

## Efecto de células alimentadoras inactivadas de dos segmentos del oviducto en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos

### Effect of inactivated feeder cells of two segments of the oviduct on the *in vitro* development of bovine embryos

Gleni T. Segura<sup>1,3</sup>, Marigeidy Santiago<sup>2</sup>, Jenin V. Cortez<sup>1</sup>, Nilton L. Murga<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de células alimentadoras inactivadas (sistema *feeder layer*) provenientes de dos segmentos del oviducto bovino (istmo y ampulla) en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos. Se generaron líneas celulares de segmentos del istmo y ampulla para posteriormente ser inactivadas con mitomicina C (40 µg/ml) para inhibir su capacidad de división y eliminar la competencia por nutrientes con los embriones. Se maduraron *in vitro* ovocitos bovinos por 24 h y fueron fertilizados por 18 h en cultivo convencional con semen bovino Brangus. Los ovocitos supuestamente fertilizados fueron cultivados por siete días en el sistema *feeder layer* con células de istmo y ampulla separadamente a una concentración de  $1.44 \times 10^5$  células/ml. Se obtuvo mejores resultados de producción de embriones bovinos *in vitro* con células ampulares (280/84; 30%) en comparación con las células del istmo (278/75; 26.9%) y el grupo control (275/73; 26.5%) realizado en un sistema convencional. Se concluye que las células del oviducto pueden cumplir funciones similares a las que cumple el oviducto en el proceso *in vivo*, mejorando la producción *in vitro* de embriones.

**Palabras clave:** mitomicina C; células oviductuales; sistema con capa de alimentación; inactivación celular

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético, Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Perú

<sup>2</sup> Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza, Chachapoyas, Perú

<sup>3</sup> E-mail: glenytatty@gmail.com

Recibido: 20 de septiembre de 2018

Aceptado para publicación: 12 de febrero de 2019

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of inactivated feeder cells (feeder layer system) from two segments of the bovine oviduct (isthmus and ampulla) in the *in vitro* development of bovine embryos. Cell lines from segments of the isthmus and ampulla were generated and subsequently inactivated with mitomycin C (40 µg/ml) to inhibit their ability to divide and eliminate competition for nutrients with embryos. Bovine oocytes were matured *in vitro* for 24 h and were fertilized for 18 h in conventional culture with Brangus bovine semen. The expected fertilized oocytes were cultured for seven days in the feeder layer system with isthmus and ampulla cells separately at a concentration of  $1.44 \times 10^5$  cells/ml. The best results in the production of *in vitro* bovine embryos were obtained with ampullary cells (280/84, 30%) in comparison with the isthmus cells (278/75, 26.9%) and the control group (275/73, 26.5%) in a conventional system. It is concluded that the cells of the oviduct can fulfill functions like those that the oviduct fulfills in the *in vivo* process, improving the *in vitro* production of embryos.

**Key words:** mitomycin C; oviductual cells; feeder layer system; cellular inactivation

## INTRODUCCIÓN

El cultivo con células alimentadoras, también conocido como sistemas de *feeder layer* es una idea atractiva de cultivar embriones tempranos en una monocapa de células oviductales o células uterinas. Este concepto supone que la monocapa proporciona algún estímulo específico al desarrollo del embrión o de alguna manera regula el ambiente para el desarrollo (Ellington *et al.*, 1990). También sugiere que las células monocapa en cultivo deberían reflejar la actividad del mismo tipo de célula *in vivo* (Eyestone y First, 1989).

El uso de células alimentadoras en cultivo de embriones proporciona un estímulo para el desarrollo de los embriones, siendo los más utilizados el cultivo con vesículas extracelulares y células oviductuales (Hamdi, 2013), técnica que ha sido utilizado con células del tracto reproductivo para cultivar embriones *in vitro* no solo en bovinos sino también en ovinos (Dashti *et al.*, 2016).

Existen estudios con células alimentadoras de oviducto las cuales han sido utilizadas en ovinos y bovinos con el objetivo de mejorar el desarrollo *in vitro* de los embriones y comprender los mecanismos de apoyo que brindan las células en el desarrollo embrionario (Ellington *et al.*, 1990). El cultivo con células alimentadoras (sistema *feeder layer*) puede disminuir el estrés oxidativo a través de las funciones químicas benéficas que estas células producen (Mermillod *et al.*, 1993). Es así que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de células alimentadoras inactivadas provenientes de dos segmentos del oviducto bovino (istmo y ámpula) en el desarrollo *in vitro* de embriones bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del Estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético del Instituto en Ganadería y Biotecnología, Universidad Nacio-

nal Toribio Rodríguez de Mendoza, región Amazonas, Perú.

