



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



sobre su resistencia a la vitrificación por medio de un protocolo "Open Pulled Straw" (OPS). El diseño experimental queda reflejado en la tabla 1. Como complemento a estos experimentos, se realizó también un estudio ultraestructural de los grupos experimentales de este trabajo.

Tras los tratamientos (Tabla 1), todos los ovocitos fueron fecundados y cultivados *in vitro* durante ocho días. Los resultados derivados de

este experimento se describen en la tabla 2 y en la figura 1.

Las tasas de división en día tres fueron similares en todos los grupos experimentales y significativamente más bajas que en los controles realizados con ovocitos frescos. Sólo los ovocitos vitrificados tras maduración *in vitro* (MIV) dieron lugar a la formación de blastocistos tras FIV y CIV.

**Tabla 1.—Diseño experimental: Efecto del estadio de maduración del ovocito bovino antes de su vitrificación y después de la descongelación, sobre el desarrollo embrionario tras la fecundación y el cultivo *in vitro***

Tratamiento		GRUPO
Antes de OPS <sup>a</sup>	Tras descongelación <sup>b</sup>	
I	MIV	I-MIV
I	PRE+MIV	I-PREMIV
MIV		MIV
PRE	MIV	PRE
PRE+MIV		PREMIV
MIV <sup>c</sup>		Ctrl-MIV
PRE+MIV <sup>c</sup>		Ctrl-PREMIV

<sup>a</sup>Estado del ovocito antes de la OPS (I: inmaduro; PRE: premaduración -inhibición meiótica-; MIV: maduración *in vitro*);

<sup>b</sup>Tratamiento del ovocito después de desvitrificación. <sup>c</sup>Grupos control (Ctrl) realizados con ovocitos no vitrificados.

**Tabla 2.—Desarrollo embrionario (% de división en día 3 y % de blastocistos en días 7 y 8) tras fecundación y cultivo de ovocitos vitrificados/desvitrificados en diferentes estadios de maduración**

GRUPO	N	R	% División Día 3	% Blastocistos	
				Día 7	Día 8
I-MIV	139	6	25,4±5,2 <sup>x</sup>	0,0 <sup>x</sup>	0,0 <sup>x</sup>
I-PREMIV	107	6	11,5±5,2 <sup>x</sup>	0,0 <sup>x</sup>	0,0 <sup>x</sup>
MIV	142	6	37,0±5,2 <sup>x</sup>	1,5±3,2 <sup>x</sup>	1,5±2,8 <sup>x</sup>
PRE	126	6	28,2±5,9 <sup>x</sup>	0,6±3,5 <sup>x</sup>	0,8±3,1 <sup>x</sup>
PREMIV	132	6	25,8±5,2 <sup>x</sup>	0,0 <sup>x</sup>	0,0 <sup>x</sup>
Ctrl-MIV	238	7	88,7±5,2 <sup>y</sup>	36,4±3,2 <sup>y</sup>	37,7±2,8 <sup>y</sup>
Ctrl-PREMIV	156	7	84,4±5,2 <sup>y</sup>	27,5±3,2 <sup>y</sup>	32,3±2,8 <sup>y</sup>

N: zigotos cultivados;

R: repeticiones; superíndices distintos en la misma columna difieren significativamente: <sup>xy</sup> (p<0,01).



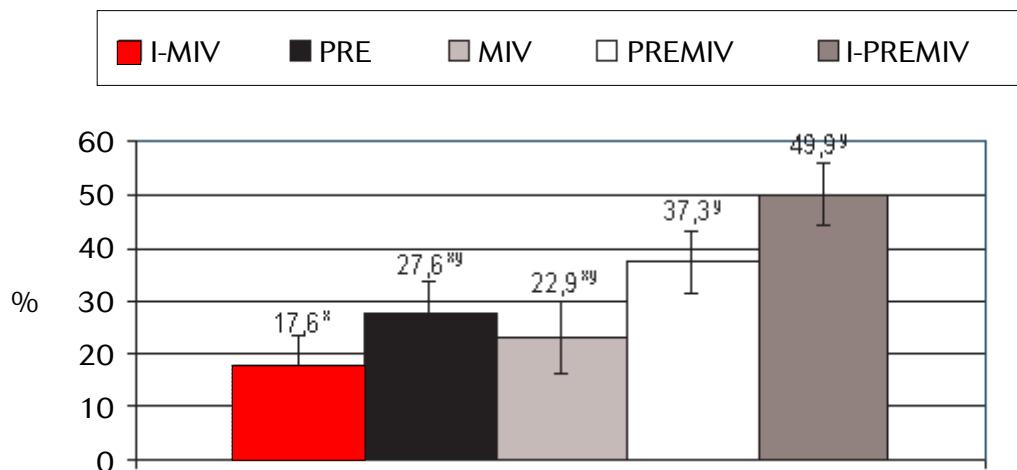


Figura 1.—Tasas de degeneración (%) de ovocitos vitrificados/desvitrificados tras FIV. Referencias como en tabla 1. Superíndices distintos denotan diferencias significativas al 1%

