

Bioingeniería tisular: Desarrollo de un modelo 3D de endometrio bovino

CARMEN DÍEZ MONFORTE. Área de Genética y Reproducción Animal. mc diez@serida.org

ANA DEL CERRO ARRIETA. Área de Sanidad Animal. anadc@serida.org

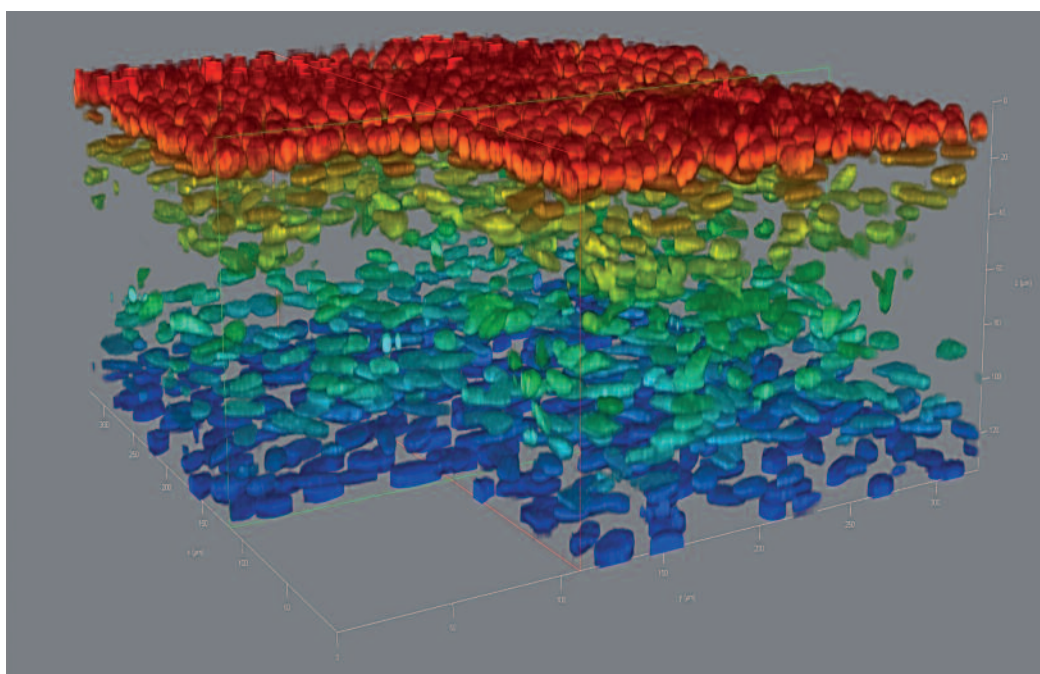
SUSANA CARROCERA COSTA. Área de Genética y Reproducción Animal. scarrocera@serida.org

MARÍA AURORA GARCÍA MARTÍNEZ. Área de Genética y Reproducción Animal. mauroragm@serida.org

MARTA MUÑOZ LLAMOSAS. Área de Genética y Reproducción Animal. mmunoz@serida.org



Reconstrucción tridimensional del volumen del modelo 3D de endometrio bovino. Los núcleos redondeados de las células epiteliales se muestran en rojo porque se encuentran en la superficie, mientras que los núcleos ovalados de las células estromales se muestran en diversos colores, según su profundidad en el *scaffold*.



Introducción

El cultivo celular es un proceso mediante el que células provenientes de un órgano normal o tumoral, son mantenidas *in vitro* en condiciones controladas para preservar al máximo su morfología y función. Las aplicaciones de los cultivos celulares son numerosas tanto en investigación básica como en investigación aplicada (Fig. 1), y permiten realizar estudios con la finalidad de conocer la morfología, el metabolismo, los mecanismos de comunicación de las células, diagnóstico de virus, la producción de proteínas para vacunas o experimentos para establecer la toxicidad de fármacos.

