

COCULTIVO CON CÉLULAS SOMÁTICAS: UNA ALTERNATIVA PARA LOGRAR MEJORES RESULTADOS EN LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

Lorenzo, M.S., Maruri, A., Lombardo, D.M.

Cátedra de Histología y Embriología, INITRA, FCV, UBA.

Introducción

En Argentina, la producción *in vitro* de embriones (PIV) bovinos es una biotecnología con una elevada potencialidad de aplicación en sistemas productivos, ya que permitiría reducir el intervalo generacional y acelerar el progreso genético en los rodeos.

La PIV consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar el resultado final del proceso. Estas son: obtención de complejos *cumulus*-ovocito (COC), selección de los ovocitos, maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo de los cigotos hasta blastocistos (estadio transferible)⁽¹⁾. La fuente de ovocitos puede provenir de hembras vivas, a través de la técnica de aspiración folicular ecoguiada (*ovum pick up*, OPU), o de ovarios de frigorífico de hembras recientemente faenadas. Estas biotecnologías reproductivas se desarrollan desde hace décadas, en las cuales se han ido modificando y optimizando los protocolos, condiciones de cultivo y medios utilizados. A pesar de los numerosos esfuerzos realizados para mejorar la eficiencia de la PIV, la misma continúa teniendo un bajo rendimiento y el porcentaje de ovocitos capaces de transformarse en embriones transferibles es inferior al 50%⁽¹⁾. Por otro lado, los embriones producidos *in vitro* son de menor calidad que los obtenidos *in vivo*, existiendo entre ellos numerosas diferencias morfológicas, cromosómicas, funcionales y metabólicas. Asimismo, en los embriones producidos *in vitro*, se observan alteraciones en la expresión génica, mayor incidencia de apoptosis y menor resistencia a la criopreservación^(2, 3, 4). Estas diferencias se deben, principalmente, a que el mayor porcentaje de los ovocitos recuperados no completaron su crecimiento en el ovario y a que las condiciones de cultivo *in vitro* son subóptimas en relación al ambiente *in vivo* en el cual se desarrollan estos procesos. Para recrear el ambiente *in vivo* se han desarrollado diversos sistemas de cocultivo de gametas y embriones tempranos con células somáticas en diferentes especies.

¿Qué es el cocultivo?

El cocultivo consiste en la incubación conjunta de gametas o embriones tempranos con monocapas de células somáticas, llevándose a cabo en alguna de las etapas de la PIV. Aquellos autores que evidenciaron efectos positivos del cocultivo, lo atribuyen a la síntesis de factores embriotróficos y promotores de la madura-

ción ovocitaria, al metabolismo de toxinas y a la contribución de un ambiente redox balanceado⁽⁵⁾. Diversos estudios han reportado el uso de células de granulosa, epiteliales oviductales, luteales o de células no pertenecientes a órganos reproductivos como fibroblastos o células de línea^(6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Incluso, en algunos casos se observaron efectos beneficiosos con el uso de cultivos interespecíficos. La diversidad de los diseños experimentales utilizados en relación no solo el tipo celular sino a las condiciones de cultivo⁽¹³⁾ (densidad de siembra, medios, tiempo de desarrollo, etc.) imposibilita o dificulta la comparación entre estudios, explicando en parte la controversia sobre su utilización⁽⁵⁾.

Nuestra experiencia

En nuestro laboratorio se utilizaron células de granulosa bovina del pasaje 1 obtenidas a partir de ovarios de fase luteal (según aspecto macromorfológico del cuerpo lúteo)⁽¹⁴⁾. La criopreservación de las mismas permitió su utilización programada en ensayos de maduración *in vitro* de complejos *cumulus*-ovocito (COC) de la misma especie (Figura 1), incrementando los porcentajes de maduración nuclear (Gráfico 1) y logrando porcentajes de clivaje pos-FIV cercanos al 80%, similares a los obtenidos suplementando con gonadotrofinas durante la MIV (Gráfico 2). Actualmente se está evaluando el efecto de este sistema de cocultivo sobre la calidad y cantidad de embriones transferibles obtenidos al día 7 de cultivo (Figura 2). Por otro lado, se logró aislar células luteales bovinas en alta pureza con el objetivo de ser utilizadas como soporte del desarrollo embrionario en la especie bovina y porcina. Es de destacar que la menor eficiencia de PIV en la especie porcina ha despertado nuestro interés en la aplicación de sistemas de cocultivo para mejorar su eficiencia.

