

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



**Reconstrucción de un modelo de epitelio oviductal
para el soporte del desarrollo embrionario**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Curso académico: 2017/2018

Autor: **Jairo Ruiz Estrada**

Tutor académico: **Prof. D. José Salvador Vicente Antón**

València, julio 2018



TÍTULO

Reconstrucción de un modelo de epitelio oviductal para el soporte del desarrollo embrionario.

RESUMEN

El oviducto participa en los procesos de transporte de gametos y embriones, fecundación y desarrollo embrionario temprano gracias a la actividad secretora y motilidad ciliar de sus células epiteliales (OECs). Por todo ello, el cultivo de OECs ha sido objeto de estudio para comprender la fisiología y la estructura tridimensional del oviducto y de qué modo contribuye a estos procesos de la biología reproductiva. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar e iniciar el cultivo primario de células oviductales de conejo (ROECs) con la finalidad de reconstruir un modelo oviductal *in vitro* y evaluar el potencial de éste para mejorar el desarrollo embrionario temprano.

Para alcanzarlo, en primer lugar se evaluó el rendimiento y viabilidad de las células epiteliales obtenidas mediante la digestión enzimática con colagenasa, pronasa y tripsina de la fracción ampular de oviductos de conejas inducidas a ovular 24, 48 o 72 horas antes. Una vez seleccionado la enzima, se estudió la viabilidad y características del cultivo de las células congeladas o no sobre las células obtenidas de los tres tipos de oviductos y, se analizó la expresión de los genes OVGP-1 y OCT4 a tiempo 0, 2 días y 7 días de los cultivos procedentes de células congeladas o no de oviductos de 24h. Finalmente, se utilizó el cultivo primario de ROECs de oviductos de conejas para estimar su efecto directo o de un medio condicionado sobre el desarrollo de embriones en estadio de pronúcleo y 2 células .

De los resultados obtenidos cabe destacar que la digestión con tripsina de los oviductos de 24h antes permite alcanzar un mayor rendimiento y una viabilidad celular suficiente para el cultivo primario de ROECs (en torno a 556.000 células/ml y 60 % de viabilidad), no observándose diferencias en términos de periodo de confluencia y del mantenimiento del movimiento ciliar (5,9 y 6,9 días respectivamente). La digestión con pronasa redujo sensiblemente la viabilidad de las células de conejas de oviductos ovuladas 72h antes (51%). La congelación de las ROECs no mermó su viabilidad, aunque tanto el periodo en el que alcanzan la confluencia celular y el de mantenimiento de actividad ciliar se vieron afectados negativamente. Por otra parte, la expresión del gen de la oviductina (OVGP-1) fue similar tanto en las ROECs congeladas como en las no congeladas, reduciendo rápidamente su expresión, indicando un posible proceso de desdiferenciación que ya es evidente a los 2 días de cultivo. Por el contrario, la expresión de OCT-4 estuvo afectada por el proceso de congelación, observándose un patrón de expresión diferencial en los primeros 2 días de cultivo. La caracterización de la capacidad proliferativa de las ROECs a través de su PDL fue baja, alcanzando el valor de 7 a 12 días de cultivo en las células procedentes de oviductos de 72h. Por último, tanto el co-cultivo de ROECs como el cultivo con un medio condicionado por ROECs mejoraron la tasa de desarrollo embrionario entre un 15 y un 18%, demostrando la contribución de las secreciones de las ROECs al desarrollo embrionario temprano.

PALABRAS CLAVE

Células oviductales, cultivo primario, crioconservación, desarrollo embrionario temprano.

SUMMARY

Oviduct epithelial cells (OECs) are involved in several processes such as gamete and embryo transport, fertilization and early embryo development due to its secretory activity and cilia motility and beating. Therefore, OECs culture has been subject of study in order to understand oviduct physiology, its three-dimensional structure and how it contributes to reproduction biological processes. Thus, the aim of the present study was to establish and characterise a primary culture of rabbit oviductal epithelial cells (ROECs) with the purpose of reconstructing an *in vitro* oviduct model and evaluate its ability to improve early embryonic development.

To reach this purpose, first of all, cell yield and viability were evaluated in isolated epithelial cells obtained through enzymatic digestion with collagenase, pronase and trypsin from ampullae fraction of oviducts deriving from female rabbits which were stimulated to ovulate 24, 48 or 72 hours before. Once the best digestive enzyme was selected, viability and culture characteristics were evaluated in frozen and not frozen ROECs. Moreover, gene expression of OVGP and OCT-4 was analysed in cultured cells at 0, 2 and 7 days for both groups (frozen and fresh cells) of 24h oviducts. Finally, ROECs primary culture and ROECs conditioned culture medium were used to determine their direct effect on early embryonic development.

After the study, it's remarkable that trypsin digestion in oviducts from rabbits which were stimulated to ovulate 24h before showed a higher cell yield and an enough cell viability to develop a primary ROECs culture (around 556.000 cells/ml and 60% viable cells), while no differences were observed in time spent to reach confluence and cilia motility maintenance (5,9 and 6,9 days, respectively). Pronase digestion significantly reduced viability of ROECs from oviducts of rabbits stimulated to ovulate 24h before (51%), while cell viability was not affected by ROECs freezing, which were able to establish a primary culture. However, time spent to reach confluence and cilia motility maintenance were adversely affected. Likewise, OVGP-1 expression was similar in frozen and fresh ROECs. OVGP-1 expression was immediately reduced, which may indicate a possible dedifferentiation event, being appreciable 2 days after culture initiation. By contrast, OCT-4 expression was affected by freezing, as a differential expression pattern was observed at the first 2 days of culture. Proliferative potential of ROECs was evaluated by PDL, which reached values of 7 to 12 days of culture in ROECs from rabbits stimulated 72h before. Finally, both ROECs co-culture with embryos and ROECs conditioned culture medium with embryos improved early embryo development rate between 15% and 18%, demonstrating that ROECs secretions contribute to early embryo development.

KEY WORDS

Oviductal cells, primary culture, cryoconservation, early embryonic development.

DATOS DEL TRABAJO

Alumno: D. Jairo Ruiz Estrada

Tutor académico: D. José Salvador Vicente Antón

València, julio 2018

AGRADECIMIENTOS

Que este trabajo sea una realidad es en gran parte gracias al profesor D. José Salvador Vicente Antón, quien desde el primer momento en el que le sugerí que dirigiera mi trabajo final de grado se ha implicado al máximo en que pudiera llevarlo a cabo de la forma más satisfactoria posible. En José me he encontrado no sólo un maravilloso profesor, guía y comunicador sino que también me he encontrado a una persona fabulosa dispuesta a ayudar a sus alumnos en todo lo que pudiese. De él he aprendido un mundo sobre biología de la reproducción pero también consejos a nivel profesional ya que gracias a su excelente capacidad de planificación y coordinación, he podido compaginar gran parte de la realización del trabajo con unas prácticas en otra ciudad. Me gustaría recalcar su paciencia y su incesante interés en ayudar siempre en todo momento y en cualquier circunstancia. José, no exagero afirmando que eres el mejor profesor que me he encontrado en el grado, en todos los sentidos.

También quiero agradecer la ayuda y compañía tan agradable de todos los compañeros del laboratorio de la 5ª planta: a Paco, Amparo, Ximo, Carmen y Luis, por haberme ayudado siempre que se lo he pedido; a David, por su esencial implicación en parte del trabajo y a las compañeras que al igual que yo realizaban su trabajo de fin de grado o máster por apoyarnos cuando lo hemos necesitado.

Por último, agradecer a mi familia, amigos y compañeros del grado su apoyo fundamental a lo largo de estos casi 5 años que ha durado mi camino hasta convertirme en biotecnólogo.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	IV

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El epitelio del oviducto en la biología reproductiva	1
1.1.1 Anatomía y estructura del oviducto	1
1.1.2 Células epiteliales de oviducto	3
1.1.3 Funciones del epitelio oviductal	4
1.2 Reconstrucción de epitelios oviductales <i>in vitro</i>	7
1.2.1 Explantes de epitelios oviductales	7
1.2.2 Cultivos histotípicos	8
1.2.3 Cultivos organotípicos	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Diseño del estudio.	13
3.2 Obtención y preparación de los oviductos.....	15
3.3 Preparación y cultivo de las ROECs.....	16
3.3.1 Obtención de ROECs y establecimiento del cultivo primario.....	16
3.3.2 Congelación ROECs.....	17
3.3.3 Descongelación de ROECs	17
3.4 Evaluación de la capacidad de proliferación celular de las ROECs: PDL.	17
3.5 Extracción de RNA y transcripción reversa para la comprobación de la expresión del gen de la proteína oviductina (OVG1) como marcador de las células epiteliales oviductales.	18
3.6 Evaluación del desarrollo embrionario temprano mediante co-cultivo de las ROECs con embriones.....	19
3.7 Análisis estadístico.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Eficiencia de obtención de ROECs a partir de oviductos tratados con pronasa, colagenasa y tripsina de conejas inducidas a ovular 24, 48 y 72 horas antes.	22
4.1.1 Concentración de células epiteliales	22
4.1.2 Viabilidad de las ROECs tras su extracción.....	24
4.1.3 Confluencia celular en placa.	26
4.1.4 Mantenimiento del movimiento ciliar.	27
4.2. Efecto de la congelación-descongelación de ROECs tras su extracción con tripsina... 29	29
4.2.1 Viabilidad de las células epiteliales descongeladas según el tipo de oviducto.	29
4.2.2 Mantenimiento del movimiento ciliar	30
4.2.3 Confluencia celular en placa P60.....	31
4.2.4 Expresión génica de OVGP1 y OCT-4.....	32
4.2.5 PDL del cultivo primario de células oviductales	34
4.3 Desarrollo embrionario temprano sobre ROECs.	35
5. CONCLUSIONES	38
6. BIBLIOGRAFÍA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Detalle de la anatomía del oviducto de vaca.	2
Figura 2 Arriba: Estructura anatómica de un oviducto el momento de 24h del ciclo de la coneja. Abajo izquierda: Histología del oviducto: capa mucosa, serosa y muscular (Paxton et al., 2003). Abajo derecha: Detalle de las crestas del interior del ámpula oviductal de un oviducto procesado en el presente estudio.	3
Figura 3 Representación de las funciones del oviducto con respecto a los gameto.	5
Figura 4 Estructuras de glicanos presentes en el epitelio oviductal.	6
Figura 5 Representación esquemática de las dos fases del protocolo de cultivo de células epiteliales oviductales.	9
Figura 6 Representación esquemática del protocolo de reconstrucción del entramado epitelial de fimbrias oviductales en el sistema tridimensional de cultivos organotípicos	11
Figura 7 Diseño experimental del estudio	14
Figura 8 Oviductos procesados en el presente trabajo. Izquierda: oviducto de 24h recubierto de tejido adiposo. Derecha: oviducto de 24h limpio.	15
Figura 9 Explantes de la fracción ampular de oviductos procesados.	16
Figura 10 Concentración de células epiteliales oviductales en función de las enzimas empleadas en la digestión. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).	23
Figura 11 Concentración de células epiteliales oviductales en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).	23
Figura 12 Proporción de células epiteliales vivas en función de la enzima empleado empleada en la digestión. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).	24
Figura 13 Proporción células epiteliales oviductales viables en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)	25
Figura 14 Proporción de células epiteliales oviductales vivas en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)	25
Figura 15 ROECs en fresco de 48h observadas con microscopio de fluorescencia. Verde: núcleos de células vivas; Rojo: núcleos de células muertas. A 200x, B 400x, C 1000x	26

Figura 16 Periodo de días que transcurren hasta alcanzar la confluencia ROECs en fresco y ROECs congeladas en una placa P60.	26
Figura 17 Periodo de días que transcurren hasta alcanzar la confluencia ROECs en fresco y ROECs congeladas en una placa P60. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)	27
Figura 18 Mantenimiento del movimiento ciliar en ROECs para cada uno de los tres tipos de oviducto en función del momento del ciclo de la coneja. Abreviaturas: h, horas, Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)	28
Figura 19 Mantenimiento del movimiento ciliar en ROECs para cada uno de las enzimas empleadas en el aislamiento celular. Abreviaturas: h, horas, Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)	28
Figura 20 Detalle de los cilios de las ROECs. Aumento 1000x.....	29
Figura 21 Proporción de células epiteliales oviductales vivas en muestras en fresco y congeladas en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja	30
Figura 22 ROECs congeladas observadas con microscopio de fluorescencia. Verde: núcleos de células vivas; Rojo: núcleos de células muertas. A. 200x y B 400x.....	30
Figura 23 Mantenimiento del movimiento celular en ROECs en fresco y congeladas para cada uno de los tres tipos de oviducto en función del momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)	31
Figura 24 Periodo de días que transcurren hasta alcanzar la confluencia ROECs en fresco y ROECs congeladas en una placa P60.	31
Figura 25 Confluencia celular en placa p60. Aumento: 40x.....	32
Figura 26 Diferencias relativas de la expresión de OVGP-1 entre ROECs en fresco y ROECs congeladas en el momento de su obtención o descongelación (control), a los 2 y a los 7 días de iniciar el cultivo.	33
Figura 27 Diferencias relativas de la expresión de OCT-4 entre ROECs en fresco y ROECs congeladas en el momento de su obtención o descongelación (control).....	34
Figura 28 Evolución del PDL en los diferentes subcultivos de líneas de ROECs procedentes de cada uno de los tres tipos de oviducto en función del momento del ciclo de la coneja.....	35
Figura 29 Embriones en estadio de pronúcleo de 2 células fotografiados previamente a ser cultivados	36
Figura 30 Blastocistos en el co-cultivo de ROECs.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los cebadores empleados en la qPCR.....	19
Tabla 2. Programa de tiempos y temperaturas empleado en la qPCR	19
Tabla 3. Tasa de desarrollo embrionario en los diferentes cultivos	36

ABREVIATURAS

3-D: tridimensional

cDNA: ADN complementario (complementary DNA)

BOECs: células epiteliales oviductales de bovino (bovine oviductal epithelial cells)

BSA: bovine serum albumine (albúmina sérica bovina)

Ca²⁺ : calcio

CaCl₂: cloruro cálcico

CO₂: dióxido de carbono

COECs: células epiteliales oviductales de canino (canine oviductal epithelial cells)

Ct: threshold cycle (ciclo umbral)

DPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline (tampón fosfato salino de Dulbecco)

E-cadherinas: cadherinas epiteliales

FBS: fetal bovine serum (suero fetal bovino)

FIV: fecundación in vitro

FSH: hormona folículo-estimulante

Fw: forward (directo)

g: gramos

GAPDH: gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

h: horas

H2AFZ: H2A histone family, member Z (gen histona)

H₂O: agua

IP: yoduro de propidio

IVM: *in vitro* maturation (fecundación *in vitro*)

kg: kilogramo

L: litro

M: molar

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MOECs: células epiteliales oviductales de murino (murine oviductal epithelial cells)

mRNA: messenger RNA (ARN mensajero; ARNm)

nM: nanomolar

Nº: número

OCT-4: gen octamer-binding transcription factor-4

OECs: células epiteliales oviductales (oviductal epithelial cells)

OGP: glicoproteína específica de oviducto u oviductina; gen de la oviductina

OVGP-1: glicoproteína específica de oviducto u oviductina; gen de la oviductina

pb: pares de bases (base pairs, bp)

PBS: phosphate buffer saline (tampón fosfato salino)

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PDL: accumulative population doubling level (nivel de duplicación de la población acumulada)

POECs: células epiteliales oviductales de porcino (porcine oviductal epithelial cells)

qPCR: quantitative polymerase chain reaction (PCR cuantitativa a tiempo real)

ROECs: células epiteliales oviductales de conejo (rabbit oviductal epithelial cells)

ROS: especies reactivas del oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

Rv: reverse (reverso)

s: segundos

tACE: tumor necrosis factor- α -converting enzyme

TCM-199: medio de maduración in vitro

UI: unidades internacionales

μ L: microlitro

μ m: micrometro

$^{\circ}$ C: grados centígrados

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El epitelio del oviducto en la biología reproductiva

1.1.1 Anatomía y estructura del oviducto

El oviducto es responsable de crear un microambiente que permite a los gametos y a los embriones llevar a cabo su papel en la reproducción. Entre las funciones más importantes del oviducto están el transporte de espermatozoides, óvulos, facilitar la fecundación y las etapas iniciales del desarrollo embrionario (Killian et al., 2004; Suarez, 2008). El oviducto está dividido en cinco regiones atendiendo a sus características histológicas. Estas cinco regiones son las fimbrias, el infundíbulo, el ámpula, el istmo y la intersección útero-tubal (Hwang y Song., 2004). En ocasiones, algunas de estas regiones se consideran como regiones adyacentes a la estructura oviductal, como es el caso de las fimbrias y el infundíbulo, diferenciando, entonces, tan sólo dos regiones ámpula e istmo (Boling y Blandau, 1971; Jansen y Bajpai, 1982; Anzaldúa et al., 2002). Por otra parte, dadas las diferencias en la histología sobre en la composición, distribución y orientación de los diferentes tipos celulares que lo componen, algunos autores optan por clasificar las regiones oviductales como región anterior, media y posterior (Kim et al., 2011).