Tras el aislamiento, las células se cultivan y mantienen a una temperatura apropiada en una atmósfera controlada (habitualmente, 37 °C, 5% CO₂ y 95% O₂) en un incubador con 100% de humedad ambiente. Los medios de cultivo, fuentes de energía y compuestos necesarios para el crecimiento celular, y los diferentes sistemas existentes para el cultivo de las células, varían ampliamente para cada tipo celular. Así, hay células que crecen en suspensión en el medio de cultivo sin adherirse a una superficie, como las células sanguíneas, mientras que la mayoría de células que forman parte de tejidos sólidos, necesitan una

Aplicaciones de los cultivos celulares

INVESTIGACIÓN BÁSICA

ACTIVIDAD INTRACELULAR: Transcripción DNA, síntesis de proteínas, metabolismo, apoptosis.

FLUJO INTRACELULAR MOLÉCULAS: Procesamiento RNA, transporte de membrana.

PROTEÓMICA: Fenotipo celular, rutas metabólicas.

GENÓMICA: Análisis genético, transfección, transformación, inmortalización, senescencia.

INTERACCIONES CÉLULA-CÉLULA: Morfogénesis, proliferación celular, adhesión celular.

INVESTIGACIÓN APLICADA

BIOTECNOLOGÍA: Producción industrial de fármacos (insulina, interferón, hormona crecimiento).

INMUNOLOGÍA: Producción de anticuerpos, señalización de fenómenos de inflamación.

FARMACOLOGÍA: efectos de fármacos, fenómenos de resistencia.

TOXICOLOGÍA: Citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis.

INGENIERÍA DE TEJIDOS: Producción de tejidos artificiales, desdiferenciación y diferenciación inducida.

superficie sólida sobre la que adherirse para crecer y multiplicarse. Generalmente el soporte para los cultivos de células adherentes es la base de una placa o frasco de plástico de poliestireno. Estos cultivos siempre se han considerado en dos dimensiones (2D), es decir, monocapas de células adheridas a una superficie de crecimiento.

En un sistema de cultivo 2D, la arquitectura de los tejidos se pierde, las interacciones célula-célula se reducen y las células se adaptan anormalmente a su entorno bidimensional al aplanar su morfología y alterar la transcripción de genes, traducción de proteínas y su funcionalidad. Por ello, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por desarrollar sistemas de cultivo *in vitro* "mejorados" que permitan reproducir mejor la situación *in vivo*: los cultivos celulares en tres dimensiones (3D).

Los cultivos celulares en tres dimensiones (3D)

En los cultivos 3D, las células se comportan de manera más parecida a como lo hacen en sus órganos o tejidos de origen y, como consecuencia, muestran una estructura y función significativamente mejoradas en comparación con las que presentan cuando son cultivadas de forma convencional en 2D (Fig. 2) (Knight and Przyborski 2014).

Por esta razón, la fiabilidad de la información obtenida cuando se realizan ensayos con cultivos 3D es mayor, lo que contribuye, entre otras ventajas, a reducir el número de ensayos de toxicidad y preclínicos en la industria farmacológica y a mejorar los modelos de tumores utilizados en el desarrollo de terapias citotóxicas para combatir el cáncer (Fontana F et al. 2021).

↑
Figura 1.-Aplicaciones de los cultivos celulares en investigación básica y aplicada.

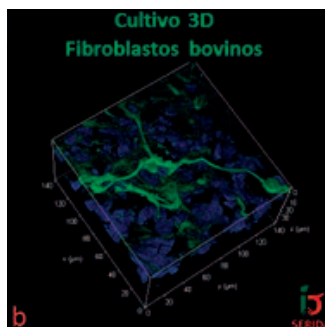
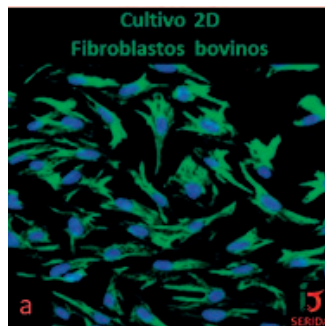
Cultivos celulares 2D

