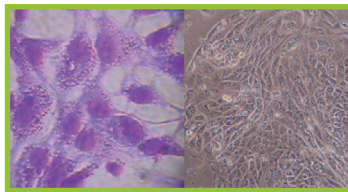


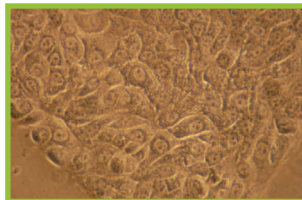
Capítulo 3

Cultivo de células del tracto reproductivo de la hembra bovina

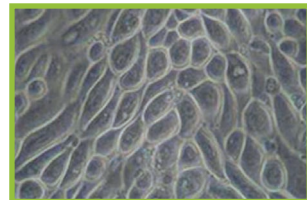
Autores: Ángela Patricia López Cardona, Ariel Marcel Tarazona Morales, Carlos Andrés Giraldo Echeverri Yasser Yohan Lenis Sanín, Carolina Mesa Pineda y Martha Olivera Ángel.



Células de la granulosa bovina



Células oviductales bovinas



Células epiteliales endometriales bovinas

El estudio de la fisiología reproductiva de la hembra bovina ha sido una importante área de desempeño del Grupo de Investigación Biogénesis. Las características geográficas y climáticas del contexto colombiano han permitido establecer ganados *Bos indicus*, sus cruces con *Bos taurus* y el ganado criollo colombiano, con un comportamiento reproductivo propio del trópico y con algunas particularidades si se compara con los reportes de los países con estaciones. Con la implementación de la ultrasonografía transrectal, fue posible describir las dinámicas foliculares de las vacas, principalmente del ganado cebuino y blanco orejinegro. Luego comenzamos a enfatizar la línea de investigación en torno al anestro posparto —un momento crítico para los ganaderos desde el punto de vista de eficiencia económica.

Una vez logramos realizar importantes aproximaciones a la fisiología de esta etapa, como la caracterización de las ondas foliculares durante el ciclo estral y durante el anestro posparto, el papel del manejo del amamantamiento en el acortamiento del período abierto, la relación de la condición corporal con el reinicio de la actividad reproductiva posparto, el papel del cuerpo lúteo y la producción de progesterona en el reconocimiento materno embrionario, nuevas preguntas fueron surgiendo como interesantes hipótesis asociadas con nutrición (leptina y ácidos grasos), fisiología endometrial (prostaglandinas e interferón tau) y fisiología ovárica (luteinización), lo cual nos llevó a estandarizar cultivos primarios de las células asociadas a estos fenómenos.

A continuación se presentan los protocolos para el cultivo de células de la granulosa y su proceso de luteinización, de células endometriales y células oviductales. La bibliografía asociada con los experimentos para el uso de estas líneas con respecto a procesos fisiológicos, como luteinización, luteólisis, reconocimiento materno embrionario y cocultivo con embriones, se encuentra al final de este capítulo.

Procedimientos para el cultivo de células de granulosa bovina

Toma de muestras: recolección de ovarios

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para recolectar y transportar ovarios desde la planta de beneficio hasta el laboratorio.
- **Materiales:** Termo de boca ancha, tijeras curvas, guantes de látex, termómetro y bolsas resellables.
- **Indumentaria:** Trabajo en planta de beneficio para toma de muestras (ver capítulo 1).
- **Medio:** 500 ml de solución salina (NaCl 0,9%) (ver capítulo 2).



Procedimiento:

- Llenar $\frac{3}{4}$ partes del termo con hielo para mantener una temperatura de 4°C durante la recolección.
- Verter 100 ml de solución salina (NaCl 0,9%) en una bolsa resellable, e introducirla en el termo.
- Recolectar los ovarios del tracto reproductivo con tijeras curvas (ver figura 3.1). Retirar la mayor cantidad de tejido posible dejando solo el ovario; lavarlos con agua fría y depositarlos dentro de la bolsa. Cerrar y tapar el termo. Repetir este paso hasta obtener la cantidad deseada de ovarios.
- Al finalizar la colecta, sacar del termo la bolsa con los ovarios, y retirar con cuidado la solución salina sucia.
- Lavar dos veces los ovarios con 100 ml de solución salina limpia atemperada a 4°C , para retirar la mayor cantidad de sangre posible.
- Verter 200 ml de solución salina atemperada a 4°C (suficiente para cubrir los ovarios), cerrar muy bien la bolsa asegurándose de que quede la menor cantidad de aire posible, y que no haya escapes.
- Cambiar el hielo del termo e introducir la bolsa con los ovarios ya lavados. Verificar la temperatura y la hora de salida, cerrar muy bien el termo y transportar los ovarios hasta el laboratorio.

Nota: El tiempo máximo desde el inicio de la recolección de ovarios hasta la llegada al laboratorio no debe superar las tres horas.



Figura 3.1. Separación de ovario del tracto reproductivo.

Obtención de células de la granulosa bovina

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para obtener células de la granulosa bovina.
- **Materiales:** Gradilla para tubos cónicos, tubos cónicos de 15 ml, jeringas de 10 ml, jeringas de 5 o 10 ml de tres piezas, gasa, agujas hipodérmicas de 18 Gx11/2.
- **Medios:** Solución salina buferada fosfatada pH 7,3 (PBS) y medio para cultivo de células de granulosa (ver capítulo 2).
- **Equipos:** Centrífuga, incubadora de CO₂, micropipetas de 100 µl y 1000 µl, y vórtex.

Procedimiento:

- Para la obtención de fluido folicular (FF), refiérase al procedimiento “Aspiración ovárica” (ver capítulo 5).
- Centrifugar los tubos de cónicos de 15 ml con el FF aspirado a 290 gravedades por cinco minutos.
- Realizar dos lavados con PBS, de la siguiente manera: retirar el FF sin retirar el pellet celular del fondo del tubo, adicionar 10 ml de PBS atemperado a 37°C, resuspender el pellet celular y centrifugar nuevamente a 290 gravedades por cinco minutos (repetir este paso).
- Para finalizar el lavado, retirar el PBS del segundo lavado y adicionar 10 ml de medio de cultivo para células de granulosa atemperado a 37°C, y centrifugar nuevamente a 290 gravedades por cinco minutos.
- Después de la última centrifugación, retirar la mayor cantidad de medio posible y resuspender el pellet celular en 5 ml de medio nuevo (ver figura 3.2).

Cultivo de células de la granulosa bovina

- **Propósito:** Indicar los procedimientos para el cultivo de células de la granulosa bovina.
- **Materiales:** Cajas de 24 pozos, pinzas con garra estériles, laminillas redondas estériles, tubos para microcentrífuga de 0,2 ml, 0,5 ml y 1,5 ml.
- **Medios:** Medio para cultivo de células de granulosa (ver capítulo 2), ácido acético glaciado (3%)
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, incubadora de CO₂, cámara de Neubauer, vórtex, microscopio óptico, micropipetas de 100 µl y 1000 µl.

