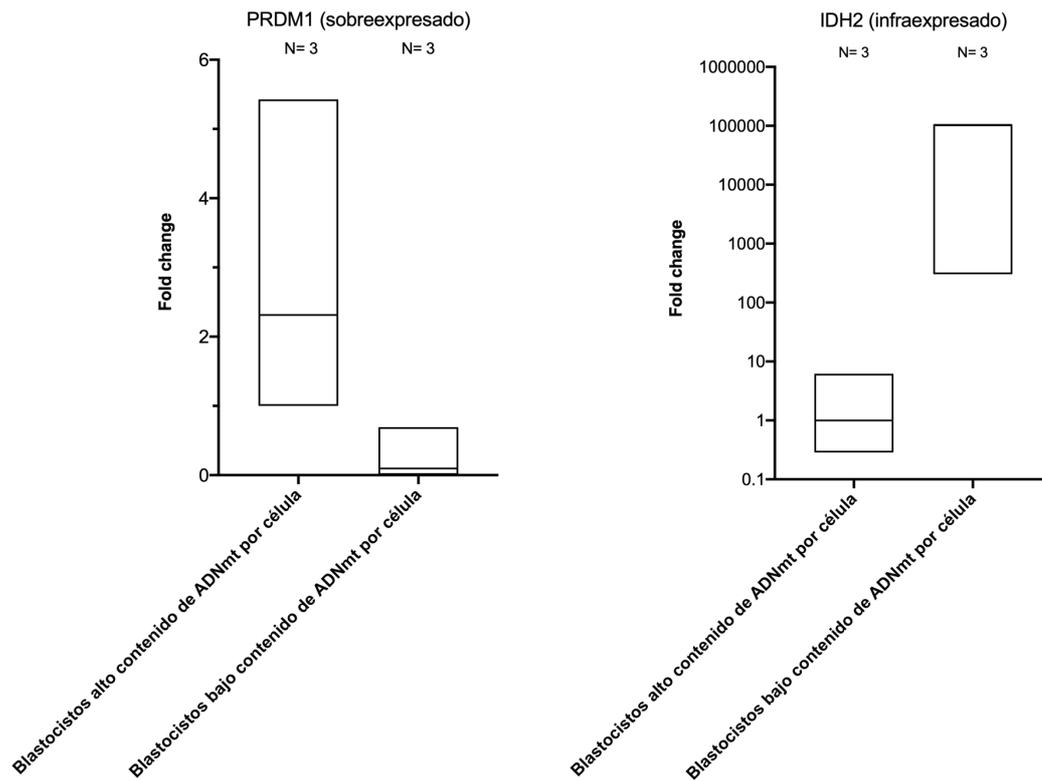


Figura 41. Validación de los datos de secuenciación de RNA-seq. Niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune (PRDM1) y el metabolismo energético (IDH2) en blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación. Los genes se validaron mediante RT-PCR, se cuantificaron mediante el método $\Delta\Delta Ct$ y se expresaron como fold change.

*Eje Y para IDH2 en escala logarítmica.

Discusión de resultados

El papel fundamental de las mitocondrias en el desarrollo embrionario ha provocado que muchos grupos de investigación centren sus esfuerzos en el estudio del contenido de ADNmt por célula como marcador mitocondrial de la competencia embrionaria. Mientras que algunos grupos argumentan que un alto contenido de ADNmt por célula está relacionado con una mala calidad embrionaria, la aneuploidía y la ausencia de implantación evolutiva, otros observan resultados contrastantes o ningún efecto (tabla suplementaria 1). Esto puede deberse a inconsistencias en la cuantificación del ADNmt

entre laboratorios, a la falta de evidencia sobre la relación entre el ADNmt y el estado mitocondrial, y/o al significado fisiológico desconocido del ADNmt en el embrión antes de la implantación.

De hecho, no está claro si existe una correlación necesaria entre el número de copias de ADNmt y el número de mitocondrias totales y activas en una célula. Estudios anteriores han revelado que existe una baja correlación entre el contenido de ADNmt y la masa mitocondrial, además de poca información sobre la relación entre el contenido de ADNmt y la actividad mitocondrial (Wiesner *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Jeng *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2012; Reznik *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Ricchetti, 2018; Herbers *et al.*, 2019; Mei *et al.*, 2020). Esto sugiere que el contenido de ADNmt por célula no es necesariamente un marcador de estos parámetros.

Los diferentes tipos de celulares tienen unos requisitos fisiológicos específicos que afectan la producción de energía y el metabolismo (Herbers *et al.*, 2019). Por tanto, el número de copias de ADNmt por mitocondria puede variar según el tipo de célula y depende directamente de los eventos de fusión y fisión que ocurren en las mitocondrias (Twig *et al.*, 2008; Westermann, 2012; Wallace and Chalkia, 2013; Fazzini *et al.*, 2018).

Un número menor de mitocondrias puede contener tantas copias de ADNmt como una masa mitocondrial más grande. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de TFAM regula directamente el contenido de ADNmt sin afectar la masa mitocondrial (Larsen *et al.*, 2012; Ricchetti, 2018). Lo mismo ocurre con la actividad mitocondrial; aunque hay estudios que afirman que el contenido de ADNmt por célula es un marcador prometedor de la función mitocondrial en ciertos tipos de células, no está del todo claro (Wang *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Jeng *et al.*, 2008; Reznik *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2017; Herbers *et al.*, 2019). La expresión del genoma mitocondrial puede equilibrar las proporciones alteradas de ADNmt por mitocondria mencionadas anteriormente (Ricchetti, 2018) y, por lo tanto, el contenido de ADNmt por célula no se correlaciona necesariamente con la actividad mitocondrial en algunos tejidos. De hecho, algunos estudios sugieren que los mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, en lugar de la dosis del gen, determinan hasta qué punto se expresa el genoma mitocondrial (Wiesner *et al.*, 1992; Reznik *et al.*, 2016).

Por otro lado, las mitocondrias que producen ATP de forma activa pueden sufrir una disipación continua del potencial de membrana, dando lugar a una condición media de

baja polarización en lugar de en una condición media de alta polarización (Van Blerkom, 2004).

Todos estos factores hacen que sea difícil estudiar con precisión la correlación entre el contenido de ADNmt y la masa y la actividad mitocondrial.

En el presente estudio se ha intentado identificar la relación entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas en blastocistos, además de analizar la expresión de las vías relacionadas con valores altos de contenido de ADNmt por célula. Con ello, se ha pretendido ahondar en las causas que han provocado la pérdida de confianza en el uso del contenido de ADNmt por célula como indicador de competencia embrionaria.

Se ha descubierto que los valores de contenido de ADNmt por célula no están relacionados con el número de mitocondrias totales y activas, sino que están relacionados con vías de estrés celular.

Específicamente, no se observa ningún tipo de correlación entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas con la aproximación de microscopia confocal. Estos resultados están reforzados por la ausencia de diferencias de expresión de rutas metabólicas mitocondriales entre blastocistos de alto y bajo contenido de ADNmt por célula.

Merece la pena destacar el hecho de que no se observen diferencias en rutas mitocondriales de producción energética entre blastocistos con alto y bajo contenido de ADNmt por célula a pesar de existir una sobreexpresión de la expresión génica mitocondrial en blastocistos con valores altos de contenido. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el incremento del contenido de ADNmt, observado en situaciones como la recuperación del proceso de vitrificación/desvitrificación, pueda tener a veces un propósito diferente al de simplemente proporcionar energía (Objetivo específico 2).

No obstante, se observan vías sobreexpresadas, como las relacionadas con el estrés del RE, la transcripción de ADN en respuesta a estrés, la detención del ciclo celular, la regulación de la apoptosis o la transducción de señales por el regulador P53, en blastocistos con un alto contenido de ADNmt por célula (Ljungman, 2000; Liebermann

and Hoffman, 2008; Fimia and Piacentini, 2009; Simmons *et al.*, 2009; Fulda *et al.*, 2010; Muralidharan and Mandrekar, 2013; Chircop and Speidel, 2014).

Además, las evidencias indican que los resultados no parecen estar afectados por el tiempo en cultivo in-vitro tras la desvitrificación y además apuntan a que los blastocistos que parten con un mayor contenido de ADNmt por célula podrían ser más susceptibles al estrés causado por el proceso de vitrificación/desvitrificación.

También se ha identificado una sobreexpresión de vías relacionadas con las respuestas a sustancias tóxicas y niveles de oxígeno y nutrientes, en blastocistos con altos valores de contenido de ADNmt por célula. Esto puede indicar que existe una respuesta alternativa del blastocisto a las moléculas tóxicas utilizadas como crioprotectores, y puede resaltar la importancia de mantener muy buenas condiciones de cultivo embrionario (Hosseini *et al.*, 2009; Salzano *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018b; Truong and Gardner, 2020). A pesar de que el DMSO y el etilenglicol se utilizan en concentraciones más bajas para optimizar la eficacia y disminuir los efectos tóxicos durante la vitrificación (Kasai and Mukaida, 2004; Javed *et al.*, 2011), ciertos embriones pueden ser más susceptibles a estos agentes (Kasai and Mukaida, 2004; Best, 2015; Kang *et al.*, 2017, 2020; Yurchuk *et al.*, 2018; Raju *et al.*, 2021).

También hay que señalar que casi todos los datos de alto contenido de ADNmt por célula de ambos experimentos (microscopía confocal y RNA-seq) estaban por encima del tercer cuartil. Esto constituiría unos valores muy altos de contenido de ADNmt por célula, en comparación con los datos de bajo contenido de ADNmt por célula que estaban alrededor del primer cuartil. El estrés celular asociado a valores de contenido de ADNmt por célula muy elevados podría estar en línea con el mal pronóstico percibido por algunos grupos de investigación en cuanto a viabilidad e implantación embrionaria (tabla suplementaria 1). El contenido de ADNmt en embriones humanos puede ser muy dinámico, y se ha comprobado que los embriones pueden modularlo durante el cultivo in-vitro en respuesta a una variedad de estímulos dentro de un cierto "rango fisiológico". Dentro de esta premisa, solo los blastocistos con valores extremos de contenido de ADNmt por célula probablemente tendrían poco éxito. No obstante, hay que tener en

cuenta que también existe un umbral mínimo de contenido de ADNmt para que se produzca un correcto desarrollo embrionario (Jing *et al.*, 2019).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que los blastocistos analizados son aneuploides. Los blastocistos aneuploides, en comparación con los blastocistos euploides, demuestran una sobreexpresión de la expresión génica vinculada a la función de la membrana mitocondrial, que afecta proteínas como la ATP sintetasa y la subunidad del citocromo 6C (Groff *et al.*, 2019) por lo tanto, el estado de aneuploidía podría influir en cierta parte en el análisis de RNA-seq.

Finalmente, puede que parte de la falta de correlación que se observa entre las cantidades del genoma mitocondrial y el número real de mitocondrias se deba a la presencia de eventos de fusión y fisión mitocondrial que ocurren constantemente (en cuestión de minutos) en las células y en respuesta a procesos estresantes (Twig *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2017). De hecho, aunque no se observan diferencias entre los dos grupos en cuanto a biogénesis mitocondrial o vías de replicación del ADN, el análisis de expresión génica muestra una sobreexpresión de la vía de fisión de orgánulos en blastocistos que contienen valores altos de contenido de ADNmt por célula. Además, esta falta de correlación puede deberse también a una distribución aleatoria del contenido de ADNmt y/o del estado mitocondrial (unidades totales y activas) a lo largo de un mismo trofoectodermo.

En conclusión, aunque los valores de contenido de ADNmt por célula no se correlacionan con la masa mitocondrial ni con el estado metabólico del trofoblasto, se ha demostrado una relación entre altos valores de contenido de ADNmt por célula y el estrés. Este hallazgo puede ser útil para comprender mejor el impacto del contenido de ADNmt en los blastocistos y para evaluar el uso potencial de estos valores como un indicador adicional para la priorización de la transferencia, al menos cuando se observan valores de contenido muy altos del mismo.

EPÍLOGO

Epílogo

III

Consecución de objetivos y relevancia científica

Gracias a la presente tesis doctoral se ha podido dar respuesta a numerosos aspectos cuestionados por la comunidad científica con respecto al contenido mitocondrial en el embrión humano.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral era analizar el contenido y el estado mitocondrial en el embrión humano para esclarecer las causas que explican la falta de consenso sobre el uso del contenido de ADNmt del blastocisto humano como marcador de competencia embrionaria.

Para ello, se establecieron tres objetivos específicos con el fin de abordar el análisis mitocondrial mediante distintas aproximaciones.

A continuación, se enumera y se describe la consecución de los distintos objetivos del estudio:

Objetivo específico 1. Caracterizar el contenido y el patrón de distribución del ADN mitocondrial durante el desarrollo embrionario humano preimplantacional: por un lado, no existían suficientes datos acerca del contenido de ADNmt durante el desarrollo embrionario humano in-vitro. A lo largo de este primer objetivo se ha descrito el análisis del contenido total y por célula de ADNmt en diferentes estadios embrionarios mediante RT-PCR. Gracias a esta metodología de cuantificación de ADN se ha podido concluir que el contenido de ADNmt en ovocitos MII no descartados es dependiente de la edad femenina y varía ampliamente entre donantes y dentro de la misma cohorte de una donante. Además, un bajo contenido de ADNmt se relaciona con el FF independientemente de la edad materna y del tiempo de cultivo in-vitro.

Por otro lado, se ha concluido que existe una degradación del contenido total de ADNmt por espécimen y una distribución del contenido de ADNmt entre las células del embrión a lo largo de las divisiones embrionarias durante el desarrollo embrionario in-vitro, hasta la etapa de blastocisto incluida. No obstante, a pesar de ser resultados consistentes con

estudios previos (Hashimoto *et al.*, 2017), algunas diferencias encontradas llevan a considerar la posibilidad de que factores como la condición de vitrificación o no vitrificación de las muestras puedan afectar los resultados.