### Recolección del Tejido

La muestra de tejido del istmo y ampulla del oviducto se recolectó del útero de una vaca cruzada Brown Swiss x criollo, mayor a dos partos, en condición corporal 3 y con actividad reproductiva (ciclando). El útero fue retirado luego del beneficio del animal y fue colocado en un recipiente isotérmico con solución salina 0.9% y a temperatura de 35-37 °C para su transporte al laboratorio.

### Obtención de las células alimentadoras (*feeder layer*)

Los productos químicos y los medios de cultivo utilizados fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (EEUU) y los materiales de plástico desechable de Nunc (Roskilde, Dinamarca) a menos que se especifique lo contrario.

En el laboratorio se retiró el tejido conectivo de los dos segmentos. Cada extremo del oviducto fue cerrado por una sutura quirúrgica estéril. Se lavó y desinfectó con etanol cada segmento del oviducto. Se retiró la capa externa de cada segmento y la capa interna fue colocada en una placa petri dentro de la cabina de bioseguridad, donde se realizó una digestión mecánica. Luego se procedió a realizar múltiples lavados con buffer fosfato salino (PBS) y antibióticos y se sometió a digestión enzimática por 18 h en 10 ml de colagenasa (1 mg/ml en medio DMEM-F12 suplementado con 0.025 mg/ml de estreptomicina y 10% SFB) a 37 °C y con agitación orbital. Luego se agitó vigorosamente para desprender células que aún pudieran encontrarse adheridas al mismo. Se dejó reposar por 3 min y se recuperó el sobrenadante, siendo sembrado en placas petri de 35 mm estériles. El volumen del cultivo se completó a 2 ml con medio DMEM-F12 suplementado con 1 mM de glutamina, 0.2 mM de piruvato, 10 ng/ml de EGF (*epidermal growth factor*) y 30% de suero fetal bovino (SFB) y

fue puesto en una incubadora (CCL-170B-8, ESCO) de CO<sub>2</sub> a 38 °C para el desarrollo de las células.

### Congelación de las Células Alimentadoras

Cuando el crecimiento de las células llenó toda la placa de cultivo, se procedió a la identificación de aquellas placas donde las células tuvieron rápida división. Se inició el proceso de congelación donde se sacó todo el medio de cultivo de las placas con células y se lavó varias veces con PBS, luego se agregó tripsina-EDTA al 0.025% para despegar las células crecidas, y posteriormente se inactivó la tripsina adicionando DMEN F12 suplementado con 10% SFB. Cuando las células se despegaron, todo el contenido fue puesto en tubos de 15 ml y centrifugado por 489 g por 5 min; se cogió el pelet y se colocó en una placa de 60 mm en medio DMEN F12 suplementado con 10% de SFB y 8% de DMSO (dimetil sulfóxido). Luego se colocó a razón de 1 ml en viales Nalgene de 2 ml (Nalgene, Dinamarca) a una concentración de 3x10<sup>6</sup> células/ml. La congelación se llevó a cabo mediante un gradiente de -1 C°/min, empleando el sistema Mister Frosty (Nalgene, Dinamarca) en el interior de un congelador comercial de -80 °C. Luego de 4 h los viales fueron introducidos a un tanque de nitrógeno líquido (-196 °C).

### Recolección de Ovarios

Se recolectaron 20 ovarios por repetición por semana del centro de beneficio de Chachapoyas, Amazonas. Las vacas eran Brown Swiss x criollo, de dos a más partos y con condición corporal de 2.5-4.0. Los ovarios fueron transportados al laboratorio en cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% (wt/vol) con 0.025 mg/ml de estreptomicina, temperado a 35- 37 °C.

### Maduración *in vitro* de Ovocitos (MIV)

Los folículos de 2 a 6 mm fueron aspirados con aguja 18 G acoplada a una jeringa. El líquido folicular fue colectado en tubos de

15 ml y mantenido por 15 min a 37 °C para sedimentar. Para la búsqueda de los ovocitos se retiró el sedimento y se mezcló con medio de manipulación (TCM-199 suplementado con 4 mM de bicarbonato, 18 mM de Hepes, 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina).

