

CULTIVO DE CÉLULAS LUTEALES PORCINAS COMO SUSTRATO PARA LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE COMPLEJOS CUMULUS OVOCITO PORCINOS. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

Culture of porcine luteal cells as a substrate for *in vitro* maturation of porcine cumulus oocyte complexes. Establishment and characterization

Gabriela Maia Teplitz^{1,2}, Alejandro Maruri^{1,3}, Paula Romina Cruzans^{1,4}, María Clara Carou^{1,5}, Daniel
Marcelo Lombardo^{1,6}

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

^{2 y 3} Veterinario.

⁴ Mg. De la Universidad de
Buenos Aires en
Biotecnología.

^{5 y 6} Prof.; Dr. De la
Universidad de Buenos
Aires. Área de Biología
Celular y Molecular.

E-mail:
dlombard@fvvet.uba.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer y caracterizar el cultivo de células luteales porcinas (CLP) para el posterior cocultivo de COC porcinos con el fin de promover la maduración ovocitaria. Para el establecimiento y caracterización del mismo se realizó la disección de cuerpos lúteos obtenidos a partir de ovarios de frigorífico. El tejido luteal se sometió a digestión mecánica y enzimática con collagenasa IV. La suspensión se filtró y centrifugó y las células se diluyeron en 15 mL de medio DMEM/F12 suplementado y se sembraron en 3 frascos de cultivo T25, incubándose en ambiente controlado y renovando el medio cada 48 h. Para el análisis y caracterización del mismo se realizó la evaluación del contenido de lípidos intracelulares por tinción con rojo Nilo, inmunocitoquímica (ICQ) para 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) y determinación de progesterona (P4) por ELISA. Se observó la presencia de gotas lipídicas citoplasmáticas, una producción de P4 en forma creciente medida a las 48, 96 y 144 h de cultivo y casi la totalidad de las células positivas a 3 β -HSD, demostrando la capacidad esteroideogénica de las células en cultivo.

Palabras clave: cocultivo, cuerpo lúteo, porcino, maduración *in vitro*, COC.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish and characterize the porcine luteal cells (PLC) culture for the subsequent coculture with porcine COC. The final purpose is to promote the oocyte maturation. The PLC was established using corpora lutea obtained from slaughterhouse ovaries. Corpora lutea were dissected and luteal tissue submitted to a mechanical and enzymatic digestion with collagenase IV. The cell suspension was filtered and centrifuged and the cells obtained were diluted in 15 mL of DMEM-F12 supplemented media. Diluted cells were seeded in 3 culture flasks T25, staying in a controlled environment and changing the

medium every 2 days. For the analysis and characterization, the cells were assessed by the Nile red staining to detect intracellular lipids, immunocytochemistry (ICC) for 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD) and ELISA for P4 determination. We observed the presence of lipid intracellular droplets. Also, we observed an increase of P4 concentration at 48, 96 y 144 h of primary culture and almost all the cells were positive to the ICC evaluation for 3 β -HSD, showing the steroidogenic capacity of the culture cells.

Keywords: Coculture, Corpus Luteum, Porcine, *In vitro* Maturation, COC.

INTRODUCCION

El cuerpo lúteo (CL) es una compleja glándula endócrina que tiene un rol central en la regulación de varios procesos reproductivos. Se compone de diversos tipos celulares (células endoteliales capilares, células sanguíneas, fibroblastos, células luteales pequeñas y células luteales grandes) que difieren en el tamaño y densidad (Wang *et al.*, 2013). Estudios enfocados al entendimiento de la fisiología ovárica, específicamente a los mecanismos de luteogénesis y luteólisis, han requerido del aislamiento y cultivo *in vitro* de células luteales. El desarrollo embrionario en cocultivo con células somáticas se ideó hace más de 40 años en un intento de mejorar el desarrollo y la viabilidad preimplantacional de los de embriones mamíferos generados y cultivados *in vitro* (Orsi *et al.*, 2007). Diversos trabajos han demostrado que el cocultivo, a través de producción de compuestos con actividad mitogénica, sustancias que promueven la diferenciación celular, detoxificación de embriotoxinas, moléculas antioxidantes y la modificación de concentraciones de sustratos energéticos, favorecen el desarrollo embrionario (Moore *et al.*, 1993; Bosch *et al.*, 2006; Angela *et al.*, 2007). La elección de células de CL en monocapa para cocultivo de complejos cumulus ovocito (COC) se basa en que éstas son células esteroideogénicas, con producción basal de progesterona (P4). Esta hormona posee un efecto antiapoptótico durante el desarrollo del cuerpo lúteo debido a la expresión por debajo de los niveles basales (downregulation) del ligando Fas (proteína) (Pietrowski *et al.*, 2014) y su efecto antioxidante. La progesterona, al igual que la angiotensina II (ANG II) y las prostaglandinas (PG), son mediadores de la reanudación meiótica inducida por el aumento de las gonadotropinas. La ANG II, PG y P4 son pasos secuenciales en la misma cascada que culmina con la maduración ovocitaria. (Siqueira *et al.*, 2012). El objetivo de este trabajo fue establecer y caracterizar el cultivo de células luteales porcinas (CLP) para el posterior cocultivo de COC porcinos durante la maduración *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de cuerpo lúteo porcino:

