



(Bribón, Rubio VI, Kunfú, Raitán y Coral) de medio hermanos y utilizando siete marcadores moleculares codominantes, repartidos en dos grupos de ligamiento: cinco marcadores en el cromosoma 3 (BMS 937, INRA 003, BMS 2790, ILSTS 029, INRA 123) y dos marcadores en el cromosoma 10 (BMS 2349, ILSTS 005). Por otra parte, como consecuencia del pequeño número de muestras disponibles con relación al previsto para cada semental, y con el fin de mantener el mismo objetivo final de potencia de detección de QTL, se sustituyó el genotipado selectivo y el análisis de pools por el genotipado individual, lo que cuadruplicó el número total de genotipados.

El análisis de los datos se enfocó desde dos estrategias estadísticas: Frecuentista y Bayesiana. Con el enfoque frecuentista, se realizó un análisis de regresión lineal y Bayesiano,

para el caso de las variables con una distribución normal, y un análisis de rangos para los fenotipos no gaussianos. El fenotipo peso presentó una distribución normal, por lo que el análisis de regresión lineal está plenamente justificado para esta variable. El peso fue utilizado como variable criterio o dependiente frente a las probabilidades de los genotipos relativos al QTL, que se emplearon como variables independientes o predictoras. De acuerdo con los resultados obtenidos, no hay evidencia de ligamiento con el carácter peso en ninguno de los cromosomas estudiados. El fenotipo conformación no presentó una distribución normal por lo que no es válido el análisis de regresión lineal sobre esta variable. El análisis bayesiano efectuado sobre el fenotipo peso, puso de manifiesto la baja probabilidad de que exista algún QTL ligado a los marcadores analizados; dicha probabilidad fue inferior a 0,044.

1FD97-0023. Desarrollo de nuevas tecnologías reproductivas adaptadas a programas de selección asistida por marcadores

Investigador responsable	Organismo
Carmen Díez Monforte	SERIDA
Equipo investigador	
Enrique Gómez Piñeiro	SERIDA
Carlos Hidalgo Ordóñez	"
Lupicinio Prieto Tejerina	"
Jose Antonio García Paloma	"
Belén Pintado Sanjuanbenito	INIA
Paloma Duque Alvarez	Becaria-SERIDA

■ Desarrollar y ensayar medios básicos para maduración, cultivo y congelación y descongelación de embriones in vitro.

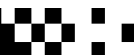
Resultados

Desarrollo de medios de cultivo

Los sistemas de cultivo para el embrión bovino incorporan frecuentemente suplementos proteicos como el suero (FCS) o sus derivados (albúmina sérica bovina –BSA-), que confieren a los medios unas características indefinidas. Aunque el suero aporta factores beneficiosos para el embrión, como substratos energéticos, vitaminas, aminoácidos y factores de

Objetivos

■ Poner a punto tecnologías aplicadas al desarrollo embrionario in vitro.



crecimiento, y su presencia en el medio de cultivo acelera la formación y eclosión del blastocisto y aumenta su número de células, también ocasiona inconvenientes como: incremento de los lípidos citoplasmáticos (relacionados con los problemas de congelabilidad de los embriones producidos *in vitro*-EPIV), sobrepeso en los individuos nacidos después de la transferencia embrionaria, riesgos sanitarios debidos a su origen animal, resultados poco repetibles, e imposibilidad de conocer el papel de ciertas sustancias en el cultivo embrionario dada su composición indefinida.

Por todo ello, y aunque en trabajos recientes se consiguió obtener, tras cultivo en condiciones definidas, embriones bovinos morfológicamente similares a los producidos en medio con FCS o BSA, existe mucho interés en diseñar sistemas de cultivo que permitan producir blastocistos viables en ausencia de suplementos de origen animal.