Si bien se está tendiendo al diseño de medios sintéticos definidos, los sistemas secuenciales de cocultivo estandarizados recrearían de la mejor forma el ambiente en el cual se desarrollan estos procesos *in vivo*. No solo pueden ser un complemento factible de ser utilizado para lograr mejores resultados productivos, sino un modelo para el estudio de la interacción materno-embriónica, la biología de los procesos reproductivos y el mecanismo de embriotropismo con el fin de dilucidar los factores necesarios en los medios de cultivo *in vitro*.

Figura 1. Cocultivo de complejos cumulus - ovocito bovinos con células de granulosa bovina del pasaje 1 (CPGB-1). A, CPGB-1. B, COC bovinos parcialmente expandidos 22 h pos-MIV.

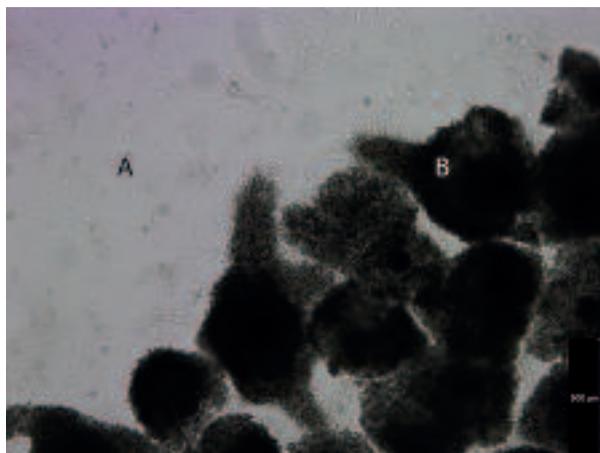


Gráfico 1. Porcentajes de maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados *in vitro* en medio de maduración sin células (control, TCM-199+10%SFB) o en cocultivo con CPGB-1. N=268. Los porcentajes fueron analizados a través del test estadístico diferencia de proporciones.

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Se utilizó el software Infostat.

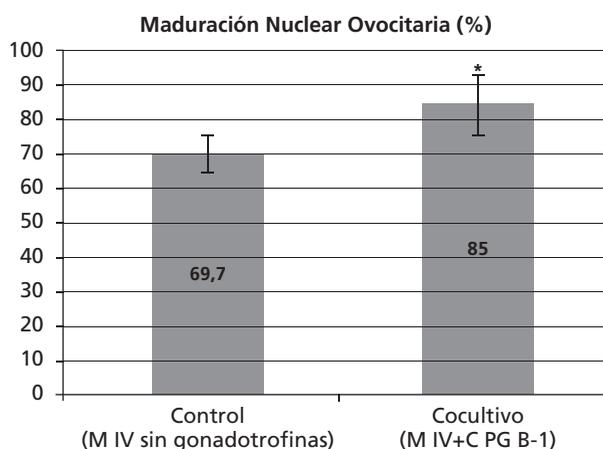


Gráfico 2. Porcentajes de clivaje al día 2 pos-FIV cuyos ovocitos fueron madurados *in vitro* con gonadotrofinas (control) o en cocultivo con CPGB-1. N=317. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

