



## SISTEMA *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA RECEPTIVIDAD UTERINA BOVINA.

**Villalba, Lucia**

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Directora: Stassi, Antonela F.  
Codirectora: Baravalle, Ma. Eugenia.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *in vitro*, bovinos, células inmunes.

### INTRODUCCIÓN

Los problemas relacionados con la disminución de la eficiencia reproductiva en los sistemas de producción ganaderos tienen causas multifactoriales como la nutrición, el manejo, las deficiencias en detección de celo, estrés calórico, entre otros. En efecto, la infertilidad o subfertilidad observada en los rodeos se debe a la reducción de las tasas de concepción en cada servicio. El conocimiento de la anatomía y fisiología reproductiva de la vaca es un requisito indispensable para lograr un manejo eficiente de la reproducción (Cattaneo, 2016). Estudios previos concuerdan en que la mayoría de las pérdidas embrionarias ocurren principalmente entre la primera y tercera semana de preñez y son raramente detectadas. En bovinos, hasta el 40% de las pérdidas embrionarias totales ocurren entre los días 8 y 17 de preñez, lo que indica que la mortalidad temprana es la principal causa de falla reproductiva y tiene enormes implicancias económicas, siendo aún más prevalente en vacas de alta producción.

En bovinos, el embrión permanece en el oviducto durante aproximadamente 3-4 días postconcepción (pc), y entra en el útero aproximadamente en la etapa temprana de mórula, con 16 células (Hackett y col., 1993; Spencer y col., 2013). Varios estudios han determinado la interacción inmunológica entre el embrión y el endometrio en los bovinos después de la eclosión del embrión (12-13 días pc), durante el reconocimiento materno de la preñez (16 días pc) y durante el período periimplantatorio (18-19 días pc) (Walker y col., 2010; Forde y col., 2011; Mansouri-Attia y col., 2012; Oliveira y col., 2013; Kamat y col., 2016). Sin embargo, existen pocos reportes que se centren en la respuesta inmune uterina

**Título del proyecto:** "Células inmunes residentes y moléculas de adhesión celular del endometrio pospartal bovino".

**Instrumento:** ANPCyT-PICT-2020-SERIEA-03403 (2022-2025).

**Año convocatoria:** 2020.

**Organismo financiador:** Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

**Director/a:** Velázquez, Melisa María del Luján.



Federación  
Universitaria  
del Litoral

100



UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL LITORAL

preimplantacional, particularmente durante el período desde la llegada de la mórula al útero (5 días pc) hasta la eclosión del blastocisto (9 días pc). Es conocido que las células del estroma endometrial bovino cumplen roles en la inmunidad innata y tienen la capacidad de iniciar respuestas inflamatorias (Turner y col., 2014). Estas células están estrechamente conectadas con células propias del sistema inmune, como por ejemplo los macrófagos. La relación y comunicación intercelular entre las células del estroma y macrófagos ha sido ampliamente estudiada *in vitro* (Lebovic y col., 2004; Wang y col., 2014, 2015; Chan y col., 2017). Además, en humanos, se ha prestado especial atención a la acción de los macrófagos en las enfermedades endometriales por su capacidad de interacción con las células del endometrio (Loh y col., 1999; Yang y col., 2006, 2017; Tong y col., 2016; Mei y col., 2014, 2017; Gu y col., 2018). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado en profundidad la relación entre las células del epitelio endometrial y los macrófagos.

## OBJETIVOS

**a.** Desarrollar un sistema *in vitro* de cultivo de células endometriales bovinas, que permita evaluar modificaciones en la receptividad uterina. **b.** Desarrollar un sistema de co-cultivo de células endometriales con macrófagos bovinos, que permita evaluar el impacto de estas células inmunes en la receptividad uterina.