Si se analiza la función, la estructura e histología del oviducto (Figura 1), el infundíbulo es la parte inicial en el que se recogen los ovocitos tras el proceso de ovulación debido a la capacidad de éste de deslizar las fimbrias sobre la superficie ovárica. Microscópicamente, las fimbrias conectan el oviducto al ovario gracias a la multitud de cilios que proyectan las células epiteliales que revisten mayoritariamente las fimbrias. En sentido descendente, la siguiente región es el ámpula, lugar donde se lleva a cabo la fecundación y el desarrollo embrionario. Este compartimento ocupa más de la mitad de la longitud del conducto oviductal. Cabe destacar que contiene un lumen interno conformado por multitud de pliegues mucosos y una densa población de células ciliadas. La última región del conducto previa a la intersección con el útero es el istmo, considerablemente estrecha en comparación a las dos anteriores regiones y con muchos menos pliegues. Esta región tiene un papel regulador en el transporte de los posibles cigotos al útero, ya que sus paredes se relajan y permiten el paso de éstos, solo cuando los niveles de progesterona se incrementan y consecuentemente, el endometrio produce las secreciones adecuadas para albergar el desarrollo de los embriones en estadio de blastocisto. El istmo conduce a la intersección útero-tubal, región donde se sitúa la transición hacia el útero y que en determinadas fases se convierte en zona de almacenamiento y regulación del transporte espermático (Alexandra et al., 2005).

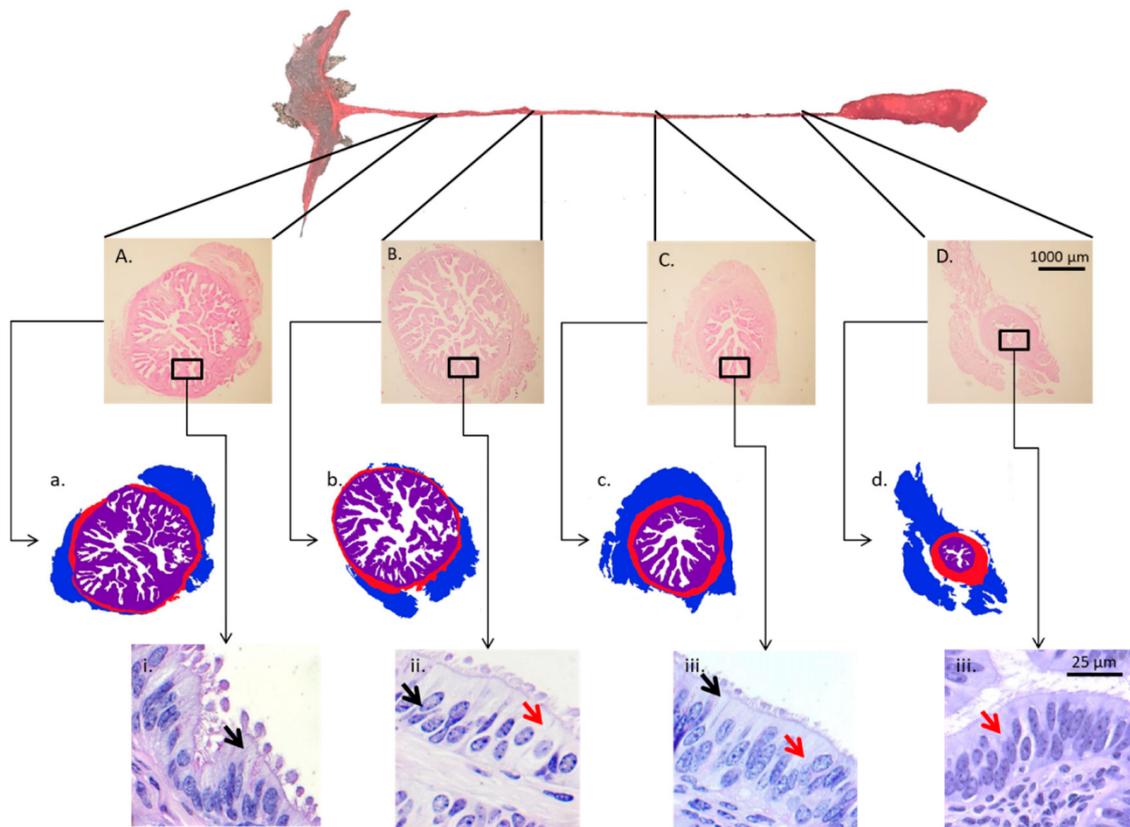


Figura 1 Detalle de la anatomía del oviducto de vaca. En la parte superior se muestra grosso modo la estructura anatómica del oviducto. A continuación, se muestran secciones transversales de las diferentes regiones del oviducto donde se diferencian tres tonos: azul (serosa compuesta fundamentalmente por tejido conjuntivo, vascular y terminaciones nerviosas), rojo (tejido muscular) y azul (mucosa, compuesta por tejido epitelial y el tejido conjuntivo que conforma la lámina propia). A, a, i: segmento craneal del ámpula; B, b, ii: segmento caudal del ámpula; C, c, iii: segmento craneal del istmo; D, d, iv: segmento caudal del istmo. Las flechas negras señalan las células secretoras y las células rojas señalan las células ciliadas. (Binelli et al., 2018)

El oviducto de conejo, desde un punto de vista macroscópico, es una estructura tubular rectilínea desde la intersección útero-tubal hasta las proximidades del ovario en la que puede observarse un asa que da paso a la membrana infundibular. El oviducto está compuesto por tres capas: la capa serosa, la capa muscular y la capa mucosa tal y como se observa en la figura 2. La capa serosa exterior rodea y conecta el oviducto con el ligamiento ancho del útero, concretamente con el mesosálpinx, un repliegue que fija ambos órganos. La capa muscular se sitúa por debajo de la serosa y está formada por una capa circular interna y una capa longitudinal exterior. Por último, se puede observar la mucosa en el que se observa un epitelio pseudoestratificado revistiendo multitud de pliegues o crestas. El oviducto de conejo, como en otras especies, presenta una mayor frecuencia de estos pliegues en la región ampular (Figura 2), siendo menos frecuentes en la zona de transición al infundíbulo y en el istmo. En el istmo, además, es posible observar una gruesa capa de musculatura lisa con fibras orientadas de forma circular y en menor medida, por células musculares lisas con orientación longitudinal. Por su parte, la intersección útero-tubal muestra un pequeño lumen con pocos pliegues y conformando criptas (Pedrero-Badillo et al., 2013).

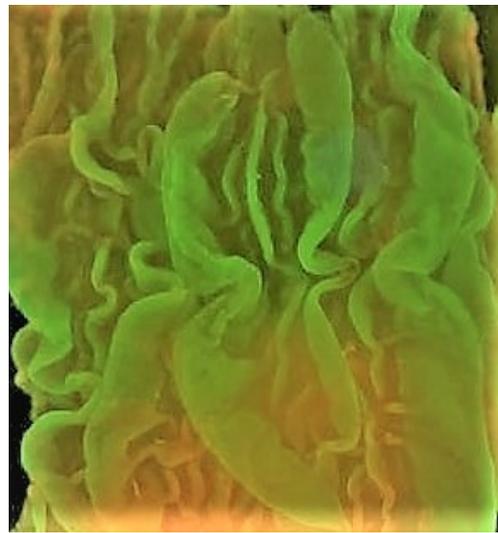
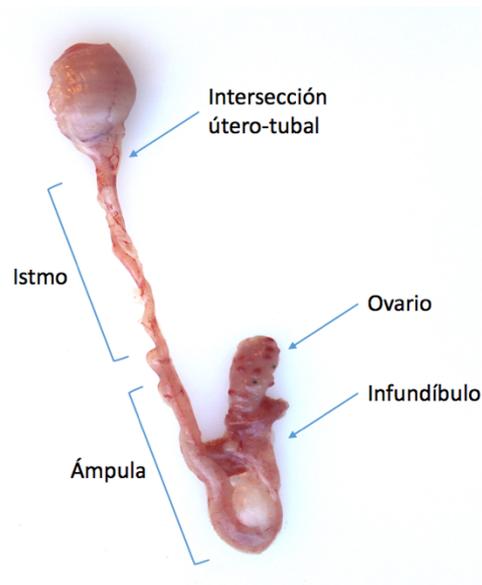


Figura 2 Arriba: Estructura anatómica de un oviducto el momento de 24h del ciclo de la coneja. Abajo izquierda: Histología del oviducto: capa mucosa, serosa y muscular (Paxton et al., 2003). Abajo derecha: Detalle de las crestas del interior del infundíbulo oviductal de un oviducto procesado en el presente estudio.

1.1.2 Células epiteliales de oviducto

La mucosa oviductal se caracteriza por estar formada de un epitelio de una sola capa, el cual engloba dos poblaciones celulares diferentes: células ciliadas y células secretoras (Coy et al., 2012). Las células secretoras o intercalares proporcionan los factores proteicos y las condiciones que permiten la capacitación de los espermatozoides además de protección y nutrición tanto a los óvulos como a los embriones. Por su parte, las células ciliadas se encargan de generar un flujo y por tanto impulsar o transportar gametos, embriones y el conjunto de las secreciones oviductales hacia el útero. (Yániz et al., 2013).

A lo largo del oviducto, el epitelio muestra algunas variaciones en grosor y composición celular, así el grosor del istmo es considerablemente mayor que el del infundíbulo o es posible observar en la fimbria, el infundíbulo y el ampulla una mayor proporción de células ciliadas que

en el istmo y la intersección útero-tubal, mientras que en estos últimos predominan las células secretoras. Comenzando por la fimbria, es preciso señalar que algunas de las criptas están prácticamente formadas por células ciliadas. En el infundíbulo, la estructura es de tipo asimétrico en forma de “c”, la cual consta de epitelio columnar de revestimiento que se organiza en multitud de proyecciones o filamentos formados mayoritariamente por células ciliadas. Sin embargo, tanto el tejido epitelial como el muscular están poco desarrollados en los bordes del infundíbulo mínimo (Stewart et al., 2012). En la zona de transición entre el infundíbulo y el ámpula cabe destacar que hay una proporción equilibrada de células ciliadas y secretoras en el epitelio de revestimiento mientras que en la zona de transición entre ámpula e istmo destaca una gruesa capa de músculo liso con fibras orientadas circularmente con presencia de células del músculo liso orientadas de forma longitudinal. Por su parte, el istmo, región que cubre casi la mitad del oviducto, posee pliegues muy dispersos formados por epitelio cúbico, que a su vez está compuesto mayoritariamente de células secretoras. En esta región, se observa tanto células musculares lisas en la estructura de los pliegues como la conformación de numerosas criptas. Finalmente, la intersección útero-tubal muestra un pequeño lumen con unos pocos pliegues de epitelio cúbico, el cual está formado tanto por células secretoras como ciliadas y las criptas de esta zona muestran un epitelio más cilíndrico y compacto con similitudes con el endometrial (Pedrero-Badillo et al., 2013).

1.1.3 Funciones del epitelio oviductal

Como se ha indicado anteriormente, el oviducto es la estructura anatómica que conecta el ovario con el tracto uterino comportándose no solamente como un conducto pasivo si no como un órgano que participa del transporte de gametos y embriones en fase temprana y otras funciones de tipo secretorio como capacitación espermática, fecundación o desarrollo embrionario temprano. Mientras que la actividad ciliar de las células epiteliales facilitan el tránsito de los gametos y embriones hacia el útero, la actividad secretora regula la procesos de mantenimiento, capacitación y adherencia de los espermatozoides y favorece la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. En el conejo, además, el epitelio oviductal envuelve los cigotos con un cubierta de mucina que contribuirá posteriormente a facilitar la implantación. (Figura 3).

Según diversos estudios, se conoce que las células del epitelio oviductal permiten prolongar la vida útil del esperma mediante un mecanismo por el cual las células epiteliales proporcionan un revestimiento o protección a las cabezas de los espermatozoide de forma que mantienen la viabilidad de los mismos (Pacey et al. 1995 a, b; Kervancioglu et al. 2000; Suarez y Pacey 2006). La adhesión de las células tanto ciliares como secretoras del epitelio oviductal a los espermatozoides permite regular la actividad espermática reduciendo los niveles de calcio libre intracelular en el esperma durante el proceso de capacitación espermática (Dobrinski et al. 1997). En el caso concreto del experimento llevado a cabo por Dobrinski et al. (1997) en un modelo equino, se demostró que el mantenimiento de niveles bajos de Ca^{2+} se consigue mediante la interacción de un receptor espermático con su respectivo ligando en el epitelio del istmo del oviducto. Dicha interacción provocaría la extracción del Ca^{2+} intracelular de los espermatozoides y por ende, un incremento de Ca^{2+} en el fluido preovulatorio del istmo.