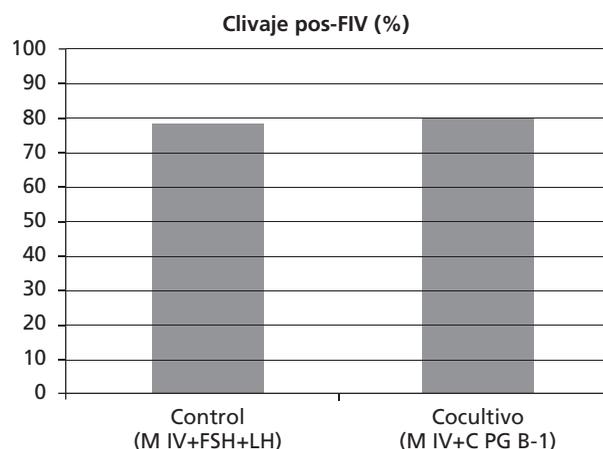
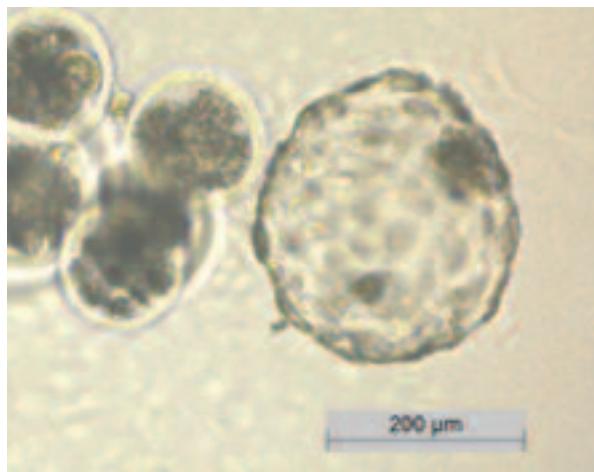


Figura 2. Blastocisto bovino eclosionado (día 8 de cultivo *in vitro*).



Bibliografía

- Gordon, I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. CAB International. ISBN 0 85199 666 3.
- Pomar, F.J., Teerds, K.J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T. and Aguilar, B. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, Vol. 63.
- Rinaudo, R. and Schultz, P. 2004. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction*, Vol. 128: 301-311.
- Matwee, C., Betts, D.H., King, W.A. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, Vol. 8: 57-68.
- Orsi, B. and Reischl, J. 2007. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*, Vol. 67, pp. 441-458.
- Bosch, P. y col. 2007. Desarrollo de embriones caprinos *in vitro*: efecto del co-cultivo con células epiteliales de oviducto. *Revista Científica*, Vol. 16 (3): 273-281.
- López, A.C. y col. 2007. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. *Rev. MVZ Cordoba*, Vol. 12 (2). ISSN: 0122-0268.
- Goovaerts, I.G.F., Leroy, J.L.M.R., Rizo, D., Bermejo Alvarez, P., Gutierrez Adan, A., Jorssen, E.P.A., Bols, P.E.J. 2011. Single *in vitro* bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. *Theriogenology*.
- Thibodeaux, J.K., Broussard, J.R., Godke, R.A., and Hansel, W. 1994. Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst-stage embryos or trophoblastic vesicles. *Journals of Reproduction and Fertility*, Vol. 101:657-662.
- Batista, M., Torres, A., Diniz, P., Mateus, L., Lopes-da-Costa, L. 2012. Development of a bovine luteal cell *in vitro* culture system suitable for co-culture with early embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, Vol. 48: 583-592.
- Wang, Z. and Chen, S. 2013. A simple and economical method in purifying dairy goat luteal cells. *Elsevier, Tissue and Cell*.
- Torres, A., Batista, M. and Diniz, P. 2013. Embryo-luteal cells coculture: an *in vitro* model to evaluate steroidogenic and prostanoid early embryo-maternal interactions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*.
- Portela, V.M., Zamberlam, G., and Price, C.A. 2010. Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells. *Fertility and Sterility*, Vol. 93: 2050-2055.
- Okuda, K., Miyamoto, A. and Sauerwein, H. 1992. Evidence for oxytocin receptors in cultured bovine luteal cells. *Biology of Reproduction*, Vol. 46: 1001-1006.