Los ovarios se obtuvieron a partir de hembras porcinas recién faenadas en frigorífico y se transportaron en un recipiente adiabático dentro de las 2 h de su obtención. Se realizó una minuciosa extracción del tejido luteal de 5 ovarios, de fase luteal temprana e intermedia, por compresión con gasa estéril y se lavó en PBS estéril refrigerado suplementado con 1000 U/mL de gentamicina y 1000 U/mL de anfotericina B. Luego se realizó la disociación mecánica por medio de cortes en pequeños fragmentos. Se llevó a cabo la digestión enzimática del tejido luteal por incubación en agitación a 37°C durante 30 minutos con 0,5 U/mL de collagenasa tipo IV, en medio DMEM/F12 con el agregado de 10 % v/v de suero fetal bovino biotecnológico, 1000 U/mL de gentamicina y 1000 U/mL de anfotericina B. La suspensión celular se filtró y centrifugó (10 minutos a 1100 rpm) se procedió a la lisis de glóbulos rojos con 2 mL de agua destilada y 10% de NaCl. Luego de resuspender en DMEM/F12 con el agregado de 10 % v/v de suero fetal bovino biotecnológico, 1000 U/mL de gentamicina, 1000 U/mL de anfotericina B y 100 U/mL de L-glutamina y de evaluar la viabilidad celular con Azul Tripan (Gibco®) en cámara de Neubauer, se sembraron las células en 3 frascos T 25. Durante una semana se realizaron cambios de medio de cultivo cada 48 h hasta la confluencia de las células, luego se levantaron las mismas con 0,25% de tripsina 0,02% EDTA (células del pasaje 1 denominadas CLP-1), luego se las criopreservó a -80°C para su caracterización.

Análisis y caracterización de células luteales obtenidas (CLP-1):

- Evaluación del contenido de lípidos intracelulares. (Genicot *et al.*, 2005). Se preparó la solución de trabajo por dilución en dimetil sulfoxido (DMSO) de 1 mg/mL de la solución madre de rojo Nilo que se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad. La monocapa de CLP-1 se fijó con paraformaldehído al 4%, se lavaron y se tiñeron en 500 μ L de la

solución de stock diluida en solución salina fisiológica (0,9% NaCl) por 3 h en oscuridad. Luego, las células luteales se lavaron y tiñeron con Hoechst 33342 y se examinaron inmediatamente en microscopio de fluorescencia. Se tomaron imágenes digitales con microscopio trilocular LEICA DM4000B LED® y cámara LEICA DCC-380X® con LASZ como soporte de software para la captura digital.

- Inmunocitoquímica (ICQ) para 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD). Las CLP-1 se fijaron con paraformaldehído al 4%, permeabilizaron con 100 U/mL Triton 0,3% por 20 min y bloquearon en un primer momento con 3% de agua oxigenada 10 min y luego con 5% g/v de leche descremada, entre cada uno de estos pasos se lavaron los cubreobjetos con PBS. Se procedió a incubar con el anticuerpo primario 1/100 (3β -HSD P-18: sc-30820, Santa Cruz Biotechnology). Se continuó el protocolo según instrucciones del kit CHEMICON IHC Select® Immunoperoxidase Secondary Detection System. Finalmente se contrastó con hematoxilina, se secaron y montaron las muestras para la

observación al microscopio de campo claro. Las imágenes se capturaron de la misma forma que se especificó en el punto anterior.

- Medición de la producción de progesterona mediante la técnica de ELISA. Se siguieron las instrucciones del kit Progesterone EIA Kit (EA74) Oxford Biomedical Research® en alícuotas de medio de cultivo tomadas a las 48, 96 y 144 horas. Se utilizó un lector EZ READ 400 ELISA Biochrom®.