Se seleccionaron los ovocitos en clasificación 1 y 2, que son aquellos que presentan abundantes células de cúmulos y coloración homogénea del citoplasma (Liebfried y First, 1979; Sato *et al.*, 1990). Para la maduración, se colocaron 25 ovocitos por pocillo por 24 h en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> a 38.5 °C, en medio de maduración TCM-199 suplementado con 0.2 mM de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0.01 UI/ml de hormona folículo estimulante (FSH), 0.01 UI/ml de hormona luteinizante (LH), 0.6 mM de glutamina, 10 ng/ml factor de crecimiento epidermal (EGF), 1 µg/ml de estradiol y 10% SFB (Vajta *et al.*, 2000).

#### **Fecundación *in vitro* de Ovocitos (FIV)**

Los ovocitos madurados fueron juntados en una incubadora por 18 h en una atmósfera humidificada a 38.5 °C y 5% CO<sub>2</sub> con los espermatozoides lavados, seleccionados y capacitados por el método de Percoll (Parrish *et al.*, 1995) de un toro Brangus en medio de fecundación TALP-FIV (Vajta, 2000), suplementado con 2 mM de piruvato de sodio, 50 µg/ml de gentamicina, 0.03 mg/ml de heparina y 3 mg/ml de BSA-FAF.

#### **Inactivación de Células Alimentadoras**

Las células del istmo y ampulla fueron descongeladas bajo inmersión en baño maría a 37 °C, y se esperó a tener las células al 90% de confluencia (Figura 1), para ser inactivadas mediante incubación en una atmósfera humidificada a 38.5 °C y 5% CO<sub>2</sub> con 40 µg/ml de mitomicina C (MCC) durante 5 h. Después de la inactivación, se retiró el medio que contenía las placas y las células se lavaron dos veces con PBS, para luego ser disociadas con tripsina-EDTA al 0.025%. Luego se inactivó la tripsina adi-

cionando DMEN F12 suplementado con 10% SFB.

#### **Cultivo de Células Alimentadoras Inactivadas (sistema *feeder layer*)**

Las células despegadas e inactivadas se sembraron en placas de cuatro pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), a una densidad de 1.44 x 10<sup>5</sup> células/pocillo (Gómez *et al.*, 2010) en medio DMEN F12. Pasadas las 24 h de cultivo el medio DMEN F12 fue remplazado con el medio SOF base (Vajta *et al.*, 2000) suplementado con 0.044 g/l de piruvato de sodio, 0.039 g/l de L-glutamina, 3.0 mg/ml de suero albúmina bovina (BSA-FAF), 1X de amino ácidos esenciales, 1X de amino ácidos no esenciales, 10 mg/ml de EGF, 0.1 mg/ml de ácido cítrico, 0.5 mg/ml de myo-inositol, 50 µg/ml de gentamicina y 2% de SFB.

#### **Cultivo de Cigotos en el Sistema *Feeder Layer***

Los presuntos cigotos fueron desnudados por pipeteo y colocados en las placas de cuatro pocillos que contenían las células de istmo y ampulla inactivadas en el medio de cultivo SOF mencionado anteriormente. Luego fueron incubadas a 38.5 °C, 90% de humedad y mezcla de gases (90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) en bolsas herméticas.

## RESULTADOS

Se obtuvieron 500 ovocitos clasificados como 1 y 2 por cada tratamiento, los cuales pasaron por un proceso de maduración y fecundación. La evaluación a las 48 horas no demostró diferencia significativa en el porcentaje de clivaje de embriones (Cuadro 1). No obstante, en el desarrollo *in vitro* de los embriones (Figura 2; Cuadro 2) se encontró un porcentaje mayor de blastocistos al día 7 con el uso células alimentadoras inactivadas de ampulla en la etapa de cultivo en comparación al cultivo con células alimentadoras inactivadas de istmo y con el grupo control (p<0.05).