El porcentaje de ovocitos degenerados tras desvitrificación y FIV se presenta en la figura 1. Los ovocitos vitrificados con posterioridad a la MIV (Grupo MIV) o inmaduros antes de la vitrificación y sometidos a MIV tras la descongelación (Grupo I-MIV) fueron los que menores tasas de degeneración presentaron tras la FIV. La inhibición meiótica seguida de una MIV antes y después de la vitrificación, se tradujo en porcentajes de degeneración más altos que en el resto de los grupos (Grupos I-PREMIV y PREMIV).

Los resultados resumidos del análisis ultraestructural fueron los siguientes:

1) Los complejos *cumulus* ovocito (CCOs) vitrificados inmaduros fueron los que menos alteraciones presentaron desde el punto de vista ultraestructural. Los citoplasmas del ovocito y de las células del *cumulus* presentaron una morfología normal, *a priori* compatible con un desarrollo ulterior. Los orgánulos citoplásmicos presentaron normalidad morfológica. Tras la MIV y la fijación de estos CCOs, se pudo observar una correcta migración de los gránulos corticales, así como la expansión de las células del *cumulus*, lo que es imprescindible para que la FIV tenga lugar en adecuadas condiciones.

Estos resultados contrastaron, no obstante, con los obtenidos tras la FIV y el CIV, ya que, no

se obtuvieron embriones viables a partir de los CCOs vitrificados inmaduros.

2) Los CCOs vitrificados tras la MIV presentaron fenómenos de degeneración en las células del *cumulus* y en el citoplasma del ovocito en, aproximadamente, el 50% de los casos estudiados. En el resto, el estudio ultraestructural reflejó una correcta migración de los gránulos corticales y expansión de las células del *cumulus*, compatibles ambos con un desarrollo posterior. Estos resultados confirmaron los obtenidos tras la FIV y CIV de estos CCOs, único grupo que permitió obtener embriones viables (ver Tabla 1).

3) Los tratamientos de premaduración (PRE) y MIV, previos o posteriores a la vitrificación, produjeron importantes lesiones en ovocitos y en las células del *cumulus*, incompatibles ambas con el posterior desarrollo embrionario.

### **Efecto del medio de maduración sobre la sensibilidad del ovocito a la criopreservación**

Se estudió el posible efecto de tres medios de MIV sobre la resistencia a la criopreservación del ovocito bovino maduro (Metafase II –MII–). Para ello, y a partir de un medio base



**Tabla 3.—Porcentaje de degeneración y de desarrollo embrionario (% de división en día 3 y % de blastocistos en día 7) tras FIV (día 0) y CIV de ovocitos vitrificados/desvitrificados después de su MIV en presencia de FCS (MIV-FCS), PVA (MIV-PVA) o ácido 9-*cis* retinoico (MIV-9 *cis*)**

GRUPO	N	R	Degeneración Día 1 (%)	Desarrollo Embrionario	
				% División Día 3	% Blastocistos Día 7
MIV-FCS	167	6	17,7±13,2 <sup>y</sup>	51,1±6,4 <sup>y</sup>	1,3±3,6 <sup>z</sup>
MIV-PVA	176	6	12,0±7,7 <sup>y</sup>	47,3±6,4 <sup>y</sup>	0,0 <sup>z</sup>
MIV-9 <i>cis</i>	185	6	15,5±8,8 <sup>y</sup>	44,6±6,4 <sup>y</sup>	0,0 <sup>z</sup>
Ctrl MIV-FCS <sup>a</sup>	247	5	0,0 <sup>x</sup>	79,3±5,8 <sup>x</sup>	46,6±4,1 <sup>x</sup>
Ctrl MIV-PVA <sup>a</sup>	217	5	0,0 <sup>x</sup>	82,3±5,8 <sup>x</sup>	23,7±4,1 <sup>y</sup>
Ctrl MIV-9 <i>cis</i> <sup>a</sup>	205	5	0,0 <sup>x</sup>	86,7±5,8 <sup>x</sup>	20,8±4,1 <sup>y</sup>

<sup>a</sup> Grupos controles (Ctrl) de ovocitos no vitrificados; N: zigotos cultivados; R: repeticiones; superíndices distintos en la misma columna difieren significativamente: <sup>xy</sup> (p<0,01). FCS: Suero fetal bovino, PVA: Polivinil Alcohol, 9-*cis*: Acido 9-*cis* retinoico. Referencias como en tabla 1.

común [Tissue Culture Medium 199 –TCM199-HNaCO<sub>3</sub>- + hormona folículo estimulante (FSH) + hormona luteinizante (LH) + 17β Estradiol], se establecieron tres grupos experimentales en función de la adición de:

- 10% de suero fetal bovino (FCS) (medio con composición indefinida)
- Polivinil Alcohol (PVA) (medio con composición definida)
- ácido 9-*cis* retinoico (medio con composición definida).

