



EL ROL DE LAS CÉLULAS LUTEALES EN LA PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS Y PORCINOS

Alejandro Maruri⁽¹⁾, Gabriela Teplitz^(1,2) y Daniel Lombardo⁽¹⁾

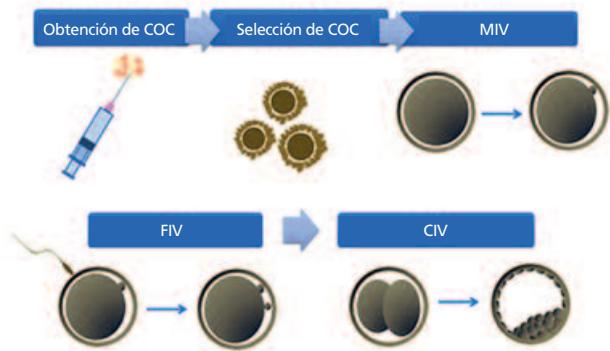
Introducción

La incorporación de biotecnologías reproductivas innovadoras en la producción bovina posibilitó el incremento de la producción de leche y de carne, lo cual es necesario para abastecer los requerimientos de alimento en el mundo. En el ganado porcino, nos encontramos un paso más atrás, porque la implementación comercial de estas biotecnologías todavía se encuentra fuera del alcance de los productores. Otro logro en este campo es la posibilidad de obtener animales genéticamente modificados y hay muchas expectativas en la comunidad biomédica con respecto al uso del porcino como un modelo experimental debido a que ciertas características fisiológicas se asimilan al humano.

La producción *in vitro* de embriones (PIV) es una de las biotecnologías con mayor potencial de aplicación en nuestros sistemas ganaderos. La eficiencia del proceso de la PIV (Fig. 1) es afectada por diversas variables, asociadas a las condiciones de cultivo durante la maduración (MIV), fecundación (FIV) y cultivo embrionario *in vitro* (CIV). Estos tres pasos, implican una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos, condicionando cada uno de ellos el éxito o el fracaso del siguiente. Sin embargo, las condiciones de cultivo *in vitro* en estas etapas siguen siendo subóptimas y la calidad y cantidad de embriones obtenidos son menores que los producidos *in vivo*. Esto se asocia a mayores pérdidas embrionarias tempranas que afectan negativamente la produc-

ción. Para modular estos procesos y obtener microambientes que imiten lo que ocurre *in vivo*, el uso de sistemas de cocultivo comenzó a implementarse en la PIV en porcinos y bovinos.

Figura 1. Secuencia de la PIV de embriones.



Sistemas de cocultivo

El cocultivo se define como la coincubación *in vitro* de dos o más tipos celulares diferentes. En el campo de la biología de la reproducción la utilización de sistemas de cocultivo permite estudiar fenómenos de interacción entre las gametas e interacciones materno-embriónicas imitando el ambiente en el cual se desarrollan estos procesos *in vivo*⁽¹⁾. Varios sistemas de cocultivo se han utilizado, mayormente empleando líneas celulares de oviducto, endometrio, células epiteliales de la ampolla oviductal, cocultivos secuenciales de oviducto y endometrio, células de la granulosa, células VERO e incluso células de carcinoma ovárico. Entre los posibles mecanismos de acción en el

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA).

(2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

cocultivo se encuentran la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas de acción parácrina, el contacto directo que puede desencadenar respuestas bidireccionales, la eliminación de compuestos tóxicos de los medios de cultivo ⁽¹⁾ y la disminución del estrés oxidativo ⁽²⁾.

Hay escasos reportes sobre la utilización de células luteales (CLs) en sistemas de cocultivo. Thibodeaux et al. ⁽³⁾, reportaron por primera vez la coincubación de CLs bovinas con blastocistos bovinos producidos *in vivo* con el objetivo de estudiar el efecto luteotrófico de los embriones y de vesículas trofoblásticas. Casi 20 años después, Torres et al. ⁽⁴⁾, emplearon un sistema de cocultivo de embriones bovinos producidos por FIV con el objetivo de estudiar las interacciones entre embriones tempranos y CLs, evaluando la síntesis de progesterona (P4) y prostanoides.