Finalmente, con el hallazgo de la falta de influencia de la calidad y el día de desarrollo del blastocisto sobre el contenido de ADNmt, se han aportado nuevos resultados sobre un asunto que actualmente presenta mucha disparidad de opiniones.

Objetivo específico 2. Describir el contenido de ADN mitocondrial y el estado mitocondrial en embriones humanos bajo condiciones de estrés: no existían estudios previos que analizaran concretamente el comportamiento del ADNmt durante el cultivo in-vitro embrionario previo a la implantación en respuesta a perturbaciones del cultivo y situaciones de estrés como son el proceso de vitrificación/desvitrificación y el bloqueo embrionario. Para el análisis de este fenómeno se ha realizado una aproximación mediante RT-PCR, microscopia confocal y microscopia electrónica. A través de estas técnicas, se ha llevado a cabo la cuantificación del contenido de ADNmt, del estado redox y del contenido mitocondrial en blastocistos, respectivamente. Además, se ha realizado una aproximación de RNA-seq para el análisis de la expresión génica en embriones durante el desarrollo in-vitro normal y en embriones que se encontraban bajo situación de estrés, como son los blastocistos aneuploides tras el proceso de vitrificación/desvitrificación y los embriones bloqueados. Gracias al conjunto de estos análisis se han observado varias cuestiones:

- Por un lado, no existen diferencias significativas en cuanto a rutas de actividad mitocondrial entre las primeras etapas de desarrollo embrionario (ovocitos MII vs embriones no bloqueados en etapa de división). No es hasta la etapa de blastocisto, coincidiendo con el momento de activación metabólica embrionaria, que se observa una sobreexpresión de rutas de actividad mitocondrial en comparación con el estadio embrionario previo (embriones no bloqueados en etapa de división).
- Por otro lado, se ha evidenciado que los embriones humanos pueden modular el contenido de ADNmt por célula antes de la implantación e incrementarlo en cuestión de pocas horas para posiblemente sobrepasar una situación de estrés. Específicamente, los blastocistos desvitrificados sufren una disminución del contenido de ADNmt con respecto a su contenido previo a la vitrificación. Este valor

va aumentando a lo largo de las horas de cultivo hasta llegar a sobrepasar el nivel previo a la vitrificación, para finalmente volver a disminuir y restablecer el contenido que poseía inicialmente. Analizando este evento a través del análisis de la ratio redox, el recuento mitocondrial y la expresión génica, se observan diferentes cuestiones: por un lado, no se observó un consecuente aumento o disminución del metabolismo mitocondrial ni del recuento de mitocondrias en blastocistos cultivados varias horas tras la desvitrificación (con aumento del contenido de ADNmt) en comparación con blastocistos recién desvitrificados. Finalmente, se determinó que no existen diferencias significativas en cuanto a rutas de actividad mitocondrial, pero sí una sobreexpresión de vías de estrés celular y de desarrollo embrionario en blastocistos cultivados varias horas tras la desvitrificación en comparación con blastocistos recién desvitrificados. Por tanto, parece que este incremento de ADNmt ocurre para que se de una recuperación embrionaria, aunque quizá a través de mecanismos distintos al de producción de energía.

- Contrariamente, en otro tipo de situación de estrés embrionario como son los embriones bloqueados que intentan infructuosamente continuar su desarrollo, también se observa un incremento de ADNmt por célula, aunque en este caso de forma más abrupta y acompañado de una sobreexpresión de la actividad mitocondrial en comparación con embriones no bloqueados en la misma etapa de desarrollo.

Objetivo específico 3. Identificar la relación existente entre el contenido de ADN mitocondrial por célula y la masa y la actividad mitocondrial en el blastocisto humano: por último, hasta la fecha no se había abordado la relación que existe entre el contenido de ADNmt y el estado mitocondrial general en el embrión humano. A través de microscopía confocal y análisis de expresión génica en blastocistos aneuploides con datos de contenido de ADNmt por célula conocido, ha sido posible analizar I) si existía algún tipo de correlación entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas en un momento que sería cercano al de la transferencia embrionaria y II) si existían diferencias a nivel de expresión génica entre blastocistos de alto y bajo contenido de ADNmt por célula. Tal y como se concluye en este objetivo

específico, no existe una correlación significativa entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas en el trofoectodermo. De hecho, la aproximación con RNA-seq apoya estos resultados al no encontrarse diferencias significativas a nivel de expresión de rutas de actividad mitocondrial entre blastocistos de alto y bajo contenido de ADNmt por célula. No obstante, sí que se observa una sobreexpresión de rutas de estrés celular en los blastocistos con un mayor contenido de ADNmt por célula.

Todos estos hallazgos llevan a la conclusión general de que I) el contenido de ADNmt puede verse modulado en cuestión de pocas horas en respuesta a factores externos e internos antes de la implantación, y que II) a pesar de no encontrarse una utilidad en el contenido de ADNmt por célula como marcador del recuento y del estado mitocondrial en el blastocisto, existe una importante relación entre los valores altos de contenido de ADNmt por célula y el estrés embrionario.

Estos hallazgos pueden explicar, en parte, la disparidad de opiniones que existen respecto al uso del contenido de ADNmt por célula como marcador de competencia embrionaria, y pueden ser útiles para establecer la base molecular necesaria que respalde, en un futuro, su uso como un indicador adicional para la priorización de la transferencia embrionaria.

Perspectivas futuras

El presente estudio, ha arrojado luz sobre diversos aspectos y limitaciones que pueden ser causantes de la falta de acuerdo entre investigadores con respecto al uso del ADNmt como marcador de competencia embrionaria. Todos estos hallazgos abren nuevos caminos hacia la búsqueda de la mejora o de alternativas en su forma de uso.

Por un lado, sería recomendable establecer un consenso entre laboratorios en cuanto a la forma de cuantificación del ADNmt, ya que la normalización de su forma de medición eliminaría muchos problemas a la hora de comparar resultados entre investigadores. Pero, además, la capacidad de modulación del ADNmt por parte del embrión en cuestión de pocas horas hace que el valor de contenido de ADNmt por célula pueda variar dependiendo del momento en el que se haga la biopsia embrionaria.

Por último, la falta de correlación entre el contenido de ADNmt por célula y el contenido de mitocondrias totales y activas podría deberse a los numerosos eventos de fusión y fisión que ocurren de forma constante y en cuestión de minutos en las células.

Es por ello por lo que sería muy interesante abordar nuevas formas de cuantificación del ADNmt no invasivas y rápidas en un momento cercano a la transferencia embrionaria. De esta forma se podría demostrar su eventual asociación con la viabilidad o la implantación evolutiva de una manera más fiable. Por tanto, este tipo de aproximación tendría sentido en ciclos en fresco, ya que es el tipo de ciclo en el que se podría hacer una selección embrionaria en un momento cercano a la transferencia. Por ejemplo, existen resultados prometedores en cuanto a la obtención de ADN nuclear y mitocondrial a partir de muestras de blastocite o de medio de cultivo. Esta técnica eliminaría muchos inconvenientes al ser prácticamente no invasiva y su optimización podría permitir obtener resultados rápidos (Hammond *et al.*, 2016).

Por último, y una vez optimizado el proceso de medición del contenido de ADNmt, sería de gran importancia profundizar en la relación existente entre los altos valores de ADNmt por célula y el estrés celular. El significado biológico del estrés y su relación con la mitocondria en el desarrollo embrionario no están aún del todo descifrados. Por ejemplo, sería muy interesante estudiar si el incremento de ADNmt por célula y las vías

de estrés celular pueden afectar los resultados neonatales después de la transferencia de blastocistos vitrificados, generando un mayor riesgo de LGA y macrosomía (Ernstad *et al.*, 2019; Elias *et al.*, 2020), así como una posible predisposición a la disfunción del balance energético y enfermedades crónicas en etapas posteriores de la vida (García-Domínguez *et al.*, 2018; Barberet *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2021)

Conclusiones

1. El contenido de ADNmt en el ovocito humano es dependiente de la edad femenina y varía ampliamente entre los ovocitos de la misma cohorte de una donante y entre donantes distintas.
2. El bajo contenido de ADNmt en ovocitos está directamente relacionado con el FF humano independientemente de la edad materna y el tiempo de cultivo in-vitro.
3. A lo largo del desarrollo embrionario humano in-vitro hay una degradación del contenido de ADNmt total por embrión y una distribución de éste entre las células a lo largo de las divisiones.
4. No existen diferencias en el contenido de ADNmt en blastocistos aneuploides humanos según su calidad embrionaria o su día de desarrollo cuando la medición se hace en el embrión completo.
5. El contenido de ADNmt en el blastocisto humano es capaz de verse modulado y sobrepasar sus niveles basales durante situaciones de estrés embrionario como el proceso de vitrificación/desvitrificación y el bloqueo embrionario en etapa de división. Esta modulación se puede dar en cuestión de pocas horas y puede ocurrir como un intento de restablecer el estado previo al estrés embrionario. No obstante, esta modulación puede hacer que el momento en el que se mide el contenido de ADNmt en el embrión tenga influencia sobre el valor que se obtiene.
6. Este aumento del contenido de ADNmt en situaciones de estrés está acompañado de una sobreexpresión de rutas de estrés celular y de un aumento de actividad mitocondrial, aunque este último solo se da en la situación de bloqueo embrionario. Por lo tanto, el aumento de ADNmt también podría tener implicaciones biológicas distintas a la producción de energía.

7. El contenido de ADNmt por célula no es representativo del contenido de mitocondrias totales ni activas en blastocistos humanos aneuploides.
8. A pesar de que el contenido de ADNmt no está relacionado con la masa ni con la actividad mitocondrial, los niveles altos del mismo están relacionados con rutas de estrés celular en blastocistos humanos, sugiriendo que pueden ser indicadores de estrés embrionario. Se observa que los blastocistos que parten de un nivel de contenido de ADNmt por célula más alto son más susceptibles de sufrir estrés tras el proceso de vitrificación/desvitrificación en comparación con blastocistos con un contenido más bajo.
9. Por tanto, estos hallazgos podrían explicar la falta de consenso que existe en cuanto al uso del contenido de ADNmt por célula como marcador de competencia embrionaria, y sugieren que quizá su cuantificación en un momento cercano a la transferencia embrionaria constituiría un marcador más realista del estado del embrión, y podría permitir, en un futuro, la selección de blastocistos en base a su nivel de estrés embrionario.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario

Contribuciones científicas

1. Publicaciones en revistas científicas

“Mitochondrial DNA content decreases during in-vitro human embryo development, insights of mtDNA variation in preimplantation embryos donated for research”. Pérez-Sánchez M, Díez-Juan A, Beltrán D, Mifsud A, Mercader A, Vidal C, Labarta E, Pellicer A, Prof, Seli E, de los Santos MJ. *Fertility and Sterility Science*, Mayo 2020.

“Mitochondrial DNA replication after blastocyst vitrification: A heroic act of survival or an alert for the future?”. Pérez-Sánchez M, Díez-Juan A, Quiñonero A, Domínguez F, Martín A, Vidal C, Beltrán D, Mifsud A, Mercader A, Pellicer A, Cobo A, de los Santos MJ. *Human Reproduction*, bajo revisión, 2021.

“Does mitochondrial DNA content per cell in blastocysts correlate with mitochondrial mass and activity?”. Pérez-Sánchez M, Martín A, Mercader A, Beltrán D, Tejera A, Pellicer A, de los Santos MJ. *Bajo revisión*, 2021.

2. Comunicaciones orales en congresos

“Are human embryos able to modulate mitochondrial DNA (mtDNA) content before implantation?”. Pérez-Sánchez M, Díez-Juan A, Vidal C, Castelló D, de los Santos MJ. Congreso European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Viena (Austria). 23-26 junio, 2019.

“Is mtDNA content assessment an indicator of the amount of mitochondria (total and active ones) in the human blastocyst?: A confocal microscopy approach”. Pérez-Sánchez

M, Mercader A, Mifsud A, Beltrán D, Vidal C, Labarta E, Pellicer A, de los Santos MJ. Congreso virtual American Society for Reproductive Medicine (ASRM). 17-21 octubre, 2020.

3. Comunicaciones con póster en congresos

“Total mitochondrial DNA (mtDNA) content decreases along embryo development, insights of mtDNA turnover in human preimplantation development”. Pérez-Sánchez M, Insúa MF, Díez-Juan A, Mercader A, Bellver J, Escrich L, Pellicer A, de los Santos MJ. Congreso IVIRMA, Palma de Mallorca (España). 4-6 abril, 2019.

“Is low mitochondrial DNA (mtDNA) content after fertilization failure due to oocyte aging in culture?”. Pérez-Sánchez M, Mercader A, Beltrán D, Delgado A, Escrich L, Pellicer A, Vidal C, de los Santos MJ. Congreso ASRM, Filadelfia (EEUU). 12-16 octubre, 2019.

“Positive association between the mtDNA content of oocytes from donors and age”. Mifsud A, Beltrán D, Pérez-Sánchez M, Díez-Juan A, Labarta E, Galán A, de los Santos MJ. Congreso Controversies in preconception, preimplantation and prenatal genetic diagnosis (COGEN), París (Francia). 7-9 noviembre, 2019.

“The transcriptional profile of arrested cleavage stage human embryos”. Pérez-Sánchez M, Domínguez F, Quiñonero A, Beltrán D, Delgado A, Mercader A, Martín A, Pellicer A, de los Santos MJ. Congreso virtual ESHRE. 26 junio- 1 julio, 2021.

“Mitochondrial DNA replication after blastocyst vitrification: a heroic act of survival or an alert for the future?”. Pérez-Sánchez M, Martín A, Quiñonero A, Domínguez F, Vidal C, Pellicer A, Cobo A, de los Santos MJ. Congreso ASRM, Baltimore (EEUU). 17-20 octubre, 2021.