Además, en este estudio también se observó como los exosomas (vesículas) producidos por las células epiteliales del istmo permitían mantener bajos los niveles de Ca^{2+} intracelular en los espermatozoides y postergaban el proceso de capacitación y apoptosis de éstos.

Un estudio más reciente realizado por Caballero et al. (2014) evidenciaba el papel de las células epiteliales en el proceso de fecundación a través de la regulación del nivel de calcio del espermatozoide, en dicho proceso están involucrados eventos de adhesión entre los espermatozoides y las células epiteliales del oviducto (OECs) y las del cúmulo. Las células epiteliales participan en la adhesión con el fin de mantener la concentración de calcio intracelular baja mediante las cadherinas epiteliales (E-cadherinas), unas glucoproteínas transmembrana cuyo dominio citoplásmico se une a proteínas adaptadoras β -catenina permitiendo así los eventos de adhesión que se dan en el oviducto. En el estudio realizado en bovino se demostró la presencia de las E-cadherinas en espermatozoides, ovocitos, cúmulo oophorus y OECs (Caballero et al., 2014).

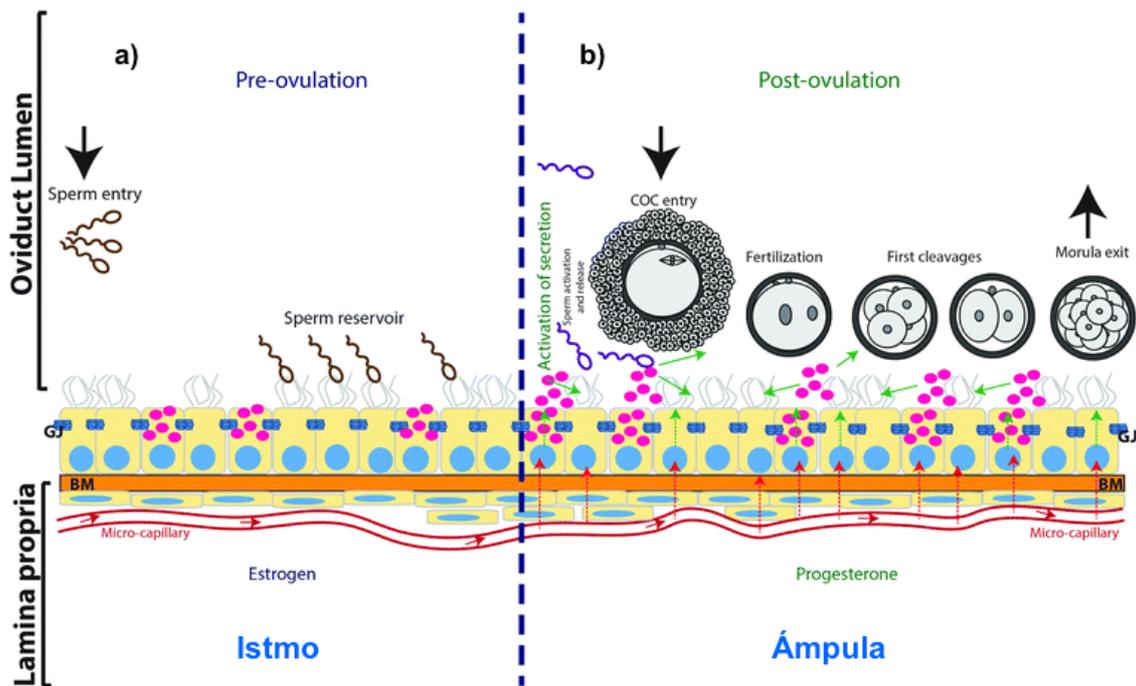


Figura 3 Representación de las funciones del oviducto con respecto a los gametos: a) Etapa preovulatoria en el istmo: entrada de espermatozoides y formación del reservorio de espermatozoides en las células epiteliales del istmo; b) Etapa postovulatoria: activación de la secreción, transporte de los espermatozoides hacia el sitio de fecundación, encuentro de los espermatozoides con las células del cúmulo, penetración del espermatozoide en la zona pelúcida y generación de la mórula que se dirige hacia el útero (Ferraz et al., 2017).

Como se ha indicado anteriormente, el oviducto actúa como un sitio de almacenamiento de espermatozoides en mamíferos, más concretamente el istmo. Para entrar en el istmo, el espermatozoide atraviesa la intersección útero-tubal, región donde se produce un control de la entrada del fluido espermático, no permitiéndose la entrada de espermatozoides deficientes en algunas proteínas implicadas en la adhesión entre el espermatozoide y el cúmulo oophorus como lo son la proteína ADAM2, la calmegina o la tACE (Nakanishi et al., 2004). Tras este control del contenido proteico del espermatozoide, el istmo realiza la función de reservorio del espermatozoide reteniéndolo, alargando la vida útil del mismo y permitiendo la liberación gradual del espermatozoide competente o preparado

para llevar a cabo la fertilización (Hunter y Leglise., 1971). Durante la preparación de los espermatozoides en su camino a ser competentes fértilmente, las células epiteliales del oviducto mantienen protegidos y anclados a los gametos masculinos suprimiendo su motilidad y aminorando la capacitación, lo cual acaba prolongando la vida útil (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Además, numerosos estudios afirman que proteínas solubles presentes en el fluido oviductal como la glutatión-peroxidasa del oviducto, la superóxido dismutasa y la catalasa se encargan de regular el equilibrio entre especies reactivas del oxígeno (ROS) y antioxidantes en el espermatozoide, lo cual es crucial para mantener la viabilidad y motilidad espermática (Lapointe et al., 2003). Recientemente se demostró que la activación de la transcripción de una peroxidasa estaba regulada por el comportamiento sexual en la hembra, de modo que al producirse la retención de espermatozoide en el epitelio del oviducto, se lograba producir una peroxidasa clave en la fertilidad a largo plazo (Shaw et al., 2014).

En la capacitación y adhesión de los espermatozoides al epitelio oviductal intervienen unos agentes presentes también en el fluido y epitelio oviductal: proteoglicanos y cadenas de glicosaminoglicanos (Figura 4). Se observan abundantes estructuras de glicanos con residuos de ácido siálico tanto en células ciliadas como no ciliadas de diferentes zonas del ampulla e istmo del oviducto. Por otro lado, únicamente en el istmo se encontraron glicanos unidos a estructuras de Lewis, que consisten un trisacárido de galactosa y fucosa unidas a N-acetilglucosamina con las que interactúan los espermatozoides que son retenidos en el epitelio (Machado et al., 2014; Miller, 2015). Los eventos de pérdida de proteínas o proteólisis contribuyen a que los espermatozoides se liberen del epitelio oviductal (Töpfer-Petersen et al., 2008; Hung y Suárez, 2010).

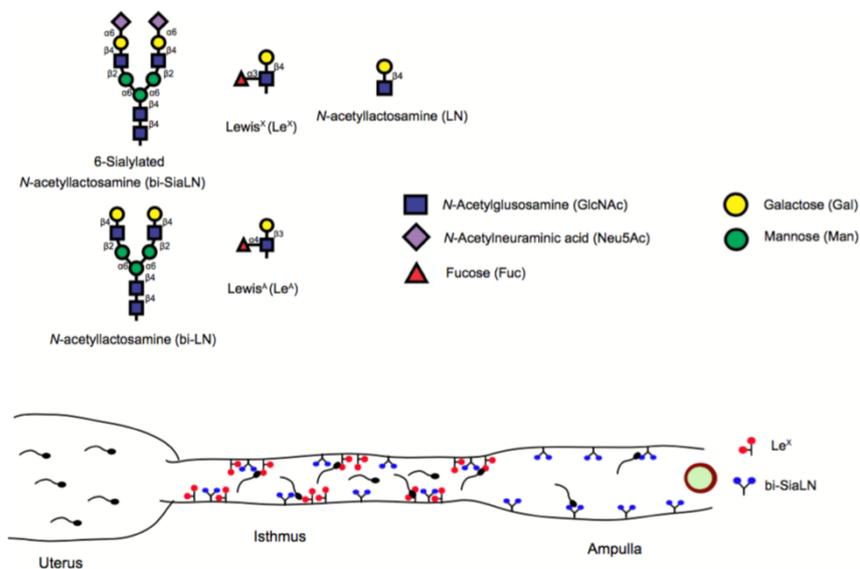


Figura 4 Estructuras de glicanos presentes en el epitelio oviductal, entre las que se encuentran bi-SiaLN, Le^x y ramificaciones con manosa. Se observa como únicamente las estructuras de Lewis son las que logran retener a los espermatozoides que atraviesan el oviducto (Miller, 2015).

Por su parte, muchas proteínas presentes en el fluido del oviducto son incorporadas los espermatozoides mientras están retenidos en este conducto. La glicoproteína específica de

oviducto u oviductina (OGP), también conocida como OVGP1 se produce en los oviductos de multitud de mamíferos donde se incorpora a los espermatozoides que allí se encuentran retenidos. Abe et al (1995) demostró la importancia de esta proteína dado su papel en el mantenimiento de la viabilidad y motilidad del esperma mediante eventos de fosforilación de residuos de tirosina en proteínas del espermatozoide. Recientes experimentos señalan que el esperma de ratón tratado con oviductina recombinante ve incrementado esos eventos de fosforilación, y por ende, se obtienen mayores tasas de capacitación de espermatozoides (Saccary et al., 2013). Además, la oviductina también interacciona con la zona pelúcida del ovocito donde crea sitios adicionales necesarios para la unión con los espermatozoides (O'Day-Bowman et al., 2002; Lyng y Shur, 2009). Otra proteína interesante que participa en los eventos de interacción entre el epitelio oviductal y los gametos es la osteopontina. A diferencia de la oviductina, no se encuentra una ganancia neta de osteopontina en los espermatozoides retenidos en el epitelio, lo que puede significar que ambas proteínas poseen funciones redundantes (Erikson et al., 2007). Sin embargo, hay estudios que afirman que la adición de esta proteína a una fecundación *in vitro* logra disminuir el grado de polispermia (Gonçalves et al., 2008; Monaco et al., 2009).

1.2 Reconstrucción de epitelios oviductales *in vitro*

1.2.1 Explantes de epitelios oviductales

El uso de células epiteliales de oviducto comenzó a principios de los años noventa con la finalidad de mejorar las condiciones de cultivo y, la viabilidad y desarrollo de los embriones producidos *in vitro* sobre todo en modelos como el bovino, en la que un 10,5% de los embriones que se comercializan son producidos *in vitro* (AETE, 2014). Otras especies también fueron objeto de estudio para la reconstrucción de epitelios oviductales, entre ellas, el caballo. Un estudio llevado a cabo en 1991 se centró en concretar las ventajas que suponía el uso de explantes oviductales (pequeños fragmentos separados de su órgano o tejido propio por métodos de disgregación mecánica o enzimática) en lugar de vesículas del trofoblasto para evaluar el desarrollo de embriones equinos en el día 2 de su desarrollo. Se concluyó que el co-cultivo de embriones con explantes oviductales mejoraba el desarrollo embrionario de embriones de 4 células hasta el estadio de blastocisto (Ball et al., 1991). Otro ejemplo de estos años fue el ensayo que comparaba la viabilidad embrionaria, la duración de la gestación y la tasa de nacimiento en oveja a partir de producidos *in vitro* e *in vivo* tras su cultivo con y en ausencia de células epiteliales oviductales. Sus resultados sugerían que el método de producción *in vivo* o *in vitro*, más que la presencia de células oviductales, determinaba la viabilidad y desarrollo de éstos (Holm et al., 1996).

Actualmente, se está reconsiderando el empleo de explantes de epitelios oviductales con el fin de subsanar las limitaciones de los actuales medios de cultivo e incrementar la calidad de los embriones producidos *in vitro*, de establecer modelos de estudio de las interacciones y señalizaciones locales que tienen lugar entre el epitelio del tracto oviductal y los gametos (Coy et al., 2012) e, incluso, modelos para ensayos de toxicidad reproductiva (Spielmann, 2009). En todos ellos es necesario reconstruir la estructura tridimensional del epitelio oviductal para evitar

eventos de desdiferenciación y obtener una respuesta adecuada cuando se estimulan dichos cultivos.

Un aspecto sumamente importante a mantener en la reconstrucción de epitelios oviductales es el debido aislamiento y polarización de las células epiteliales. Existen diferencias sustanciales en cuanto al uso de monocapas de epitelio oviductal o al uso de explantes oviductales en suspensión. Estudios llevados a cabo a finales del siglo pasado ya indicaban que las monocapas de células epiteliales del oviducto tienen una pobre adherencia (en torno al 50%). La estrategia de reconstrucción del epitelio oviductal permite una rápida proliferación, sin embargo, acarrea una serie de eventos de desdiferenciación como pérdida de caracteres morfológico, reducción del tamaño celular, pérdida del movimiento ciliar, ausencia de la morfología columnar y de microvellosidades o pérdida de secreciones específicas (Walter, 1995). Por su parte, la reconstrucción del epitelio oviductal basada en explantes oviductales permite mantener diferentes grados de diferenciación y función celular. Prueba de ello es el trabajo de Dobrinski et al (1999), en la que compararon el cultivo de células epiteliales a partir de explantes de ampulla e istmo de oviductos equinos en tres medios de cultivo con o sin fibroblastos y sobre matrigel, observando que características como la adhesión celular, la confluencia y la polaridad mejoraban en los cultivos con matriz. Matrigel parecía proporcionar mayor polaridad al cultivo y modificar ligeramente el patrón de secreción de las células.

Existen diversos métodos de cultivos celulares utilizados para intentar crear tejidos u órganos “in vitro” preservando su estructura tridimensional y funciones. A continuación, se exponen las características y aplicaciones de estos en el contexto de reconstrucción de epitelios oviductales.

1.2.2 Cultivos histotípicos

Los cultivos histotípicos son cultivos en suspensión de un solo linaje celular formados a partir de células procedentes de fragmentos de un tejido obtenidos por disgregación enzimática. Estos cultivos buscan restituir la estructura tridimensional del tejido original alcanzando densidades celulares elevadas. Este tipo de cultivos son interesantes para el desarrollo de la presente investigación ya que el objetivo primordial es restituir concretamente el tejido epitelial del oviducto, conformado por células ciliadas y secretoras.