Rol de las células luteales en la MIV

In vivo, la maduración ovocitaria se lleva a cabo dentro del folículo ovárico en presencia de fluido folicular, el cual está compuesto por un exudado plasmático así como también por la secreción de las células foliculares. La P4 es el

esteroide que se encuentra en mayor cantidad en el fluido folicular de folículos preovulatorios en mamíferos. Las acciones biológicas de la P4 están mediadas por 3 isoformas genómicas del receptor de P4 (PR), PR-A, PR-B y PR-C, además de la existencia de 3 isoformas no genómicas alpha, beta, y gamma ^{(5), (6)}. Tanto PR-A como PR-B son expresados en células de la granulosa de folículos preovulatorios ⁽⁷⁾. El PR de membrana está particularmente asociado a la promoción de la meiosis en el ovocito ⁽⁶⁾. En bovinos se reportó que la P4 es un factor intermediario junto con la angiotensina II y las prostaglandinas en la cascada estimuladora de la reanudación meiótica en forma concentración dependiente ⁽⁸⁾.

La reanudación de la meiosis en ovocitos es desencadenada por hormonas esteroideas, específicamente por la P4. Los niveles de P4 y su relación con los niveles de estrógenos están fuertemente asociados con la calidad ovocitaria y a su maduración ⁽⁹⁾. Existen controversias con respecto al efecto de la P4 en la MIV. Algunos trabajos indican que suplementar con P4 el medio de MIV disminuye los porcentajes de maduración ⁽¹⁰⁾, otros han demostrado que el agregado de P4 al



Ecógrafos Veterinarios 

Ecógrafos veterinarios HONDA - 100% Japanese

HONDA HS 102 V
HONDA HS 1600 V

NUEVA PANTALLA

- * 2.5 veces más brillo y contraste
- * Mayor calidad de imagen y definición



MEDICIONES

- Grilla rápida
- Cáliper

NUEVA PANTALLA

- + Brillo
- + Contraste
- + Ángulo de visión
- + Calidad de imagen



ANGULO DE VISION 170°

FINANCIACION DIRECTA EN PESOS



MULTIPLES TRANSDUCTORES

- + Calidad de carne
- + OPU



www.imgadvantage.com.ar - info@imgadvantage.com.ar - ecografoshonda@hotmail.com - 011 4751.5920

medio de maduración en ratones no mejora los porcentajes de maduración nuclear, tanto en COC como en ovocitos desnudos y que dosis elevadas de P4 inhiben la reanudación meiótica ⁽¹¹⁾. Sin embargo, en bovinos se observó que al inhibir la producción de P4 por las células del cumulus, el porcentaje de blastocistos cayó abruptamente y estos valores fueron revertidos al adicionar P4 o agonistas de P4⁽¹²⁾. Esta observación apoya el rol positivo de la P4 sobre la calidad ovocitaria ⁽¹²⁾. Estos resultados inconsistentes pueden deberse a los diferentes diseños experimentales. Además, el periodo de tiempo que transcurre desde la estimulación con LH hasta la ruptura de la vesícula germinal (VG) podría explicar las diferencias observadas en las diversas especies. Mantener la calidad del ovocito y su capacidad de madurar en especies con un largo periodo entre el pico de LH y la ruptura de la VG requiere el apoyo de esteroides. En porcinos, Mattioli et al. ⁽¹³⁾, reportaron que la presencia de P4 en el medio de maduración aumentó la descondensación de cabezas espermáticas y la formación del pronúcleo masculino. Por otro lado, Zhang et al. ⁽¹⁴⁾, adicionaron P4 al medio de maduración en esta misma especie observando un aumento tanto en los porcentajes de penetración como de clivaje.

Rol de las células luteales en el desarrollo embrionario

Es conocido el efecto embriotrófico indirecto de la P4 a través de cambios fisiológicos del endometrio durante la gestación. Sin embargo, también se demostró un efecto trófico directo sobre el embrión temprano ^(15, 16). Por otro lado, las CLs producen prostanoides y el ácido lisofosfatídico (LPA) tendría un efecto sobre la calidad embrionaria ⁽¹⁷⁾. El LPA es un conocido mediador de señalización celular en los tejidos reproductivos asociado con una amplia gama de eventos celulares, incluyendo supervivencia, diferenciación, proliferación, migración, invasión y adhesión ⁽¹⁸⁾. Estudios en bovinos demostraron que el CL sintetiza LPA y que la suplementación *in vitro* de LPA afectó los niveles de transcripción de marcadores de calidad embrionaria ⁽¹⁹⁾. Se observó además un aumento de la transcripción de genes antiapoptóticos (bcl2) y de crecimiento (igf2r) y una disminución de genes proapoptóticos (bax)⁽¹⁷⁾.