“Transcriptional profile of stressed human embryos: study of early-stage arrested embryos”. Pérez-Sánchez M, Beltrán D, Insua F, Quiñonero A, Domínguez F, Mercader A, de los Santos, MJ. Congreso ASRM, Baltimore (EEUU). 17-20 octubre, 2021.

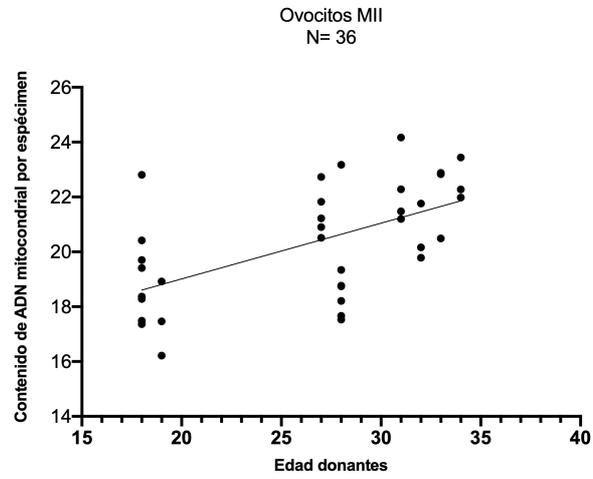
“Mitochondrial DNA content before vitrification (Mitoscore[®]) is not a reliable marker of mitochondrial mass and activity in the human blastocyst: a confocal and electron microscopy approach”. Pérez-Sánchez M, Martín A, de los Santos JM, Nohales M, Cobo A, de los Santos MJ. Congreso ASRM, Baltimore (EEUU). 17-20 octubre, 2021.

“Estudio mediante microscopía confocal y electrónica de la representatividad del contenido de ADN mitocondrial (ADNmt) respecto a la actividad y a la masa mitocondrial en el blastocisto humano post-desvitrificación”. de los Santos JM, Pérez-Sánchez M, Martín A, Nohales M, Cobo A, de los Santos MJ. Congreso ASEBIR, Toledo (España). 17-19 noviembre, 2021.

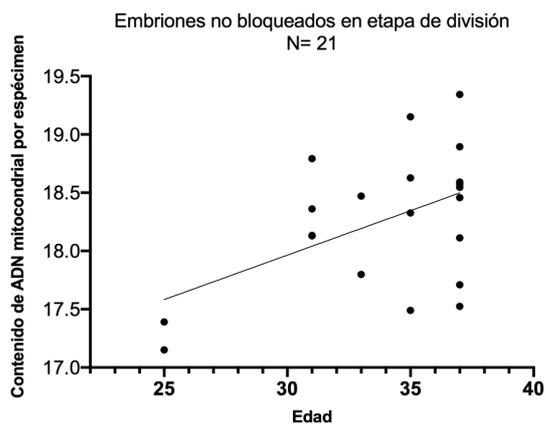
“El perfil transcripcional de embriones humanos bloqueados en estadio tempranos”. Beltrán D, Pérez-Sánchez M, Insua F, Quiñonero A, Domínguez F, Mercader A, de los Santos MJ. Congreso ASEBIR, Toledo (España). 17-19 noviembre, 2021.

Figuras suplementarias

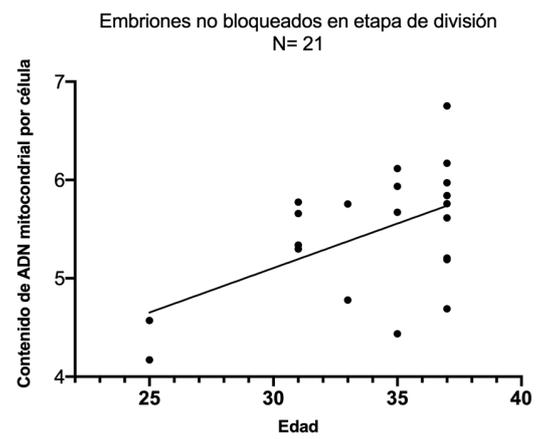
A



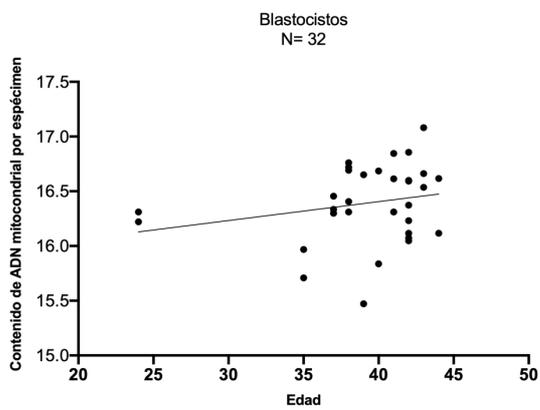
B



C



D



E

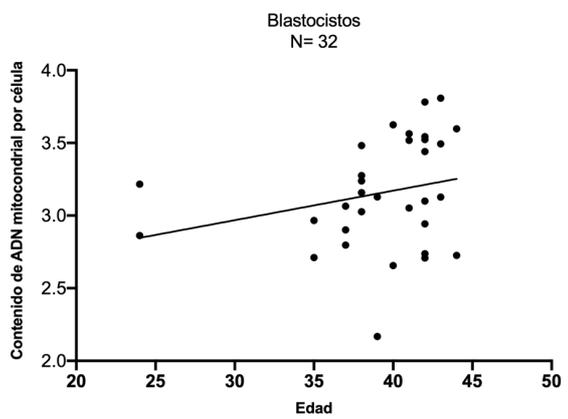


Figura suplementaria 1. Contenido de ADNmt durante el desarrollo embrionario humano según la edad materna. A) Correlación entre el contenido de ADNmt y la edad de la donante en ovocitos MII donados. B) Correlación entre el contenido de ADNmt por espécimen y la edad materna en embriones no bloqueados en etapa de división. C) Correlación entre el contenido de ADNmt por célula y la edad materna en embriones no bloqueados en etapa de división. D) Correlación entre el contenido de ADNmt por espécimen y la edad materna en blastocistos. E) Correlación entre el contenido de ADNmt por célula y la edad materna en blastocistos.

*Edad en años.

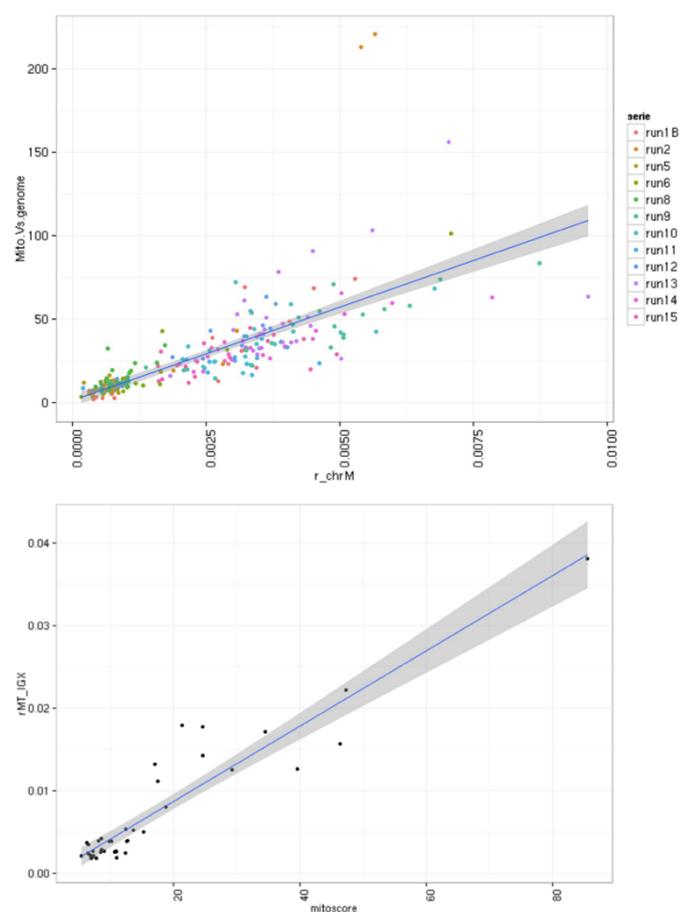


Figura suplementaria 2. Correlación entre el contenido de ADNmt medido por NGS (eje Y en el panel superior y eje X en el panel inferior) y por RT-PCR (eje X en el panel superior y eje Y en el panel inferior). El panel superior contiene embriones euploides y aneuploides, mientras que el panel inferior solo contiene embriones euploides.

* R^2 en panel superior= 0,75 y R^2 en panel inferior= 0,93.

** Imágenes cedidas por el Dr. Antonio Díez-Juan.

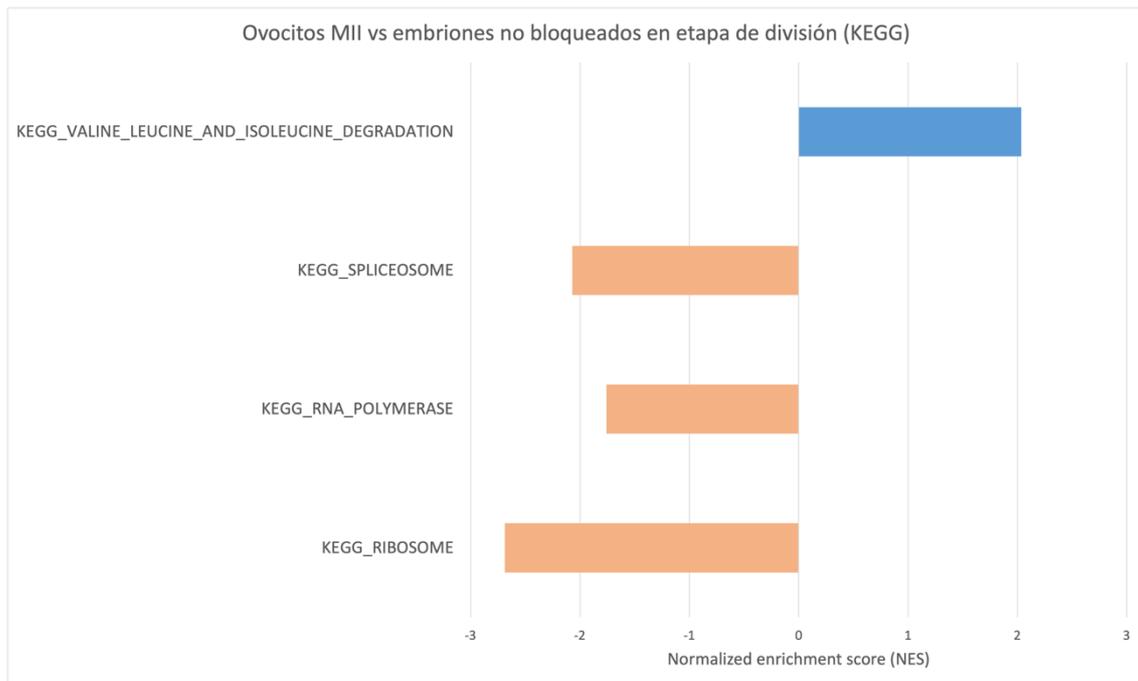


Figura suplementaria 3. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de ovocitos MII vs embriones no bloqueados en etapa de división. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de KEGG significativas ($P < 0,05$).

* Las barras azules indican sobreexpresión en ovocitos MII; las barras naranjas indican infraexpresión en ovocitos MII.

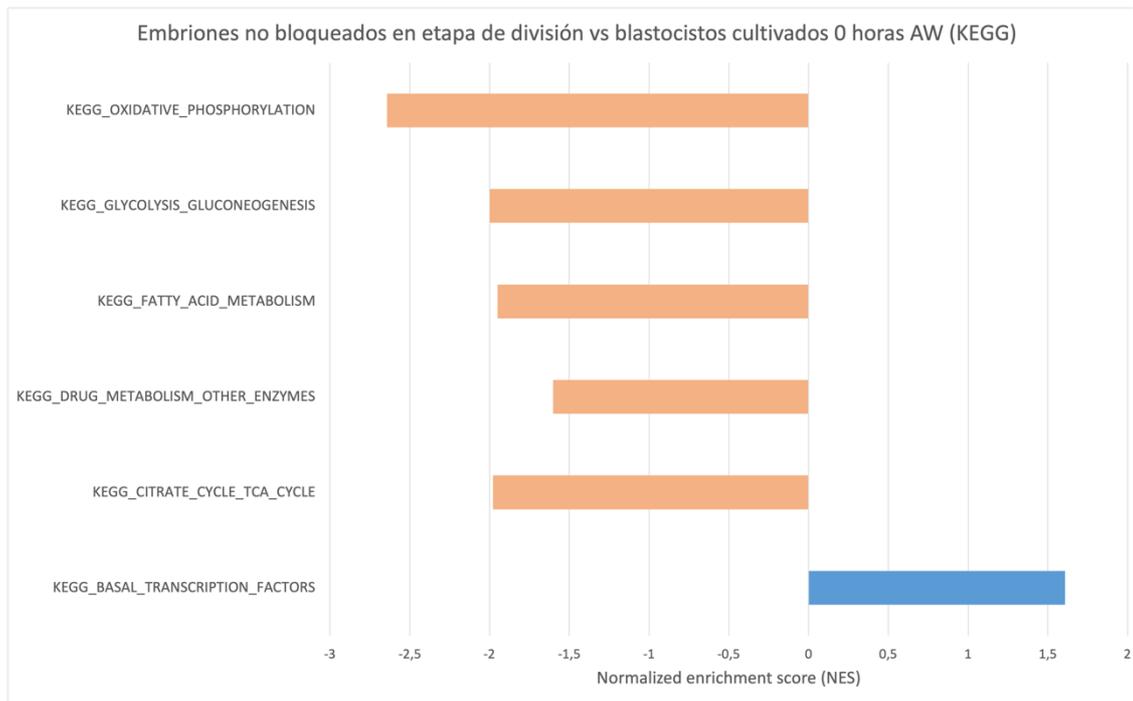


Figura suplementaria 4. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de embriones no bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación (after warming, AW). Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de KEGG significativas ($P < 0,05$) de interés.

