

Los retinoides en el desarrollo y la diferenciación del embrión bovino producido “*in vitro*”

Referencia: AGL2002-01175. Organismo financiador: Ministerio de Educación y Ciencia. Importe: 83.800 €. Duración: 2003–2005.

Equipo investigador

Enrique Gómez Piñeiro	SERIDA
Carmen Díez Monforte	SERIDA
Carlos Olegario Hidalgo Ordóñez	SERIDA
Isabel Álvarez Fernández	SERIDA
Luis José Royo Martín	SERIDA
Aida Rodríguez García	Becaria MEC
Ana Salas Bustamante	Universidad de Oviedo
Mario Hermsen	Universidad de Oviedo

Organismo

Investigadores en colaboración

Shuntaro Ikeda	Universidad de Kyoto (Japón)
Gustavo Carneiro	Universidad de California (Davis)
Pedro L. Lorenzo	Universidad Complutense (Madrid)
Mohammad Reza Darabi	Universidad de Isfahan (Irán)

Entidad colaboradora

Laboratorios Calier

Resultados y conclusiones

El ácido 9-cis-retinoico (9-cis-RA) es beneficioso para el cultivo de embriones *in vitro* si se administra durante el período de maduración en condiciones químicamente definidas (ausencia de sueros y albúmina del suero bovino [BSA]). Se obtuvieron las primeras evidencias del control de la diferenciación del blastocisto utilizando retinoides. 9-cis-RA aumenta la calidad del embrión y del ARNm del ovocito y se activan genes que estimulan el desarrollo embrionario (midkine) sin signos de daño oxidativo o alteraciones del ciclo celular.

El ovocito contiene retinoides endógenos, que son necesarios para que el embrión se desarrolle hasta blastocisto.

Cuando se administra retinol (vitamina A) a vacas, al cabo de 4 días la concentración de esta molécula en el líquido folicular (ova-

rio) permanece elevada, mientras que en sangre los niveles fueron normales. Esto es así a pesar de que se encontró más retinol hemático al cabo de 24 horas de su administración intramuscular. El que el folículo sea capaz de mantener niveles altos de retinol justifica su administración 4 días antes del efecto esperado y permite establecer pautas lógicas de tratamiento.

Las inyecciones repetidas de retinol a novillas donantes permiten recobrar más ovocitos mediante Ovum-Pick-Up (OPU), por lo que parece que esta molécula, de origen no animal, puede ser capaz de reemplazar en todo o en parte a la hormona folículo estimulante [FSH] en la producción de ovocitos *in vitro*. Sin embargo, el tratamiento con retinol dio lugar a mayor proporción de ovocitos de peor calidad, los cuales, una vez madurados, fertilizados y cultivados *in vitro*, fueron capaces de alcanzar

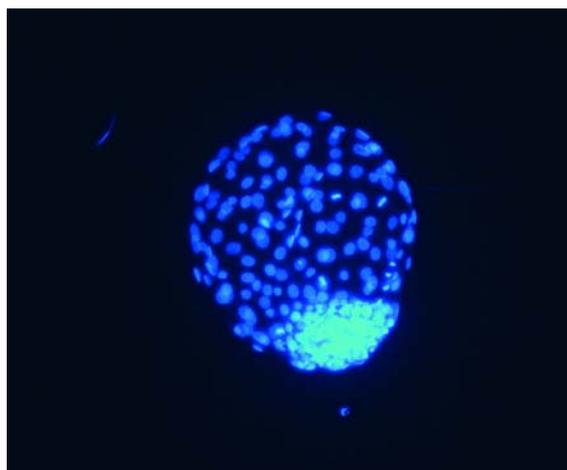


la fase de blastocisto. Una vez transferidos a receptoras, los blastocistos procedentes de vacas tratadas con retinol no dieron lugar a gestaciones, al contrario que los madurados *in vitro* en presencia de 9-cis-RA (derivado activo del retinol). Se demuestra así que el aumento del número de blastocistos consecutivo a la administración de retinol, que otros autores señalaron como beneficiosa en la vaca, cerda, oveja y coneja, tiene lugar en perjuicio de la viabilidad de dichos embriones. El efecto teratogénico del retinol se ha podido demostrar por primera vez en mamíferos, circunscrito al crecimiento intrafolicular del ovocito con independencia de otros efectos sobre el embrión.

Los retinoides endógenos controlan funciones importantes durante la formación del blastocisto (desarrollo, distribución celular y apoptosis). El cultivo de mórulas producidas *in vitro* con ácido All-trans-retinoico (ATRA) durante 24h permite obtener blastocistos eclosionados con un 40% más de células, aumentando tanto la masa celular interna (MCI) como el trofotodermo (TE), sin alterar las proporciones entre ambos tejidos. Al mismo tiempo, se reduce la necrosis y no aumenta la apoptosis. El resultado es prometedor y, tras las oportunas pruebas de viabilidad, puede permitir superar la limitación clásica en el número de células de los embriones *in vitro* frente a sus homólogos *in vivo*.

Se pueden obtener embriones de mayor calidad con más células en la MCI si se estimulan los receptores nucleares del ácido retinoico mediante la aplicación de agonistas selectivos receptor de ácido retinoico [RAR] y receptor X de retinoides [RXR], lo que puede también mejorar el rendimiento en células troncales embrionarias.

Se han puesto a punto técnicas de detección de genes que pueden alterarse por acción del retinol durante el crecimiento de los folículos antrales, período en el cual el ovocito alcanza plena capacidad para desarrollarse. Los siguientes genes responden a ácido retinoico: receptor de FSH, receptor de hormona luteinizante [LH], Peroxisome-promoted activated receptor α (PPAR α), el protooncogen c-Fos,



la hormona del crecimiento (GH) e IGF-1 en células de la granulosa de folículos antrales de varios diámetros.

Resultados no previstos en el proyecto

- Puesta a punto de técnicas de detección de apoptosis en blastocistos y su aplicación en el estudio de retinoides endógenos y exógenos durante la transición de mórula a blastocisto eclosionado.
- Establecimiento de técnicas de aislamiento de MCI de blastocistos bovinos y porcinos (aislamiento mecánico, enzimático e inmunocirugía).
- Aislamiento, cultivo, inactivación mitótica y criopreservación de fibroblastos fetales bovinos, porcinos y murinos, células utilizadas como monocapa para el cocultivo de las MCI.
- Cultivo de células madre de ratón (utilizadas como control positivo en las pruebas de caracterización de las líneas celulares obtenidas).
- Caracterización de la línea celular procedente de las MCI por medio de marcadores específicos y de fosfatasa alcalina.