En la especie porcina uno de los mayores obs-

táculos en la PIV es la insuficiente maduración de los ovocitos mientras que en la especie bovina las condiciones subóptimas del cultivo *in vitro* se reflejan en una menor calidad embrionaria respecto de su contraparte *in vivo*. Por lo tanto, nos propusimos evaluar el uso de células luteales porcinas y bovinas en cocultivo durante la MIV y el CIV de embriones, respectivamente.

Principales resultados obtenidos

Cocultivo de células luteales porcinas en la MIV de ovocitos porcinos

El cocultivo de complejos *cumulus*-ovocito (COC) porcinos con células luteales porcinas del pasaje 1 (CLP-1) logró obtener los mismos porcentajes de maduración nuclear de los ovocitos que utilizando gonadotrofinas (71% vs. 78%). Al evaluar parámetros de la FIV como medida de evaluación de la maduración citoplasmática de los ovocitos, el cocultivo aumentó la eficiencia de la FIV así como el porcentaje de penetración espermática monospérmica.

Cocultivo de células luteales bovinas en el CIV de embriones bovinos

El cocultivo de embriones bovinos con células luteales bovinas del pasaje 1 (CLB-1) durante las primeras 48 h de CIV modificó la cinética de desarrollo embrionario. Esto se evidenció en un incremento significativo del porcentaje de blastocistos respecto al grupo control (maduración con hMG y sin cocultivo embrionario) (50,4% vs. 29,8%). Sin embargo, al día 2 de desarrollo no se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de segmentación embrionaria entre los grupos (control: 84% vs. CLB-1: 83%) (Tabla 2).

Tabla 2. Desarrollo de embriones bovinos cultivados *in vitro* las primeras 48 horas en ausencia (control) o en presencia de CLB-1.

GRUPO	Ovocitos (n)	Embriones segmentados (%) Día 2	Blastocistos/ ovocitos (%) Día 8	Blastocistos/ segmentados (%) Día 8
CONTROL	141	118 (84) ^a	42 (29,8) ^a	42 (35,6) ^a
CLB-1	133	111 (83) ^a	67 (50,4) ^b	67 (60,4) ^b

Al analizar los porcentajes relativos de los diferentes estadios de blastocistos se observaron diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos de estadio 6, siendo mayor en los embriones cocultivados con CLB-1 respecto al grupo con-

trol (37,3% vs. 23,8%). Por otro lado, no se observaron diferencias en los porcentajes de expansión ni eclosión de los blastocistos (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes relativos de blastocistos bovinos, de acuerdo a su grado de desarrollo según la IETS, cultivados *in vitro* las primeras 48 horas en ausencia (control) o en presencia de CLB-1, evaluados a los 8 días post-FIV.

GRUPO	Blastocistos (n) Día 8	Estadio 5 (%)	Estadio 6 (%)	Estadio 7 (%)	Estadio 8 (%)
CONTROL	42	4 (9,5)	10(23,8) ^a	18(42,9)	10(23,8)
CLB-1	67	2 (3)	25(37,3) ^b	29(43,3)	11(16,4)

Conclusiones

Se reportó por primera vez el uso de un sistema de cocultivo con células luteales porcinas y COC porcinos durante la MIV demostrando un efecto beneficioso sobre la maduración ovocitaria así como también sobre la eficiencia de la FIV. Asimismo, es el primer reporte sobre el efecto embriotrófico inducido por células luteales bovinas durante las primeras 48 horas de CIV de embriones bovinos. Los altos porcentajes de blastocistos obtenidos, sumado a su mayor calidad, postulan a este modelo de cocultivo como una alternativa válida para incrementar la eficiencia de la PIV.

En conclusión, las células luteales en pureza pueden ser utilizadas en sistemas de cocultivo en diferentes etapas de la PIV de embriones para mejorar la eficiencia de esta biotecnología en las especies bovina y porcina.