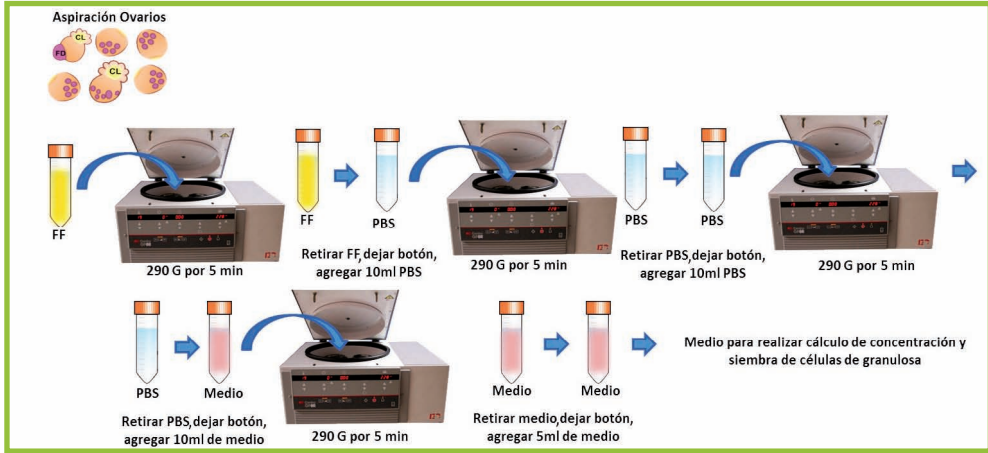


Figura 3.2. Diagrama para la obtención de células de granulosa bovinas.

Procedimiento:

Nota: Es necesario determinar la concentración celular en cámara de Neubauer (procedimiento similar al conteo de células espermáticas en el capítulo 4), y realizar la dilución de células con ácido acético glacial (para lisar los glóbulos rojos y evitar contarlos), de la siguiente manera: a) homogenizar por vórtex los 5 ml de medio que contienen las células de granulosa recuperadas durante 30 segundos; b) tomar un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml y adicionar 10 μ l del medio de cultivo donde se encuentran resuspendidas las células de la granulosa más 190 μ l de ácido acético glacial al 3%; c) cargar cada microcámara con 10 μ l de la dilución anterior y realizar el conteo. El promedio de ambas cámaras se debe multiplicar por $5 \times 10 \times 1000 \times 20$ (factor de dilución). El valor final será expresado en millones de células por ml de medio de cultivo recuperado en la última centrifugación.

- Marcar la caja de 24 pozos con la fecha, el código del cultivo de células de granulosa bovinas y el nombre del responsable, asegurándose de abrirla sólo dentro de la cabina de flujo laminar.

Es recomendable colocar una laminilla redonda estéril en el fondo de cada pozo para que las células se adhieran a ella, y luego se puedan retirar para análisis de morfología.

- Calcular la siembra para una concentración final de 3.000.000 células/ml. De acuerdo a la concentración hallada en la cámara de Neubauer, añade el volumen necesario para completar 1000 μ l por pozo. Al momento de sembrar en los pozos, tener en cuenta el siguiente orden: adicionar primero el medio para ajustar el volumen, y luego el volumen de medio con las células. Homogenizar delicadamente por pipeteo.

- Incubar a 37,5°C, 5% de CO₂, y humedad relativa del 90%.

Nota: El tiempo máximo desde el inicio del procedimiento hasta la incubación no debe superar las seis horas.

- Realizar cambio total de medio a las 48 horas.

Las células permanecen por 96 horas en cultivo. Cada 24 horas se debe evaluar el aspecto morfológico de las células en el microscopio invertido. Aproximadamente durante las primeras 48 horas de cultivo, la morfología de las células de granulosa es redondeada, ellas flotan en el medio de cultivo (ver figura 3.3), y su esteroidogénesis es hacia la producción de estrógenos. Luego ocurren cambios tanto morfológicos (células fibroblastoides, adheridas a la placa) como funcionales (esteroidogénesis hacia producción de progesterona), que indican que las células están iniciando un proceso de luteinización *in vitro*, por tanto, se debe hablar de células de granulosa luteinizadas entre las 48 y 96 horas de cultivo.

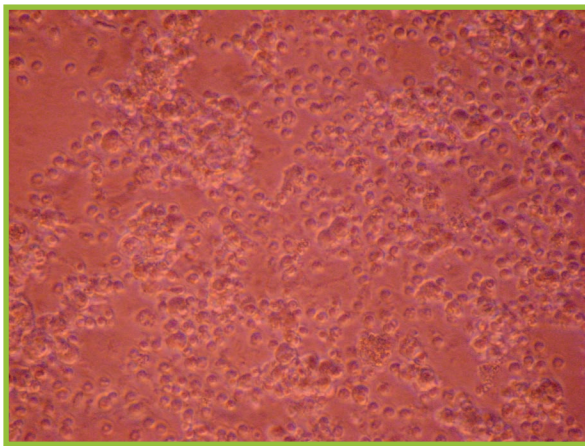


Figura 3.3. Células de granulosa en cultivo a las 0 horas.

Características del cultivo de células de granulosa bovinas

- **Propósito:** Indicar las características del cultivo de células de granulosa bovinas y los cambios de morfología durante el cultivo.
- **Materiales:** Cajas de cultivo de 24 pozos.
- **Equipos:** Incubadora de CO₂, microscopio óptico y microscopio invertido de contraste de fase.
- **Descripción:** Las laminillas redondas del fondo del plato se retiran y se realizan las tinciones para morfología colocándolas sobre una lámina portaobjetos. Entre



las 12 y las 24 horas de cultivo, las células comienzan el proceso de adherencia al plato de cultivo (ver figura 3.4 A), además, se observan pequeños grupos de células que comienzan a unirse (ver figura 3.4 B). A partir de las 48 horas, la granulosidad de las células en su citoplasma es evidente con coloración de hematoxilina/eosina (de allí su nombre) (ver figura 3.4. C). Después de 72 horas de cultivo es evidente el alargamiento del citoplasma, lo que caracteriza el inicio de la formación de la monocapa, la cual ocupa la totalidad del plato de cultivo a las 96 horas (ver figuras 3.4 D y E), y puede ser evaluada con microscopía de contraste de fase para observar las viabilidad del cultivo horas (ver figuras 3.4 F y G).

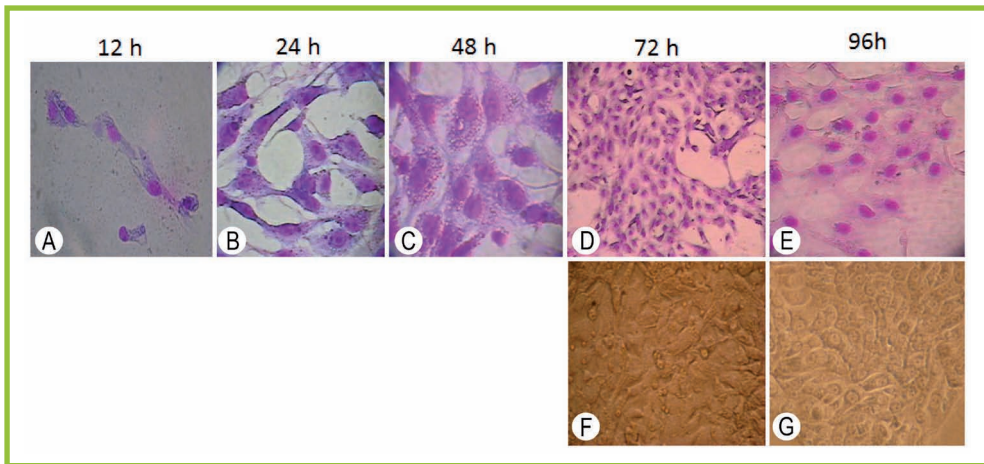


Figura 3.4. Morfología y cinética de las células de la granulosa bovina en cultivo a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas. A-E: Tinción de hematoxilina/eosina, F-G: evaluación de monocapas de granulosa. A: inicio de adherencia al plato de cultivo; B: agrupación de células de la granulosa; C: gránulos en el citoplasma; D-E: formación de monocapa; F-G: evaluación de viabilidad del cultivo en microscopio de contraste de fases.

