

29. Ciencia, Tecnología e Innovación

Cultivo *in vitro* de láminas de corteza ovárica en porcinos. Efecto del suero fetal bovino y de la hormona folículo estimulante sobre la integridad de los folículos preantrales.

Gabriel, P.¹; Cisale, H.^{1,2}; Fischman, M. L.¹; Fratto, M. C.¹; Lombardo D.¹

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). Buenos Aires, Argentina. ² CONICET-Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA). Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El cultivo *in vitro* de láminas de tejido ovárico sería un método eficaz para analizar el potencial daño criogénico sobre los folículos preantrales (FPA). El objetivo fue evaluar el efecto de distintos porcentajes de suero fetal bovino (SFB) en el medio de cultivo en presencia o ausencia de hormona folículo estimulante (FSH), sobre la morfología y morfometría de los FPA porcinos en láminas de corteza ovárica. Se utilizaron ovarios de faena (n=4). Las muestras se cultivaron 24 h a 39 °C, en cámara húmeda (5% de CO₂), en medio D-MEM, ITS (insulina 1mg/L, transferrina 0,55 mg/mL, selenio 0,5 µg/mL), glutamina 2 mM, gentamicina y anfotericina B 10 µg/mL, con SFB (0 %, 5%, 10% y 20%), en ausencia o presencia (50 ng/mL) de FSH. Se evaluaron morfológicamente cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina por microscopía de campo claro (x400). Se analizó la morfometría sobre fotos digitales obtenidas con cámara LEICA DCC-380X® (programa de captura LAS LEICA Inc ®). Se determinó el área nuclear (AN), citoplasmática (AC) y total de cada ovocito con el software Leica Qwin Plus® 3.1. Se calculó la relación de área núcleo/citoplasma (AN/AC). Se analizaron 505 FPA (Test de Friedman p<0,05). Los medios de cultivo con 0% y 5% de SFB sin FSH produjeron una reducción significativa en el porcentaje de FPA normales con respecto al control y a los restantes tratamientos. Los FPA primordiales presentaron una reducción significativa del AN y AN/AC. En presencia de FSH combinada con 20% de SFB, se observó una reducción significativa del porcentaje de FPA morfológicamente normales con respecto al control y los demás tratamientos. Se sugeriría la suplementación del medio de cultivo con 10% de SFB.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, tejido ovárico, porcino, FSH, SFB.

Introducción:

La criopreservación de láminas de tejido ovárico permite conservar gran cantidad de ovocitos contenidos en folículos preantrales (FPA) (Amorim, et al., 2013) constituyendo de este modo una herramienta fundamental para salvaguardar material genético de especies en peligro de extinción o de individuos con genotipo destacable para su especie (Agca, 2012). A diferencia de los que se encuentran en un estadio más avanzado, los ovocitos contenidos en los FPA son más resistentes al proceso de criopreservación. Esto se debe a su menor tamaño, baja tasa metabólica, ausencia tanto de zona pelúcida como de gránulos corticales y la escasa cantidad de lípidos intracitoplasmáticos sensibles al frío (Borges, Silva, & Futino, 2009). A su vez, estos ovocitos se encuentran arrestados en la profase de la primera división meiótica, lo que disminuye los riesgos de alteraciones genéticas y permite que tengan más tiempo para reparar daños no letales a nivel de organelas y otras estructuras celulares (Otkay, Newton, Aurbard, Salha, & Gosden, 1998) (Shaw, Orabratnachai, & Trouson, 2000).