En el contexto de los cultivos de células epiteliales de oviducto existe una nomenclatura para denominar los cultivos en función de la especie utilizada en el experimento. Esta nomenclatura consiste en las siglas OEC (cultivo de células epiteliales), común para todas las especies, además de la inicial correspondiente con la especie: MOEC (murino), BOEC (bovino), POEC (porcino). Estos tres modelos animales son los más comúnmente empleados en la biología reproductiva y por ende también lo son en el desarrollo de cultivos histotípicos. Un estudio llevado a cabo en 2011 escogió el cerdo como especie modelo debido a que se trata de un animal con semejanzas a nivel fisiológico y anatómico con los humanos además de ser de enorme interés las reacciones moleculares que se dan lugar en el oviducto porcino debido a su extendido uso en la industria alimentaria (Bendixen et al., 2010). En ese estudio, el cultivo de POEC logró reproducir con bastante éxito el fenotipo del epitelio oviductal si bien las células necesitaron un

periodo de tres semanas para terminar de diferenciarse y pasar de estar aisladas a aglomerarse y reconstruir las crestas y microvellosidades características del oviducto así como las funciones que estas características morfológicas permiten ejercer. Además, no se observó un incremento de eventos de dediferenciación pasadas las seis semanas del cultivo sino que se comenzaron a presenciar signos característicos de las células epiteliales columnares como el alargamiento del núcleo. En cuanto a las funciones específicas del oviducto, se observó mediante un test de respuesta hormonal al estradiol que el cultivo de POEC lograba expresar la oviductina u OVGP1, considerado el marcador más importante en el epitelio oviductal (Miessen et al., 2011). Los resultados que se obtuvieron en esta investigación consolidaron la estrategia de utilizar los cultivos histotípicos para abordar la reconstrucción del epitelio oviductal.

Recientemente, Chen et al. (2017) realizaron un estudio con células oviductales de tres modelos animales (murino -MOEC-, porcino -POEC- y bovino -BOEC-) en el que el cultivo se desarrolló en dos fases: proliferación y diferenciación (Figura 5). Tras la digestión enzimática, las células fueron cultivadas sobre un insert en un medio que favorecía la proliferación (suplementado, entre otros, con factor de crecimiento epidérmico, insulina y transferrina). En esta fase de proliferación, que coincide con la primera semana del cultivo, se implantaron las OEC en los inserts hasta que alcanzaron la confluencia. La fase de diferenciación precisó de dos semanas más para que las POEC y MOEC terminaran de diferenciarse a células epiteliales columnares tanto secretoras como ciliadas así como expresar actividad ciliar y alcanzar el grado de polarización adecuado. Por su parte, las BOEC necesitaron tan solo de siete días. Además de confirmarse la expresión de la oviductina, se realizó un estudio proteómico que detectó la presencia de aproximadamente el 97% de las proteínas presentes en los oviductos *in vivo* en los tres cultivos. Este estado diferenciado del cultivo epitelial duró ocho semanas, por lo que se logró reconstruir de forma eficaz el epitelio oviductal en los tres modelos. Finalmente, se evaluó la capacidad de estos cultivos para albergar un embrión y permitir su desarrollo a largo plazo. Los resultados de este experimento fueron positivos ya que las tasas de división celular tanto del embrión como del blastocisto fueron elevadas evidenciando así que la reconstrucción del epitelio oviductal tuvo éxito (Chen et al., 2017).

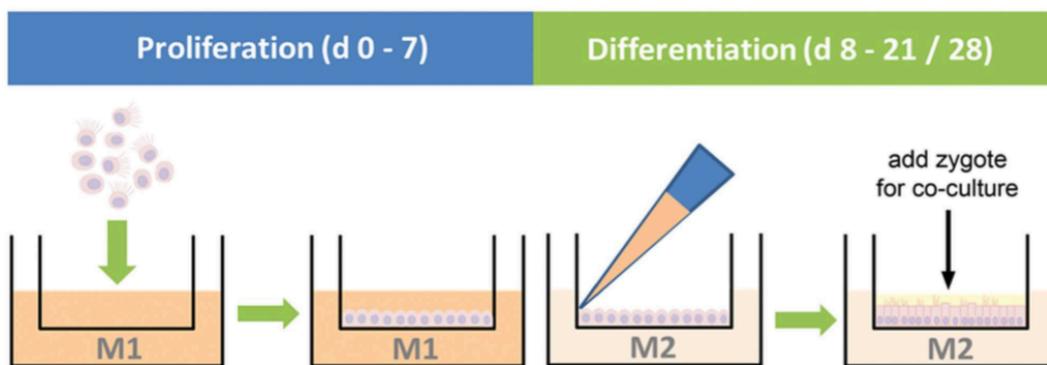


Figura 5 Representación esquemática de las dos fases del protocolo de cultivo de células epiteliales oviductales (Chen et al., 2017)

1.2.3 Cultivos organotípicos

Los cultivos organotípicos son cultivos adherentes donde las células pertenecen a diferentes linajes. En este tipo de cultivos, a diferencia de los histotípicos, las células generan una estructura tridimensional que simula la regeneración estructural de un órgano a nivel fisiológico y bioquímico. A finales de los años noventa, diversos estudios lograron desarrollar cultivos que reconstruían de forma intacta órganos completos como la glándula submandibular (Larsen et al., 2006) o el riñón (Srinivas et al., 1999).

En el contexto de la biología reproductiva, los cultivos organotípicos permiten evaluar la respuesta a estímulos hormonales con mayor eficacia que otros modelos *in vitro*. Una investigación llevada a cabo a principios de siglo desarrolló un modelo organotípico en el que células epiteliales de un endometrio humano se cultivaban a modo de organoides glandulares en matrices de Matrigel en un cocultivo junto con células estromales. En este estudio se consiguió estudiar los efectos de los esteroides en el endometrio humano en un sistema *in vitro*, el cual permitió un screening en tiempo real tanto de la proliferación celular del cultivo como de la expresión génica (Bläuer et al., 2005).

Con este y otros estudios, el modelo organotípico quedó consolidado como una sólida opción para estudiar *in vitro* los comportamientos internos en el tracto reproductivo. A pesar del potencial de este modelo *in vitro*, no se ha estudiado con la suficiente profundidad en el ámbito de la reconstrucción de epitelios oviductales. Eddie et al. (2015) intentó desarrollar un sistema de cultivo tridimensional del oviducto humano para evaluar así el rol de las fimbrias oviductales en eventos de tumorigénesis serosa y mutagénesis en cáncer ovárico. Para desarrollar dicho sistema utilizó una matriz de alginato a modo de soporte para la fimbrias *ex vivo*, las cuales fueron cultivadas con factores de carácter carcinogénico (Figura 6). El cultivo organotípico logró desarrollar poblaciones de células epiteliales ciliadas y secretoras, manteniéndose apto para los experimentos de respuesta a los factores tumorigénicos durante 7 días (Eddie et al., 2015). Por tanto, este sistema 3-D de fimbrias oviductales permitió recrear el microambiente fisiológico del oviducto. Sin embargo, esta investigación se enmarca en el ámbito oncológico y no hay estudios que sigan esta estrategia para modelizar los eventos embrio-maternales que ocurren en el oviducto.

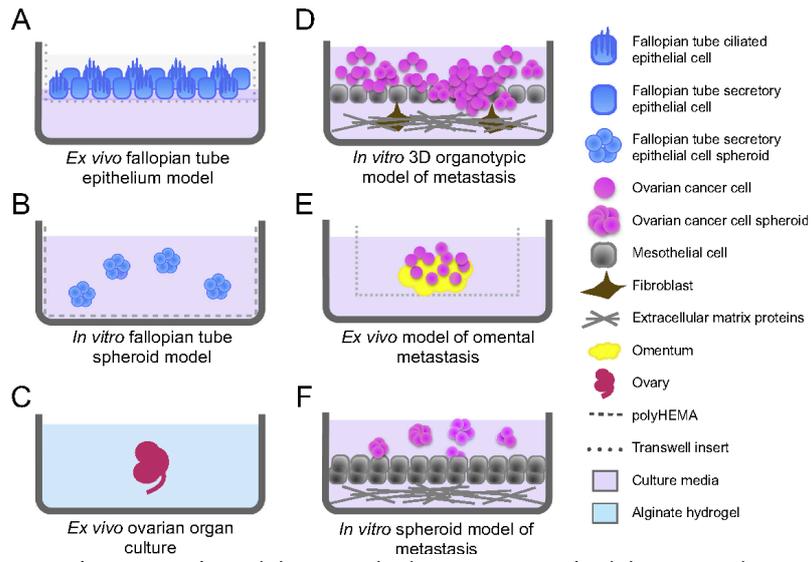


Figura 6 Representación esquemática del protocolo de reconstrucción del entramado epitelial de fimbrias oviductales en el sistema tridimensional de cultivos organotípicos (Eddie et al., 2015)

2. OBJETIVOS

La reconstrucción *in vitro* de un epitelio a partir de células de oviducto de conejo facilitaría tanto el estudio comparado entre especies como la mejora de los procesos de capacitación espermática, fecundación y desarrollo embrionario temprano. En este sentido, este estudio preliminar pretende:

- Obtener y caracterizar el cultivo primario de células epiteliales de oviducto de conejo (ROECs).
- Evaluar la viabilidad post-descongelación de las ROECs y su capacidad para establecer un cultivo primario.
- Evaluar el potencial de las ROECs para ser utilizadas en la mejora del desarrollo embrionario temprano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio.

El estudio constó de una primera fase en la que se evaluó el tratamiento enzimático para la extracción de células epiteliales del ámpula oviductal, su proliferación *in vitro* y su viabilidad post-descongelación y, de una segunda fase, en la que se evaluó su potencial como soporte del desarrollo embrionario temprano.

En la primera fase se utilizaron fracciones ampulares de oviductos procedentes de conejas en diferentes momentos de su ciclo a partir de la inducción de la ovulación:

- Ámpulas de 24 horas después de la inducción
- Ámpulas de 48 horas después de la inducción
- Ámpulas de 72 horas después de la inducción

A partir de las cuales se obtuvieron cultivos primarios de células epiteliales de oviducto de conejo (ROECs), evaluando la eficiencia de la extracción (viabilidad y concentración de células) en función de la enzima utilizada (colagenasa, pronasa y tripsina). Se caracterizaron los cultivos en términos de confluencia celular y motilidad ciliar y, por último, sobre ROECs extraídas con tripsina:

- Se analizó la viabilidad post-descongelación de las tres fuentes de células (tipos de oviductos).
- Se evaluó la expresión de los genes de la oviductina (OVGP1) y OCT4 de células congeladas o no de oviductos de 24h a tiempo cero (tras la extracción o tras la extracción y la descongelación), a los 2 días y a los 7 días de cultivo.
- Se estudió la tasa de proliferación celular medida como su PDL (acumulative population doubling level) de las células según el tipo de oviducto.

Finalmente, en la segunda fase, se utilizó el cultivo primario de ROECs para estimar su efecto sobre el desarrollo de embriones en estadio de pronúcleo y 2 células.

En la figura 7 se muestra de forma esquemática el diseño experimental del estudio.

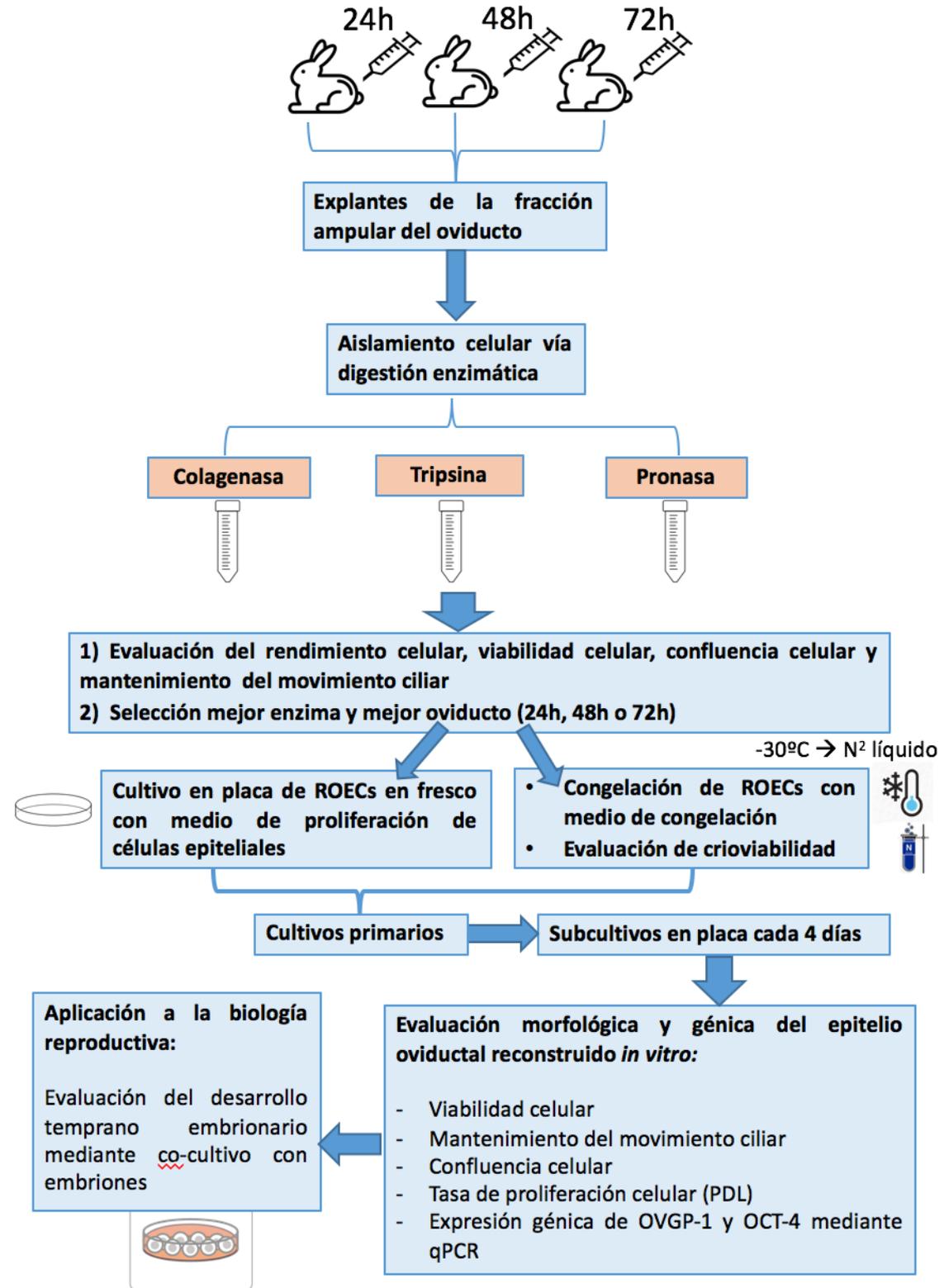


Figura 7 Diseño experimental del estudio

3.2 Obtención y preparación de los oviductos.

Para la realización de este estudio se obtuvieron tractos reproductores (oviducto y útero) de hembras de conejo recién sacrificadas en el matadero de la granja de animales de la granja del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal de la Universitat Politècnica de València. Estos tractos reproductores estaban destinados a la recuperación de embriones por lo que su sacrificio y procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa europea sobre experimentación con animales Directiva 2010/63 / UE y han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (código 2015 / VSC / PEA /00061). Los tractos fueron trasladados al laboratorio para ser procesados a temperatura ambiente, una vez recuperados los embriones para otros fines, se aislaron las fracciones del infundíbulo y ámpula del oviducto tal y como se observa en la figura 8.



Figura 8 Oviductos procesados en el presente trabajo. Izquierda: oviducto de 24h recubierto de tejido adiposo. Derecha: oviducto de 24h limpio.