Procedimientos para el cultivo de células de oviducto bovinas

Toma de muestras: Recolección de oviductos

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para recolectar y transportar oviductos bovinos desde la planta de beneficio hasta el laboratorio.
- **Materiales:** Termo de boca ancha, tijeras curvas estériles, guantes de nitrilo estériles, termómetro, tubos cónicos de 50 ml, hielo.
- **Indumentaria:** Planta de beneficio local para toma de muestras (ver capítulo 1).
- **Medios:** 500 ml de solución salina (NaCl 0,9%) (ver capítulo 2).

Procedimiento:

- Llenar un tubo cónico de 50 ml con 15 ml de solución salina (NaCl 0,9%), atemperada a 4°C en el termo con hielo.
- Seleccionar úteros de animales con condición corporal mayor de 3,0 (en escala de 1,0 a 5,0). No incluya úteros gestantes. En caso de que el cultivo de células oviductales sea para realizar cocultivo con embriones, es preferible colectarlas de tractos que presenten un ovario o con folículo preovulatorio (terciario) o cuerpo hemorrágico.
- Separar el oviducto cortando con las tijeras estériles 5 cm antes de la unión útero-tubal (istmo), continuando por todo el mesosalpinx y la bolsa ovárica, y teniendo la precaución de incluir el menor tejido adiposo posible (ver figura 3.5 B). Puede dejar incluido el ovario que corresponde a cada oviducto, en caso de necesitarlos para otros cultivos (ver figura 3.5 C).
- Depositar en el tubo los oviductos con solución salina, y procurar que siempre se encuentren sumergidos en esta.
- Transportar el tubo con los oviductos en el termo con hielo a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

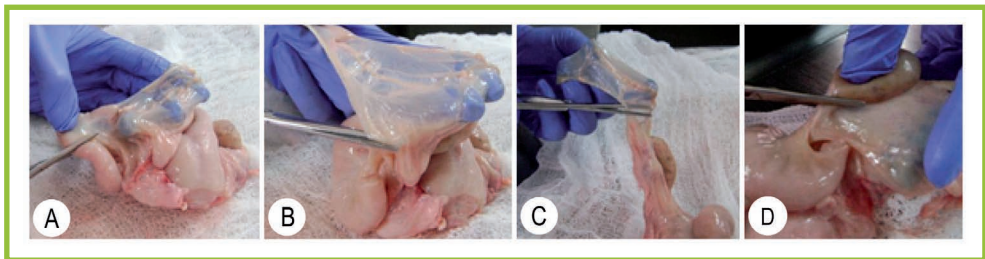


Figura 3.5. Separación de oviductos de piezas reproductivas bovinas. A. Ubicación del oviducto y del mesosalpinx, corte en la unión útero-tubárica; B-C. Corte del mesosalpinx con el oviducto; D. Corte del ovario.

Recuperación de fluido oviductal

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada de obtener fluido oviductal con presencia de células epiteliales bovinas para cultivo celular.
- **Materiales:** Tijeras de disección estériles, pinzas estériles, cuchillas de bisturí estériles, láminas portaobjetos estériles, cajas de Petri de 60 y 100 mm estériles, tubos cónicos de 15 ml estériles, gasa estéril y micropipetas de 10, 100 y 1000 μ l.
- **Medios:** 500 ml de solución salina (NaCl 0,9%) estéril, HEPES, medio de cultivo de células oviductales (ver capítulo 2).



Procedimiento:

- Retirar la solución salina de transporte del tubo cónico y lavar los oviductos tres veces con solución salina estéril a temperatura ambiente.
- En cabina de flujo laminar, colocar el oviducto sobre una gasa estéril exponiendo el oviducto. Retirar cuidadosamente el mesosalpinx con la ayuda de pinzas y una cuchilla de bisturí, sin cortar el oviducto (ver figuras 3.6 A y B).
- Secar el oviducto disectado con gasa estéril (ver figura 3.6 C).
- Remover 3 cm del extremo del ápice del cuerno uterino y 3 cm del extremo ovárico (fimbrias), dejando solo el ampulla y el istmo (ver figura 3.6 D y E).
- Colocar el oviducto sobre una caja de Petri de 100 mm, la mitad de su longitud en la caja, y la otra mitad en la tapa (ver figura 3.6 F).
- Realizar raspado con una lámina portaobjetos estéril, formando un ángulo de 30° y haciendo presión desde el extremo útero-tubárico hacia el extremo ovárico. Tratar de realizar la mayor parte de manipulación en la caja (no en la tapa) para disminuir el riesgo de contaminación del botón de células que se recuperan (ver figura 3.6 G y H).
- Retirar el oviducto de la caja de Petri. Tomar con una micropipeta de 1000 µl el pellet celular de aspecto denso y color amarillo. Pasar el pellet a una caja de Petri de 35 mm estéril, con 3 ml de medio HEPES, y resuspender el pellet celular. Por último, pasar el pellet a un tubo cónico de 15 ml estéril con 10 ml de medio de lavado HEPES, aatemperado a 37°C (ver figura 3.6 A y B).
- Dejar que las células se sedimenten por gravedad durante 5 min (se pueden obtener entre 0,1 ml a 1 ml de células por cada oviducto procesado).
- Aspirar y descartar el sobrenadante, dejar solo el pellet compuesto por cúmulos grandes de células. Resuspender el pellet con 10 ml de medio HEPES y dejar decantar 5 min.
- Descartar el sobrenadante y adicionar 5 ml de medio HEPES, aspirar suavemente con una jeringa de 5 ml y aguja de 25Gx5/8. Realizar tres pases de las células por la jeringa para separar los cúmulos más grandes.
- Dejar decantar durante 5 min.
- Retirar el sobrenadante y adicionar 10 ml de medio de cultivo de células oviductales aatemperado a 37°C y resuspender.

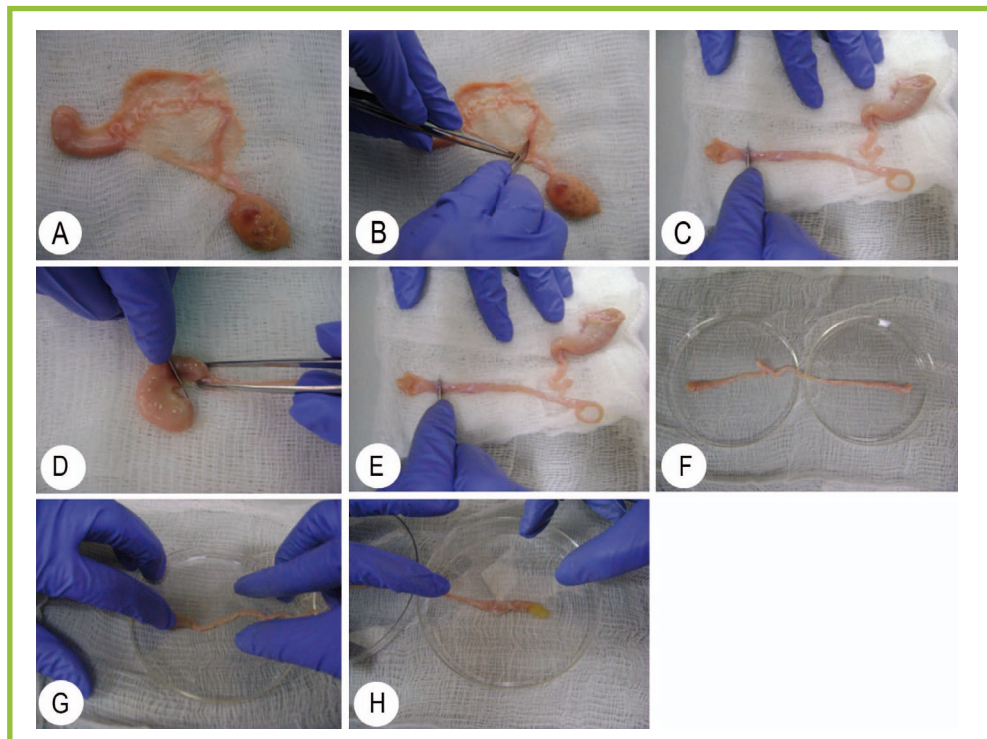


Figura 3.6. A-B-C. Corte de tejido sobrante; D-E. Corte en unión ovárica y útero-tubárica; F-G-H. Raspado de oviducto

Siembra de células oviductales

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para la siembra y cultivo de células oviductales bovinas.
- **Materiales:** Caja para cultivo celular de 24 pozos, micropipetas de 10, 100 y 1000 μl .
- **Equipos:** Estereoscopio, cabina de flujo laminar, incubadora de CO_2 , microscopio invertido de contraste de fase.
- **Medios:** Medio de lavado HEPES, medio de cultivo de células oviductales (ver capítulo 2).