## METODOLOGÍA

### Animales y diseño experimental.

Se obtuvieron de un frigorífico local tractos reproductores de vacas no preñadas, en ausencia de anomalías reproductivas y sin signos de inflamación, que fueron transportados inmediatamente al laboratorio y se emplearon en los ensayos *in vitro*. Para la selección de úteros en fase lútea, se siguieron los criterios descritos por Swangchan-Uthai y col. (2012) y Oguejiyor y col. (2015) en lo que refiere a apariencia y tamaño del cuerpo lúteo en ovarios.

### Toma y procesamiento de muestras.

**Objetivo a.** Para el desarrollo de un sistema *in vitro* de cultivo de células endometriales bovinas, a los úteros seleccionados se les realizó 1 lavado con alcohol 70° para reducir la carga bacteriana, seguido de 2 lavados con solución fisiológica a 37°C. Luego, dentro del flujo laminar, se obtuvieron 4 porciones pequeñas de endometrio de aproximadamente 1cm x 1 cm x 1mm (ancho x largo x profundidad) de las regiones intercarunculares. Estas porciones fueron lavadas con PBS-ATB y luego se disgregaron con bisturí, seguido de una digestión enzimática. Para ello, se colocó el homogeneizado celular junto a 1ml de colagenasa y 4,5ml de medio de cultivo base (MCB - DMEM F-12, transferrina 2 ng/ml, selenito 1µg/ml, antibiótico-antimicótico 1x) en un tubo de 15 ml y se incubó 18h a 37°C. Al día siguiente, el tejido se tamizó con filtros de 70µm para células en condiciones de esterilidad. Luego de centrifugar y resuspender el pellet en 5 mL de MCB suplementado con SFB al 10%, se realizó el recuento celular y la evaluación de viabilidad, por medio de una dilución en Azul de Tripán (Biopack) y utilizando la cámara de Neubauer.

Para la evaluación y caracterización de las células endometriales bovinas, se realizaron citoespines fijando por centrifugación las células recuperadas a un portaobjeto. Dichos citoespines se utilizaron para evaluar la morfología de las células cultivadas utilizando la tinción May Grunwald-Giemsa (MGG), y por inmunocitoquímica (ICQ) se determinó la presencia de células epiteliales y estromales en el cultivo mixto. A su vez, se verificó la especificidad de los anticuerpos utilizados en la ICQ mediante la técnica de inmunohistoquímica, corroborando las poblaciones inmunomarcadas. Asimismo, las células del cultivo mixto del sistema *in vitro* aisladas fueron identificadas y cuantificadas mediante citometría de flujo (Attune, NxT, LifeTechnology) como células epiteliales y estromales a través de la marcación con

anticuerpos anti-citoqueratina conjugado a alexa fluor 750 y anti-vimentina conjugado a alexa fluor 680, respectivamente.

Una vez que las células endometriales son obtenidas mediante el método descrito, se siembran en placas de 12 pocillos ( $1 \times 10^6$ /pocillo) para usarse posteriormente en el co-cultivo con macrófagos bovinos y/o ensayos posteriores.