Ventajas

- 1- Ampliamente usados
- 2- Protocolos establecidos y reproducibles
- 3- Condiciones altamente definidas
- 4- Control rápido de microambiente
- 5- Fácil observación, manipulación
- 6- Baratos

Desventajas

- 1- Condiciones de cultivo no fisiológicas
- 2- Aplanamiento de células
- 3- Adhesión celular limitada
- 4- Interacciones entre células en un solo plano
- 5- Aumento en la sensibilidad a fármacos
- 6- Cultivo a largo plazo difícil



Cultivos celulares 3D

Ventajas

- 1- Permiten la organización celular "libre"
- 2- Polaridad celular no impuesta
- 3- Dureza de matriz variable
- 4- Interacciones y adhesión celular en 3D
- 5- Migración y crecimiento celular dependiente de propiedades de la matriz
- 6- Modulación del microambiente por células
- 7- Cultivo a largo plazo posible

Desventajas

- 1- Protocolos no estandarizados
- 2- Difusión de oxígeno y nutrientes limitada
- 3- Condiciones frecuentemente no definidas
- 4- Problemas de reproducibilidad
- 5- Problemas para visualizar y manipular células
- 6- Coste



Figura 2.-Comparativa del uso de cultivos celulares en tres dimensiones (3D) vs. dos dimensiones (2D): ventajas y desventajas. En las fotografías se puede apreciar los cambios de morfología que sufren los fibroblastos bovinos cuando son cultivados en 2D (a) vs. en 3D (b).

Los cultivos celulares 3D en el campo de la reproducción

En el campo de la biología de la reproducción los cultivos 3D han permitido crear numerosos modelos *in vitro* de órganos y tejidos del tracto reproductivo. Estos modelos, desarrollados mayoritariamente para la especie humana, se han utilizado para el estudio de enfermedades y procesos patológicos como la endometriosis, cánceres ginecológicos y trastornos de la fertilidad, dando lugar a resultados muy prometedores (Francés Herrero E *et al.*, 2022; Zubizarreta *et al.* 2020).

Al contrario de lo que sucede en la especie humana, en el campo de la reproducción animal hay muy pocos estudios que aborden el desarrollo y aplicación de los cultivos 3D. Éstos podrían ser de gran utilidad para el estudio y desarrollo de tratamientos de patologías reproductivas que afectan frecuentemente a los animales domésticos, dando lugar a pérdidas económicas muy importantes para los productores.

El desarrollo de un cultivo 3D requiere de la puesta a punto de una serie de técnicas de cultivo celular que permitan re-

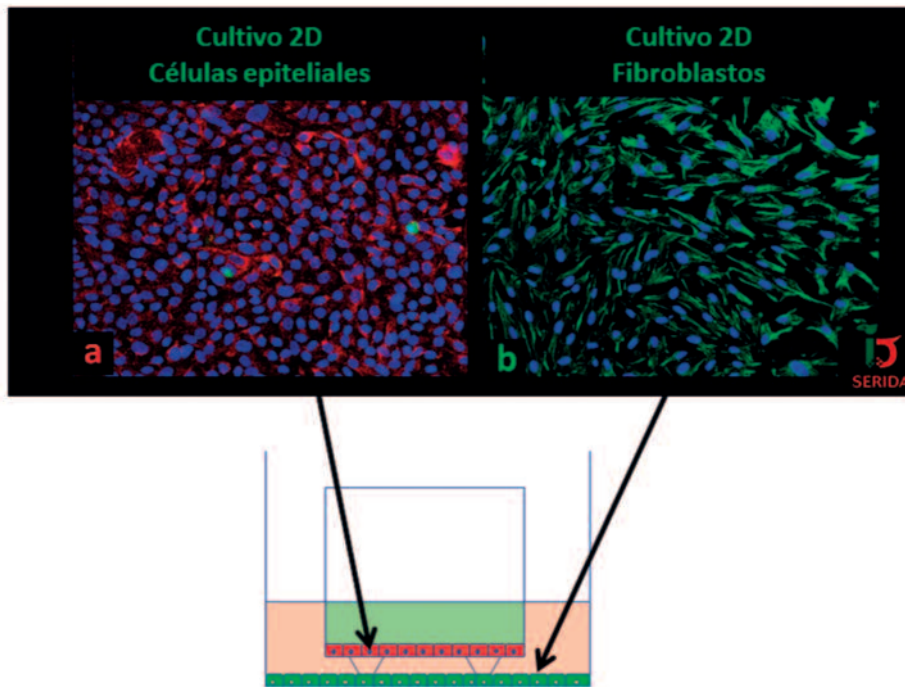
construir la anatomía y fisiología de los tejidos, además de someterlo a diversos ensayos que demuestren su adecuada funcionalidad.