Los oviductos aislados se lavaron en una solución de alcohol al 70% y tres veces en una solución con tampón fosfato salino (PBS, pH=7,4) atemperado a 37°C con el fin de reducir la carga microbiana y evitar posibles contaminaciones. A continuación, se procedió a diseccionar el ámpula del oviducto introduciendo un tubo de poliestireno de 1mm de diámetro desde el infundíbulo en dirección hacia el istmo de forma que el conducto oviductal recubre el tubo. De esta forma, fue más sencillo retirar tejido adiposo y el ligamento mesosálpinx, obteniéndose explantes de oviductos de entre 5 y 7 cm correspondientes a la fracción ampular, tal y como se observa en la figura 9 A. Posteriormente, se retiró parte del tubo dejando únicamente un pequeño trozo de en torno a 1cm dentro del conducto oviductal para posteriores manipulaciones, tal y como se observa en la figura 9 B.

Una vez obtenidos y preparados los explantes de las fracciones ampulares de los oviductos, éstos fueron sometidos a digestión enzimática con colagenasa, pronasa y tripsina para recuperar células epiteliales ROECs (rabbit oviduct epithelial cells) para su inmediato cultivo primario o su congelación.

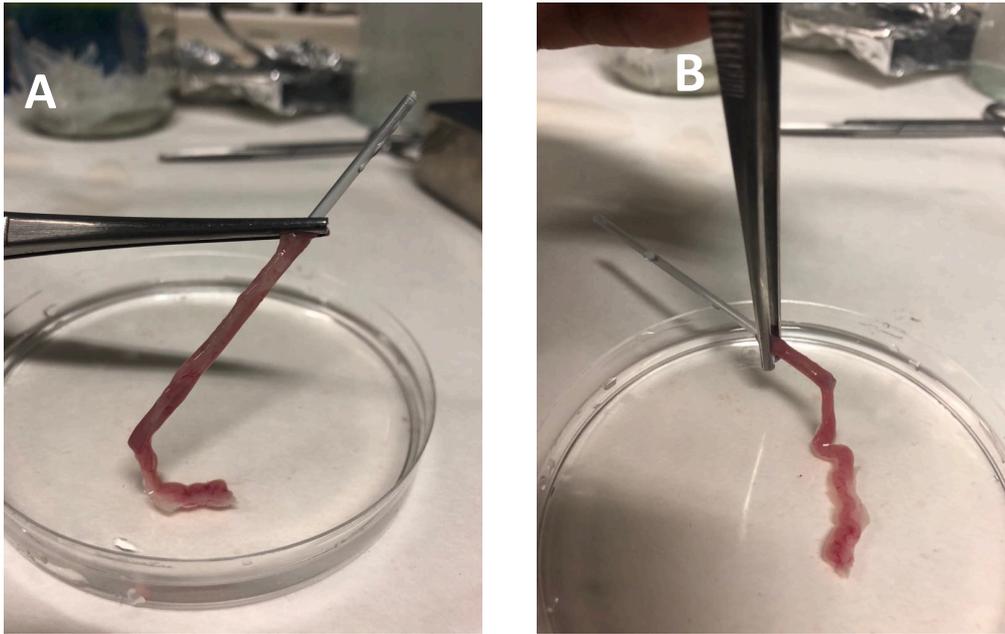


Figura 9 Explantes de la fracción ampular de oviductos procesados

3.3 Preparación y cultivo de las ROECs

3.3.1 Obtención de ROECs y establecimiento del cultivo primario.

Cada uno de los explantes de oviducto de cada coneja se sometió a una digestión enzimática con el fin de disgregar y aislar las células para posteriormente proceder a cultivarlas. En el estudio se emplearon tres enzimas diferentes: pronasa, tripsina y colagenasa. Las condiciones de la digestión fueron las mismas para las tres enzimas: 1 hora a 37°C con una solución de PBS al 1% (p/v). Tras someter a las muestras al proceso de digestión, se perfundieron los oviductos con ayuda de una pipeta, haciendo pasar por el conducto oviductal 2-3ml de medio de cultivo básico con suero bovino fetal al 10%. Tras la perfusión los tubos se agitaron en el vórtex y fueron centrifugados a 3000rpm durante 10min a temperatura ambiente, re-suspendiendo el pellet de uno de los oviductos de la coneja con 2ml de medios de proliferación y el otro, con 2ml de medio de congelación.

Las células re-suspendidas con el medio de proliferación fueron utilizadas para calcular la concentración celular mediante recuento en cámara de Thoma.

Además, se evaluó la viabilidad celular de cada muestra mediante una tinción con los fluoróforos SYBR/IP. Para este ensayo, se dispusieron en tubos eppendorf 100 μ L de la muestra de ROECs, a los que se les añadió 5 μ L del marcador SYBR. Se dejaron transcurrir 10 minutos desde que se añadió el SYBR para a continuación añadir 2,5 μ L de IP. A los 5 minutos de haber añadido el segundo fluoróforo, se añadió glutaraldehído para fijar la muestra y se depositó parte de ella en un portaobjetos y se observó en un microscopio de fluorescencia a 450/505 y 510/575 (longitudes de onda de excitación/emisión) para SYBR y IP respectivamente.

Tras realizar la estimación de la concentración y viabilidad celular en cada una de las muestras, se añadieron 10^4 células por cm^2 a las placas de cultivo P60 con 5 ml de medio de proliferación epitelial. Las ROECs fueron incubadas a 38.5°C , 5% de CO_2 y humedad de saturación, sustituyendo el medio de cultivo a las 24 horas para eliminar las células no adheridas y se observaron las placas cada 24 horas anotando cuando se alcanzaba la confluencia celular y la presencia y permanencia de movimiento ciliar.

Medio de cultivo básico

- DMEM / Ham's F12
- 15 mM HEPES
- 100 U/ml de penicilina
- 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomicina

Medio de proliferación

- Componentes del medio de cultivo básico
- 5% FBS
- 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina
- 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina
- 25 ng/ml de EGF

3.3.2 Congelación ROECs.

El pellet re-suspendido con medio de congelación se envasó en pajuelas identificadas de 0,5 ml, se refrigeraron 15 minutos a 5°C para posteriormente permanecer 30 min a -30°C , finalmente se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Medio de congelación

- 10% dimetilsulfóxido
- 90% Suero bovino fetal

3.3.3 Descongelación de ROECs

Para la descongelación, se procedió a retirar las pajuelas de los tanques de N_2 líquido para inmediatamente introducir las en un baño de agua a 40°C durante 30s. Una vez descongeladas las muestras, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min tras lo que se eliminó el medio de congelación y se re-suspendieron en 2ml de medio de proliferación, se evaluó su concentración y viabilidad y, se cultivaron como se ha descrito en el apartado anterior.

3.4 Evaluación de la capacidad de proliferación celular de las ROECs: PDL.

Las células se subcultivaron cada 4 días y se sembraron a una concentración de 10.000 células / cm^2 . El número de células se estimó tras su obtención mediante tripsina, bloqueo con suero, lavado de las mismas y recuento en cámara Thoma. La capacidad de proliferación de las células fue estimada mediante el cálculo del nivel de duplicación de la población (PDL). Para calcular el PDL, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{PDL} = (\log N_f - \log N_o) / \log 2$$

3.5 Extracción de RNA y transcripción reversa para la comprobación de la expresión del gen de la proteína oviductina (OVG1) como marcador de las células epiteliales oviductales.

El RNA total fue aislado utilizando el método tradicional de extracción de separación de fases con TRIzol/cloroformo. Tras la separación de fases, se recogió la fase acuosa y se le añadió isopropanol para precipitar el RNA. A continuación se eliminó el sobrenadante y se realizaron varios lavados con etanol. Finalmente el RNA extraído se diluyó 1:5 en agua miliQ. Para prevenir la contaminación por DNA, se realizó un tratamiento con desoxirribonucleasa al total de RNA aislado (100 ng) (gDNA Wipeout Buffer, Qiagen Iberia S.L., Madrid, España)

La concentración, calidad e integridad fueron evaluadas mediante el uso del equipo espectrofotométrico Nanodrop 200 (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos).

Tras esto se llevó a cabo la transcripción reversa utilizando el kit Reverse Transcriptase Quantitect (Qiagen Iberia SL, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El volumen final de reacción fue de 20 μ L. Una vez finalizada la retrotranscripción, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

La cuantificación relativa de los genes objeto de este estudio se realizó mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo Real (RT qPCR) con el termociclador modelo 7500 de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) y la enzima SYBR® Green como sistema de detección. Cada PCR se realizó en una dilución de 5 μ L de cDNA a una dilución 1:40, 250 nM de los cebadores directos y reversos (Tabla 1) y 10 μ L del Master Mix de PowerSYBR Green PCR (Fermentas GMBH, Madrid, España) en un volumen final de 20 μ L. El protocolo de PCR se inició con un ciclo inicial de 2 min a 50°C, seguido de uno de 10 min a 95°C y 42 ciclos a 95°C (15 segundos) y a 60°C (60 segundos). Una vez realizada la PCR, se realizó el análisis de la curva de melting mediante incrementos progresivos de temperatura desde 65°C a 95°C, al mismo tiempo que se obtenían datos de los cambios de intensidad de emisión fluorescente. Se realizaron diluciones seriadas de cDNA procedente de diversas muestras con el fin de comprobar la eficiencia de la PCR. Se empleó un método de ajuste (Weltzien et al., 2005), utilizando la media geométrica de los genes de referencia escogidos para ser usados como factores de normalización housekeeping: H2AFZ (miembro Z de la familia de histonas H2A; Mamo et al., 2008) y GADPH (gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa; Navarrete-Santos et al., 2004). Tanto los genes de referencia como los genes diana de la oviductina (OVGP-1;) y OCT-4 (octamer-binding transcription factor 4; Mamo et al., 2008) se analizaron por duplicado en muestras desconocidas. La expresión del pool de cDNA de diversas muestras se usó como calibrador para normalizar todas las muestras en una serie o varias series de PCR.

En cuanto a los genes diana elegidos para analizar su expresión, se escogió el gen de la oviductina (OVGP-1) ya que es la proteína con mayor relevancia y presencia en los oviductos de mamíferos (Abe et al., 1995). También se decidió analizar la expresión del gen OCT4 debido a su rol en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre (Medvedev et al., 2008; Shi y Jin, 2010).

Tabla 1. Características de los cebadores empleados en la qPCR

Gen	Secuencias de los primers	Tamaño amplificado	Nº de acceso	Referencia bibliográfica
OVGP-1	Fw - 5' CCACCTATGGACGCACCTTT	137	NM_001082105.1	-
	Rv - 5' CACGAAGGAGCAGACCTCAT			
OCT4	Fw - 5'CGAGTGAGAGGCAACTTGG	125 pb	NM_001099957	Mamo et al., 2008
	Rv - 5' CGGTTACAGAACCACACACG			
H2AFZ	Fw - 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	85 pb	AF030235	Mamo et al., 2008
	Rv - 5'CAGTCGCGCCACACGTCC			
GADPH	Fw - 5' GCCGCTTCTTCTCGTGCA	144 pb	L23961	Navarrete-Santos et al., 2004
	Rv - 5' ATGGATCATTGATGGCGACAACAT			

Una vez finalizada la qPCR, se realizó una curva de disociación del producto amplificado para comprobar la ausencia de amplificaciones no específicas, contaminaciones o primer dimers. El programa de tiempos y temperaturas empleado se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa de tiempos y temperaturas empleado en la qPCR

	Proceso	Tiempo	Temperatura (°C)
Pasos iniciales	Activación de la DNA polimerasa	2 min	50
		10 min	95
		15 s	95
PCR (40 ciclos)	Desnaturalización	30 s	60
	Hibridación/ extensión	15 s	95
	Curva de disociación	1 min	60
		15 s	95

La cuantificación de los niveles relativos de expresión génica, técnica mediante la cual se obtiene la magnitud de los cambios en los niveles de expresión del gen de interés al compararla con uno o más genes de referencia (Pfaffl et al., 2004), se realizó mediante la siguiente ecuación, descrita previamente por Weltzien et al., (2005):

$$\text{Ratio N} = \left[\text{E}_{f_target} \right]^{-(\text{Ct calibrador} - \text{Ct muestra})} \cdot \left[\text{E}_{f_Housekeeping} \right]^{-(\text{Ct muestra} - \text{Ct calibrador})}$$

3.6 Evaluación del desarrollo embrionario temprano mediante co-cultivo de las ROECs con embriones

Los embriones en estadio de pronúcleo y 2 células fueron obtenidos de 6 conejas donantes superovuladas con Corifolitropina alfa (FSH-CTP; Elonva; 150 µg/mL, Merck Sharp & Dohme S.A.; Spain), en una única dosis de 3 µg/0.5mL vía subcutánea. Las hembras fueron

inseminadas 72 horas después de recibir el tratamiento de superovulación. La inseminación se llevó a cabo con una dosis de, al menos, 20 millones de espermatozoides móviles en 0'5 mL de una mezcla de tres eyaculados de tres machos de la misma línea no emparentados. La dosis seminal se preparó a partir de los eyaculados obtenidos mediante vagina artificial y diluidos 1:10 en Tris-cítrico-glucosa (0'25 M Tris (hidroximetil) aminometano), 83 mM ácido cítrico, 47 mM Glucosa). Tras estimar el porcentaje de motilidad de cada uno, si éstos eran superior al 70% se mezclaron para, a continuación calcular la concentración en una cámara Thoma.

Las conejas fueron sacrificadas a las 22-24 horas de ser inseminadas mediante la administración intravenosa de 1 mL/kg de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinarias, S.A., Vétoquinol, Madrid, Spain). Una vez sacrificadas, se les extirpó el aparato reproductor para proceder a la recuperación de los embriones.

Los oviductos y los cuernos uterinos fueron perfundidos con 10 mL de tampón fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado con 0.2% (v/w) de BSA (albúmina de suero bovino, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,132 g/L de CaCl₂, 0,1 g/L MgCl₂ y antibióticos (100 UI de penicilina G sódica y 25 µg de dihidroestreptomicina por mL; Penivet, Divasa Farmavic, Barcelona, España), y atemperado a 37°C. A través del infundíbulo se introdujeron los 10 mL de medio, siendo el primer mililitro introducido más despacio para dilatar la unión itsmo-ampular. Debajo del cuerno uterino se colocó una placa Petri donde se recogieron los embriones para su posterior evaluación.

Los embriones se recuperaron observando las características que se corresponden con el estadio habitual de pronúcleo y 2 células a las 22-24 h tras la inseminación. Los embriones fueron catalogados como normales cuando se observó la presencia de 2 células o la presencia de 2 pronúcleos con la expulsión del 2º corpúsculo polar, en ambos casos debían tener un citoplasma homogéneo y una zona pelúcida esférica.