**Objetivo b.** Para el sistema de co-cultivo de estas células endometriales se realizó el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica bovina, y a partir de éstas se purificaron macrófagos bovinos. Para ello se diluyó 10 ml de sangre con 10 mL de PBS 1X estéril. Luego se colocaron 3 ml de Ficoll-Hypaque (FH) en tubos de 15 ml y se agregó lentamente 9 ml de la sangre diluida. Se centrifugaron 20 min a 1800 rpm, luego se retiró 5 ml de plasma con micropipeta y suavemente se recogió la capa anteada (células mononucleares) y se colocó en tubos de 15 ml con 5ml de PBS 1X estéril para lavar las células. Se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante por inversión. Se resuspendió el pellet en 5 ml de PBS 1X estéril. Se repitió el lavado, centrifugación y se resuspendió el pellet en medio de cultivo BoMac (RPMI, glutamina 2mM, antibiótico-antimicótico 1x, suero fetal bovino 10%). Se ensayaron dos concentraciones celulares diferentes a sembrar en un frasco T de 5 ml:  $20 \times 10^6$  y  $30 \times 10^6$  células/frasco. El cultivo de células mononucleares se incubó 12 h a  $37^\circ\text{C}$  - 5% de  $\text{CO}_2$  en estufa humidificada. Esta incubación favorece la adherencia de los monocitos sembrados a la superficie del frasco T. Luego de las 12 h, se descartó el medio de cultivo, se hicieron 2 lavados con PBS 1X estéril para eliminar las células no adheridas, detritos celulares y glóbulos rojos, y se colocaron 5 ml en medio de cultivo BoMac para continuar con el cultivo a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  en estufa humidificada. Se continuó con los lavados y el cambio de medio cada 48 h, hasta llegar al día 6 de cultivo donde las células se cosecharon de la superficie utilizando scrapper y se colocaron sobre portaobjetos mediante citocentrifugación (citospines, Cyto-Tek-Sakura). Se recuperaron muy pocas células de los frascos T sembrados ( $4 \times 10^6$  -  $6 \times 10^6$  células/ml). Sin embargo, al microscopio observamos mayor cantidad de células adheridas a la superficie del frasco cuando menor fue la concentración celular inicial sembrada. Estos resultados nos permiten inferir que las células mononucleares se adhieren mejor y en mayor cantidad cuando se siembran en concentraciones menores.

Para la evaluación y caracterización de los macrófagos bovinos, una vez cosechados luego de los 6 días de cultivo, fueron citocentrifugados sobre portaobjetos. Los citospines obtenidos se utilizaron para determinar el porcentaje de pureza del cultivo al día 6 y evaluar la morfología de los presuntos macrófagos por medio de la tinción de May-Grünwald Giemsa. Se observó que la morfología de las células provenientes del cultivo *in vitro* corresponde a macrófagos (células grandes, núcleos con cromatina laxa y citoplasma vacuolado).

## CONCLUSIONES

Se logró poner a punto el cultivo primario mixto de células endometriales bovinas, el éxito del mismo fue corroborado mediante los métodos que se detallan a continuación:

- ♦ Mediante inmunocitoquímica se corroboró la presencia de células epiteliales y estromales en el cultivo primario mixto de células endometriales bovinas.
- ♦ Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células epiteliales (30% aproximadamente) y de células estromales (70% aproximadamente).

Por otro lado, actualmente se tienen puesto a punto por separado los cultivos primarios de células endometriales y de macrófagos bovinos, por lo que son necesarios ensayos posteriores para lograr eficientemente el co-cultivo y poder utilizarlos en ensayos subsiguientes. En relación al cultivo de monocitos a partir de sangre periférica, se corroboró que la morfología de las células cultivadas *in vitro* a los 6 días, corresponde en un alto porcentaje de pureza a macrófagos.



## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Cattaneo L.** 2016. Determinación de perfiles hormonales e impacto económico de enfermedades reproductivas de origen ovárico que afectan la eficiencia productiva en vacas lecheras. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza. Argentina.
- **Chan RWS, Lee CL, Ng EHY, Yeung WSB.** 2017. Co-culture with macrophages enhances the clonogenic and invasion activity of endometriotic stromal cells. *Cell Prolif* 50(3), e12330..
- **Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, OGaora P, Roche JF, Lonergan P.** 2011. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol Reprod* 85, 144–156.
- **Gu S, Ni T, Wang J, Liu Y, Fan Q, Wang Y, Huang T, Yiwei Chu Y, Sun X, Wang Y.** 2018. CD47 Blockade Inhibits Tumor Progression through Promoting Phagocytosis of Tumor Cells by M2 Polarized Macrophages in Endometrial Cancer. *J Immunology Res*, 1–12.
- **Kamat MM, Vasudevan S, Maalouf SA, Townson DH, Pate JL, Ott TL.** 2016. Changes in myeloid lineage cells in the uterus and peripheral blood of dairy heifers during early pregnancy. *Biol Reprod* 95, 68.
- **Lebovic DI, Chao VA, Taylor RN.** 2004. Peritoneal Macrophages Induce RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) Chemokine Gene Transcription in Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89(3), 1397–1401.
- **Loh FH, Bongso A, Fong CY, Koh DR, Lee SH, Zhao HQ.** 1999. Effects of peritoneal macrophages from women with endometriosis on endometrial cellular proliferation in an in vitro co-culture model. *Fertil Steril* 72(3), 533–538.
- **Mansouri-Attia N, Oliveira LJ, Forde N, Fahey AG, Browne JA, Roche JF, Sandra O, Reinaud P, Lonergan P, Fair T.** 2012. Pivotal role for Monocytes/Macrophages and dendritic cells in maternal immune response to the developing embryo in Cattle. *Biol Reprod* 87, 1–12.
- **Mei J, Chang KK, Sun HX.** 2017. Immunosuppressive macrophages induced by IDO1 promote the growth of endometrial stromal cells in endometriosis. *Mol Med Rep* 15(4), 2255– 2260.
- **Mei J, Xie XX, Li MQ, Wei CY, Jin LP, Li DJ, Zhu XY.** 2014. Indoleamine 2, 3-dioxygenase- 1 (IDO1) in human endometrial stromal cells induces macrophage tolerance through interleukin-33 in the progression of endometriosis. *Int J Clin Exp Pathol* 7(6), 2743-2757.
- **Oguejiofor CF, Cheng Z, Abudureyimu A, Fouladi-Nashta AA, Wathes DC.** 2015. Global transcriptomic profiling of bovine endometrial immune response in vitro. I. Effect of lipopolysaccharide on innate immunity. *Biol Reprod* 93, 100.
- **Spencer TE, Forde N, Dorniak P, Hansen TR, Romero JJ, Lonergan P.** 2013. Conceptus derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction* 146, 377–387.
- **Swangchan-Uthai T, Lavender CR, Cheng Z, Fouladi-Nashta AA, Wathes DC.** 2012. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biol Reprod* 87, 135.
- **Turner ML, Cronin JG, Healey GD, Sheldon IM.** 2014. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. *Endocrinology* 155, 1453- 1465.
- **Walker CG, Meier S, Littlejohn MD, Lehnert K, Roche JR, Mitchell MD.** 2010. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics* 11, 474.
- **Wang Y, Chen H, Wang N, Guo H, Fu Y, Xue S, Ai A, Lyu Q, Kuang Y.** 2015 Combined 17 $\beta$ -Estradiol with TCDD Promotes M2 Polarization of Macrophages in the Endometriotic Milieu with Aid of the Interaction between Endometrial Stromal Cells and Macrophages. *PLoS ONE* 10(5), e0125559.
- **Wang Y, Fu Y, Xue S, Ai A, Chen H, Lyu Q, Kuang Y.** 2014 The M2 polarization of macrophage induced by fractalkine in the endometriotic milieu enhances invasiveness of endometrial stromal cells. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 194–203.
- **Yang HL, Zhou WJ, Chang KK, Mei J, Huang LQ, Wang MY, Meng Y, Ha SY, Li DJ, Li MQ.** 2017. The crosstalk between endometrial stromal cells and macrophages impairs cytotoxicity of NK cells in endometriosis by secreting IL-10 and TGF- $\beta$ . *Reproduction* 154(6), 815–825.
- **Yang JH, Wu MY, Chang DY, Chang CH, Yang YS, Ho HN.** 2006. Increased Interleukin-6 Messenger RNA Expression in Macrophage-Cocultured Endometrial Stromal Cells in Adenomyosis. *American J Reprod Immunol* 55(3), 181–187.