Los cultivos celulares en la reproducción bovina

El Grupo de Reproducción Animal del SERIDA trabaja desde el año 2016 en el desarrollo de un modelo *in vitro* de endometrio bovino, la capa interna del útero, que permita estudiar la fisiología uterina, la comunicación materno-embionaria durante los primeros estadios del desarrollo embrionario y diversas patologías uterinas que afectan a la eficiencia reproductiva. En los primeros trabajos realizados, se utilizó un sistema de cultivo en 2D en el que células epiteliales y células estromales aisladas del endometrio bovino crecían en compartimentos separados por una membrana porosa que permitía el paso de moléculas secretadas por las células (Fig. 3).

Este modelo permitió establecer que el endometrio bovino responde de forma diferente a la presencia de embriones dependiendo de su sexo (Gómez *et al.*; 2017, Gómez *et al.* 2018, Muñoz *et al.* 2020), re-

Cocultivo 2D de células de endometrio bovino



←
Figura 3.-Cocultivo de células de endometrio bovino en dos dimensiones. Las células epiteliales, identificadas mediante la expresión de citoqueratina (en color rojo) son sembradas en un inserto (a) mientras que los fibroblastos, identificados mediante la expresión de vimentina (en color verde) (b), son sembrados directamente sobre el pocillo de una placa de cultivo.

sultado que puede mejorar la formulación de los medios de cultivo habitualmente utilizados en la producción de embriones *in vitro* con semen sexado y, por ende, la eficiencia de la producción de estos embriones y su calidad.

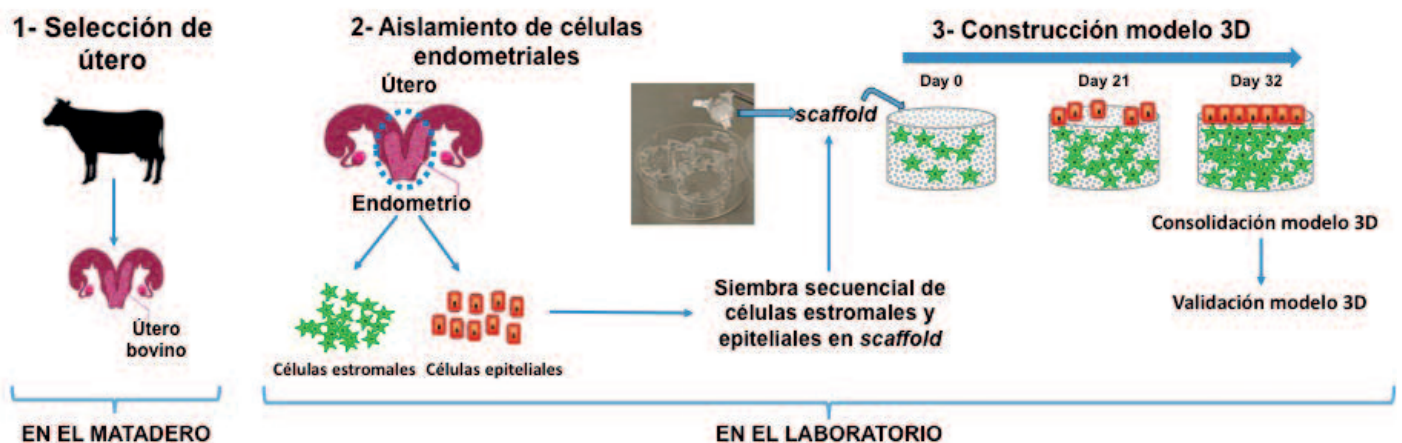
Los resultados publicados en 2018 por Eissa y colaboradores, describiendo las ventajas del uso de cultivos 3D para el estudio de modelos de infertilidad humana, nos guiaron para implementar el cultivo en 3D del endometrio bovino con el

