



## **AGL 2002-01175. Los retinoides en el desarrollo y la diferenciación del embrión bovino producido "in vitro"**

<b>Investigador responsable</b>	<b>Organismo</b>
Enrique Gómez Piñeiro	SERIDA
<b>Equipo investigador</b>	
Carmen Díez Monforte	SERIDA
Carlos Olegario Hidalgo Ordóñez	"
Isabel Álvarez Fernández	"
Luis José Royo Martín	"
Aida Rodríguez García	M. de Ciencia y Tecnología (Becaria)
Ana Salas Bustamante	Universidad Oviedo
Mario Hermsen	"

### **Investigador en colaboración**

Alfonso Gutiérrez Adán      INIA

### **Objetivos**

- Controlar la diferenciación del blastocisto utilizando ácido retinoico (AR), para obtener embriones con mayor número de células en su masa celular interna a costa de disminuir sus homólogas en el trofotodermo, buscando mayores índices de gestación y reducción del sobrepeso al nacimiento.
- Contribuir al estudio de las células madre bovinas, como vehículo de elección para aplicaciones en biotecnología reproductiva (transferencia de núcleos, modificación genética, recuperación de especies, etc.).

### **Resultados**

#### **Identificación de los mecanismos de acción del AR en células de la granulosa**

Se estudió la expresión de genes que se activan en respuesta a la estimulación por el

AR en células de la granulosa: FSHr, LHr, c-Fos, CRABP II, PPAR $\alpha$  y aromatasa. Se detectó la presencia de todos los genes estudiados salvo CRABP II, cuyo estudio deberá reanudarse bajo un enfoque distinto. La presencia de alguno de estos genes podrá determinar el empleo de estimuladores específicos para intentar mejorar características de interés en el ovocito, como son la congelabilidad y la capacidad de desarrollo *in vitro*.

#### **Determinación de anomalías cromosómicas (aneuploidías)**

Se diseñó y puso a punto una sonda de ADN basada en una secuencia repetitiva centromérica del cromosoma Y bovino, para su uso mediante Fluorescencia e Hibridación in Situ (FISH), y se utilizó también una estructura (BAC) que permite identificar el cromosoma X bovino (cesión del Dr. P.Humblot; UNCEIA, Francia). Las posibles alteraciones en la dotación cromosómica de los embriones pueden conocerse usando estos marcadores, los cuales permiten además establecer con precisión los índices de sexo característicos de cada sistema de cultivo de embriones. La técnica pudo ser adaptada para cultivos de espermatozoides. Las variaciones en las proporciones de elementos de cada sexo son frecuentes con las técnicas *in vitro*, y su identificación y control son esenciales.

#### **Identificación de mecanismos moleculares de actuación del AR en el ovocito**

Se encontró que el AR aumenta la cantidad de ARNm poliadenilado en el ovocito bovino, lo cual se asocia a un incremento de la estabilidad del ARN mensajero, este hecho se produce en grupos de ovocitos que presentan una





mayor capacidad de desarrollo. En paralelo, al contrario que en otras células, se demostró que la presencia del AR no parece provocar daños oxidativos en el ovocito. El retinoide tampoco altera la expresión de genes cuyo producto participa activamente en la regulación del ciclo celular (Ciclinas B1 y H1). El conocimiento preciso de estos mecanismos permitirá controlar qué momentos del cultivo son los óptimos para utilizar el AR.

En el complejo cumulus-ovocito existen depósitos intracelulares de retinol (ROH) que

participan activamente en la maduración *in vitro* y afectan al desarrollo del embrión hasta el estado de blastocisto.

Mediante el empleo de citral, un inhibidor de la síntesis del AR a partir de ROH, se pudo demostrar que la diferenciación del blastocisto se ve afectada por la acción de los retinoides endógenos y exógenos, y su control es importante para mejorar la calidad de los embriones y, probablemente, la estabilidad de las células madre bovinas, hito de la biotecnología reproductiva aún no conseguido.

## **AGL2001-0379. Estudio de la repercusión de los sistemas de producción de embriones bovinos "in vitro" sobre sus características criobiológicas: desarrollo de dos métodos de criopreservación para ovocitos y embriones**

### **Investigador responsable**

Carmen Díez Monforte

### **Organismo**

SERIDA

### **Equipo investigador**

Enrique Gómez Piñeiro

Carlos Olegario Hidalgo Ordóñez

Lupicinio Prieto Tejerina

Lina Fernández Celadilla

Maite Carbajo Rueda

José Manuel Meana Busto

SERIDA

"

"

Universidad León

"

ASTURGEN

el fin de ofertar al sector ganadero la posibilidad de almacenar de forma indefinida los gametos de hembras de alto valor genético o de interés zootécnico.

- Optimizar un sistema de criopreservación adaptado a embriones producidos *in vitro* y que supere su especial sensibilidad a los efectos del frío.

### **Objetivos**

- Desarrollar un sistema de criopreservación de ovocitos que proporcione máximas tasas de embriones viables tras descongelación, fecundación (FIV) y cultivo *in vitro* (CIV), con

### **Resultados**

#### **Efecto del estadio del ovocito sobre su sensibilidad a la criopreservación**

Los trabajos realizados analizaron la influencia del grado de maduración del ovocito bovino