Procedimiento:

- Marcar la caja de siembra (24 pozos) con la fecha y el nombre del cultivo. Abrirla solo en la cabina de flujo laminar.
- Colocar en cada pozo 1 ml de medio de cultivo de células oviductales.



- En cada pozo, sembrar 10 μl del último medio resuspendido con las células (ver figura 3.7).
- Incubar bajo ambiente controlado, a 37,5°C, 5% de CO_2 y humedad relativa del 90%.
- Verificar en microscopio de contraste de fase antes de llevar a la incubadora, la presencia de movimiento ciliar como signo de viabilidad celular (ver figura 3.8, y el enlace http://www.youtube.com/watch?v=I0zx7iRWxS4&feature=player_embedded).
- Revisar cada 24 horas el estado del cultivo, observar los cambios morfológicos del cultivo, y si hay presencia de pozos contaminados, retirarlos.

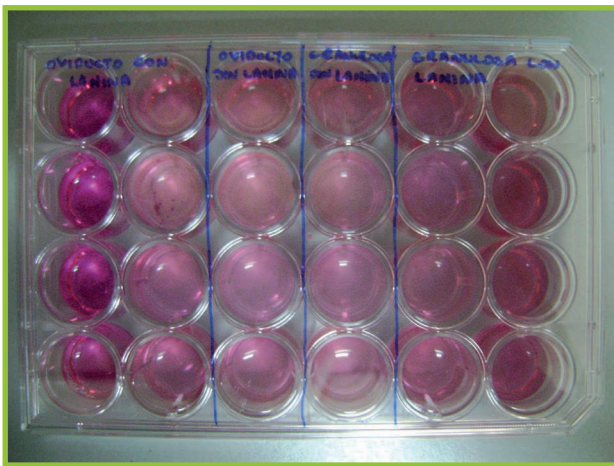


Figura 3.7. Cultivo de células de oviducto.

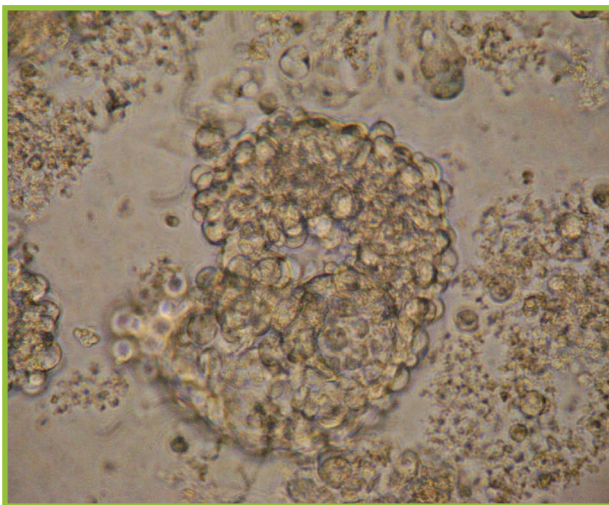


Figura 3.8. Verificación de viabilidad celular en microscopio.

Evaluación morfológica de cultivo de células oviductales

- **Propósito:** Identificar la morfología característica de las células oviductales bovinas durante su cultivo *in vitro*.
- **Materiales:** Micropipetas de 10, 100 y 1000 μl , láminas portaobjetos y laminillas cubreobjeto.
- **Medios:** Solución de Giemsa (ver capítulo 2).
- **Equipos:** Microscopio invertido de contraste de fases, microscopio óptico.

Procedimiento:

- Tomar 10 μl del último medio resuspendido después de los lavados y realizar un extendido en una lámina portaobjetos.
- Dejar secar al aire.
- Fijar en metanol al 96% por 10 min.
- Aplicar la solución con el colorante Giemsa sobre la lámina portaobjeto, cubriéndola completamente. Dejar actuar por 20 min.
- Lavar suavemente con agua corriente.
- Dejar secar al aire y evaluar al microscopio óptico en objetivo de 40 y 100X.

Evaluación al día cero y uno:

En el epitelio oviductal es importante identificar las células secretoras y las células ciliadas, tanto en su forma simple (ver figura 3.9), como los agregados celulares (ver figura 3.10), los cuales se pueden observar en el medio en suspensión o precipitados en el pozo de cultivo. Según el día de cultivo, ambos tipos celulares forman estructuras diferenciales en el cultivo.

Evaluación al día tres:

Revisar las células cada 24 horas permite identificar contaminaciones y observar los cambios de morfología. El día tres de cultivo se debe observar, en los agregados celulares en suspensión, un movimiento ciliar activo de las células ciliadas y, en el fondo del pozo, el inicio de la adherencia por parte de las células secretoras que comienzan a formar monocapa (ver figura 3.11)

Evaluación entre los días cinco y ocho:

El día cinco de cultivo, las células alcanzan la confluencia tapizando el fondo del pozo, y los agregados de células en suspensión continúan con la presencia de movimiento de forma muy activa. Para el día ocho se puede observar el alargamiento de las células que forman la monocapa, y el movimiento ciliar sigue presente como signo de viabilidad del cultivo (ver figura 3.12, y el enlace <http://www.youtube.com/watch?v=nOtnfAG8STc>).

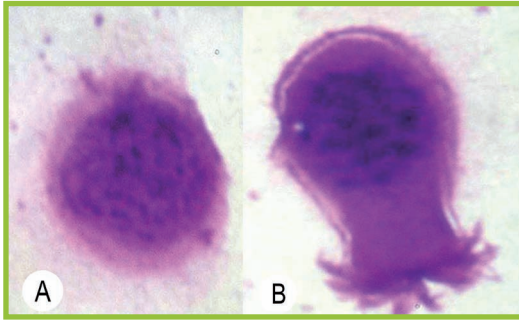


Figura 3.9. Morfología celular al día del aislamiento. Tinción de Giemsa. A. Célula secretora del epitelio oviductal; B. Célula ciliada del epitelio oviductal.

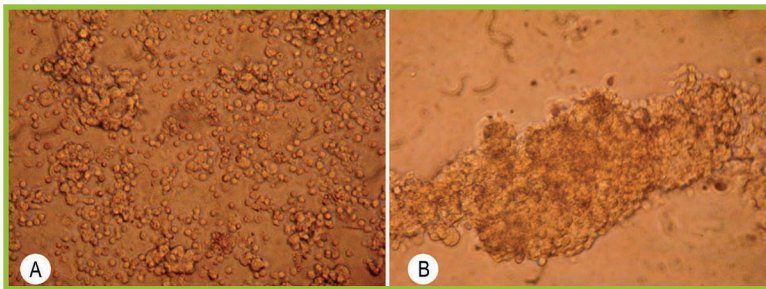


Figura 3.10. Primer día de cultivo. A: agregados de células precipitados; B: agregado de células en suspensión.