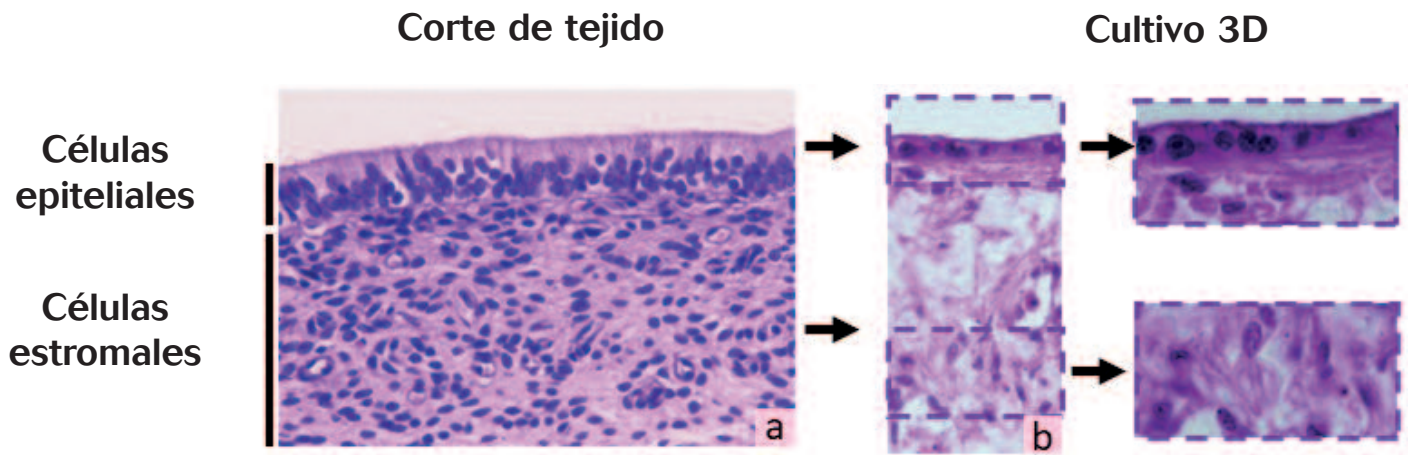
fin de superar algunas de las limitaciones de nuestro modelo previo en 2D.

En primer lugar, tras valorar las ventajas y desventajas de los distintos sistemas disponibles para cultivar células en 3D (gota pendiente, organoides, hidrogeles, andamios-*scaffolds* sintéticos) (Langhans, SA 2018), optamos por utilizar un *scaffold* poroso de poliestireno disponible comercialmente. Este *scaffold* había sido ya empleado para crear modelos celulares 3D de tejidos complejos estructuralmen-

↓
Figura 4.-Diagrama de la metodología utilizada para el aislamiento de células del endometrio bovino para el desarrollo de un cultivo celular en tres dimensiones.

Desarrollo de un cultivo 3D de endometrio bovino





↑
Figura 5.-Tinción hematoxilina-eosina de un corte histológico de endometrio bovino (a) y de un *scaffold* tras 35 días de cultivo (b). En ambas imágenes se puede apreciar el crecimiento de una capa de células epiteliales, sobre un compartimento estromal.