* Las barras azules indican sobreexpresión en embriones no bloqueados en etapa de división; las barras naranjas indican infraexpresión en embriones no bloqueados en etapa de división.

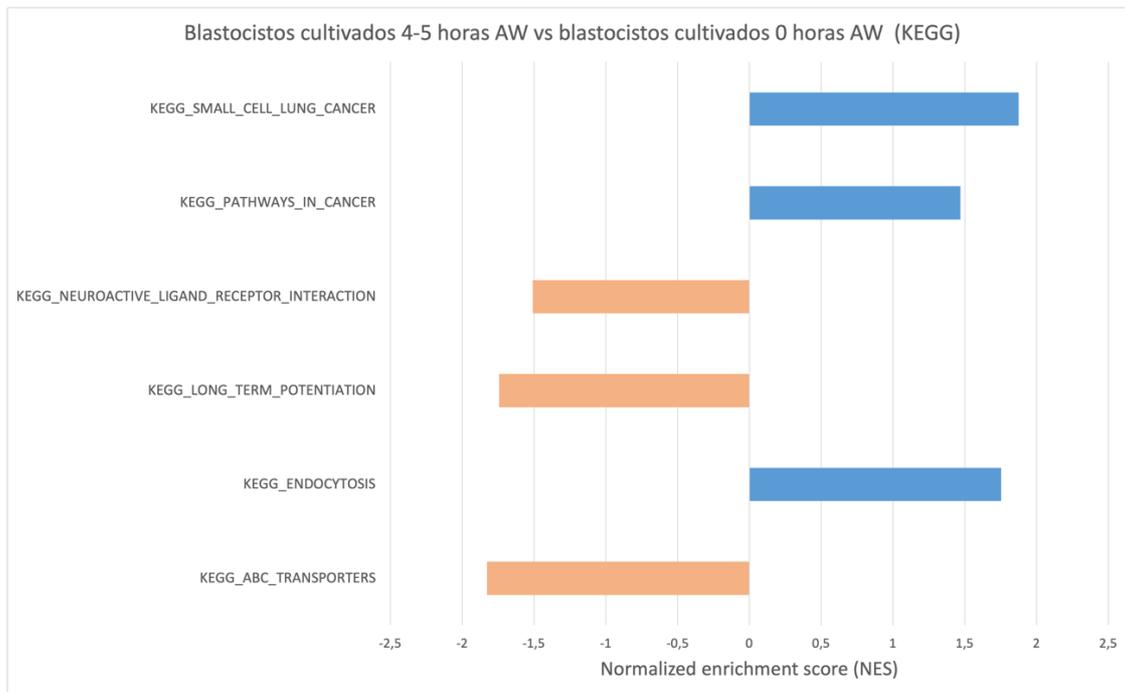


Figura suplementaria 5. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de blastocistos cultivados durante 4-5 horas tras la desvitricación (after warming, AW) vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de KEGG significativas ($P < 0,05$).

* Las barras azules indican sobreexpresión en blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW; las barras naranjas indican infraexpresión en blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW.

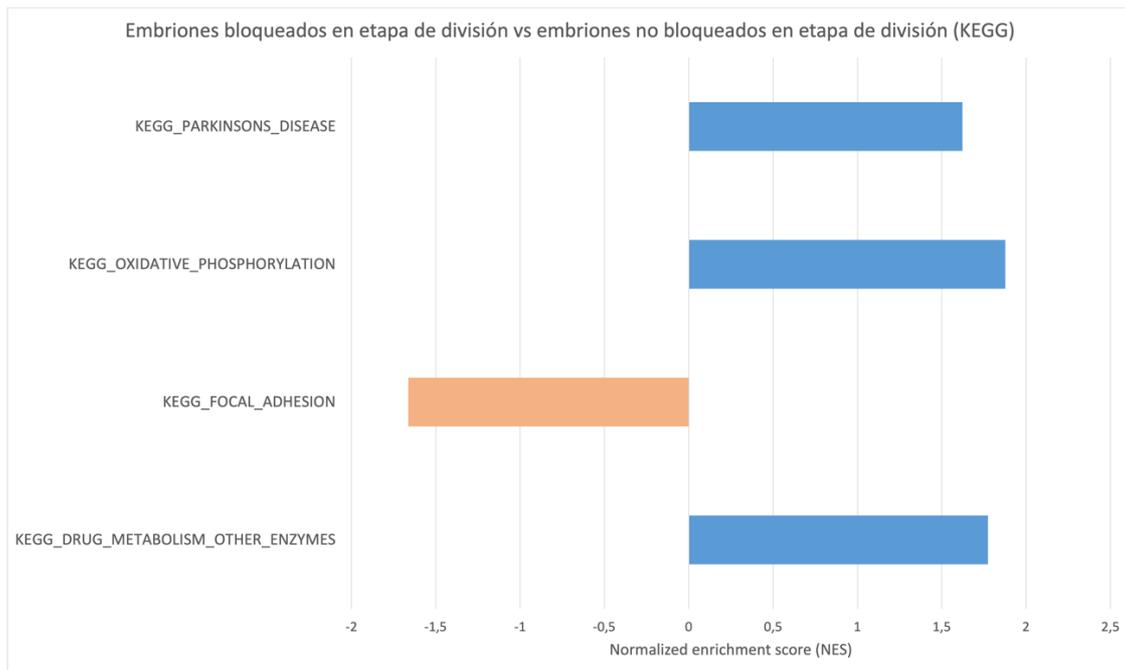


Figura suplementaria 6. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de embriones en etapa de división bloqueados vs embriones en etapa de división no bloqueados. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de KEGG significativas ($P < 0,05$) de interés.

*Las barras azules indican sobreexpresión en embriones bloqueados en etapa de división; las barras naranjas indican infraexpresión en embriones bloqueados en etapa de división.

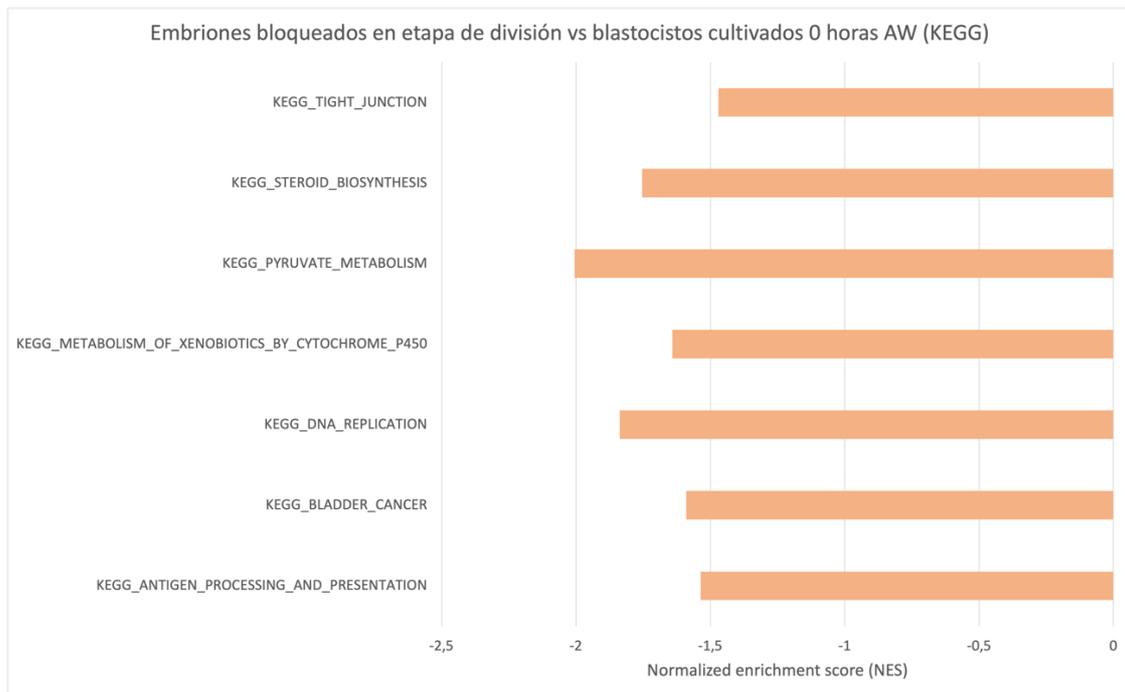


Figura suplementaria 7. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de embriones bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación (after warming, AW). Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de KEGG significativas ($P < 0,05$) de interés.

* Las barras naranjas indican infraexpresión en embriones bloqueados en etapa de división.

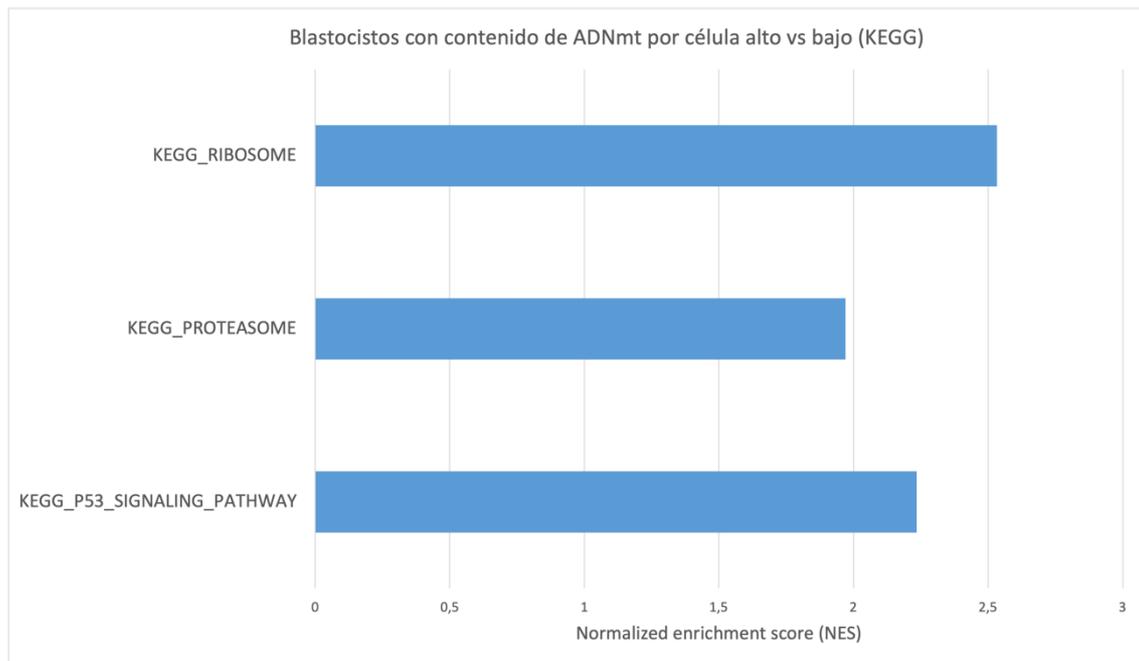
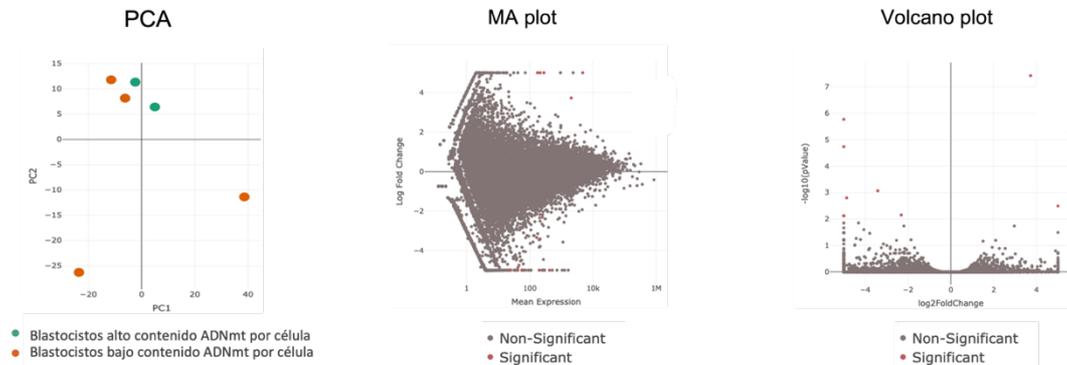


Figura suplementaria 8. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación. Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de KEGG significativas ($P < 0,05$).

* Las barras azules indican sobreexpresión en los blastocistos de alto contenido de ADNmt por célula.

A

Blastocistos cultivados durante 0 horas AW: contenido de ADNmt alto vs bajo



B

Blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW: contenido de ADNmt alto vs bajo

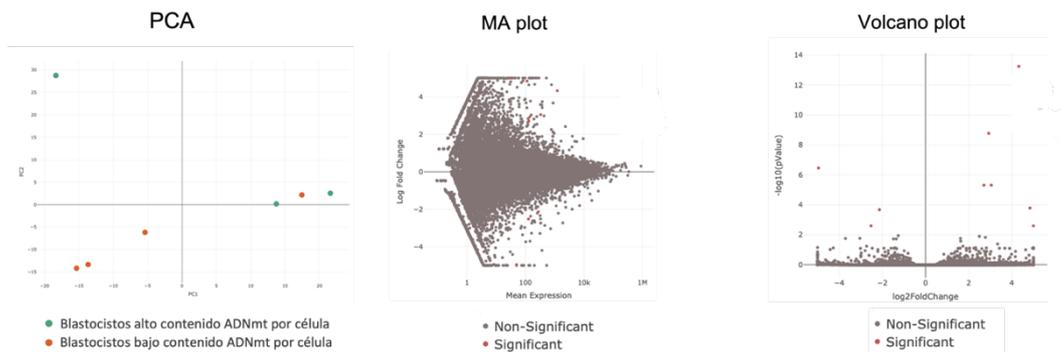


Figura suplementaria 9. PCA, MA plot y Volcano plot para A) blastocistos cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación: contenido de ADNmt por célula alto vs bajo y B) blastocistos cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación: contenido de ADNmt por célula alto vs bajo.