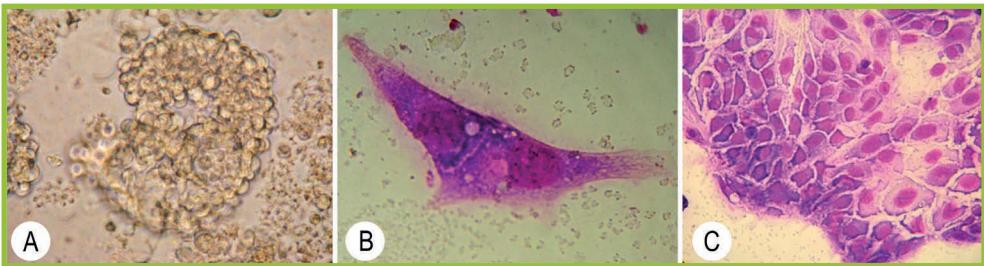


Figura 3.11. Día tres de cultivo. A: agregado de células oviductales en suspensión; B: adherencia de células epiteliales oviductales al fondo de la caja; C: inicio de formación de monocapa de células de epitelio oviductal. Tinción de Giemsa.

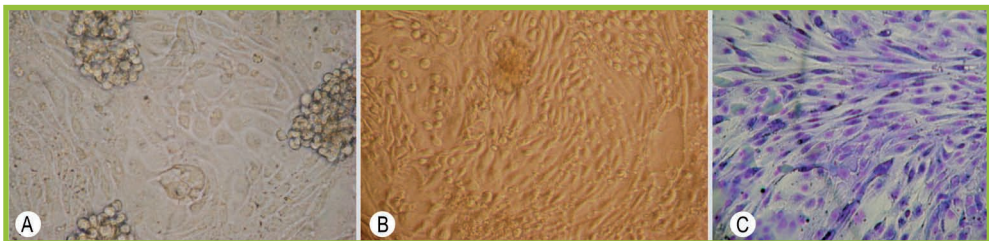


Figura 3.12. Morfología de las células oviductales en cultivo. A: ambos tipos celulares al día cinco; B: ambos tipos celulares al día ocho; C: monocapa al día ocho. Tinción de Giemsa.

Indicaciones para cocultivo de embriones

- **Propósito:** Identificar la forma adecuada de utilizar cúmulos de células oviductales en el sistema de cocultivo con embriones bovinos.
- **Materiales:** Micropipetas de 10 μ l.
- **Medios:** Cultivo celular y medio de desarrollo CR1 AA de trabajo (ver capítulo 2).
- **Equipos:** Estereoscopio.

Procedimiento:

- El cultivo de células de oviducto se inicia el mismo día de la maduración de los oocitos; así, el tercer día coincide con el momento en el cual los presuntos cigotos inician la etapa de cultivo.
- Veinte minutos antes del momento de cultivo de los presuntos cigotos, se sacan las cajas de cultivo celular y se evalúan aquellos pozos que tengan células con movimiento ciliar activo y que no presenten contaminación.
- Seleccionar colonias celulares con movimiento celular activo y someterlas a tres lavados en gotas de 50 μ l de medio de cultivo celular y una gota final de 100 μ l de medio CR1 AA, antes de colocarlos con los embriones.
- Sacar la caja de cultivo de embriones previamente preparada, y colocar diez agregados por cada embrión que se vaya a poner en cultivo.
- Realizar los procedimientos de cultivo de embriones in vitro (ver capítulo 5) y colocarlos en la caja previamente preparada con los agregados celulares de oviducto. Llevar a la incubadora bajo las condiciones utilizadas para embriones (ver figura 3.13).

Procedimientos para aislamiento y cultivo primario de células endometriales epiteliales bovinas (CEEP)

Toma de muestras: recolección de úteros

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para la selección, recolección y transporte de úteros desde la planta de beneficio hasta el laboratorio.
- **Materiales:** Nevera de poliestireno expandido (icopor), pilas de frío, tijeras estériles, guantes estériles, bolsas resellables, overol, botas, casco y gorro blanco.
- **Indumentaria:** planta de beneficio local para toma de muestras (ver capítulo 1)
- **Medios:** 1000 ml de solución salina (NaCl 0,9%) (ver capítulo 2).

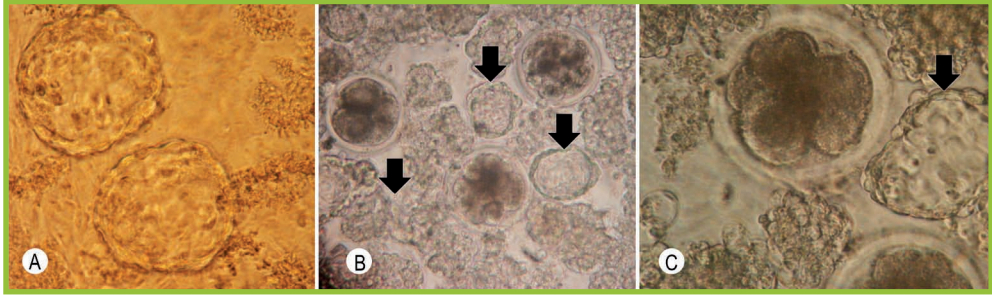


Figura 3.13. Cocultivo de células oviductales y embriones.

A. agregados de células oviductales seleccionados; B y C. embriones en cocultivo. Las flechas muestran los agregados de células oviductales. Microscopio invertido.

Procedimiento:

- Poner las pilas de frío en la nevera de poliestireno expandido para garantizar una temperatura aproximada de 4°C. Adicionar solución salina en la bolsa resellable e introducirla en la nevera, procurando en todo momento mantenerla cerrada para evitar un aumento de temperatura.
- No incluir úteros grávidos dentro del material recolectado, ya que es frecuente la presencia de preñeces, no detectables al tacto, en el momento de seleccionarlos (ver figura 3.14 A). Tener en cuenta la actividad de los ovarios, seleccionar los que tengan cuerpo lúteo y folículos, y no retirar los ovarios hasta llegar al laboratorio (ver figura 3.14 B).
- Retirar con cuidado el tejido circundante (mesometrio, ligamento ancho, etc.), para no ocupar mucho espacio en la bolsa, y depositar los úteros dentro de esta con solución salina. Cerrar la bolsa.
- Depositar la bolsa en la nevera y tapar. Repetir este proceso para cada útero.
- Finalizada la recolección, retirar con cuidado la solución salina sucia y lavar dos veces los úteros con solución salina limpia para extraer la mayor cantidad de sangre posible.
- Adicionar la cantidad suficiente de solución salina limpia para cubrir los úteros, sellar las bolsas y asegurarse de que quede la menor cantidad de aire posible.
- Verificar la hora de salida, cerrar muy bien la nevera y transportarla lo más pronto posible al laboratorio.

Nota: El tiempo máximo desde el inicio de la recolección de úteros hasta llegar al laboratorio no debe superar las dos horas.



Figura 3.14 A. Útero con preñez temprano (no apto para recolección); B. Útero apto para cultivo de CEEP.

Preparación de úteros para aislamiento de CEEP

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para el procesamiento de los úteros en el laboratorio antes de realizar el aislamiento de CEEP.
- **Materiales:** Cedazo metálico, tijeras estériles, guantes estériles, gasas estériles.
- **Medios:** 1000 ml de solución salina (NaCl 0,9%), 700 ml de solución salina yodada (ver capítulo 2), alcohol al 70% y clorexidina.

Procedimiento:

- Al momento de llegar al laboratorio, verificar la hora.
- Depositar los úteros en el cedazo metálico.
- Lavar los úteros con 500 ml de solución salina. Retirar la mayor cantidad de sangre posible y desinfectar su parte externa con 500 ml de solución salina yodada (2%) (ver figura 3.15).