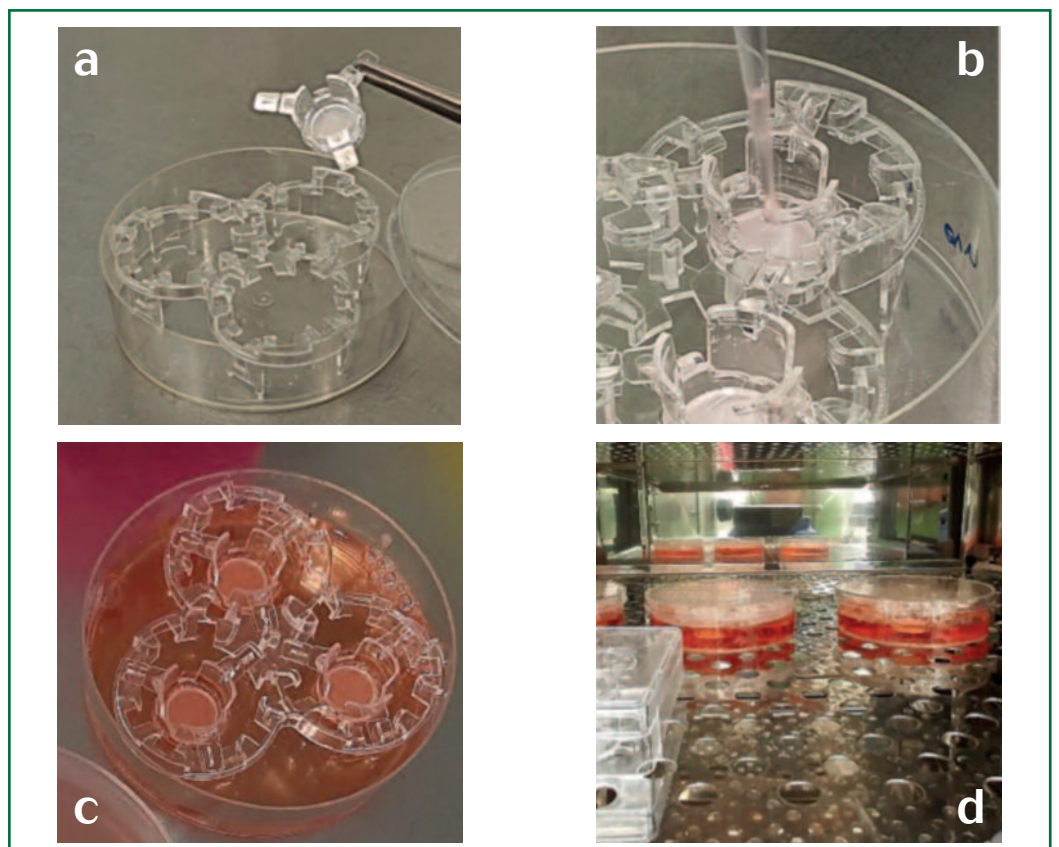
te similares al endometrio, y en los que distintos tipos de células se disponen de forma ordenada formando múltiples capas (Costello et al; 2021).

Así, tras poner a punto un protocolo de aislamiento celular que nos permitiera recuperar los dos tipos celulares mayoritarios en el endometrio, las células epiteliales y las células estromales (Murillo Muñoz 2021), se procedió a realizar un cultivo secuencial para crear un compartimento es-

tromal robusto sobre el que las células epiteliales pudieran formar una monocapa similar al epitelio luminal *in vivo* (Fig 4).

A continuación, el modelo de endometrio 3D desarrollado se sometió a una caracterización morfológica exhaustiva mediante técnicas de histología clásica, inmunofluorescencia y microscopía confocal, demostrándose que la estructura del modelo 3D era similar al endometrio *in vivo* (Fig 4 y 5).

→
Figura 6.-Siembra de células endometriales. (a) Montaje de *scaffolds* en placa de cultivo. (b) Siembra de células en *scaffold*. (c) Adición de medio de cultivo tras la siembra del *scaffold*. (d) Placas de cultivo en incubador.



Por último, confirmamos la correcta funcionalidad del modelo de endometrio 3D tras evaluar las respuestas celulares, cambios en expresión génica y síntesis de prostaglandinas en respuesta a un tratamiento hormonal que reproducía las características fisiológicas del ciclo estral (oxitocina + ácido araquidónico) (Díez et al 2023).