RESULTADOS

Se observó la presencia de gotas lipídicas citoplasmáticas (Figura 2) y células positivas en la ICQ para 3β -HSD (Figura 1) en un 99% de las células en cultivo. A su vez se observó una producción de P4 en forma creciente medida a las 48, 96 y 144 h de cultivo. ($34,1 \pm 7,6$; $56,6 \pm 4,2$; $66,8 \pm 7,04$) (Figura 1).

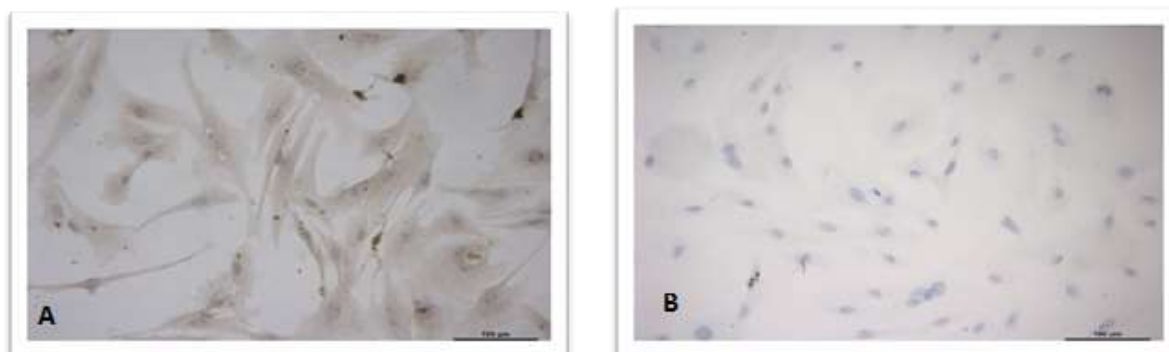


Fig. 1: A. ICQ para 3β -HSD. B. Control negativo. X200

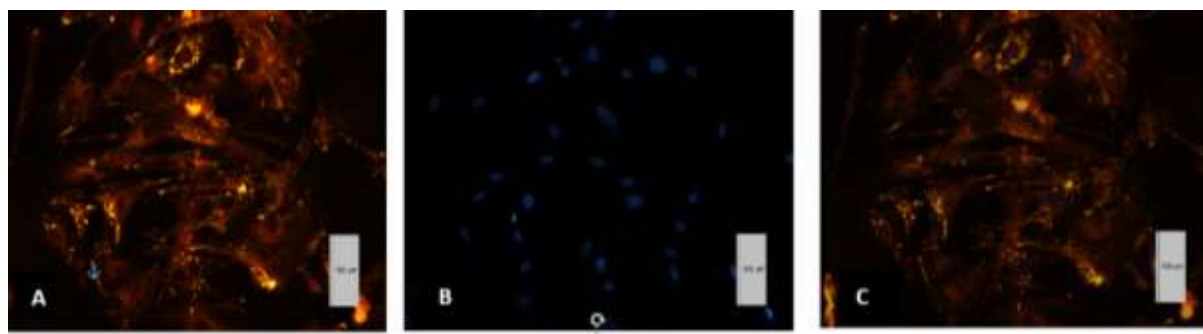


Fig. 2: A. Tinción con Rojo Nilo λ exc 450-490 nm. B. Tinción con Hoechst 33342 λ exc 350nm. C. Merge. Se evidencia la presencia de gotas lipídicas citoplasmáticas (fluorescencia amarilla). X200