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.

La composición del medio de MIV no tuvo efecto sobre la resistencia del ovocito a la vitrificación. En los tres grupos experimentales se obtuvieron tasas similares de degeneración tras la desvitrificación de los ovocitos. Sólo en el grupo de MIV con 10% de FCS se obtuvieron embriones viables tras FIV y CIV. Se observaron diferencias en las tasas de blastocistos obtenidos en día 7 en los grupos control (CCOs no vitrificados). La MIV en presencia de FCS produjo tasas de blastocistos significativamente superiores a los obtenidos en los grupos de MIV en medios definidos (PVA y ácido 9-*cis* retinoico).

### **Comparación de dos sistemas de MIV**

Utilizando el medio MIV-FCS, se compararon dos sistemas diferentes de maduración:

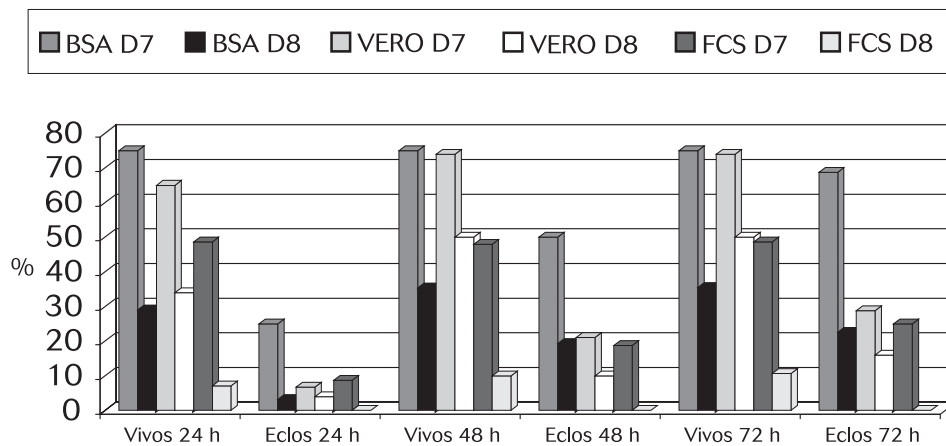
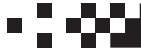
- ❖ en monocapa de células VERO.
- ❖ sin células.

La utilización de monocapas de células VERO durante la MIV no tuvo efecto sobre la supervivencia de los ovocitos a la vitrificación. La producción de embriones en los dos grupos control (ovocitos no vitrificados) fue similar.

### **Efecto del sistema de cultivo del embrión sobre su resistencia a la criopreservación**

A partir del sistema de cultivo que permitió obtener los primeros terneros producidos en España por Ovum Pick Up (OPU), tras la transferencia de blastocistos producidos íntegramente *in vitro*, vitrificados y desvitrificados (Proyecto FEDER GAN 97-0023), se ensayaron diversas modificaciones de las condiciones de la MIV y el CIV. Para ello, se planteó un diseño experimental combinando dos sistemas de MIV y tres de CIV:





**Figura 2.**—Porcentajes de supervivencia (vivos) y eclosión (eclos) a las 24, 48 y 72 h, de embriones producidos en tres medios de cultivo (SOF+ BSA; SOF + FCS;

1 MIV: medio TCM 199 HNaCO<sub>3</sub> + FSH-LH + 17b Estradiol

- en monocapa de células VERO
- sin células

2 CIV

- medio sintético indefinido: Synthetic Oviduct Fluid (SOF) + 5% FCS (a partir de día 3) (Grupo FCS)
- medio sintético semidefinido: SOF + 20g/L albúmina sérica bovina (BSA) (Grupo BSA)
- cocultivo VERO + B2 INRA MENEZO (medio comercial) + 5% FCS (Grupo VERO)

Los resultados se recogen en la figura 2. Como resumen, cabe señalar:

- ❖ Ni el sistema de MIV (células vs. no células) ni la calidad morfológica del embrión afectaron a la supervivencia embrionaria post-vitrificación.
- ❖ Tanto el día de vitrificación (blastocistos de día 7 vs. blastocistos de día 8;  $p < 0,001$ ) como el medio de cultivo (FCS vs. BSA vs. VERO;  $p < 0,01$ ) tuvieron efectos significativos sobre la supervivencia embrionaria a la criopreservación.
- ❖ Los blastocistos de día 7 producidos en BSA y en células VERO sobreviven a la vitrificación en mayor porcentaje que los producidos con FCS.
- ❖ La producción de embriones en SOF + BSA permite obtener tasas de eclosión a 24, 48 y 72 h significativamente más elevadas que el resto de los tratamientos.