La técnica de vitrificación utiliza una tasa de enfriamiento ultra rápida llevando a un estado sólido vítreo sin la formación de cristales (Fabbri, et al., 2014). Los agentes crioprotectores deben penetrar los diferentes tipos celulares que forman el tejido ovárico generando la menor cantidad de efectos tóxicos posibles (Salehnia, Sheikhi, & Pourbeiranvand, 2012). En nuestro laboratorio hemos desarrollado un protocolo de vitrificación para FPA porcinos contenidos en láminas de corteza ovárica que permitió preservar un alto porcentaje de los mismos con características morfológicamente normales (Gabriel, et al., 2012). No obstante, dichas características evaluadas inmediatamente postatemperado podrían verse modificadas si se somete a los tejidos a un cultivo *in vitro* a tiempo corto. Numerosos autores plantean la importancia de realizarlo postatemperado durante 12 o 24 h (*STTI: short term tissue incubation*) con el objetivo de permitir que se reestablezca el metabolismo celular normal (Borges, Silva, & Futino, 2009; Carvalho, et al., 2011; Salehnia, Sheikhi, & Pourbeiranvand, 2012). Por este motivo, el cultivo *in vitro* de láminas de tejido ovárico sería un método eficaz para evaluar los potenciales daños que pudieran ocasionar los agentes crioprotectores y el proceso de criopreservación sobre los FPA. La determinación de las concentraciones óptimas de SFB en presencia o ausencia de FSH en el medio es un paso fundamental para establecer un protocolo *in vitro* que permita el rescate criogénico postatemperado.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de distintos porcentajes de suero fetal bovino (SFB) en el medio de cultivo en presencia o ausencia de hormona folículo estimulante (FSH), sobre la morfología y morfometría de los folículos preantrales porcinos en láminas de corteza ovárica.

Materiales y método

Se utilizaron ovarios porcinos de faena ($n=4$), de los cuales se tomaron muestras de láminas de corteza ovárica de 5 x 2 x 1 mm. De cada ovario se obtuvieron 18 muestras, 2 para control y el resto para el cultivo *in vitro*. Los controles fueron fijados inmediatamente en solución de Bouin por 24 h. Las muestras restantes fueron cultivadas durante 24 h a 39 °C, en cámara húmeda con 5% de CO₂, en placas de cultivo de 12 pocillos. Se utilizó un medio de cultivo base compuesto por D-MEM, ITS (insulina 1mg/mL, transferrina 0,55 mg/mL, selenio 0,5 µg/mL), glutamina 2 mM, gentamicina 10 µg/mL y anfotericina B 10 µg/mL, combinado con concentraciones crecientes de SFB (0 %, 5%, 10% y 20%), en ausencia o presencia (50 ng/mL) de FSH pituitaria porcina. Transcurrido ese tiempo, las láminas fueron levantadas y fijadas de la misma manera que los controles. La evaluación morfológica se llevó a cabo sobre cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina con microscopía de campo claro (x400). Los FPA se clasificaron como normales (sin alteraciones en el ovocito o en las células de la granulosa) o anormales (con cambios degenerativos en el ovocito y/o células de la granulosa con alta picnosis o alteración del epitelio). A su vez se tomaron fotografías digitales de dichos cortes utilizando un microscopio trinocular LEICA DM4000B LED® y una cámara LEICA DCC-380X® con el soporte digital del programa de captura LAS LEICA Inc ®. Finalmente se determinó el área nuclear (AN), citoplasmática (AC) y total (AT) de cada ovocito utilizando el software Leica Qwin Plus ® versión 3.1. También se calculó la relación área nuclear/área citoplasmática (AN/AC). El análisis estadístico, sobre un total de 505 FPA, se realizó mediante el test de Friedman ($p < 0,05$).

Resultados y Discusión

El uso de un medio de cultivo con bajos porcentajes de SFB (0 y 5%) en ausencia de FSH produjo una reducción significativa en el porcentaje de FPA normales con respecto al control y a los restantes tratamientos (Primordiales: Control: 90,75%; 0%SFB: 26,19%; 5%SFB:

20,27%; 10%SFB: 69,17%; 20%SFB: 72,22%. Primarios: Control: 88,38%; 0%SFB: 4,55%; 5%SFB: 27,07%; 10%SFB: 47,52%; 20%SFB: 72,20%). En cambio, con el agregado de FSH se observó una reducción significativa del porcentaje de FPA morfológicamente normales al combinarla con 20% de SFB en comparación con el control y los demás tratamientos (Primordiales: Control: 90,75%; 0%SFB: 80,74%; 5%SFB: 82,41%; 10%SFB: 86,11%; 20%SFB: 38,34%. Primarios: Control: 88,38%; 0%SFB: 33,33%; 5%SFB: 61,34%; 10%SFB: 62,04%; 20%SFB: 23,22%). En cuanto a la localización de las lesiones, en ambos tipos de folículos, el mayor porcentaje del daño se observó en el ovocito o en el ovocito y las células de granulosa en forma conjunta. La lesión de las células de la granulosa de manera aislada fue muy poco frecuente. La mayoría de los ovocitos lesionados presentaron daño a nivel nuclear o del núcleo y del citoplasma simultáneamente. La presencia de ovocitos con lesiones exclusivamente a nivel citoplasmático fue infrecuente.