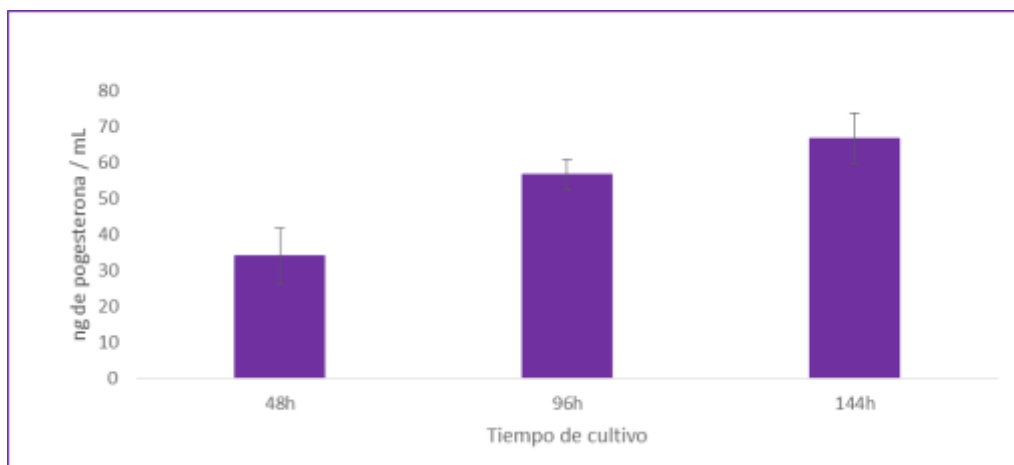


Figura 3. Producción de progesterona en ng/mL a las 48, 96 y 144 h de cultivo *in vitro* de CLP-1.

DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos en este estudio se puede observar la capacidad esteroidogénica de las células en cultivo. Éstas son células que poseen gotas lipídicas citoplasmáticas, presentaron marcación por ICQ para 3β -HSD y son productoras de progesterona. Esto nos serviría como punto de partida para realizar un sistema de cocultivo entre el cultivo de CLP-1 y COC porcinos durante la maduración *in vitro*. No hay estudios previos de un sistema de cocultivo de estas características en la especie porcina. Sin embargo, se han reportado trabajos de cocultivo durante la MIV con células oviductales (Annadie *et al.*, 2002), de granulosa y de la corteza ovárica (Chen *et al.*, 2007). En bovinos se han realizado estudios de cocultivo durante el desarrollo embrionario con células luteales observando un aumento significativo de la calidad y cantidad embrionaria (Torres *et al.*, 2013), pero en esa especie tampoco existen publicaciones refiriéndose a la MIV.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten postular al cultivo de CLP-1 como posible soporte para la maduración *in vitro* de ovocitos porcinos en cocultivo. Al promover la maduración ovocitaria contribuirán a la optimización de la producción *in vitro* de embriones porcinos.

REFERENCIAS

- Bosch P, Blanch M, Ferrero S, Díaz H, Picatto F, Bosch R. Desarrollo de Embriones Caprinos *In vitro*: Efecto del Co-Cultivo con Células Epiteliales de Oviducto. Rev. Cient. (Maracaibo). 2006, 16(3). 273-281
- Chen XY, Li QW, Zhang SS, Han ZS, Zhao R, Wu SY, Huang J. Effects of ovarian cortex cell co-culture during *in vitro* maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. Anim Reprod Sci. 2007 Jun;99(3-4):306-16.
- Córdova B, Morató R, Izquierdo D, Paramio T, Mogas T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the *in vitro* maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. Theriogenology. 2010 Nov;74(8):1341-8.
- Genicot G, Leroy J, Van Soom A, Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. Theriogenology. 2005;63(4):1181-94.
- Goovaerts I, Leroy J, Rizos D, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Jorssen E, Bols P. Single *in vitro* bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. 2011;76(7):1293-303
- Kidson A, Schoevers E, Langendijk P, Verheijden J, Colenbrander B, Bevers M. The effect of oviductal epithelial cell co-culture during *in vitro* maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. Theriogenology. 2003 May;59(9):1889-903.
- López A, Olivera M, Ruiz T, Tarazona A. Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos *in vitro*. Revista MVZ Córdoba, 2007. 12(2), 1061-1067.
- Moore K, Bondioli KR. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos. Biol Reprod. 1993;48(4):833-40.
- Orsi NM, Reischl JB. Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. Theriogenology. 2007;67(3):441-58.

- Pietrowski D, Gong Y, Mairhofer M, Gessele R, Sator M. Effects of progesterone and its metabolites on human granulosa cells. *Horm Metab Res.* 2014;46(2):133-7.
- Siqueira L, Barreta M, Gasperin B, Bohrer R, Oliveira J, Santos J. Gonçalves, P. Angiotensin II, progesterone, and prostaglandins are sequential steps in the pathway to bovine oocyte nuclear maturation. *Theriogenology*, 2012.1779-87.
- Torres A, Batista M, Diniz P, Mateus L, Lopes-da-costa L. Embryo–luteal cells co-culture: an *in vitro* model to evaluate steroidogenic and prostanoid bovine early embryo–maternal interactions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2013,134-146.
- Wang Z, Shulin C, Hongfei M, Yingxue W, Jinyan L, Jianbo S, Shantin Z. A simple and echonomic method of purifying dairy goat luteal cells. *Tissue and cell*, 2013. 269-74.