Los embriones normales fueron cultivados con un medio habitual para el desarrollo embrionario TCM199 (Sigma, St. Louis, MO, USA) con antibióticos (penicilina G sódica 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI y sulfato de dihidroestreptomicina 1250 mg/L, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España) y suplementado con 10% suero fetal bovino (control), en un medio condicionado (1/2 medio control + ½ medio en el que proliferaron células oviductales de conejas de coetáneas -24h- obtenido tras su primer subcultivo) y un co-cultivo de embriones con ROECs confluentes de conejas coetáneas cultivadas durante 7 días después de su extracción en las que se sustituyó el medio de proliferación por medio control el día en que se introdujeron los embriones en el cultivo. En todos los casos el cultivo se realizó en placas NUNC con un volumen de medio de cultivo de 750 µL y entre 10 y 15 embriones por pocillo de la placa.

Los embriones se cultivaron in vitro (CIV) durante 72 horas a una temperatura de 38°C y una atmósfera controlada con un 5,0% de CO₂ y humedad a saturación. Al finalizar el cultivo se evaluó el estadio de desarrollo alcanzado.

3.7 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 19.0. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

El efecto del enzima de digestión utilizado (colagenasa, pronasa y tripsina) y del tipo de oviducto (24h, 48h y 72h) sobre la concentración de células oviductales, viabilidad y periodo para alcanzar la confluencia y de mantenimiento de la actividad ciliar fueron analizados mediante un modelo lineal general en las que se incluyó ambos factores y su interacción. En el estudio sobre el efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y los parámetros de cultivo (periodo de confluencia y movilidad ciliar, PDL) se utilizó un modelo lineal general que incluyó como factores fijos la crioconservación (fresco y congelado), el tipo de oviducto y su interacción.

En el análisis de la expresión diferencial de los transcritos de OCT4 y OVPG1 de las células epiteliales se incluyó en el modelo los factores fijos: crioconservación (fresco o congelado) y tiempo de cultivo (control, 48 h y 7 días de cultivo).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Eficiencia de obtención de ROECs a partir de oviductos tratados con pronasa, colagenasa y tripsina de conejas inducidas a ovular 24, 48 y 72 horas antes.

4.1.1. Concentración de células epiteliales

Tanto la enzima utilizada para la digestión como el tipo de oviducto fueron factores determinantes en la cantidad de células obtenidas. Como se observa en la figura 10, tras realizar la digestión enzimática de 16 oviductos con colagenasa, 16 con pronasa y 17 con tripsina; se observó como el uso de la tripsina permite obtener un mayor rendimiento a nivel de concentración celular, alcanzado una media de 438.571 ± 21.144 células por ml frente a las 247.556 ± 21.602 en el caso de la colagenasa y las 267.222 ± 21.602 del caso de la pronasa. Estos resultados contrastan con los obtenidos en dos estudios, uno llevado a cabo en BOECs (células epiteliales del oviducto bovino) (Palma-Vera et al., 2014) y otro en POECs (células epiteliales del oviducto porcino, Chen et al., 2013b), donde reconstruyeron un modelo *in vitro* de oviducto con el fin de evaluar el impacto de la insulina en la morfología de dichas células. En ambos casos, se empleó la colagenasa como enzima para la digestión de los explantes de la fracción ampular de oviductos, la cual les permitió obtener 1×10^6 células por ml en el primer caso y, entre $0,5$ y 3×10^7 células en el segundo. Sin embargo, es preciso comentar que en sendos estudios se realizó un tratamiento de corte y disgregación mecánica del oviducto previo a la digestión enzimática. Esto puede explicar el mayor rendimiento, aunque probablemente también aumentó el número de células musculares, endoteliales y fibroblastos extraídas junto a las epiteliales, tratándose de células con capacidad de proliferación y que pueden ser contaminantes no deseados en el cultivo primario de las epiteliales. En el presente trabajo, la extracción celular fue mucho más dirigida a la recuperación de células del lumen ampular, de esta forma, se sacrificó un mayor rendimiento celular con el fin de reducir la contaminación de células endoteliales y de fibroblastos.

Por otra parte, el uso de la pronasa, una enzima que bloquea la inactivación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, no es habitual para el aislamiento de células epiteliales, sí lo son la digestión enzimática por medio de la tripsina, una peptidasa que ataca los enlaces peptídicos entre proteínas y la colagenasa, una metaloproteínasa de matriz que digiere los enlaces peptídicos del colágeno. Aldarmahi (2017) comparando el rendimiento entre tripsina y colagenasa en oviductos de cerda, obtuvo mejores resultados con la colagenasa que con la tripsina, sugiriendo un mayor concentración de células con capacidad de proliferación.

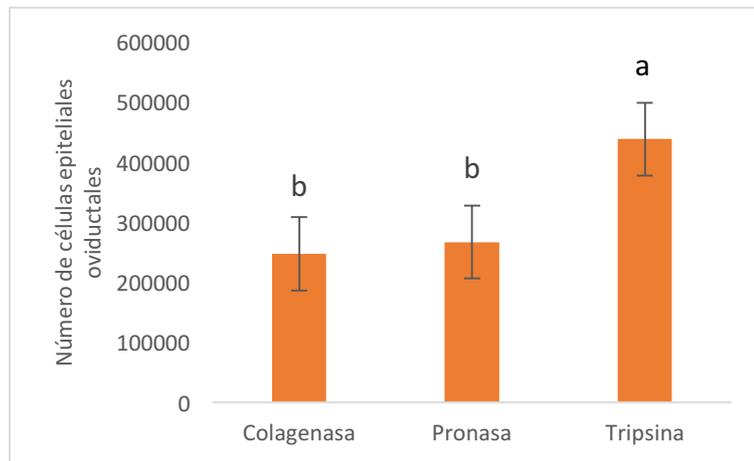


Figura 10 Concentración de células epiteliales oviductales en función de las enzimas empleadas en la digestión. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Atendiendo al momento en el que se obtuvieron los oviductos de las conejas (24h, 48h o 72h tras la inducción hormonal), tras evaluar 15 oviductos de muestras procedentes de conejas ovuladas 24h antes, 15 de 48h y 19 de 72h; se observó que los oviductos de coneja de 24h permiten una concentración celular mayor con una media de 388.000 ± 22.229 células por ml frente a las 304.000 ± 22.229 en el caso de las muestras de 48h y las 261.349 ± 19.803 en el caso de las muestras de 72h (Figura 11). En uno de los escasos estudios previos en los que se cultivaron ROECs se emplearon oviductos de conejas sacrificadas 19 horas post-inducción de la ovulación y se extrajeron estas células mediante digestión enzimática con tripsina al 0,5% (Carney et al., 1990). Sin embargo, no ofrecieron datos sobre rendimiento celular alcanzado. En trabajos realizados en OECs de otras especies no se ha llegado a comparar la extracción en distintos momentos del ciclo sexual (BOECs de vacas ovuladas 3-5 días antes, Eckhard et al., 2006; POECs de cerdas no cíclicas, Chen et al., 2013a; MOECs de ratonas en celo, POECs and BOECs de cerdas y terneras sin identificar su momento del ciclo, Chen et al. 2017).

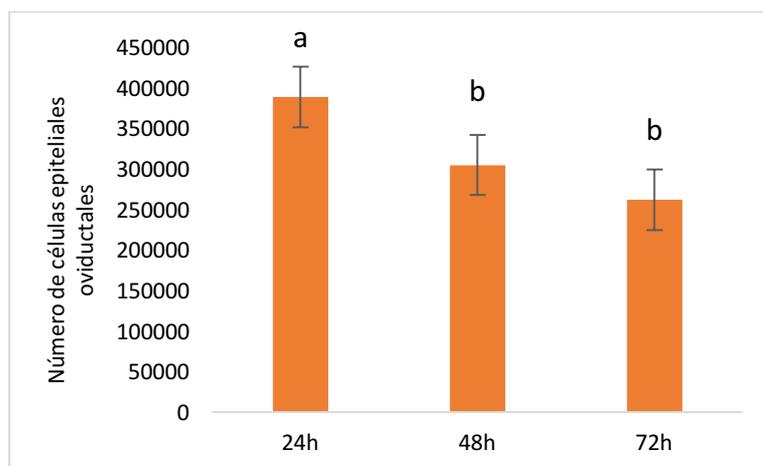


Figura 11 Concentración de células epiteliales oviductales en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

No se observó una interacción estadísticamente significativa entre el tipo de oviducto y la enzima utilizada ($P=0,058$). No obstante, cabe reseñar que de los oviductos de hembras de conejo sacrificadas 24h después de la inducción hormonal y que fueron sometidos a una digestión enzimática con tripsina se obtuvo un rendimiento celular de 556.000 ± 38.501 ROECs por ml.

4.1.2 Viabilidad de las ROECs tras su extracción.

Como se observa en la figura 12, la digestión enzimática con colagenasa, pronasa o tripsina afecta ligeramente a la proporción de células viables. La tripsina aumenta significativamente la proporción de células vivas frente al uso de la colagenasa, alcanzado una media del $63,6 \pm 1,94$ % de células vivas frente al $56,3 \pm 1,99$ % en el caso de la colagenasa. La digestión con pronasa ofreció un valor intermedio $59,7 \pm 1,99$ %.

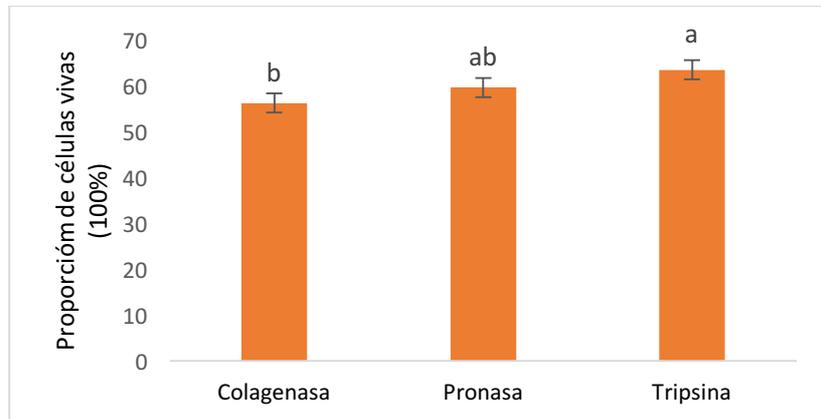


Figura 12 Proporción de células epiteliales vivas en función de la enzima empleada en la digestión. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$)

El factor tipo de oviducto (24h, 48h o 72h tras las inducción hormonal) no fue estadísticamente significativo, aunque sí la interacción con la enzima utilizada, tal y como se muestra en la figura 13 y la figura 14. En estudios previos realizados en otros modelos animales se alcanzaron tasas de viabilidad algo superiores. En concreto, en un sobre los factores que afectan a la proliferación y des-diferenciación de BOECs se obtuvo una viabilidad celular del 84%, utilizando tripsina al 0,25% (Cox et al., 1997) mientras que en otro similar utilizando colagenasa, la viabilidad de las BOECs fue de un 95% (Mishra et al., 2003). Además, de la posible diferencia debido a la especie, el procedimiento de extracción y la utilización de un concentración enzimática del 1% en el presente trabajo podría haber provocado un descenso de la viabilidad. No existen referencias para la viabilidad post-extracción de las ROECs.

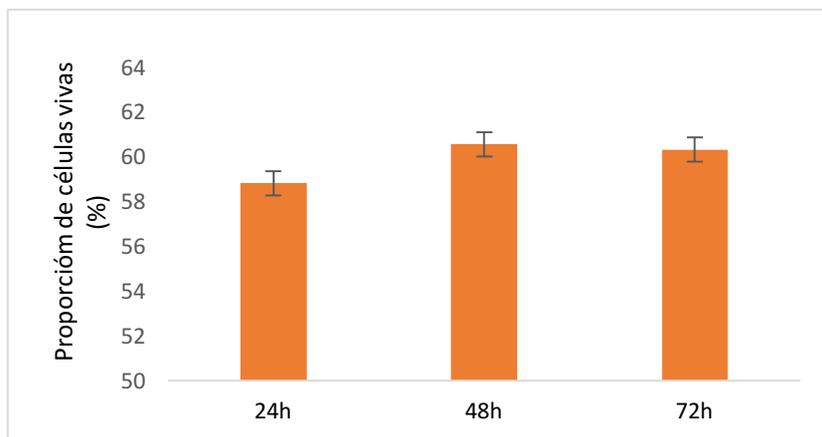


Figura 13 Proporción células epiteliales oviductales viables en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Como se ha comentado, se observó una interacción significativa entre el tipo de oviducto y la enzima (figura 14). En el caso de la pronasa, la viabilidad celular es significativamente menor si se utilizan oviductos de 72h ($51,3 \pm 3,23$ %) que si se utilizan oviductos de 48h ($64,6 \pm 3,54$ %) mientras que en la colagenasa, la viabilidad celular es significativamente mayor si se utilizan oviductos de 72h ($61,8 \pm 3,23$ %) que si se utilizan oviductos de 48h ($52,6 \pm 3,54$ %).

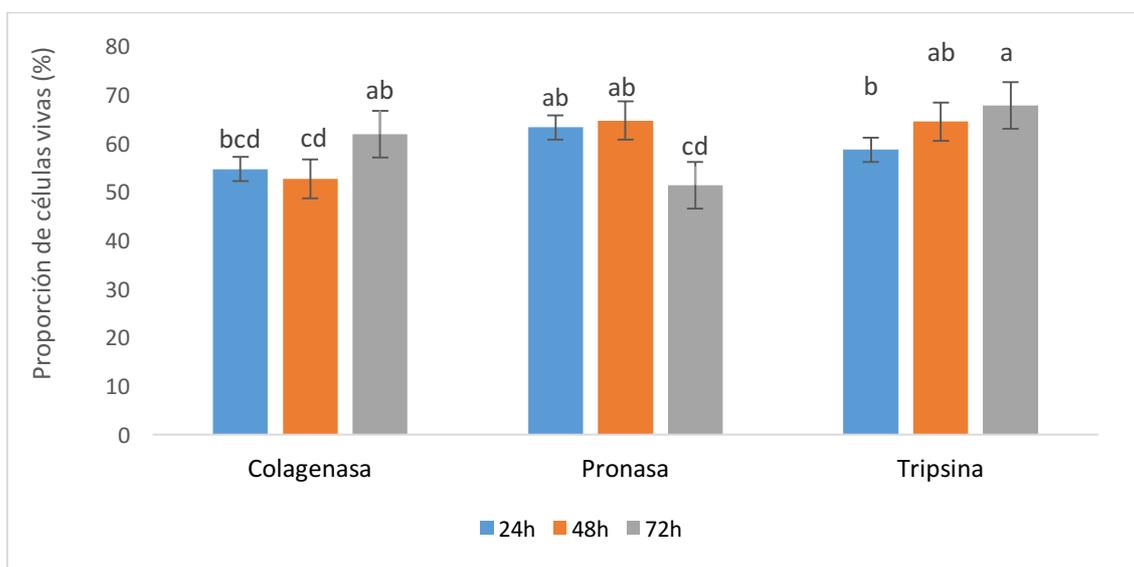


Figura 14 Proporción de células epiteliales oviductales vivas en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Tal y como se observa en la figura 15, durante la valoración de la viabilidad se pudo apreciar el aspecto cúbico y la presencia de cilios, característico de éstas células epiteliales. Otro de los aspectos destacable durante la valoración fue la elevada supervivencia celular observada en las pequeñas agrupaciones celulares a diferencia de las células aisladas, que en su mayoría estaban muertas o en proceso de apoptosis. Este hecho puede deberse al proceso de anoikis,

muerte celular inducida por la pérdida de conexión entre las células y la matriz celular, en este caso la lámina propia (Kaeffer et al., 2011).