A



B

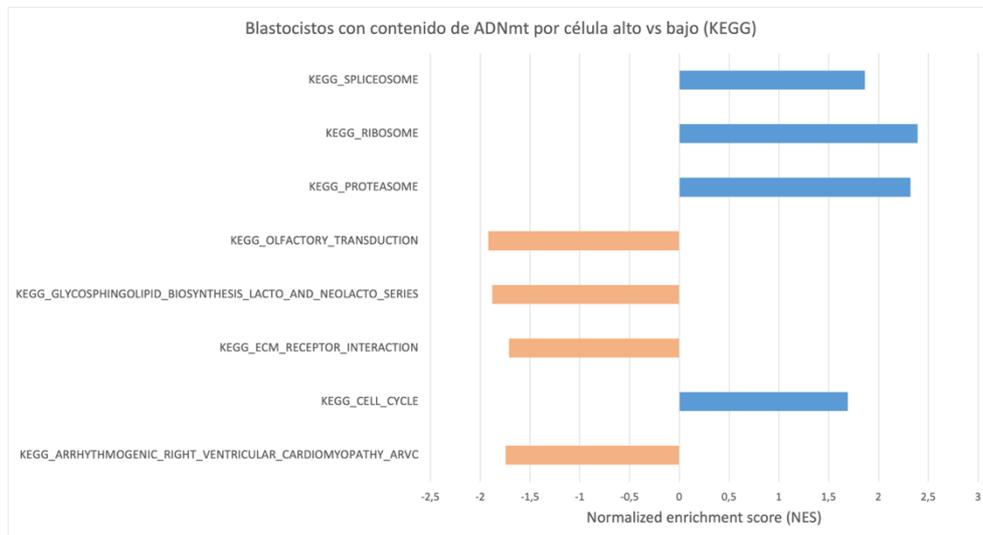


Figura suplementaria 10. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación (after warming, AW). Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para A) las categorías de GO significativas ($P < 0,05$) de interés y B) para las categorías de KEGG significativas ($P < 0,05$).

* Las barras azules indican sobreexpresión en blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula; las barras naranjas indican infraexpresión en blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula.

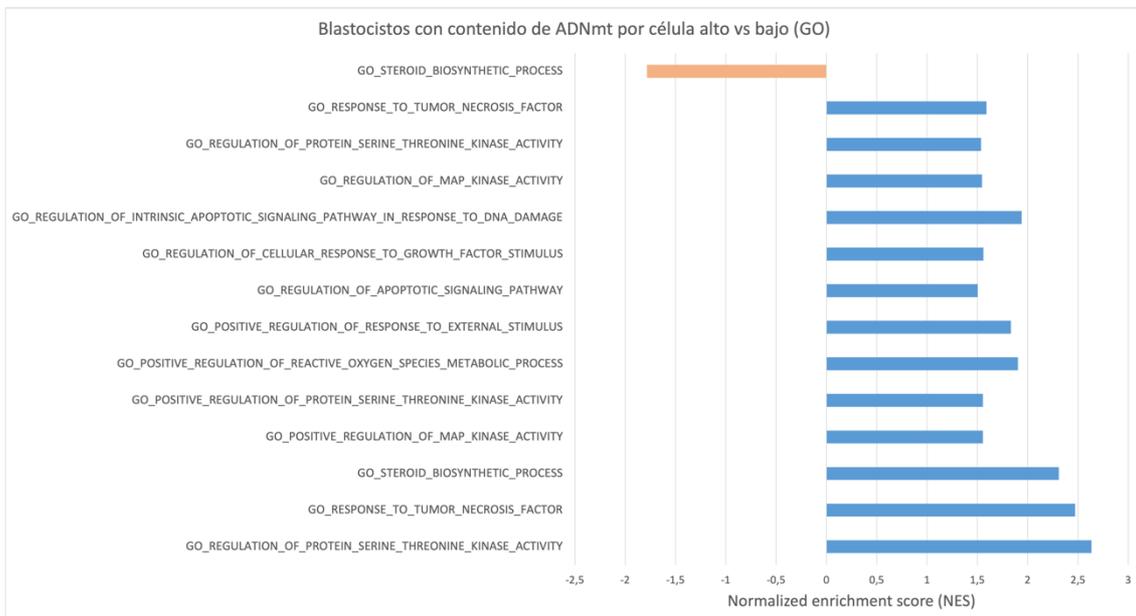


Figura suplementaria 11. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para la comparación de blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación (after warming, AW). Las barras representan la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) para las categorías de GO significativas ($P < 0,05$) de interés. No existen categorías de KEGG significativas para esta comparación.

* Las barras azules indican sobreexpresión en blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula; las barras naranjas indican infraexpresión en blastocistos con alto contenido de ADNmt por célula.

Tablas suplementarias

Estudio	Día de biopsia	Edad materna	Calidad blastocisto	Estado ploidía	Tasa de Implantación
Tan et al, Giga Science 2014	No evaluado	No evaluado	No evaluado	Mayor en aneuploides	No evaluado
Diez-Juan A et al, Fertil Steril 2015	No evaluado	No efecto	Mayor en baja calidad (tendencia)	No evaluado	Menor en implantados
Fragouli E et al, PloS Genetics 2015	No evaluado	Depende estadio embrionario	No evaluado	Mayor en aneuploides	Menor en implantados
Fragouli E et al, Human Reprod 2017	No evaluado	Mayor en edad avanzada	No evaluado	No evaluado	Menor en implantados
Victor AR et al, Fertil Steril 2017	No evaluado	No efecto	No evaluado	No efecto	No efecto
Ravichandran K et al, Human Reprod 2017	No efecto	Mayor en edad avanzada	No efecto	No evaluado	Menor en implantados
Treff NR et al, Human Reprod 2017	Menor en día 6 que en día 5	Menor en edad avanzada	Mayor en baja calidad	No evaluado	No efecto
De los Santos MJ et al, Fertil Steril 2018	No evaluado	No efecto	Mayor en baja calidad	Mayor en aneuploides	No evaluado
Klimczak et al, JARG 2018	Menor en día 6 que en día 5	No efecto	Depende de la ploidia	Mayor en aneuploides	No efecto
Ho et al, JARG 2018	No evaluado	No efecto	No efecto	Mayor en aneuploides	No evaluado
Lledo B et al, Hum Reprod Open 2018	Menor en día 6 que en día 5	Menor en edad avanzada	No efecto	No evaluado	Menor en implantados
Scott R et al, Reprod Biomed 2020	Menor en día 6 que en día 5	No efecto	No evaluado	No evaluado	No efecto

Tabla suplementaria 1. Comparación de varios estudios sobre el potencial del contenido de ADNmt por célula como marcador de diferentes parámetros embrionarios y resultados clínicos.

Donantes N= 16	
Promedio de especímenes analizados por donante	2,43
Promedio de edad ovocito (años)	25,06
Índice de masa corporal (nº de donantes)	
< 18,5	1 (6,25%)
18,5-24,9	8 (50%)
25-29,9	6 (37,5%)
> 30	1 (6,25%)
Protocolo de estimulación (nº de donantes)	
Antagonistas	13 (81,25%)
Sin análogos	3 (18,75%)
Indicación de tratamiento (nº de donantes)	
Donación de ovocitos	16 (100%)
Pacientes N= 108	
Promedio de especímenes analizados por paciente	2,93
Promedio de edad ovocito (años)	37,45
Índice masa corporal (nº de pacientes)	
< 18,5	1 (1,1%)
18,5-24,9	71 (78,1%)
25-29,9	30 (33%)
> 30	6 (6,6%)
Indeterminado	2 (2,2%)
Protocolo de estimulación (nº de pacientes)	
Antagonistas	83 (75,45%)
Agonistas	8 (7,27%)
Sin análogos	5 (4,54%)
Mínima estimulación	8 (7,27%)
Indeterminado	6 (5,45%)
Ovodonación	13 (11,81%)
Indicación de tratamiento (nº de pacientes)	
Edad materna	73 (63,36%)
Factor masculino	9 (8,18%)
Aborto repetición	5 (4,54%)
Fallo implantación	5 (4,54%)
Baja reserva/ baja respuesta	6 (5,45%)
Combinación de anteriores	12 (10,90%)

Tabla suplementaria 2. Características demográficas y clínicas de las pacientes.

Marcador	N	Mínimo	Máximo	Rango	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
Nonil-naranja de acridina	12	1131	1839	707.8	1433	229.5	66.26
MitoTracker Deep Red	12	846.7	1779	932.1	1368	274.3	79.19

Tabla suplementaria 3. Estadística descriptiva de la intensidad de fluorescencia ajustada manualmente para cada marcador fluorescente con la metodología de fluorescencia fija. Los valores mostrados son en términos de valores medios de gris (brillo de píxel). Se observa que el error estándar es bajo con respecto a la media.

Gen		Secuencia del primer	Referencia comercial
EHMT2	Forward	TGGAGGCACCCAAGATTGAC	Invitrogen, EEUU
	Reverse	CAGTGGTGTTTGACCATGCG	
SULT1A4	Forward	ACTCTGAAAGACACACCGCC	Invitrogen, EEUU
	Reverse	GTGCGCCTTTTCCATACGGT	
ATP5MC1	Forward	CCGCCGGGGCATTATTCATT	Invitrogen, EEUU
	Reverse	GGGCAAAGCCAAGAATGGCA	
HAND1	Forward	CTCAGGACCCAAGAAGGAGC	Invitrogen, EEUU
	Reverse	CCAGCACGTCCATCAGGTAG	

Tabla suplementaria 4. Descripción de los primers utilizados para la validación del estudio RNA-seq del objetivo secundario 2.

Grupo de comparación	Transcritos diana	Genes diferencialmente expresados (P_{adj} < 0,05)
Ovocitos MII vs embriones no bloqueados en etapa de división	178.517	12.408
Embriones no bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW	178.517	12.286
Blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW	178.517	40
Embriones bloqueados en etapa de división vs embriones no bloqueados en etapa de división	178.517	3.279
Embriones bloqueados en etapa de división vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW	178.517	1.188

Tabla suplementaria 5. Número de transcritos diana y genes diferencialmente expresados para los grupos de comparación de RNA-seq del objetivo específico 2.

* Tras la desvitrificación= after warming, AW.

Blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW

Genes diferencialmente expresados (Padj < 0,05)	Identificación del gen	Biotipo	Media bases	Log₂ Fold Change
MPP5	ENSG00000072415	protein_coding	830	0,770133517
EPB41L3	ENSG00000082397	protein_coding	192	1,428626632
SH3BP2	ENSG00000087266	protein_coding	127	-2,141748531
EIF5	ENSG00000100664	protein_coding	23056	1,154574469
KNG1	ENSG00000113889	protein_coding	66	-2,100035348
SNAI1	ENSG00000124216	protein_coding	102	-1,423162088
PPARG	ENSG00000132170	protein_coding	366	1,2889436
FST	ENSG00000134363	protein_coding	71	2,71304941
GLS2	ENSG00000135423	protein_coding	21	3,065798163
ALDH1L2	ENSG00000136010	protein_coding	86	-2,44122443
STXBP1	ENSG00000136854	protein_coding	47	1,721587506
GOLGA1	ENSG00000136935	protein_coding	426	0,770621521
FAHD2B	ENSG00000144199	protein_coding	221	1,143830639
MAGEA4	ENSG00000147381	protein_coding	978	-2,605374171
KCTD14	ENSG00000151364	protein_coding	244	1,79168315
DDAH1	ENSG00000153904	protein_coding	27	2,115577157
ITGA2	ENSG00000164171	protein_coding	29	2,188886046
ARHGAP42	ENSG00000165895	protein_coding	599	0,954977976
PLIN1	ENSG00000166819	protein_coding	10	3,413539906
AL159987.1	ENSG00000169164	transcribed_unprocessed_pseudogene	43	-1,651740212
PYGO1	ENSG00000171016	protein_coding	176	1,185115205

NPTX1	ENSG00000171246	protein_coding	760	2,285372793
KRT19	ENSG00000171345	protein_coding	763	1,516697261
OR1N1	ENSG00000171505	protein_coding	65	2,533497428
DYNAP	ENSG00000178690	protein_coding	77	-1,262457234
SIAH2	ENSG00000181788	protein_coding	23	2,221495736
SERHL2	ENSG00000183569	protein_coding	62	-1,243546636
MED12	ENSG00000184634	protein_coding	190	-1,274275212
BLOC1S5	ENSG00000188428	protein_coding	848	0,538809246
NRAP	ENSG00000197893	protein_coding	13	-3,72525101
EHMT2	ENSG00000204371	protein_coding	112	24,77148638
TTC25	ENSG00000204815	protein_coding	80	-1,737506166
NAP1L4	ENSG00000205531	protein_coding	2142	0,714762703
SULT1A4	ENSG00000213648	protein_coding	186	-2,926756433
RPL10P6	ENSG00000230076	processed_pseudogene	19	-4,713413776
RPL10P9	ENSG00000233913	processed_pseudogene	148	-6,937564722
RAMACL	ENSG00000235272	protein_coding	443	-6,666676114
TSPY10	ENSG00000236424	protein_coding	8	6,298060579
AK4P1	ENSG00000263535	processed_pseudogene	686	6,123736855
C2orf15	ENSG00000273045	protein_coding	72	1,807989151

Tabla suplementaria 6. Lista de los genes diferencialmente expresados ($P_{adj} < 0,05$) para la comparación de blastocistos cultivados durante 4-5 horas tras la desvitricación (after warming, AW) vs blastocistos cultivados durante 0 horas AW.