Dentro de los parámetros morfométricos evaluados, se observó una reducción significativa del área nuclear en los folículos primordiales cultivados con bajos porcentajes de SFB (0% y 5%) en ausencia de FSH en comparación con los restantes tratamientos y el control (ver Tabla 1). A su vez se observó en estos medios una reducción significativa de la relación AN/AC en los ovocitos de dichos folículos (ver Tabla 2). En los restantes parámetros evaluados no se observaron diferencias significativas en los tratamientos entre sí, ni con respecto al control.

Tabla 1

Parámetro	Tratamiento								
	Control	Sin FSH				Con FSH			
		0% SFB	5% SFB	10% SFB	20% SFB	0% SFB	5% SFB	10% SFB	20% SFB
AN Primordiales (μ ²)	450,09± 102,55	171,59± 62,79	162,14± 33,09	256,64± 64,80	384,98± 57,81	323,85± 28,29	353,96± 21,88	292,97± 69,67	192,48± 59,90
AC Primordiales (μ ²)	1233,09 ± 140,19	694,76± 215,39	837,07± 167,55	832,80± 176,48	970,91± 93,52	1118,89± 164,85	1255,82± 218,29	1010,92± 295,98	664,17± 175,63
AN Primarios (μ ²)	384,88± 37,60	138,35± 42,20	201,91± 64,93	307,23± 78,17	254,85± 40,73	245,2± 66,35	353,21± 22,61	342,14± 67,12	230,82± 103,88
AC Primarios (μ ²)	1323,14± 104,72	1110,37± 223,56	680,1± 72,61	1314,21± 342,88	796,49± 170,88	912,45± 317,37	1404,21± 227,46	1302,15± 292,85	1223,56± 370,72

Valores promedio y error estándar de AC y AN de ovocitos pertenecientes a folículos primordiales y primarios cultivados en los diferentes medios

Tabla 2

Parametros	Tratamiento								
	Sin FSH					Con FSH			
	Control	S/SFB	5% SFB	10% SFB	20% SFB	S/SFB	5% SFB	10% SFB	20% SFB
Primordiales AN/AC (μ^2)	0,38 ± 0,1	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,41 ± 0,08	0,31 ± 0,06	0,31 ± 0,05	0,30 ± 0,06	0,26 ± 0,08
Primarios AN/AC (μ^2)	0,3 ± 0,04	0,18 ± 0,07	0,3 ± 0,07	0,36 ± 0,06	0,4 ± 0,09	0,31 ± 0,04	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,06

Valores promedio y error estándar de relación AC/AN de ovocitos pertenecientes a folículos primordiales cultivados en los diferentes medios.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo coincidirían con los obtenidos por estudios recientes que han demostrado la presencia de receptores para FSH en ovocitos de folículos primordiales porcinos, permitiendo plantear la existencia de un efecto directo de esta hormona en dicho estadio folicular (Almeida, et al., 2014). En cabras, los sistemas de cultivo que contienen FSH, mantienen la integridad de la ultraestructura folicular y promueven su desarrollo (Magalhães-Padilha, et al., 2012; Matos, et al., 2007). Además, esta hormona parecería ser un factor de supervivencia folicular ya que, en su ausencia, los folículos entran en atresia (Wu & Qi, 2000). Estudios en cerdos mostraron que la FSH induce el crecimiento de ovocitos de folículos preantrales a su tamaño completo y a una mayor velocidad (Wu & Qi, 2000) (Hirao, Nagai, Kubo, Miyano, & Kato, 1994). En presencia de altas concentraciones de SFB, la respuesta de las células proliferantes a la FSH podría bloquearse (Picton, Harris, Muruvi, & Chambers, 2008). Esto justificaría la obtención de un menor porcentaje de FPA morfológicamente normales al cultivarlos en medio con 20% de SFB en presencia de FSH. El suero contiene proteínas, aminoácidos, carbohidratos, hormonas, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular que promueven la adhesión y proliferación celular. La albúmina contenida en el mismo promovería el equilibrio osmótico, captando además moléculas y metales que podrían actuar como fuente de radicales libres del oxígeno (Picton, Harris, Muruvi, & Chambers, 2008). Por este motivo, la presencia de SFB en el medio de cultivo estimularía el metabolismo celular y disminuiría el daño potencial por estrés oxidativo y osmótico.