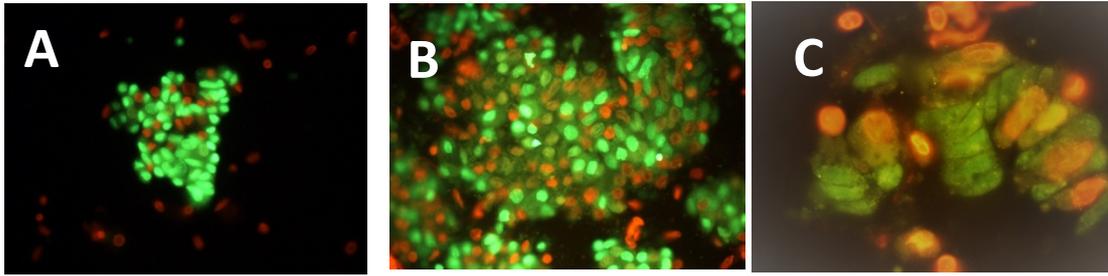


Figura 15 ROECs en fresco de 48h observadas con microscopio de fluorescencia. Verde: núcleos de células vivas; Rojo: núcleos de células muertas. A 200x, B 400x, C 1000x

4.1.3 Confluencia celular en placa.

La media de días que transcurrieron hasta que los diferentes cultivos de ROECs alcanzaron la confluencia en placa fue de $5,9 \pm 0,13$ días. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de oviducto empleado (24h, 48h o 72h), tal y como se muestra en la figura 16. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes enzimas empleadas en la digestión (figura 17). Estos resultados contrastan con el estudio publicado recientemente donde se comparó la digestión con colagenasa y tripsina en cultivos de POECs, transcurriendo un mayor número de días (22-25 días) hasta alcanzar la confluencia en placa en el caso de las POECs aisladas mediante digestión con tripsina frente a las obtenidas por digestión con colagenasa (5-12 días) (Aldarmahi et al., 2017).

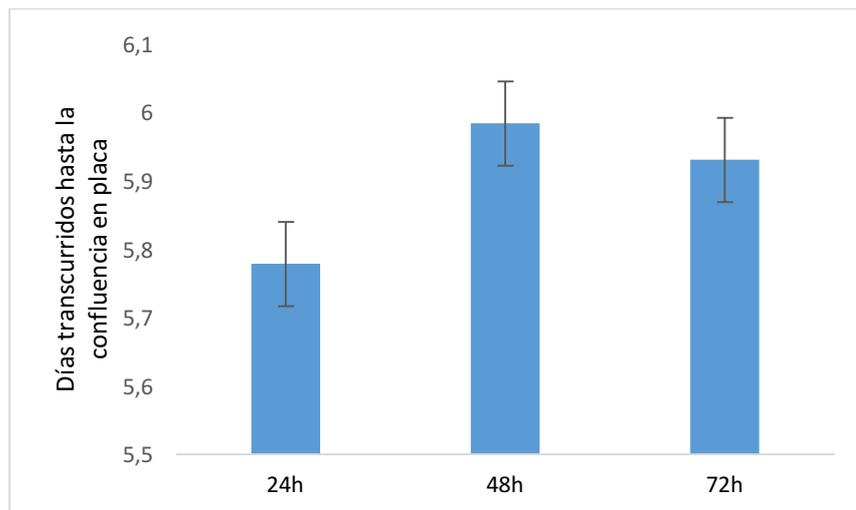


Figura 16 Periodo de días que transcurren hasta alcanzar la confluencia ROECs en fresco y ROECs congeladas en una placa P60. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

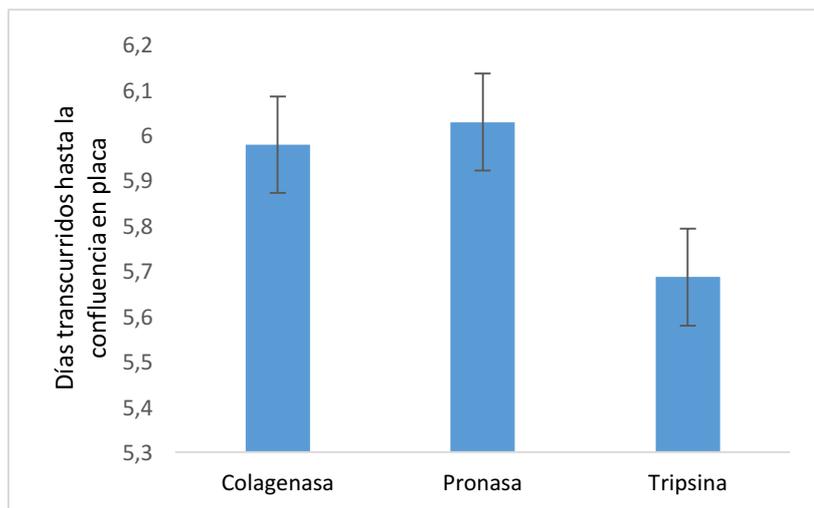


Figura 17 Periodo de días que transcurren hasta alcanzar la confluencia ROECs en fresco y ROECs congeladas en una placa P60. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

En el trabajo realizado por Chen et al. (2017) con OECs de ratón, porcino y bovino cultivadas en un medio de proliferación a una concentración inicial de 10^4 células por cm^2 , todas ellas alcanzaron la confluencia celular en torno al séptimo día, resultados similares a los obtenidos en este estudio.

4.1.4 Mantenimiento del movimiento ciliar.

El mantenimiento del movimiento ciliar en los cultivos de ROECs del presente estudio se pudo mantener de media durante $6,9 \pm 0,14$ días, lo cual se aproxima mucho a los 6 días en los que Nelis et al. (2014) observó movimiento ciliar en el cultivo de explantes de oviducto equino, superior al observado por Rottmayer et al. (2006) en el cultivo de BOECs de día 3,5 post-celo, únicamente durante 24 horas y solo en agregados celulares. Sin embargo, Miessen et al. (2011) sí obtuvo y logró mantener la actividad ciliar mediante un cultivo en interfase aire-líquido de POECs durante 3 semanas. En el estudio en el que se co-cultivaron ROECs con embriones simplemente se señaló la presencia de actividad ciliar, pero no se registró un periodo de tiempo de duración de la misma (Carney et al., 1990).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de oviducto empleado (24h, 48h o 72h) en el tiempo que transcurrió hasta que los cultivos de ROECs perdieron la movilidad ciliar en placa (figura 18). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes enzimas empleadas en la digestión (figura 19). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo se asemejan a los obtenidos por Aldarmahi et al. (2017) en el que no observó diferencias entre los cultivos de POECs obtenidos a partir de la digestión de tripsina y colagenasa.

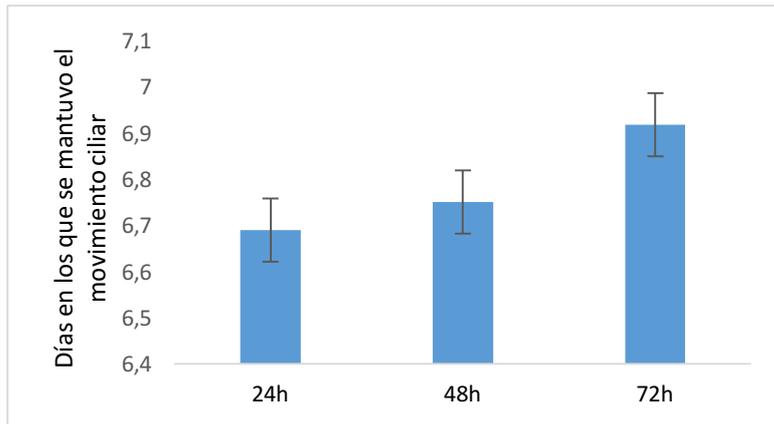


Figura 18 Mantenimiento del movimiento ciliar en ROECs para cada uno de los tres tipos de oviducto en función del momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

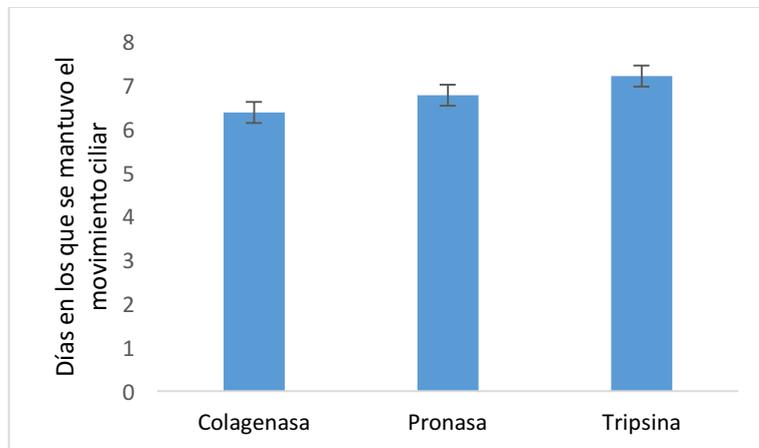


Figura 19 Mantenimiento del movimiento ciliar en ROECs para cada uno de las enzimas empleadas en el aislamiento celular. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

En otros estudios realizados en cultivo en monocapa de BOECs de día 3,5 de su ciclo lograron observar movimiento ciliar pero únicamente durante 24 horas y solo en agregados celulares (Rottmayer et al., 2006). Sin embargo, Miessen et al. (2011) sí obtuvo y logró mantener la actividad ciliar mediante un cultivo en interfase aire-líquido de POECs durante 3 semanas. En el estudio en el que se co-cultivaron ROECs con embriones simplemente se señaló la presencia de actividad ciliar, pero no se registró un periodo de tiempo de duración de la misma (Carney et al., 1990).

En la figura 20 se puede observar como algunas células epiteliales desarrollaron cilios que confieren motilidad ciliar al entramado epitelial de las ROECs de este estudio.

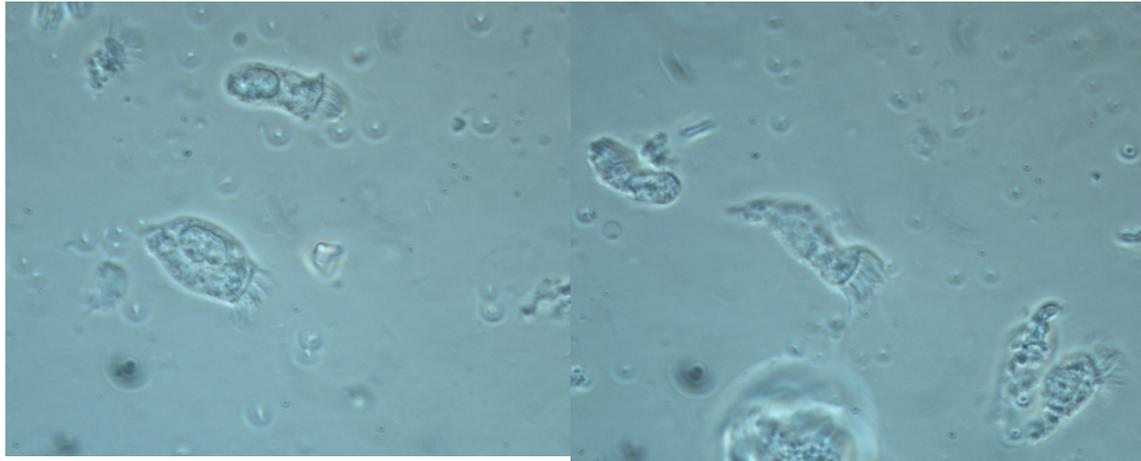


Figura 20 Detalle de los cilios de las ROECs. Aumento 1000x.

4.2. Efecto de la congelación-descongelación de ROECs tras su extracción con tripsina.

4.2.1 Viabilidad de las células epiteliales descongeladas según el tipo de oviducto.

Tras la valoración de los análisis de la viabilidad y rendimiento en concentración celular de las ROECs en fresco, se decidió abordar la evaluación de la crioviabilidad solamente en las muestras de ROECs que habían sido tratadas enzimáticamente con tripsina. Así, se evaluó la viabilidad pre y post - descongelación de 6 muestras para cada tipo de oviducto. Los resultados mostraron un rango de proporción de células vivas comprendido entre el 59,8% y el 67,8% en las ROECs, no observándose diferencias ni el tipo de oviducto ni por el hecho de haber sido congeladas y descongeladas (figura 21). Los resultados demostraron que es posible congelar células epiteliales oviductales de forma eficiente ya que más del 90% de células viables extraídas permanecen viables post-descongelación. Resultados similares se obtuvieron en un trabajo reciente en el que se evaluó el potencial de cultivos de células epiteliales de oviducto de canes (COECs) en fresco y congelados para favorecer la maduración *in vitro* de ovocitos (No et al., 2018).

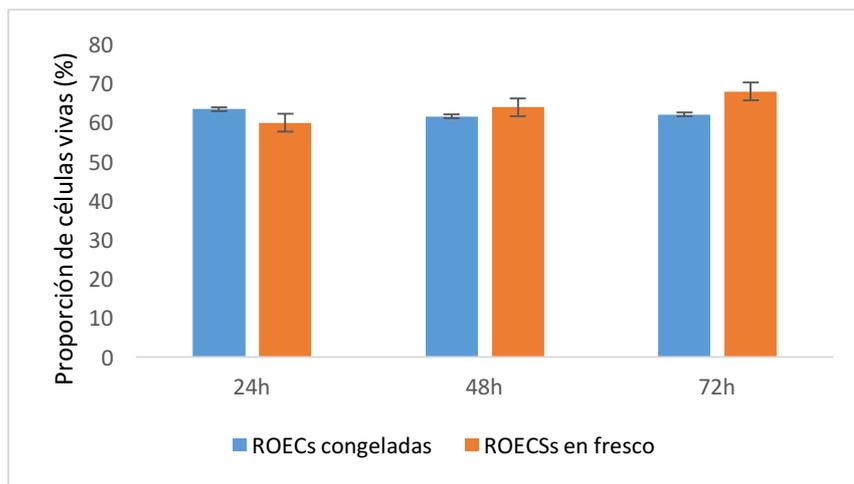


Figura 21 Proporción de células epiteliales oviductales vivas en muestras en fresco y congeladas en función del tipo de oviducto según el momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Las observaciones ya realizadas en relación con la viabilidad de las células epiteliales recién extraídas se repitieron con las congeladas-descongeladas, observándose que las células viables suelen estar en pequeñas agrupaciones celulares, tal y como se aprecia en la figura 22 A y B.