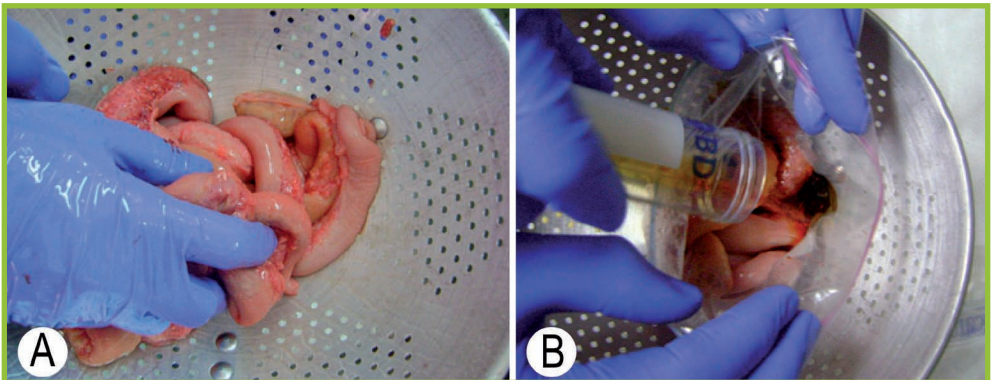


Figura 3.15. Lavado de úteros bovinos provenientes de matadero. A: Con solución salina; B: Con solución yodada.



- Retirar con cuidado el tejido conectivo (mesoovario, mesosalpinx y mesometrio) circundante con tijeras estériles y la mayor parte de tejido vascular sin exponer el endometrio (ver figura 3.16).
- Descartar aquellos úteros que presenten material purulento, material sanguinolento, petequias, u otros signos de inflamación o lesión.

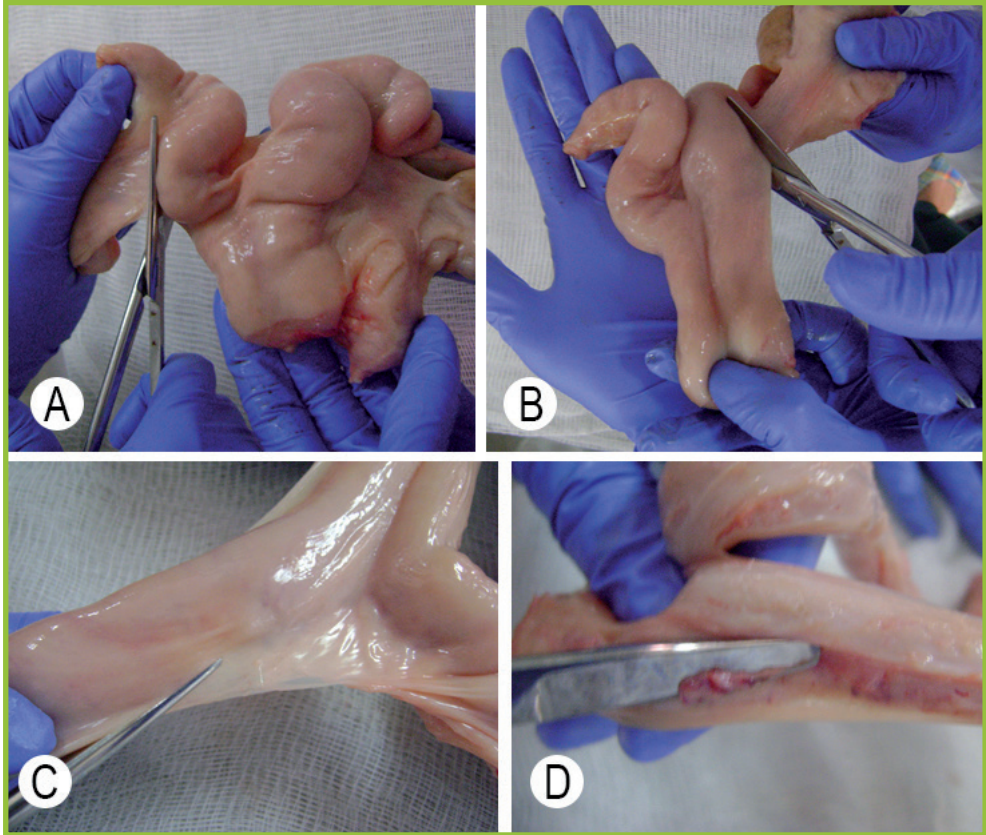


Figura 3.16. Preparación del útero. A-B. Tejido conectivo; C. Ligamento intercornual; D. Tejido vascular.

- f) Lavar externamente con alcohol al 70% el material resultante.
- g) Realizar otro lavado externo con solución salina yodada (2%).
- h) Extender una gasa estéril sobre una superficie plana, previamente desinfectada, y ubicar los úteros allí.
- i) Con unas tijeras estériles, realizar un corte desde el cuerpo del útero hasta la parte apical del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo (ver figura 3.17).

- j) Exponer el endometrio en forma cuidadosa, lavar dos veces con 25 ml de clorhexidina, frotar suavemente el tejido y retirar la mayor cantidad de moco.
- k) Lavar rápidamente con solución salina para evitar residuos de clorhexidina.
- l) Descartar los úteros que presenten alteraciones en el endometrio, que puedan alterar la viabilidad de las células epiteliales.

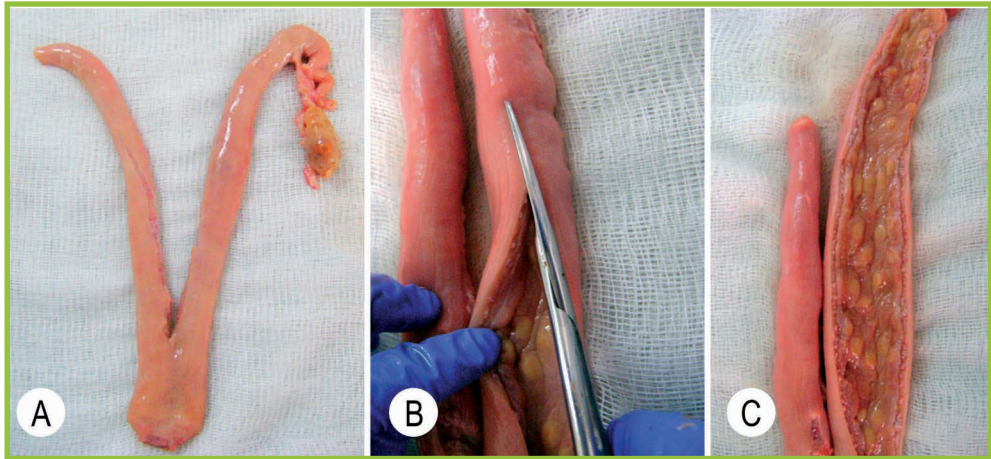


Figura 3.17. Preparación del útero. A: la flecha indica el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo; B: inicio del corte desde el cuerpo del útero; C: finalización del corte en la parte apical del cuerno uterino. La flecha indica el aspecto morfológico ideal del endometrio para el aislamiento de las CEEP.

Aislamiento mecánico de CEEP

- **Propósito:** Indicar el procedimiento adecuado para el aislamiento mecánico de CEEP.
- **Materiales:** Úteros con endometrio expuesto previamente lavados y desinfectados, gasa estéril, cuchillas de bisturí estériles, cajas Petri de 60 mm, tubos cónicos de 15 ml estériles, gradilla y marcador.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipetas de 100 y 1000 μ l, puntas para micropipeta de 100 y 1000 μ l estériles, centrífuga.
- **Medios:** Hank's Balance Salt Solution (HBSS) y RPMI suplementados (ver capítulo 2).