Gen		Secuencia del primer	Referencia comercial
EHMT2	Forward	TGGAGGCACCCAAGATTGAC	Invitrogen, EEUU
	Reverse	CAGTGGTGTTTGACCATGCG	
SULT1A4	Forward	ACTCTGAAAGACACACCGCC	Invitrogen, EEUU
	Reverse	GTGCGCCTTTTCCATACGGT	

Tabla suplementaria 7. Descripción de los primers utilizados para la validación del estudio RNA-seq del objetivo específico 3 (blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación).

Grupo de comparación	Transcritos diana	Genes diferencialmente expresados (Padj < 0,05)
Blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo AW	178.517	39

Tabla suplementaria 8. Número de transcritos diana y genes diferencialmente expresados para la comparación de blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo independientemente de las horas de cultivo tras la desvitrificación (after warming, AW).

Grupo de comparación	Transcritos diana	Genes diferencialmente expresados (P_{adj} < 0,05)
Blastocistos cultivados durante 0 horas AW: contenido de ADNmt por célula alto vs bajo	178.517	24
Blastocistos cultivados durante 4-5 horas AW: contenido de ADNmt por célula alto vs bajo	178.517	19

Tabla suplementaria 9. Número de transcritos diana y genes diferencialmente expresados para los grupos de comparación de RNA-seq: “Blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo cultivados durante 0 horas tras la desvitrificación” y “Blastocistos con contenido de ADNmt por célula alto vs bajo cultivados durante 4-5 horas tras la desvitrificación”.

*Tras la desvitrificación= after warming, AW.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Adamson D. *International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies (ICMART) report, ESHRE congress*. 2018; Barcelona (España).
- Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Seco-Filgueira M, Fernández-Fernández C, Mouriño-Bayolo D. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* [Internet] 2019;**46**:73–90. Elsevier B.V.
- Aiken CEM, Cindrova-Davies T, Johnson MH. Variations in mouse mitochondrial DNA copy number from fertilization to birth are associated with oxidative stress. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2008;**17**:806–813. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Ajduk A, Ilozue T, Windsor S, Yu Y, Seres KB, Bompfrey RJ, Tom BD, Swann K, Thomas A, Graham C, *et al*. Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nat Commun* [Internet] 2011;**2**:410–417. Nature Publishing Group.
- Akram M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochem Biophys* 2014;**68**:475–478.
- Al-Azzam N. Sirtuin 6 and metabolic genes interplay in Warburg effect in cancers. *J Clin Biochem Nutr* 2020;**66**:169–175.
- Alán L, Špaček T, Pajuelo Reguera D, Jabůrek M, Ježek P. Mitochondrial nucleoid clusters protect newly synthesized mtDNA during Doxorubicin- and Ethidium Bromide-induced mitochondrial stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;**302**:31–40.
- Alberts B. Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts. *Mol Biol Cell* 2014;; p. 759–761. Garland Science: New York (EEUU).
- Amoushahi M, Salehnia M, Mowla SJ. Vitriification of mouse MII oocyte decreases the mitochondrial DNA copy number, TFAM gene expression and mitochondrial enzyme activity. *J Reprod Infertil* 2017;**18**:343–351.
- Angajala A, Lim S, Phillips JB, Kim JH, Yates C, You Z, Tan M. Diverse roles of mitochondria in immune responses: Novel insights into immuno-metabolism. *Front Immunol* 2018;**9**..
- Archer SL. Mitochondrial dynamics - Mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med* 2013;**369**:2236–2251.

- Arciuch VGA, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxidants Redox Signal* 2012;**16**:1150–1180.
- Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* [Internet] 2013;**20**:31–42. Nature Publishing Group.
- Babayev E, Seli E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015;175–181.
- Bader DA, Hartig SM, Putluri V, Foley C, Hamilton MP, Smith EA, Saha PK, Panigrahi A, Walker C, Zong L, *et al.* Mitochondrial pyruvate import is a metabolic vulnerability in androgen receptor-driven prostate cancer. *Nat Metab* 2019;**1**:70–85.
- Barberet J, Barry F, Choux C, Guilleman M, Karoui S, Simonot R, Bruno C, Fauque P. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clin Epigenetics* 2020;**12**:1–15. Clinical Epigenetics.
- Barritt JA, Kokot M, Cohen J, Steuerwald N, Brenner CA. Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2002;**4**:243–247. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Bause AS, Haigis MC. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp Gerontol* [Internet] 2013;**48**:634–639. Elsevier B.V.
- Bayram A, Elkhatib I, Arnanz A, Linan A, Ruiz F, Lawrenz B, Fatemi HM. What Drives Embryo Development? Chromosomal Normality or Mitochondria? *Case Rep Genet* 2017;**2017**:1–4.
- Bentov Y, Yavorska T, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:773–783.
- Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res* 2015;**18**:422–436.
- Blerkom J Van. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: Engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004;**128**:269–280.
- Blerkom J Van. Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* 2009;**20**:354–364.

- Blerkom J Van. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2011;**7**:797–813.
- Blerkom J Van, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: Relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 2000;**15**:2621–2633.
- Blerkom J Van, Davis P, Mathwig V, Alexander S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod* 2002;**17**:393–406.
- Bliek AM Van Der, Sedensky MM, Morgan PG. Cell biology of the mitochondrion. *Genetics* 2017;**207**:843–871.
- Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2020;**21**:85–100. Springer US.
- Bosch E, Vos M De, Humaidan P. The Future of Cryopreservation in Assisted Reproductive Technologies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;**11**:1–15.
- Breton-Larrivée M, Elder E, McGraw S. DNA methylation, environmental exposures and early embryo development. *Anim Reprod* 2019;**16**:465–474.
- Brinkmann H, Philippe H. The diversity of eukaryotes and the root of the eukaryotic tree. *Adv Exp Med Biol* 2007;**607**:20–37.
- Cagnone G, Sirard MA. The embryonic stress response to in vitro culture: Insight from genomic analysis. *Reproduction* 2016;**152**:R247–R261.
- Chandramouleeswaran PM, Guha M, Shimonosono M, Whelan KA, Maekawa H, Sachdeva UM, Ruthel G, Mukherjee S, Engel N, Gonzalez M V., *et al.* Autophagy mitigates ethanol-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in esophageal keratinocytes. *PLoS One* [Internet] 2020;**15**:1–29.
- Chappel S. The Role of Mitochondria from Mature Oocyte to Viable Blastocyst. *Obstet Gynecol Int* 2013;**2013**:1–10.
- Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, DeCherney AH, Armant DR. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrinol Metab* [Internet] 2011;**22**:412–420. Elsevier Ltd.
- Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 2014;**114**:524–537.

- Chiaratti MR, Bressan FF, Ferreira CR, Caetano AR, Smith LC, Vercesi AE, Meirelles F V. Embryo Mitochondrial DNA Depletion Is Reversed During Early Embryogenesis in Cattle1. *Biol Reprod* 2010;**82**:76–85.
- Chircop M, Speidel D. Cellular stress responses in cancer and cancer therapy. *Front Oncol* 2014;**4**:8–9.
- Cimadomo D, Fabozzi G, Vaiarelli A, Ubaldi N, Ubaldi FM, Rienzi L. Impact of maternal age on oocyte and embryo competence. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**..
- Clément A, Seegers V, Boucret L, Hotellier VF, Bouet PE, Descamps P, Procaccio V, Reynier P. The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality. *Hum Reprod* 2017;**32**:607–614.
- Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: A prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;**25**:2239–2246.
- Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM, Murdoch AP, Chinnery PF, Taylor RW, Lightowlers RN, *et al*. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* [Internet] 2010;**465**:82–85. Nature Publishing Group.
- Dalton CM, Carroll J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J Cell Sci* 2013;**126**:2955–2964.
- Dard L, Blanchard W, Hubert C, Lacombe D, Rossignol R. Mitochondrial functions and rare diseases. *Mol Aspects Med* [Internet] 2020;**71**:100842. Elsevier.
- De los Santos MJ, Diez Juan A, Mifsud A, Mercader A, Meseguer M, Rubio C, Pellicer A. Variables associated with mitochondrial copy number in human blastocysts: what can we learn from trophectoderm biopsies? *Fertil Steril* 2018;**109**:110–117.
- Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;**8**:870–879.
- Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, Martinez S, Al-Asmar N, Riboldi M, Díaz-Gimeno P, Valbuena D, Simón C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: Less is better. *Fertil Steril* 2015;**104**:534–541.
- Ding WX, Yin XM. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* 2012;**393**:547–564.
- Dominy JE, Puigserver P. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear

- signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;**5**.
- Dorn GW, Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes Dev* 2015;**29**:1981–1991.
- Durbin BP, Rocke DM. Variance-stabilizing transformations for two-color microarrays. *Bioinformatics* 2004;**20**:660–667.
- Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nat Cell Biol* 2018;**20**:755–765.
- Shourbagy SH El, Spikings EC, Freitas M, John JC St. Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction* 2006;**131**:233–245.
- Elias FTS, Weber-Adrian D, Pudwell J, Carter J, Walker M, Gaudet L, Smith G, Velez MP. Neonatal outcomes in singleton pregnancies conceived by fresh or frozen embryo transfer compared to spontaneous conceptions: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet* [Internet] 2020;**302**:31–45. Springer Berlin Heidelberg.
- Enríquez JA. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu Rev Physiol* 2016;**78**:533–561.
- Ernstad EG, Spangmose AL, Opdahl S, Henningsen AKA, Romundstad LB, Tiitinen A, Gissler M, Wennerholm UB, Pinborg A, Bergh C, *et al.* Perinatal and maternal outcome after vitrification of blastocysts: A Nordic study in singletons from the CoNARTaS group. *Hum Reprod* 2019;**34**:2282–2289.
- Faddy MJ, Gosden MD, Gosden RG. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2018;**36**:455–458. Elsevier Ltd.
- Fazzini F, Schöpf B, Blatzer M, Coassin S, Hicks AA, Kronenberg F, Fendt L. Plasmid-normalized quantification of relative mitochondrial DNA copy number. *Sci Rep* 2018;**8**:1–11.
- Feuer S, Rinaudo P. Preimplantation Stress and Development. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev* 2012;**96**:299–314.
- Fimia GM, Piacentini M. Toward the understanding of autophagy regulation and its interplay with cell death pathways. *Cell Death Differ* [Internet] 2009;**16**:933–934. Nature Publishing Group.
- Folmes CDL, Terzic A. Metabolic determinants of embryonic development and stem

- cell fate. *Reprod Fertil Dev* 2015;**27**:82–88.
- Fragouli E. Mitochondrial DNA Assessment to Determine Oocyte and Embryo Viability. 2015;
- Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Hum Genet* 2013;**132**:1001–1013.
- Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel CE, Kokocinski F, Cohen J, Munne S, Wells D. Altered Levels of Mitochondrial DNA Are Associated with Female Age, Aneuploidy, and Provide an Independent Measure of Embryonic Implantation Potential. *Obstet Gynecol Surv* 2016;**11**(6).
- Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A, Jagasia R, Petcherski A, Ruonala MO, Priault M, Salin B, Reichert AS. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet] 2012;**1823**:2297–2310. Elsevier B.V.
- Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature* 2014;**505**:335–343.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010;**2010**:
- Garcia-Dominguez X, Peñaranda DS, Estruch G, Blanca J, García-Carpintero V, Cañizares J, Marco-Jiménez F, Vicente JS. Long-term phenotypic effects following vitrified-thawed embryo transfer in a rabbit model. *bioRxiv* 2018;
- Garcia-Dominguez X, Vicente JS, Marco-Jiménez F. Developmental plasticity in response to embryo cryopreservation: The importance of the vitrification device in rabbits. *Animals* 2020;**10**:
- Gardner DK, Pool TB, Lane M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin Reprod Med* 2000;**18**:205–218.
- Geyter C De, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G, Smeenk J, Vidakovic S, Goossens V, *et al.* ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE†. *Hum Reprod Open* 2020;**2020**:1–17.
- Gibhardt CS, Ezeriņa D, Sung HM, Messens J, Bogeski I. Redox regulation of the mitochondrial calcium transport machinery. *Curr Opin Physiol* 2020;**17**:138–148.
- Gohil VM, Greenberg ML. Mitochondrial membrane biogenesis: Phospholipids and proteins go hand in hand. *J Cell Biol* 2009;**184**:469–472.

- Gottlieb RA, Bernstein D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium* [Internet] 2016;**60**:88–101. Elsevier Ltd.
- Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of Lactate Dehydrogenase Isoforms and their Therapeutic Potentials. *Curr Med Chem* 2010;**17**:672–697.
- Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci* 2014;**71**:2577–2604.
- Greene AW, Grenier K, Aguileta MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, McBride HM, Park DS, Fon EA. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep* [Internet] 2012;**13**:378–385. Nature Publishing Group.
- Groff AF, Resetkova N, DiDomenico F, Sakkas D, Penzias A, Rinn JL, Eggan K. RNA-seq as a tool for evaluating human embryo competence. *Genome Res* 2019;**29**:1705–1718.
- Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Nardo M Di, Adiga SK, Talevi R. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. *Antioxidants* 2021;**10**:1–23.
- Guerif F, McKeegan P, Leese HJ, Sturmey RG. A Simple Approach for COsumption and RElease (CORE) Analysis of Metabolic Activity in Single Mammalian Embryos. *PLoS One* 2013;**8**:. .
- Guo H, Gong Y, He B, Zhao R. Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology* [Internet] 2017;**87**:276–283. Elsevier Ltd.
- Hackenbrock CR. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;**61**:598–605.
- Hammond ER, Shelling AN, Cree LM. Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: Evidence and potential clinical use. *Hum Reprod* 2016;**31**:1653–1661.
- Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants Redox Signal* 2012;**16**:1323–1367.
- Hara T, Kin A, Aoki S, Nakamura S, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrifiedwarmed bovine embryos. *PLoS One* 2018;**13**:1–17.