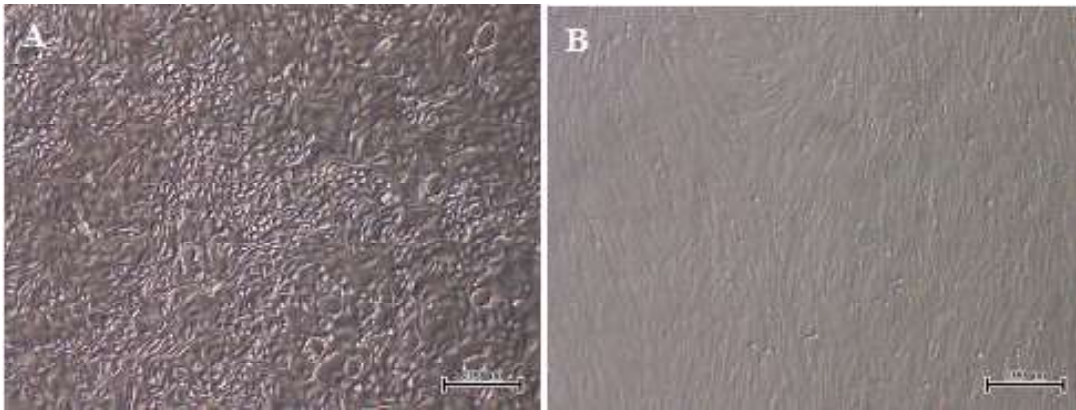


Figura 1. Cultivo *in vitro* de células alimentadoras: A) Células de ampulla crecidas; B) Células del istmo crecidas

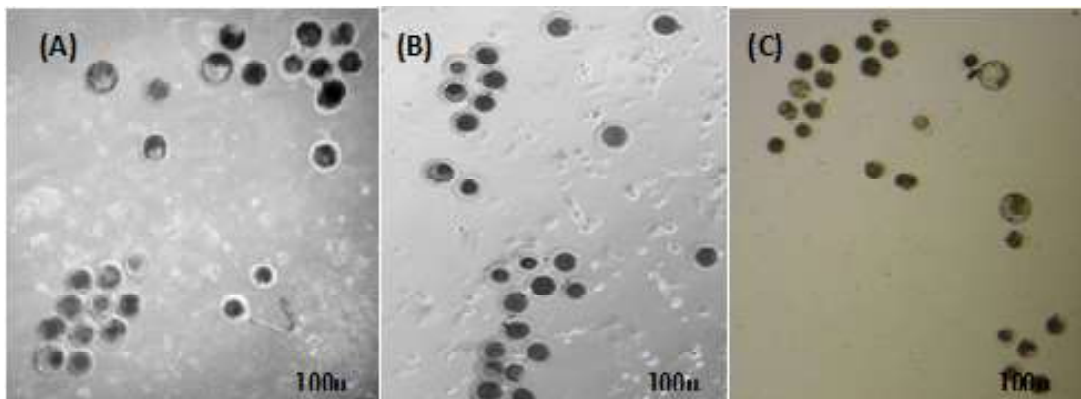


Figura 2. Blastocistos de 7 días: A) células alimentadoras de ampulla; B) células alimentadoras de istmo; C) grupo control

## DISCUSIÓN

Las células utilizadas como capa alimentadora (*feeder layer*) son unidades orgánicas que están en constante división y para lo cual consumen gran cantidad de nutrientes del medio de cultivo por lo que es muy importante utilizar un método que detenga el crecimiento de las células, pero que metabólicamente sigan activas. En el presente trabajo se utilizó mitomicina C como aditivo capaz de detener el crecimiento celular (Llames *et al.*, 2015).

Se tenía la idea de que el embrión era el único responsable de su desarrollo; sin embargo, actualmente se conoce que el ambiente que le proporciona el oviducto en el transcurso de su desarrollo tiene fundamental importancia (Watkins *et al.*, 2008), lo cual se puede observar en los resultados del estudio, donde el uso de células que forman parte de la estructura del oviducto (istmo y ampulla) han permitido obtener embriones por encima del promedio (26.5%) del control en un sistema convencional.