Procedimiento:

- Desinfectar todas las superficies de la cabina de flujo laminar y tener listos todos los materiales requeridos, para agilizar el proceso.
- Adicionar, en una caja Petri de 60 mm, 3 ml de HBSS suplementado.



- Poner los úteros sobre una capa de gasa con el endometrio hacia arriba, procurando que este no esté en contacto con ninguna superficie (ver figura 3.18 A).
- Con la cuchilla de bisturí, hacer un raspado de la superficie del tejido de forma suave y longitudinal. Comenzar desde el extremo apical del cuerno hacia el cuerpo del útero, de forma unidireccional y sin repetir en el mismo punto el raspado, para evitar la presencia de células estromales o sanguíneas (ver figura 3.18 A). Recorrer de esta manera todo el endometrio. Una vez finalice el raspado zonal, introducir la cuchilla en la caja Petri, previamente preparada, y realizar un movimiento firme para desprender las células de la cuchilla (ver figura 3.18 B).
- Depositar el contenido de la caja Petri en un tubo cónico de 15 ml (ver figura 3.18 C).
- Centrifugar tres veces a 2500 RPM por cinco minutos (ver figura 3.18 D). Tener en cuenta que se debe cambiar el HBSS (las primeras dos veces) y resuspender el botón cada vez que se centrifugue. Luego de la última centrifugación, cambiar el HBSS por RPMI.

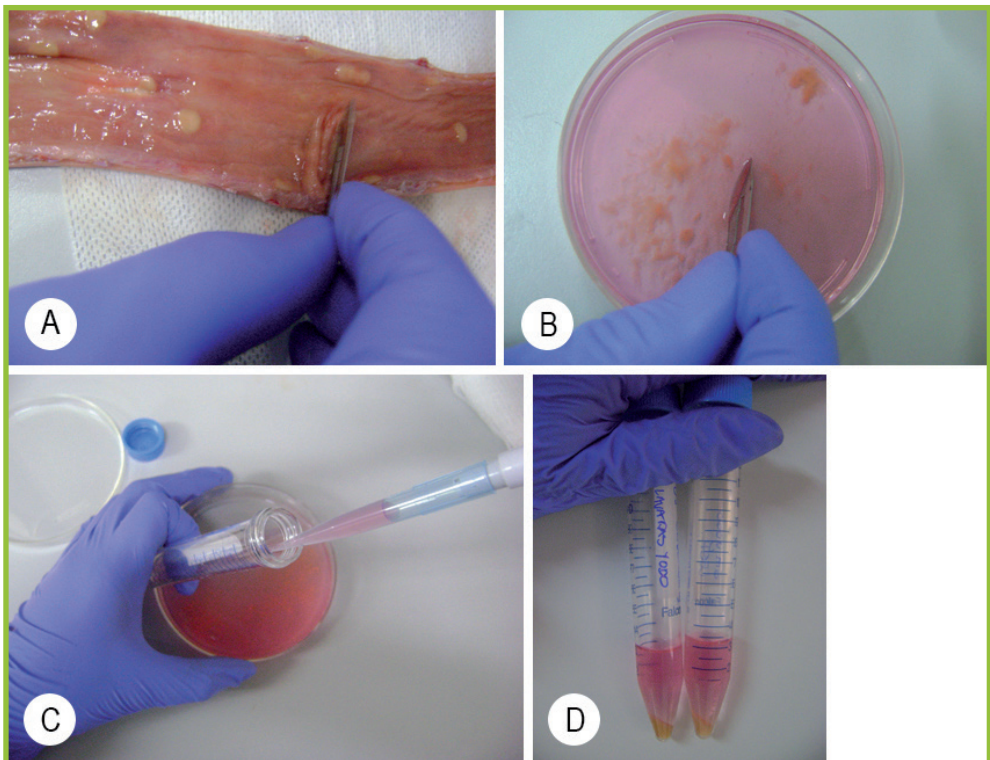


Figura 3.18. Aislamiento de CEEP. A. Raspado del endometrio; B. Disposición de material recuperado del endometrio en el medio de lavado; C. Recolección del material para centrifugación; D. Material resultante después de centrifugar.

Cultivo de CEEP

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada de realizar el cultivo primario de CEEP.
- **Materiales:** Cajas de 24 pozos, puntas para micropipeta de 100 y 1000 μ l estériles.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, micropipetas de 100 y 1000 μ l, incubadora, microscopio invertido, cámara de Neubauer.
- **Medios:** Medio para cultivo de CEEP (ver capítulo 2).

Recuento de CEEP: después de la centrifugación, homogenizar nuevamente el contenido para obtener 5 μ l del tubo cónico de 15 ml, para ser diluido en 95 μ l de agua dentro de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, para un volumen final de 100 μ l (dilución 1:20). Guardar el resto del contenido en la incubadora. Poner 10 μ l de la dilución en cada celda de la cámara de Neubauer, previamente preparada, y realizar conteo (ver capítulo 5).

Marcar la caja (24 pozos) con la fecha, el nombre del biotipo celular (CEEP) y el responsable, asegurándose de abrirla solamente en la cabina de flujo laminar (ver figura 3.19).

- Calcular la siembra para una concentración final de 600.000 células /ml.
- Incubar a 37,5°C, 5% de CO₂ y humedad relativa del 90%.
- Realizar el cambio de medio de cultivo cada 48 horas, inclinando la caja de cultivo en un ángulo aproximado de 45°. Retirar solo 800 μ l de cada pozo y reponer el mismo volumen de medio RPMI suplementado.



Figura 3.19. Caja de cultivo lista para ser introducida en la incubadora.



Características de las CEEP a los dos, cuatro y seis días de cultivo

- Las células, una vez sembradas, no experimentan ningún cambio morfológico aparente hasta el día dos o tres.
- Al día cinco o seis, las células inician la formación de pseudópodos irregulares y se adhieren al piso del plato.
- La aproximación celular inicia más o menos a las 12 horas de cultivo, y logra una confluencia aproximadamente del 90% al día 14 (ver figura 3.20).

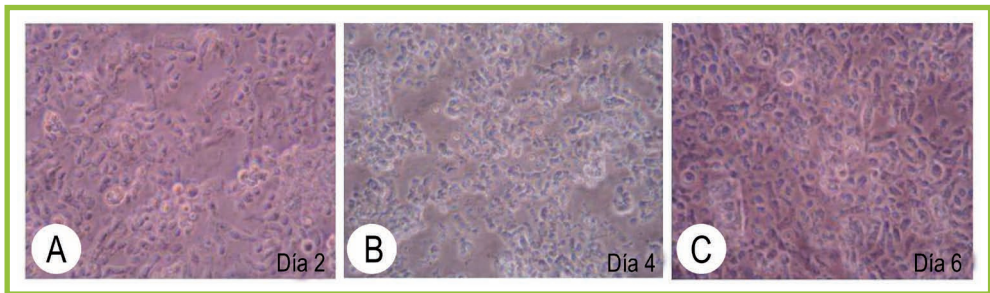


Figura 3.20. Cinética y dinámica de cultivo de las CEEP en cultivo primario. Las CEEP no presentan cambios aparentes hasta el día cuatro a cinco, cuando inician el proceso de adhesión por zonas. Obsérvese que en los días dos, cuatro y seis, más del 90% de las células presentan morfología irregular.

Características de las CEEP a los ocho, doce y catorce días de cultivo

Las CEEP presentan una morfología cuboidal, columnar o piramidal (ver figura 3.21).