Conclusiones

Este modelo de endometrio bovino 3D permite mantener las células vivas y funcionales durante semanas, dando lugar a una herramienta innovadora que permitirá profundizar en el estudio de los mecanismos que regulan la fisiología endometrial, la evolución de infecciones uterinas del ganado bovino o el análisis de disruptores endocrinos que afectan severamente la función reproductiva en el ganado bovino.

Agradecimientos

A L. Alonso (Matadero Central de Asturias) y a M. Fernández (Asociación Española de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de Raza Asturiana de los Valles) por facilitarnos el acceso al material biológico empleado para el aislamiento de células. Esta investigación ha sido financiada por el proyecto FICYT PCTI 2021-2023 (Grupin: IDI-2021-000102) y por el Gobierno del Principado de Asturias..

Bibliografía

- BREVINI, T. A. L.; PENNAROSSA, G.; GANDOLFI, F. (2020). A 3D approach to reproduction. *Theriogenology*. 150:2-7.
- DÍEZ, M. C.; PRZYBORSKI, S.; DEL CERRO, A.; ALONSO-GUERVÓS, M.; IGLESIAS-CABO, T.; CARROCERA, S.; GARCÍA, M. A.; FERNÁNDEZ, M.; ALONSO, L.; MUÑOZ, M. (2023). Generation of a novel three-dimensional scaffold-based model of the bovine endometrium. *Vet Res Commun*. doi: 10.1007/s11259-023-10130-0. Online ahead of print.
- EISSA, A. M.; BARROS, F. S. V.; VRLJICAK, P.; BROSENS, J. J.; CAMERON, N. R. (2018). Enhanced Differentiation Potential of Primary Human Endometrial Cells Cultured on 3D Scaffolds. *Biomacromolecules*. 19(8):3343-3350.
- FRANCÉS-HERRERO, E., LOPEZ, R.; HELLSTRÖM, M.; DE MIGUEL-GÓMEZ, L.; HERRAIZ, S.; BRÄNNSTRÖM, M.; PELLICER, A.; CERVELLÓ, I.; (2022). Bioengineering trends in female reproduction: a systematic review. *Human Reproduction Update*. 28(6):798-837.
- GÓMEZ, E.; CARROCERA, S.; MARTIN, D.; SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MURILLO, A.; MUÑOZ, M. (2017). Hepatoma-derived growth factor: Protein quantification in uterine fluid, gene expression in endometrial-cell culture and effects on *in vitro* embryo development, pregnancy and birth. *Theriogenology*. 96:118-125.
- GÓMEZ, E.; SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; MARTIN, D.; CARROCERA, S.; MURILLO, A.; CORREIA-ALVARIZ, E.; HERRERO, P.; CANELA, N.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; ULBRICH, S.; MUÑOZ, M. (2018). *In vitro* cultured bovine endometrial cells recognize embryonic sex. *Theriogenology*
- KNIGHT, E.; PRZYBORSKI, S. (2014). Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *J Anat*. 227(6):746-56
- SUÁREZ, M.; GÓMEZ, E.; MURILLO, A.; FERNÁNDEZ, A.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; TORRECILLAS, R.; MUÑOZ, M. (2018). Development of a novel 3D glass-ceramic scaffold for endometrial cell in vitro culture. *Ceramics International*. 44(12): 14920-14924.
- LANGHANS, S. A. (2018) Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*. 23; 9:6.
- MUÑOZ, M.; GATIEN, J.; SALVETTI, P.; MARTÍN-GONZÁLEZ, D.; CARROCERA, S.; GÓMEZ, E. (2020). Nuclear magnetic resonance analysis of female and male pre-hatching embryo metabolites at the embryo-maternal interface. *Metabolomics*. 16(4):47.
- MURILLO, A.; MUÑOZ, M. (2021). Isolation, culture, and characterization of primary bovine endometrial, epithelial, and stromal cells for 3D *in vitro* tissue models. *Methods Mol Biol*. 2273:103-110
- ZUBIZARRETA, M. E.; XIAO, S. (2020). Bioengineering models of female reproduction. *Biodes Manuf*. 2020 Sep; 3(3):237-251. ■