- Harvey AJ. Mitochondria in early development: Linking the microenvironment, metabolism and the epigenome. *Reproduction* 2019;**157**:R159–R179.
- Hashimoto S, Morimoto N, Yamanaka M, Matsumoto H, Yamochi T, Goto H, Inoue M, Nakaoka Y, Shibahara H, Morimoto Y. Quantitative and qualitative changes of mitochondria in human preimplantation embryos. *J Assist Reprod Genet* 2017;**34**:573–580.
- Hendriks WK, Colleoni S, Galli C, Paris DBBP, Colenbrander B, Stout TAE. Mitochondrial DNA replication is initiated at blastocyst formation in equine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2019;**31**:570–578.
- Herbers E, Kekäläinen NJ, Hangas A, Pohjoismäki JL, Goffart S. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. *Mitochondrion* [Internet] 2019;**44**:85–92. Elsevier B.V.
- Herst PM, Rowe MR, Carson GM, Berridge M V. Functional mitochondria in health and disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;296.
- Hirst J. Open questions: Respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC Biol* 2018;**16**:5–8. BMC Biology.
- Ho JR, Arrach N, Rhodes-Long K, Salem W, McGinnis LK, Chung K, Bendikson KA, Paulson RJ, Ahmady A. Blastulation timing is associated with differential mitochondrial content in euploid embryos. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:711–720. Journal of Assisted Reproduction and Genetics.
- Hofmann WE, Liu X, Bearden CM, Harper ME, Kozak LP. Effects of Genetic Background on Thermoregulation and Fatty Acid-induced Uncoupling of Mitochondria in UCP1-deficient Mice. *J Biol Chem* 2001;**276**:12460–12465.
- Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani Langroodi M, Sadeghi H, *et al.* Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; Which is the most important? *J Assist Reprod Genet* 2009;**26**:355–364.
- Houghton FD. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation* 2006;**74**:11–18.
- Huber W, Heydebreck A Von, Sültmann H, Poustka A, Vingron M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 2002;; p. 96–104.

- Igarashi H, Takahashi T, Abe H, Nakano H, Nakajima O, Nagase S. Poor embryo development in post-ovulatory in vivo-aged mouse oocytes is associated with mitochondrial dysfunction, but mitochondrial transfer from somatic cells is not sufficient for rejuvenation. *Hum Reprod* 2016;**31**:2331–2338.
- Injury RNT, Species RN, Species RO, Ligand R, Strength R, Rate RT, Development F, Time R, Activator R, Factor N, *et al.* Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease. *Encycl Exerc Med Heal Dis* 2012;
- Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* [Internet] 2017;**39**:73–82. Taylor & Francis.
- Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Short-term heat stress induces mitochondrial degradation and biogenesis and enhances mitochondrial quality in porcine oocytes. *J Therm Biol* [Internet] 2018;**74**:256–263. Elsevier Ltd.
- Javed M, Esfandiari N, Swain J, Michael E. Human Oocyte Cryopreservation - An Emerging ART Technique: Are We Heading in the Right Direction? *J Reprod Stem Cell Biotechnol* 2011;**2**:109–120.
- Jeng JY, Yeh TS, Lee JW, Lin SH, Fong TH, Hsieh RH. Maintenance of mitochondrial DNA copy number and expression are essential for preservation of mitochondrial function and cell growth. *J Cell Biochem* 2008;**103**:347–357.
- Jing Y, Li L, Li YY, Ouyang YC, Sun QY, Zhang CL, Li R. Embryo quality, and not chromosome nondiploidy, affects mitochondrial DNA content in mouse blastocysts. *J Cell Physiol* 2019;**234**:10481–10488.
- John JC St., Facucho-Oliveira J, Jiang Y, Kelly R, Salah R. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: A journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 2010;**16**:488–509.
- Johnson MA, Vidoni S, Durigon R, Pearce SF, Rorbach J, He J, Brea-Calvo G, Minczuk M, Reyes A, Holt IJ, *et al.* Amino acid starvation has opposite effects on mitochondrial and cytosolic protein synthesis. *PLoS One* 2014;**9**:.
- Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 2010;**47**:69–84.
- Jukam D, Shariati SAM, Skotheim JM. Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Dev Cell* 2017;**42**:316–332.

- Kaneko KJ. *Metabolism of Preimplantation Embryo Development: A Bystander or an Active Participant?* [Internet]. *Curr Top Dev Biol* [Internet] 2016;**120**:. Elsevier Inc.
- Kang MH, Das J, Gurunathan S, Park HW, Song H, Park C, Kim JH. The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: A mechanistic study. *Theranostics* 2017;**7**:4735–4752.
- Kang MH, You SY, Hong K, Kim JH. *DMSO impairs the transcriptional program for maternal-to-embryonic transition by altering histone acetylation* [Internet]. *Biomaterials* [Internet] 2020;**230**:. Elsevier Ltd.
- Kapuscinski J. DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotech Histochem* 1979;**70**:220–233.
- Karp G. La respiración aeróbica y la mitocondria. *Biol Cel y Mol* 2019;;, p. 177. EEUU.
- Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2004;**9**:164–170. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Kennaway NG, Carrero-Valenzuela RD, Ewart G, Balan VK, Lightowlers R, Zhang YZ, Powell BR, Capaldi RA, Buist NRM. Isoforms of mammalian cytochrome c oxidase: Correlation with human cytochrome c oxidase deficiency. *Pediatr Res* 1990;**28**:529–535.
- Kim J, Seli E. Mitochondria as a biomarker for IVF outcome. *Reproduction* 2019;**157**:R235–R242.
- Kirilova A, Smitz J, Sukhikh G, Mazunin I. The role of mitochondria in oocyte Maturation. *Cells* 2021;**10**:2484.
- Kleele T, Rey T, Winter J, Zaganelli S, Mahecic D, Perreten Lambert H, Ruberto FP, Nemir M, Wai T, Pedrazzini T, *et al.* Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature* [Internet] 2021;**593**:435–439. Springer US.
- Klimczak AM, Pacheco LE, Lewis KE, Massahi N, Richards JP, Kearns WG, Saad AF, Crochet JR. Embryonal mitochondrial dna: Relationship to embryo quality and transfer outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:871–877.
- Koch RE, Josefson CC, Hill GE. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence. *Biol Rev* 2017;**92**:1459–1474.
- Korla K, Mitra CK. Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. *J Biomol Struct Dyn* 2014;**32**:242–256.

- Krisher RL, Prather RS. A role for the Warburg effect in preimplantation embryo development: Metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol Reprod Dev* 2012;**79**:311–320.
- Kurland CG, Andersson SGE. Origin and Evolution of the Mitochondrial Proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;**64**:786–820.
- Labarta E, los Santos MJ de, Herraiz S, Escribá MJ, Marzal A, Buigues A, Pellicer A. Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization—a randomized pilot study. *Fertil Steril* 2019;**111**:86–96.
- Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, Schroder HD, Boushel R, Helge JW, Dela F, *et al.* Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol* 2012;**590**:3349–3360.
- Latham KE. Stress signaling in mammalian oocytes and embryos: A basis for intervention and improvement of outcomes. 2017;**363**:159–167.
- Lee H, Yoon Y. Mitochondrial fission and fusion. *Biochem Soc Trans* 2016;**44**:1725–1735.
- Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;**37**:822–834.
- Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* 2000;**348**:425–432.
- Lee SR, Han J. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev* 2017;**2017**..
- Leese HJ. Quiet please, do not disturb: A hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays* 2002;**24**:845–849.
- Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: Quietness revisited. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**:667–672.
- Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. Embryo viability and metabolism: Obeying the quiet rules. *Hum Reprod* 2007;**22**:3047–3050.
- Lewis SC, Uchiyama LF, Nunnari J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with Mitochondrial division in human cells. *Science (80-)* 2016;**353**..
- Li HL, Slone J, Fei L, Huang T. Mitochondrial DNA Variants and Common Diseases : *Cells*

- 2019;**8**:608.
- Li PA, Hou X, Hao S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *J Neurosci Res* 2017;**95**:2025–2029.
- Liebermann DA, Hoffman B. Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal* 2008;**3**:1–8.
- Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mech Ageing Dev* [Internet] 2020;**186**:111212. Elsevier.
- Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: Mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* [Internet] 2000;**2**:208–225. Neoplasia Press, Inc.
- Lledo B, Ortiz JA, Morales R, García-Hernández E, Ten J, Bernabeu A, Llácer J, Bernabeu R. Comprehensive mitochondrial DNA analysis and IVF outcome. *Hum Reprod Open* 2018;**2018**:1–9.
- Lobo-Jarne T, Ugalde C. Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Semin Cell Dev Biol* [Internet] 2018;**76**:179–190. Elsevier Ltd.
- Lunt SY, Heiden MG Vander. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;**27**:441–464.
- Maftah A, Petit JM, Ratinaud MH, Julien R. 10-N Nonyl-Acridine Orange: A fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**164**:185–190.
- Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, Chrousos GP. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 2007;**18**:190–198.
- Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, ikani M Al, Munné S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2000;**1**:17–26. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Maurer M, Ebner T, Puchner M, Mayer RB, Shebl O, Oppelt P, Duba HC. Chromosomal Aneuploidies and early embryonic developmental arrest. *Int J Fertil Steril* 2015;**9**:346–353.
- May-Panloup P, Boguenet M, Hachem H El, Bouet PE, Reynier P. Embryo and its mitochondria. *Antioxidants* 2021;**10**:1–20.
- May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y, Reynier P. Mitochondrial DNA in the Oocyte

- and the Developing Embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;**77**:51–83.
- May-Panloup P, Vignon X, Chrétien MF, Heyman Y, Tamassia M, Mathièry Y, Reynier P. Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;**3**:1–8.
- McConnell JML, Petrie L. Mitochondrial DNA turnover occurs during preimplantation development and can be modulated by environmental factors. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2004;**9**:418–424. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Mei H, Mei D, Yu H, Sun S, Chen Y, Zhang Y, Chai R, Li H. Increased mitochondrial DNA copy number protects hair cells and HEI-OC1 cells against drug-induced apoptosis. *Mol Med Rep* 2020;**21**:338–346.
- Mei H, Sun S, Bai Y, Chen Y, Chai R, Li H. Reduced mtDNA copy number increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Death Dis* 2015;**6**..
- Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology* [Internet] 2017;**391**:42–53. Elsevier Ireland Ltd.
- Molina AJA, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, Walzer G, Twig G, Katz S, Corkey BE, *et al.* Mitochondrial networking protects β -cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 2009;**58**:2303–2315.
- Monnot S, Samuels DC, Hesters L, Frydman N, Gigarel N, Burlet P, Kerbrat V, Lamazou F, Frydman R, Benachi A, *et al.* Mutation dependence of the mitochondrial DNA copy number in the first stages of human embryogenesis. *Hum Mol Genet* 2013;**22**:1867–1872.
- Muralidharan S, Mandrekar P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol* 2013;**94**:1167–1184.
- NASS MM, NASS S. Intramitochondrial Fibers With Dna Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* [Internet] 1963;**19**:593–611.
- Nohales-Córcoles M, Sevillano-Almerich G, Emidio G Di, Tatone C, Cobo AC, Dumollard R, Los Santos Molina MJ De. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Hum Reprod* 2016;**31**:1850–1858.
- O'Flynn N. Assessment and treatment for people with fertility problems: NICE

- guideline. *Br J Gen Pract* 2014;**64**:50–51.
- Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet] 2012;**26**:711–723. Elsevier Ltd.
- Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, Rasmò D De, Signorile A, Petruzzella V. *The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. Adv Exp Med Biol* 2012;**942**:
- Peña FJ, Ball BA, Squires EL. A New Method for Evaluating Stallion Sperm Viability and Mitochondrial Membrane Potential in Fixed Semen Samples. *Cytom Part B - Clin Cytom* 2018;**94**:302–311.
- Perez M, Robbins ME, Revhaug C, Saugstad OD. Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radic Biol Med* [Internet] 2019;**142**:61–72. Elsevier B.V.
- Pernas L, Scorrano L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol* 2016;**78**:505–531.
- Picard M, McEwen BS. Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review. *Psychosom Med* 2018;**80**:141–153.
- Picard M, McEwen BS, Epel ES, Sandi C. An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Front Neuroendocrinol* [Internet] 2018;**49**:72–85.
- Pikó L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* 1987;**123**:364–374.
- Ploumi C, Daskalaki I, Tavernarakis N. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *FEBS J* 2017;**284**:183–195.
- Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *J Cell Mol Med* 2020;**24**:4892–4899.
- Qin N, Zhou Z, Zhao W, Zou K, Shi W, Yu C, Liu X, Dong Z, Mao Y, Liu X, *et al.* Abnormal Glucose Metabolism in Male Mice Offspring Conceived by in vitro Fertilization and Frozen-Thawed Embryo Transfer. *Front Cell Dev Biol* 2021;**9**:1–13.
- Raimundo N, Baysal BE, Shadel GS. Revisiting the TCA cycle: Signaling to tumor formation. *Trends Mol Med* [Internet] 2011;**17**:641–649. Elsevier Ltd.
- Raju R, Bryant SJ, Wilkinson BL, Bryant G. The need for novel cryoprotectants and

- cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet] 2021;**1865**:129749. Elsevier.
- Ramanujam MS and N. Multiphoton Redox Ratio Imaging for Metabolic Monitoring in vivo. *Methods Mol Biol* 2014;**1**–477.
- Ramos-Ibeas P, Heras S, Gómez-Redondo I, Planells B, Fernández-González R, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Pérez-Cerezales S, Gutiérrez-Adán A. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev* 2019;**86**:1292–1306.
- Ravichandran K, McCaffrey C, Grifo J, Morales A, Perloe M, Munne S, Wells D, Fragouli E. Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: Retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers. *Hum Reprod* 2017;**32**:1282–1292.
- Rehman AU, Anwer AG, Gosnell ME, Mahbub SB, Liu G, Goldys EM. Fluorescence quenching of free and bound NADH in HeLa cells determined by hyperspectral imaging and unmixing of cell autofluorescence. *Biomed Opt Express* 2017;**8**:1488.
- Ren L, Zhang C, Tao L, Hao J, Tan K, Miao K, Yu Y, Sui L, Wu Z, Tian J, *et al.* High-resolution profiles of gene expression and DNA methylation highlight mitochondrial modifications during early embryonic development. *J Reprod Dev* 2017;**63**:247–261.
- Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barrière P, Malthièry Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:425–429.
- Reznik E, Miller ML, Şenbabaoglu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, Al-Ahmadie HA, Lee W, Seshan VE, Hakimi AA, *et al.* Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* 2016;**5**:1–20.
- Ricchetti M. Replication stress in mitochondria. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* [Internet] 2018;**808**:93–102. Elsevier B.V.
- Robinson JB, Srere PA. Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria. *J Biol Chem* [Internet] 1985;**260**:10800–10805. © 1985 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

- Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol* 2017;**27**:R1177–R1192.
- Romero-Garcia S, Prado-Garcia H. Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *Int J Oncol* 2019;**54**:1155–1167.
- Rosenwaks Z. Introduction: Biomarkers of embryo viability: the search for the “holy grail” of embryo selection. *Fertil Steril* 2017;**108**:719–721.
- Royston JP. An Extension of Shapiro and Wilk’s W Test for Normality to Large Samples. *Appl Stat* 1982;**31**:115.
- Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendía P, Pehlivan T, Vilorio T, Los Santos MJ De, Simón C, Remohí J, *et al*. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. *Prenat Diagn* 2007;
- Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 2007;**76**:701–722.
- Sage JM, Knight KL. Human Rad51 promotes mitochondrial DNA synthesis under conditions of increased replication stress. *Mitochondrion* [Internet] 2013;**13**:350–356. Elsevier B.V.
- Salzano A, Alberio G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, Zicarelli L, Gasparri B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. *Anim Reprod Sci* [Internet] 2014;**151**:91–96. Elsevier B.V.
- Sanchez T, Wang T, Pedro MV, Zhang M, Esencan E, Sakkas D, Needleman D, Seli E. Metabolic imaging with the use of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) accurately detects mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. *Fertil Steril* [Internet] 2018;**110**:1387–1397. Elsevier Inc.
- Santos TA, Shourbagy S El, John JC St. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril* 2006;**85**:584–591.
- Sathananthan AH, Trounson AO. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Hum Reprod* 2000;**15**:148–159.
- Scott RT, Sun L, Zhan Y, Marin D, Tao X, Seli E. Mitochondrial DNA content is not predictive of reproductive competence in euploid blastocysts. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2020;**41**:183–190. Elsevier Ltd.

- Seli E. Mitochondrial DNA as a biomarker for in-vitro fertilization outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2016;**28**:158–163.
- Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, Recher G, Hupalowska A, Bolton V, Fogarty NME, Campbell A, Devito LG, Ilic D, *et al.* Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol* 2016;**18**:700–708.
- Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 1965;**52**:591–611.
- Shpilka T, Haynes CM. The mitochondrial UPR: Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet] 2018;**19**:109–120. Nature Publishing Group.
- Simmons SO, Fan CY, Ramabhadran R. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol Sci* 2009;**111**:202–225.
- Siristatidis C, Stavros S, Drakeley A, Bettocchi S, Pouliakis A, Drakakis P, Papapanou M, Vlahos N. Omics and Artificial Intelligence to Improve In Vitro Fertilization (IVF) Success : A Proposed Protocol. 2021;1–10.
- Spikings EC, Alderson J, John JC St. Regulated Mitochondrial DNA Replication During Oocyte Maturation Is Essential for Successful Porcine Embryonic Development. *Biol Reprod* 2007;**76**:327–335.
- St John JC. Mitochondria and Female Germline Stem Cells-A Mitochondrial DNA Perspective. *Cells* 2019;**8**..
- Stack HM, Hill C, Gahan CGM. UPR, autophagy and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Handb List Monocytogenes* 2008;**40**:61–96.
- Starosti MR, Sosin OA, McCo RC. Single-cell analysis of human embryos reveals diverse patterns of aneuploidy and mosaicism. *Genome Res* 2020;**30**:814–826.
- Steuerwald N, Barritt JA, Adler R, Malter H, Schimmel T, Cohen J, Brenner CA. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. *Zygote* 2000;**8**:209–215.
- Stingle S, Stoehr G, Peplowska K, Cox J, Mann M, Storchova Z. Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells. *Mol Syst Biol* 2012;**8**..
- Sturmey RG, Brison DR, Leese HJ. Assessing embryo viability by measurement of amino

- acid turnover. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2008;**17**:486–496. Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK.
- Sugimura S, Matoba S, Hashiyada Y, Aikawa Y, Ohtake M, Matsuda H, Kobayashi S, Konishi K, Imai K. Oxidative phosphorylation-linked respiration in individual bovine oocytes. *J Reprod Dev* 2012;**58**:636–641.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 2000;**63**:582–590.
- Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci* 2012;**125**:807–815.
- Takeuchi T, Neri Q V., Katagiri Y, Rosenwaks Z, Palermo GD. Effect of Treating Induced Mitochondrial Damage on Embryonic Development and Epigenesis. *Biol Reprod* 2005;**72**:584–592.
- Tan Y, Yin X, Zhang S, Jiang H, Tan K, Li J, Xiong B, Gong F, Zhang C, Pan X, *et al.* Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis and screening using next generation sequencing. *Gigascience* 2014;**3**:30.
- Tarasov AI, Griffiths EJ, Rutter GA. Regulation of ATP production by mitochondrial Ca²⁺. *Cell Calcium* [Internet] 2012;**52**:28–35. Elsevier Ltd.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:389–402.
- Thermo Fisher Scientific. Probes for Organelles. *Mol ProbesTM Handb - A Guid to Fluoresc Probes Labeling Technol* [Internet] 2010;494–543 Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/Molecular Probes Handbook/chapter-pdfs/Ch-12-Probes-for-Organelles.pdf?icid=WE216841>.
- Thompson JG, Brown HM, Sutton-McDowall ML. Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reprod Fertil Dev* 2016;**28**:41–50.
- Thundathil J, Filion F, Smith LC. Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 2005;**71**:405–413.
- Treff NR, Zhan Y, Tao X, Olcha M, Han M, Rajchel J, Morrison L, Morin SJ, Scott RT. Levels of trophoctoderm mitochondrial DNA do not predict the reproductive potential of sibling embryos. *Hum Reprod* 2017;**32**:954–962.
- Truong TT, Gardner DK. Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-

- vitrification. *Hum Reprod* 2020;**35**:12–23.
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2008;**1777**:1092–1097.
- Valera-Alberni M, Canto C. Mitochondrial stress management: A dynamic journey. *Cell Stress* 2018;**2**:253–274.
- Victor AR, Brake AJ, Tyndall JC, Griffin DK, Zouves CG, Barnes FL, Viotti M. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertil Steril* 2017;**107**:34–42.
- Viotti M, Victor AR, Zouves CG, Barnes FL. Is mitochondrial DNA quantitation in blastocyst trophoctoderm cells predictive of developmental competence and outcome in clinical IVF ? *J Assist Reprod Genet* 2017;**34**:1581–1585. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
- Vishnyakova PA, Volodina MA, Tarasova N V., Marey M V., Tsvirkun D V., Vavina O V., Khodzhaeva ZS, Kan NE, Menon R, Vysokikh MY, *et al.* Mitochondrial role in adaptive response to stress conditions in preeclampsia. *Sci Rep* [Internet] 2016;**6**:1–9. Nature Publishing Group.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science (80-)* 1999;**283**:1482–1488.
- Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;**5**:.
- Wang B, Zhang J, Zhu Q, Yang X, Wang Y. Effects of different cycle regimens for frozen embryo transfer on perinatal outcomes of singletons. *Hum Reprod* 2020;**35**:1612–1622.
- Wang H, Hiatt WR, Barstow TJ, Brass EP. Relationships between muscle mitochondrial DNA content, mitochondrial enzyme activity and oxidative capacity in man: Alterations with disease. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999;**80**:22–27.
- Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009;**10**:483–492.
- Wang T, Babayev E, Jiang Z, Li G, Zhang M, Esencan E, Horvath T, Seli E. Mitochondrial unfolded protein response gene Clpp is required to maintain ovarian follicular reserve during aging, for oocyte competence, and development of pre-

- implantation embryos. *Aging Cell* 2018a;**17**:1–13.
- Wang T, Zhang M, Jiang Z, Seli E. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging. *Am J Reprod Immunol* 2017;**77**:
- Wang Y, Zhang M, Chen ZJ, Du Y. Resveratrol promotes the embryonic development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 2018b;**54**:430–438. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*.
- Wells D, Ph D. Mitochondrial DNA quantity as a biomarker for blastocyst implantation potential. *Fertil Steril* 2017;**108**:742–747. Elsevier Inc.
- Werner M. Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. 2008;, p. 509. España.
- Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet] 2012;**1817**:1833–1838. Elsevier B.V.
- Wiesner RJ, Rüegg JC, Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;**183**:553–559.
- Wijst MGP Van Der, Tilburg AY Van, Ruiters MHJ, Rots MG. Experimental mitochondria-targeted DNA methylation identifies GpC methylation, not CpG methylation, as potential regulator of mitochondrial gene expression. *Sci Rep* [Internet] 2017;**7**:1–15. Springer US.
- Wilding M, Coppola G, Dale B, Matteo L Di. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction* 2009;**137**:619–624.
- Woods DC, Khrapko K, Tilly JL. Influence of maternal aging on mitochondrial heterogeneity, inheritance, and function in oocytes and preimplantation embryos. *Genes (Basel)* 2018;**9**:
- Wu S, Huang Y, Tang Q, Li Z, Horng H, Li J, Wu Z, Chen Y, Li H. Quantitative evaluation of redox ratio and collagen characteristics during breast cancer chemotherapy using two-photon intrinsic imaging. *Biomed Opt Express* 2018;**9**:1375.
- Xia CY, Liu Y, Yang HR, Yang HY, Liu JX, Ma YN, Qi Y. Reference intervals of mitochondrial DNA copy number in peripheral blood for Chinese minors and adults. *Chin Med J (Engl)* 2017;**130**:2435–2440.
- Xiao B, Deng X, Zhou W, Tan EK. Flow cytometry-based assessment of mitophagy using mitotracker. *Front Cell Neurosci* 2016;**10**:1–4.

- Xu J, Zhang D, Ju S, Sun L, Zhang S, Wu C, Rui R, Dai J. Mitophagy is involved in the mitochondrial dysfunction of vitrified porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2021;**88**:427–436.
- Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. 2019;**1**:1–15.
- Yoo S, Jung Y. Molecules and Cells Minireview A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. 2018;**41**:18–26.
- Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B. Science of cryopreservation in reproductive medicine – Embryos and oocytes as exemplars. *Early Hum Dev* [Internet] 2018;**126**:6–9. Elsevier.
- Zhang H, Burr SP, Chinnery PF. The mitochondrial DNA genetic bottleneck: Inheritance and beyond. *Essays Biochem* 2018;**62**:225–234.
- Zhang H, Zhao Y, Yao Q, Ye Z, Mañas A, Xiang J. Ubl4A is critical for mitochondrial fusion process under nutrient deprivation stress. *PLoS One* 2020;**15**:1–21.
- Zhang J, Liu H, Luo S, Lu Z, Chávez-Badiola A, Liu Z, Yang M, Merhi Z, Silber SJ, Munné S, *et al*. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reprod Biomed Online* [Internet] 2017a;**34**:361–368. Elsevier Ltd.
- Zhang M, Bener MB, Jiang Z, Wang T, Esencan E, Scott III R, Horvath T, Seli E. Mitofusin 1 is required for female fertility and to maintain ovarian follicular reserve. *Cell Death Dis* [Internet] 2019a;**10**:560. Springer US.
- Zhang M, Bener MB, Jiang Z, Wang T, Esencan E, Scott R, Horvath T, Seli E. Mitofusin 2 plays a role in oocyte and follicle development, and is required to maintain ovarian follicular reserve during reproductive aging. *Aging (Albany NY)* 2019b;**11**:3919–3938.
- Zhang P, Lehmann BD, Samuels DC, Zhao S, Zhao YY, Shyr Y, Guo Y. Estimating relative mitochondrial DNA copy number using high throughput sequencing data. *Genomics* [Internet] 2017b;**109**:457–462. Elsevier Inc.
- Zhang SP, Lu CF, Gong F, Xie PY, Hu L, Zhang SJ, Lu GX, Lin G. Polar body transfer restores the developmental potential of oocytes to blastocyst stage in a case of repeated embryo fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 2017c;**34**:563–571. Journal of Assisted Reproduction and Genetics.
- Zhang X, Sun Y, Dong X, Zhou J, Sun F, Han T, Lei P, Mao R, Guo X, Wang Q, *et al*.

Mitochondrial DNA and genomic DNA ratio in embryo culture medium is not a reliable predictor for in vitro fertilization outcome. *Sci Rep* [Internet] 2019c;**9**:1–12. Springer US.

Zhang Y, Xu H. Translational regulation of mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans* 2016;**44**:1717–1724.

Zhao HC, Ding T, Ren Y, Li TJ, Li R, Fan Y, Yan J, Zhao Y, Li M, Yu Y, *et al.* Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human in vitro matured oocytes. *Hum Reprod* 2016;**31**:607–622.

Zhao XM, Du WH, Wang D, Hao HS, Liu Y, Qin T, Zhu H Bin. Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Mol Reprod Dev* 2011;**78**:942–950.

Zimorski V, Ku C, Martin WF, Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr Opin Microbiol* [Internet] 2014;**22**:38–48. Elsevier Ltd.