El presente proyecto realizó una serie de experimentos encaminados al diseño de un sistema de producción de embriones *in vitro* que solucione los problemas antes mencionados, mejorando las tasas de producción de blastocistos y su calidad. Los criterios de calidad empleados fueron:

- ❖ Número de células de la masa celular interna/células totales: para ello se realizaron recuentos celulares diferenciales en blastocistos de día 7, 8 y 9.
- ❖ Supervivencia *in vitro* a procesos de criopreservación.
- ❖ Gestaciones tras transferencias a hembras receptoras (fresco y criopreservado-congelado/vitrificado).

Los diferentes estudios experimentales realizados fueron:

1) Modificación de las concentraciones de aminoácidos esenciales y no esenciales en el medio de cultivo de embriones.

Las concentraciones de aminoácidos presentes en los preparados comerciales utiliza-

dos de forma rutinaria para la elaboración de medios de cultivo son notablemente inferiores a las encontradas, tanto en el fluido oviductal como en el uterino. Se está probando la utilización de un medio de cultivo en el que las concentraciones de los aminoácidos esenciales y no esenciales sean más aproximadas a las de los fluidos oviductal y uterino bovinos. Los resultados preliminares indican que la utilización de concentraciones de aminoácidos similares a las analizadas en el fluido oviductal bovino, permiten el desarrollo embrionario hasta la fase de mórula en porcentajes similares a los obtenidos con los grupos control. Sin embargo, dichas concentraciones no son las adecuadas para permitir el desarrollo de mórula a blastocisto.

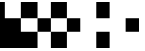
2) Estudio del tipo de macromoléculas y de la presión osmótica sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*.

El desarrollo embrionario se vio mejorado tras la utilización de un medio de cultivo SOF (Synthetic Oviduct Fluid) con presión osmótica baja, tanto en condiciones definidas (SOF+Polivinilalcohol-PVA) como semidefinidas (SOF+BSA). En el primer caso, este mejor desarrollo se vio acompañado por un incremento en el número de células de la masa celular interna, hecho que no se observó tras el uso de SOF+PVA con alta presión osmótica.

3) Efecto de la administración de retinol a hembras donantes sobre la cantidad y la calidad de ovocitos obtenidos por Ovum Pick-UP (OPU).

El tratamiento de donantes con retinol, mejoró de forma significativa el número de complejos cumulus-ovocito (CCO) recuperados tras tres sesiones de OPU, realizadas de forma consecutiva a intervalos de 3-4 días.

Los resultados obtenidos a partir de este experimento, abrieron una nueva línea de trabajo centrada en el efecto de la presencia de retinol y sus derivados durante la premaduración/maduración de ovocitos y sus repercusiones sobre el posterior desarrollo embrionario.



Los primeros resultados mostraron que la presencia de ácido 9-cis retinoico (metabolito del retinol) durante la premaduración estimuló la migración de los gránulos corticales, los niveles de expresión del gen *Midkine*, el desarrollo embrionario, la resistencia a la criopreservación y el número total de células. En consecuencia, se mejora la calidad embrionaria.

Congelación/Descongelación

La aplicación de un sistema de vitrificación (Kaidi et al, *Theriogenology* 53, 1999) permitió el nacimiento de los tres primeros terneros producidos en España tras la transferencia a hembras receptoras de embriones producidos *in vitro* tras OPU y vitrificación/desvitrificación. Los resultados apuntan a que la vitrificación (método de no equilibrio) es un sistema a ele-

gir en la criopreservación de los embriones bovinos producidos *in vitro*.

La utilización conjunta de la OPU y un sistema de criopreservación de embriones permite salvar el principal obstáculo para la aplicación práctica de las tecnologías *in vitro*. Es conocido que los embriones producidos *in vitro* presentan unos índices de supervivencia a la congelación/descongelación clásica inaceptables en la práctica, por lo que se impone su transferencia en fresco. Esta característica impide la óptima comercialización del producto y obliga a disponer de receptoras en un número demasiado elevado como para que el procedimiento resulte rentable. Esto confiere gran importancia a los resultados obtenidos. Por todos estos argumentos, el SERIDA-CENSYRA puede considerarse pionero en España en conseguir nacimientos a partir de tecnologías reproductivas en la especie bovina.