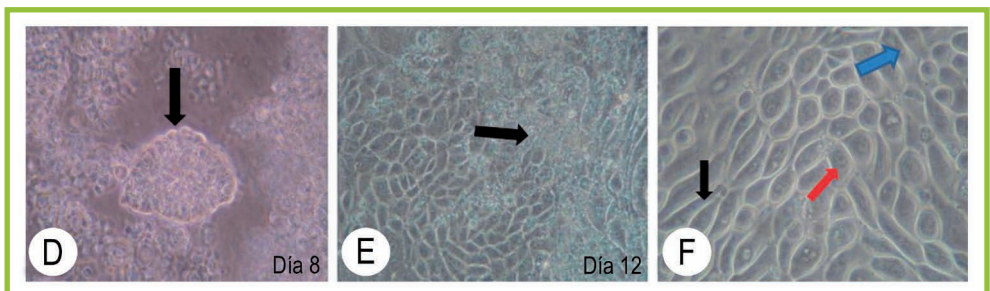


Figura 3.21. Cinética y dinámica de las CEEP en cultivo primario a los días 8, 12 y 14. A. Las células inician la formación de islotes o botones celulares organizados al día 8 de cultivo; B. El día 12 aumentan la confluencia; C. El día 14 alcanzan una confluencia de aproximadamente el 90%. En la figura se observan las células flotantes. Las flechas de colores muestran: azul, células con morfología columnar; negra, morfología piramidal; roja, morfología cuboidal.

La senescencia celular, o muerte celular, hasta el día 10 de cultivo, puede ser evaluada indirectamente por el porcentaje de células flotantes en el pozo. Las células con senescencia, o muertas, se dispondrán en la superficie del pozo (células flotantes).

Si el porcentaje de células flotantes supera el 80%, de la superficie del pozo, se sugiere repetir el proceso.



Bibliografía recomendada

- Angulo J. et al (2005). Efecto de la suplementación con grasa sobrepasante, sobre algunos parámetros reproductivos de vacas de carne. *Rev Col Cienc Pec* 18(4): 353.
- Arosh J, Banu S, Chapdelaine P, Emond V, Kim J, MacLaren L, Fortier M (2003), Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy, *Endocrinology* 7, 3076-3091.
- Arosh J, Banu S, Kimmins S, Chapdelaine P, Maclaren L, Fortier M (2004), Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2, *Endocrinology* 11, 5280-2593.
- Asselin E, Bazer F, Fortier M (1997), Recombinant ovine and bovine interferons tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells, *Biol Reprod* 2, 402-408 (b).
- Asselin E, Goff A, Bergeron H, Fortier M (1996), Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium, *Biol Reprod* 2, 371-379.
- Asselin E, Lacroix D, Fortier M (1997), IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro, *Mol Cell Endocrinol*, 1-2,117-126 (a).
- Bedoya J, Penagos F, Lenis Y, Olivera M, Tarazona A (2009), Cinética de la luteólisis funcional en un modelo de cuerpo lúteo in vitro, *Revista Colombiana de Ciencias Pecunarias*, 22:3 568-569.
- Castillo J et al (1997) Reactivación ovárica en vacas cebú Brahman con relación al peso y la condición corporal. *Rev Col Cienc Pec* 10(1): 12-18.
- Fortier M, Guilbault L, Grasso F (1988), Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows, *J Reprod Fertil* 1, 239-248.
- Giraldo CA et al (2005). Interrupción temporal del amamantamiento (ITA) en vacas Cebú y su efecto en la función ovárica. *Redvet* 6(2): 12050-12070.
- Giraldo CA et al (2008). Efecto de la variación del peso y la condición corporal, y la expresión de receptores de leptina y hormona luteinizante, sobre la anovulación posparto en vacas cebú (*Bos indicus*). *Rev Col Cienc Pec* 21(2): 228-238.
- Godkin J, Roberts M, Elgayyar M, Guan W, Tithof P (2008), Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production, *Reprod Biol Endocrinol* 23, 6:44.
- Henoa D et al (2004). Comportamiento durante el calor y dinámica folicular interestral en vacas BON (Blanco Orejinegro). *Rev Col Cienc Pec* 17(1): 39-44.
- Henoa G et al (2000). Follicular dynamics during postpartum anestrous and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (*Bos indicus*) cows. *Anim Reprod Sci* 63(2):127-136.
- Lenis Y et al (2009a). Cinética de la producción de progesterona en células de la granulosa luteinizadas *in vitro*. *Rev Col Cienc Pec* 22(3): 569.
- Lenis Y et al (2009b) Aislamiento y caracterización de células epiteliales endometriales bovinas en cultivo primario. *Rev Col Cienc Pec* 22(3): 566.
- Lenis Y et al (2010a). Señales moleculares que afectan la síntesis de PGF_{2α} y PGE₂ en el endometrio bovino. *Rev Col Cienc Pec* 23: 377-389.
- Lenis Y et al (2010b). Interferón Tau en la ventana de reconocimiento materno embrionario bovino. *Rev UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 13(1): 17-28.
- Lenis Y et al (2013). Efecto del ácido linoléico sobre la producción de las prostaglandinas PGF_{2α} y PGE₂ en células endometriales. *Rev MVZ* 18(2): 3559-3568.
- Lenis Y, Bedoya J, Ruiz-Cortez Z (2010), Simple Protocol to Cryopreserve Bovine Endometrial Epithelial Cells, *Biology of Reproduction*, 83: 664.

- Lenis Y, Olivera M, Tarazona A (2009). Caracterización de la dinámica del cultivo primario in vitro de células epiteliales endometriales bovinas, a diferentes concentraciones de siembra, *Rev Col Cienc Pec* 22 (3): 566-580.
- López A et al (2007). Efecto del co-cultivo sobre el desarrollo temprano de embriones bovinos producidos in vitro. *Rev MVZ Córdoba* 12(2): 1061-1067.
- López A et al (2008). Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino. *Analecta Veterinaria* 28(1): 42-47.
- Mahecha L et al (2004). Influence of temporal interruption of suckling on weight at weaning in Zebu calves in silvopastoral systems with supplementation. *LRRD* 16(5): 1-5.
- Mesa C et al (2008a). Bypass fat supplementation in Zebu cows (*Bos indicus*) in the early postpartum: an alternative decrease the open days period? *Reprod Domestic Anim* 43(3): 29-29.
- Mesa C et al (2008b). Effect of linoleic acid on the production of PGF_{2α} in bovine endometrial cells in vitro: indirect evaluation. *Reprod Domestic Anim* 43(3): 54-54.
- Montaño E, Olivera M, Ruiz-Cortes ZT (2009). Association between leptin, LH and its receptor and luteinization and progesterone accumulation (P4) in bovine granulosa cell in vitro, *Reprod Domest Anim* 44(4): 699-704.
- Murakami S, Shibaya M, Takeuchi K, Skarzynski D, Okuda K (2003). A passage and storage system for isolated bovine endometrial epithelial and stromal cells, *J Reprod Dev* 6, 531-538.
- Murphy BD (2000) Models of luteinization. *Biology of reproduction* 63: 2-11.
- Olivera M et al (2007). Vías implicadas en la luteólisis bovina. *Rev Col Cienc Pec* 20(1): 387-393.
- Rodríguez JC et al (2007). Análisis multifactorial de las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia. *Rev MVZ* 12(2): 978-984.
- Ruiz-Cortés ZT et al (1999). Interacción reproducción-nutrición en los animales domésticos: ¿es la leptina la clave? *Rev Col Cienc Pec* 12(2): 145-151.
- Ruiz-Cortés ZT y Olivera M (1999). Ovarian follicular dynamics in Zebu (*Bos indicus*) suckled cows monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 54(4): 211-220.
- Serrano CA y Olivera M (1997). Caracterización de la función luteal durante el primer ciclo posparto inducido por medio de un progestágeno en vacas cebú Brahman en amamantamiento. 1997. *Rev Col Cienc Pec* 10(1): 29-37.