Conclusiones

Los resultados obtenidos, al igual que los de los trabajos mencionados anteriormente, muestran la importancia de suplementar adecuadamente el medio de cultivo. La ausencia de factores como el SFB y la FSH disminuiría de manera significativa el porcentaje de FPA morfológicamente normales. El daño morfológico observado estaría acompañado de una reducción significativa del área nuclear y la relación AN/AC en los ovocitos cultivados en

dicho medio. Por este motivo se sugeriría la suplementación del medio de cultivo con 10% de SFB. Se espera que un cultivo más prolongado permita evidenciar de forma más evidente el efecto de la FSH en el medio.

Bibliografía

- Agca, Y. (2012). Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. *Theriogenology*, 78, 1653-1665.
- Almeida, A., Magalhães-Padilha, D., Araújo, V., Costa, S., Chaves, R., Lopes, C., . . . Figueiredo, J. (2014). Almeida A. P.; Magalhães-Padilha D.M. ; Araújo V.R.; Costa S.L.; Chaves R.N.; Lopes C.A. Effect of sequential medium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on in vitro development of goat preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 32-38.
- Amorim, C., Jacobs, S., Devireddy, J., Van Langendonck, A., Vanacker, J., Jaeger, V., . . . Dolmans, M. (2013). Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. *Human Reproduction*, 28(8), 2146-2156.
- Borges, E., Silva, R., & Futino, D. (2009). Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. *Cryobiology*, 59, 195-200.
- Carvalho, A., Faustino, L., Silva, G., Castro, S., HKM., L., Rosetto, R., . . . Costa, A. (2011). Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*, 76(5), 993-994.
- Fabbri, R., Vicenti, R., Macciocca, M., Paquinelli, G., Paradisi, R., Battaglia, C., . . . Venturoli, S. (2014). Good Preservation of Stromal Cells and no Apoptosis in Human Ovarian Tissue after Vitrification. *BioMed Research International*, 2014, 1-7.
- Gabriel, P., Torres, P., Boviez, J., Cisale, H., Lombardo, D., & Fischman, M. (2012). Vitrificación de tejido ovárico porcino: efecto de diferentes agentes crioprotectores en la preservación de la morfología de folículos preantales. *InVet*, 14(1), 45-56.
- Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., & Kato, S. (1994). In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Reproduction Fertil*, 333-339.
- Magalhães-Padilha, D., Andrade, P., Sales, E., Araujo, V., Lima, I., Castro, S., . . . Figueiredo, J. (2012). Effect of sequential medium on in vitro culture of goat ovarian cortical tissue. *Animal Reproduction*, 159-168.
- Matos, M., Lima-Verde, I., Bruno, J., Lopes, C., Martins, F., Santos, K., . . . Figueiredo, J. (2007). Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reprod Fertil Dev*.

- Otkay, K., Newton, H., Aurbard, Y., Salha, O., & Gosden, R. (1998). Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: An emerging technology? *Fertil. Steril.*, 354, 1-7.
- Picton, H., Harris, S., Muruvi, W., & Chambers, E. (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, 136, 703-715.
- Salehnia, M., Sheikhi, M., & Pourbeiranvand, S. (2012). Apoptosis of human ovarian tissue is not increased by either vitrification or rapid cooling. *Reproductive BioMedicine Online*, 25, 492-499.
- Shaw, J., Orabratnachai, A., & Trouson, A. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53, 59-72.
- Tian, T., Zhao, g., Han, D., Zhu, K., Chen, D., Zhang, Z., . . . Zhou, P. (2015). Effects of vitrification cryopreservation on follicular morphology and stress relaxation behaviors of human ovarian tissues: sucrose versus trehalose as the non-permeable protective agent. *Human Reproduction*, 30(4), 877-883.
- Wu, J., & Qi, T. (2000). Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. *Zygote*, 59-72.

Financiamiento

Este trabajo se realizó con el aporte de la Universidad de Buenos Aires, subsidio 20020130100648_BA (Programación UBACyT 2011-2014) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2012-0725.