Bibliografía

- Co-Culture Update: Creating an Embryotrophic Environment *In Vitro*. Conway-myers, BA. 3, 1998 : SEMINARS IN REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY , Vol. 16.
- Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*. Lopez AC, et al. 2, s.l. : Journal MVZ Cordoba, 2007, Vol. 12.
- Stimulation of progesterone production in bovine luteal cells by co-incubation with bovine blastocyst-stage embryos or trophoblastic vesicles. Thibodeaux, JK, y otros, y otros. s.l. : Journal of Reproduction and Fertility, 1994, Vol. 101.
- Development of a bovine luteal cell *in vitro* culture system suitable for co-culture with early embryos. Batista, M, y otros, y otros. s.l. : *In vitro cell dev biol* , 2012, Vol. 45.
- Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract. R*kawiecki, R, Kowalik, MK y Kotwica, J. 1, s.l. : Polish Journal of Veterinary Sciences, 2011, Vol. 14.
- Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues; a review of regulation and physiological implications. Dressing, GE, y otros, y otros. 1-2, s.l. : Steroids, 2011, Vol. 76.
- Expression and localization of the progesterone receptor in mouse and human reproductive organs. Teilmann, SC, y otros, y otros. s.l. : Journal of Endocrinology, 2006, Vol. 191.
- Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. Siqueira, LC, y otros. 2012, Theriogenology, págs. 1779-87.
- Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. Moor, RM, Polge, C y Willadsen, SM. s.l. : J Embryol Exp Morphol., 1980, Vol. 56.
- Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation *in vitro*. Fukui, Y, y otros, y otros. 2, s.l. : Theriogenology, 1982, Vol. 18.
- The effect of progesterone on the *in vitro* maturation and developmental competence of mouse germinal vesicle oocytes. Zavareh, S, Saberivand, A y Salehnia, M. 1, s.l. : Int J Fertil Steril. , 2009, Vol. 3.
- Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during *in vitro* maturation. Aparicio, IM, y otros, y otros. 5, s.l. : Biol Reprod., 2011, Vol. 84.
- Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte. Mattioli, M, y otros, y otros. 3, s.l. : Gamete Res., 1988, Vol. 21.
- Effects of follicle-stimulating hormone and ovarian steroids during *in vitro* meiotic maturation on fertilization of rat oocytes. Zhang, X y Armstrong, DT. 3, s.l. : Gamete Res., 1989, Vol. 23.
- Progesterone enhances *in vitro* development of bovine embryos. Ferguson, CE, Kesler, DJ y Godke, RA. 1, 2012, Theriogenology, Vol. 77, págs. 108-14.
- Effect of progesterone and epidermal growth factor on *in vitro*-produced eight-cell bovine embryos in serum-free culture medium. Merlo, B, Iacono, E y Mari, G. 211, 2007, Reprod Fertil Dev, Vol. 19.
- Lysophosphatidic acid signaling in late cleavage and blastocyst stage bovine embryos. Torres, AC, y otros, y otros. 2014, Mediators Inflamm.
- Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system. Ye, X. 5, 2008, Hum Reprod Update, Vol. 14, págs. 519-36.
- Lysophosphatidic acid action in the bovine corpus luteum -an *in vitro* study. Kowalczyk-Zieba, I, y otros, y otros. 6, 2012, J Reprod Dev, Vol. 58, págs. 661-71.
- In vitro* enhancement of early-stage embryos with co-culture. Thibodeaux, JK y Godke, RA. 4, s.l. : Archives of Pathology & Laboratory Medicine , 1992, Vol. 116.
- Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. Biggers, JD, Gwatkin, RB y Brinster, RL. s.l. : Nature, 1962, Vol. 194.
- Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Niswender, GD, y otros, y otros. 1, s.l. : Physiol Rev., 2000, Vol. 80.
- Comparison of endocrine and cellular mechanisms regulating the corpus luteum of primates and ruminants. Wiltbank, MC, y otros, y otros. 3, s.l. : Anim Reprod. , 2012, Vol. 9.
- Induction of autophagy in the porcine corpus luteum of pregnancy following anti-androgen treatment. Grzesiak, M, Knapczyk-Stwora, K y Slomczynska, M. 6, s.l. : J Physiol Pharmacol., 2016, Vol. 67.