Cuadro 1. Clivaje de embriones *in vitro* a las 48 horas de cultivo con células alimentadoras inactivadas (istmo y ampulla del oviducto)

Grupo	Ovocitos (n)	N.º de ovocitos madurados (%)	Ovocitos fecundados (n)	Nº de clivados (%) a las 48 h
Ámpula	500	280 (56)	280	125 (44.6±1.2) <sup>a</sup>
Istmo	500	278 (55.6)	278	118 (42.4±1.1) <sup>a</sup>
Control	500	275 (55)	275	117 (42.5±1.2) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística (p<0.05)

Cuadro 2. Desarrollo *in vitro* de blastocistos bovinos en cultivo con células alimentadoras inactivadas (sistema *feeder layer*) provenientes de dos segmentos del oviducto (istmo y ampulla) (500 ovocitos)

Grupo	N.º de blastocistos (día 7) (%)
Ámpula	84 (30.0 ± 2.3) <sup>a</sup>
Istmo	75 (26.9 ± 2.2) <sup>b</sup>
Control	73 (26.5 ± 2.2) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencia estadística (p<0.05)

La aplicabilidad y beneficios que tiene el uso de células alimentadoras inactivadas en la producción de embriones *in vitro* en diversas especies es notorio. Dashti *et al.* (2016) utilizaron células alimentadoras de istmo y ampulla en su cultivo de producción de embriones *in vitro* en ovinos obteniendo mejores resultados en porcentaje de producción de blastocistos con células de istmo (45.4%) que con el uso de células de ampulla (36.6%), mientras que Hamdi (2013) no encontró diferencia al evaluar células de toda la estructura del oviducto bovino en la producción y calidad de embriones *in vitro* en bovinos. En

el presente estudio, las células alimentadoras de ampulla presentaron un mejor efecto en la producción de embriones *in vitro* en bovinos (30.0% ± 2.3) que las células del istmo (26.9% ± 2.2).

## CONCLUSIÓN

La utilización de células del ampulla del oviducto como células alimentadoras en el proceso de producción de embriones *in vitro* en bovinos aumenta el porcentaje de producción de embriones.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas por autorizar la investigación en los ambientes del Laboratorio de Biotecnología Animal Reproducción y Mejoramiento Genético.

## LITERATURA CITADA

1. **Dashti S, Shahneh AZ, Kohram H, Zhandi M, Davachi ND. 2016.** Differential influence of ovine oviduct ampullary and isthmus derived epithelial cells on *in vitro* early embryo develop-

- ment and kinetic. *Small Ruminant Res* 136: 197-201. doi: 10.1016/j.smallrum-res.2016.02.007
2. **Ellington JE, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH, Goldman EE, McGrath AB. 1990.** Development and survival after transfer of cow embryos cultured from 1-2 cells to morulae or blastocysts in rabbit oviducts or in a simple medium wit bovine oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 89: 293-299. doi: 10.1530/jrf.0.0890293
  3. **Eyestone WH, First NL. 1989.** Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* 85: 715-720. doi: 10.1530/jrf.0.0850715
  4. **Gómez MC, Serrano MA, Pope CE, Jenkins JA, Biancardi MN, López M, Dumas C, et al. 2010.** Derivation of cat embryonic stem-like cells from *in vitro*-produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells. *Theriogenology* 7: 498-515. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.05.023
  5. **Hamdi M. 2013.** Efecto de las células epiteliales del oviducto bovino y de sus vesículas extracelulares en el cultivo embrionario bovino *in vitro*. Tesis de Maestría. Valencia, España: Univ. Politécnica de Valencia. 87 p.
  6. **Liebfried L, First N. 1979.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48: 76-86. doi: 10.2527/jas1979.48176x
  7. **Llames S, García-Pérez E, Meana Á, Larcher F, del Río M. 2015.** Feeder-layer cell actions and applications. *Tissue Eng Regen Med* 21: 345-353. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0547
  8. **Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. 1993.** Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol Reprod* 49: 582-587. doi: 10.1095/biolreprod49.3.582
  9. **Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. 1995.** Effect of bovine sperm separation by swim up or percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. *Theriogenology* 44: 859-870. doi: 10.1016/0093-691X(95)-00271-9
  10. **Sato E, Matsuo M, Miyamoto H. 1990.** Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3', 5' monophosphate. *J Anim Sci* 68: 1182-1187. doi: 10.2527/1990.6841182x
  11. **Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. 2000.** New method for culture of zona-included or zona free embryosthe well-of-the-well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* 55: 256-264. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)-55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7
  12. **Watkins AJ, Papenbrock T, Fleming TP. 2008.** The preimplantation embryo: handle with care. *Semin Reprod Med* 26: 175-185. doi: 10.1055/s-2008-1042956