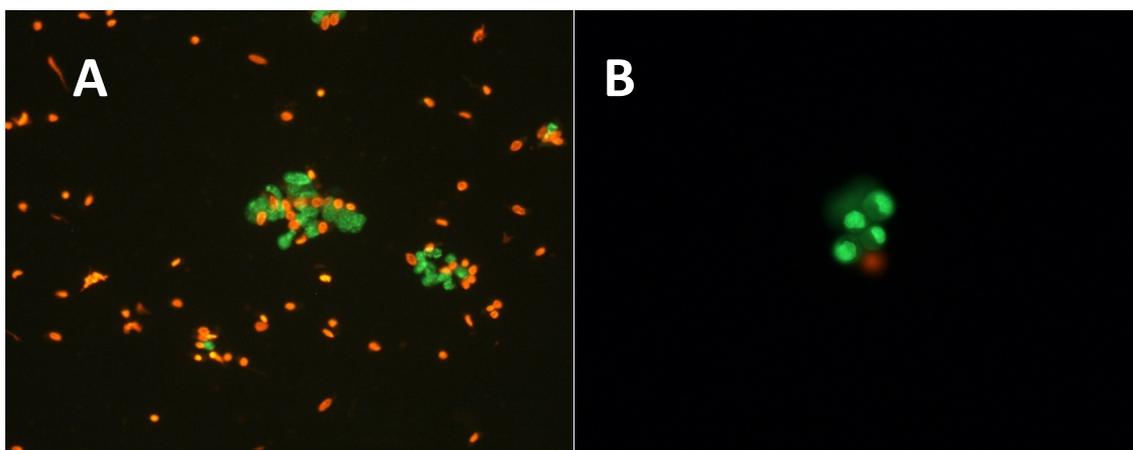


Figura 22 ROECs congeladas observadas con microscopio de fluorescencia. Verde: núcleos de células vivas; Rojo: núcleos de células muertas. A. 200x y B 400x.

4.2.2 Mantenimiento del movimiento ciliar

El mantenimiento del movimiento ciliar fue utilizado, de nuevo, para estimar el periodo en el que tanto los cultivos primarios, congelados o no lograban mantener ciertas características de un epitelio oviductal diferenciado. En el presente estudio se obtuvieron resultados similares entre los tres tipos de oviductos (24h, 48h y 72h). La media de días que se mantuvo el movimiento ciliar en el total de cultivos evaluados fue de $6,8 \pm 0,14$ días. Las diferencias significativas se observaron, tal y como se muestra en la figura 23, entre los cultivos primarios de ROECs en fresco y los cultivos primarios de ROECs congeladas. Las ROECs en fresco ($7,2 \pm$

0,25) consiguen mantener durante más tiempo el movimiento ciliar que las ROECs congeladas ($5,6 \pm 0,22$). La interacción del tipo de oviducto y el enzima empleado en la digestión no fue significativa.

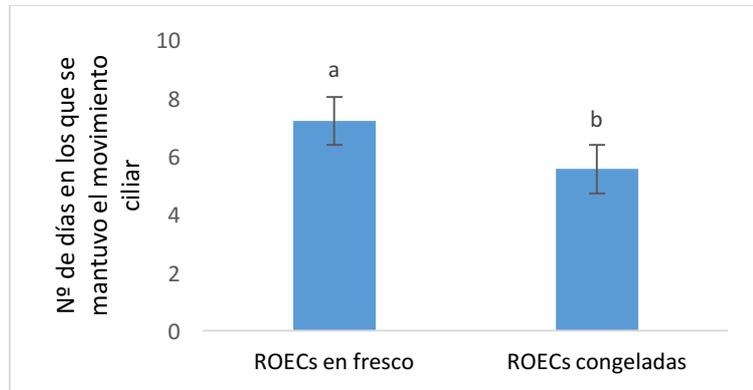


Figura 23 Mantenimiento del movimiento celular en ROECs en fresco y congeladas para cada uno de los tres tipos de oviducto en función del momento del ciclo de la coneja. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

4.2.3 Confluencia celular en placa P60

Tal y como se muestra en la figura 24, las ROECs congeladas tardaron más tiempo en alcanzar la confluencia que las ROECs en fresco. En el caso de las ROECs congeladas, la media de días en alcanzar la confluencia celular en placa se sitúa en $6,7 \pm 0,21$ días mientras que en las ROECs en fresco se sitúa en $5,7 \pm 0,25$ días. La media de días alcanzada sin tener en cuenta la congelación o no de las ROECs fue de $5,9 \pm 0,13$ días.

Estos resultados con células congeladas de conejo se aproximan como ya se ha comentado antes a los obtenidos por Chen et al. (2017) con los tres modelos animales utilizados y con células oviductales no congeladas.

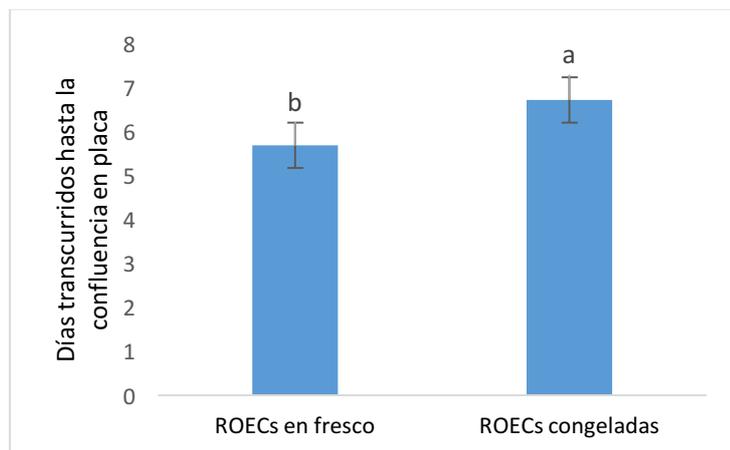


Figura 24 Periodo de días que transcurren hasta alcanzar la confluencia ROECs en fresco y ROECs congeladas en una placa P60. Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

En la figura 25 se observa el aspecto de una placa p60 de ROECs de 48h en la que se ha alcanzado la confluencia celular a los 7 días en el caso de la figura 25 A y a los 6 días en el caso de la figura 25 B.

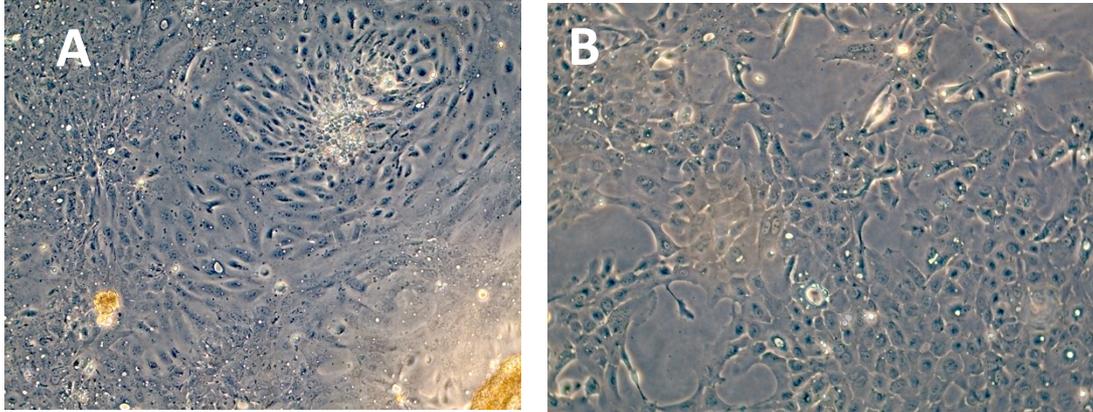


Figura 25 Confluencia celular en placa p60. Aumento: 40x.

4.2.4 Expresión génica de OVGP1 y OCT-4

Tanto en las ROECs en fresco como en las congeladas-descongeladas la expresión del gen de la oviductina (OVGP-1) fue similar, máxima en el momento de la obtención y/o descongelación, reduciendo su expresión rápidamente durante el cultivo (figura 27). A las 48h de iniciado el cultivo ya se evidencia la desdiferenciación de las células oviductales a nivel de este marcador. La congelación-descongelación no produce efectos adicionales al cultivo en monocapa de estas células. Palma-Vera et al. (2014) observaron en un cultivo en interfase aire-líquido de BOECs que tras una estimulación con 50ng/ml de estradiol, los cultivos mantuvieron la expresión de OVGP-1 hasta 6 semanas después de haberse iniciado, aunque con elevada variabilidad entre los cultivos. Miessen et al. (2011) demostraron que era posible estimular la expresión de OVGP-1 tras 3 semanas de cultivo de POECs añadiendo 50ng/ml de estradiol y 5ng/ml de progesterona al medio de cultivo, el efecto sobre la expresión fue apreciable a las 10h mientras que la producción de proteína se incrementó significativamente tras 2,5 días.

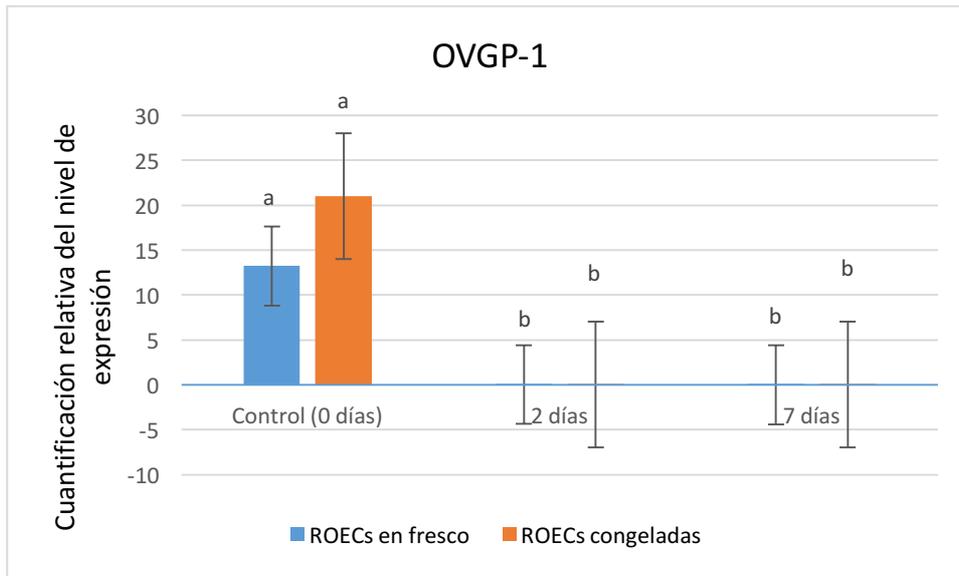


Figura 26 Diferencias relativas de la expresión de OVGP-1 entre ROECs en fresco y ROECs congeladas en el momento de su obtención o descongelación (control), a los 2 y a los 7 días de iniciar el cultivo. La expresión se normalizó mediante una combinación de múltiples genes housekeeping (H2AFZ y GADPH). Las columnas indican el promedio del nivel de expresión en los casos medidos. Las barras indican la desviación estándar de cada una de las réplicas de la q-PCR.

Del mismo modo, con la finalidad de detectar la presencia potencial de células madre se comprobó que tanto las ROECs en fresco como las congeladas expresaban OCT-4 (Medvedev et al., 2008; Shi y Jin, 2010). En este caso, el nivel de expresión de OCT-4 en los cultivos de ROECs congeladas en el momento de su obtención y a los 2 días de cultivo fue significativamente superior al nivel de expresión a los 2 días en ROECs en fresco y al de las ROECs en fresco y congeladas a los 7 días (figura 28). A diferencia del gen de la oviductina, el gen OCT-4 no ha sido un gen habitual en el análisis de expresión de células epiteliales de oviducto. Por tanto, el resultado sugeriría la presencia de células madre adultas, aspecto que es necesario comprobar con un panel de marcadores apropiados. Ratajczack et al. (2011) mostraba evidencias de la presencia de células madre de origen embrionario-fetal en diferentes órganos y tejidos de adultos. En este sentido, estudios realizados para evaluar el potencial de las células de las trompas de Falopio para desencadenar carcinomas (Paik et al., 2012) y el potencial regenerativo del oviducto de ratón (Snegovskikh et al., 2014) detectaron la expresión de marcadores característicos de células madre y sugirieron que este grupo de células indiferenciadas permite al oviducto regenerarse con rapidez y responder de forma inmediata ante posible daños.

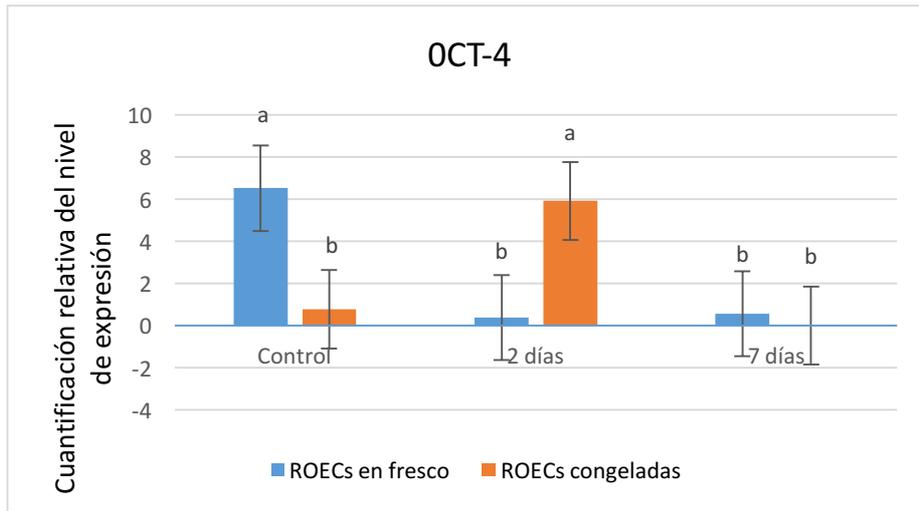


Figura 27 Diferencias relativas de la expresión de OCT-4 entre ROECs en fresco y ROECs congeladas en el momento de su obtención o descongelación (control). La expresión se normalizó mediante una combinación de múltiples genes housekeeping (H2AFZ y GADPH). Las columnas indican el promedio del nivel de expresión en los casos medidos. Las barras indican la desviación estándar de cada una de las réplicas de la q-PCR.

4.2.5 PDL del cultivo primario de células oviductales

La capacidad proliferativa de las ROECs fue evaluada en los subcultivos procedentes de ROECs en fresco. El PDL o nivel de duplicación de la población observado durante 12 días permitió reflejar el número de generaciones que podía alcanzar cada uno de los subcultivos de ROECs en fresco de oviductos de 24h, 48h y 72h. Como se aprecia en la figura 26, la línea de ROECs de los oviductos de hembras sacrificadas 72h después de la inducción hormonal, tiene un potencial proliferativo mayor que las líneas de ROECs de oviductos de 24h y 48h que apenas proliferaron a partir del segundo subcultivo mientras todavía las ROECs de 72h parecen disponer de potencial de proliferación. Así, las ROECs de 72h alcanzaron las 7 generaciones a los 12 días mientras el PDL de las de 24h y 48h se situó en torno a 6.

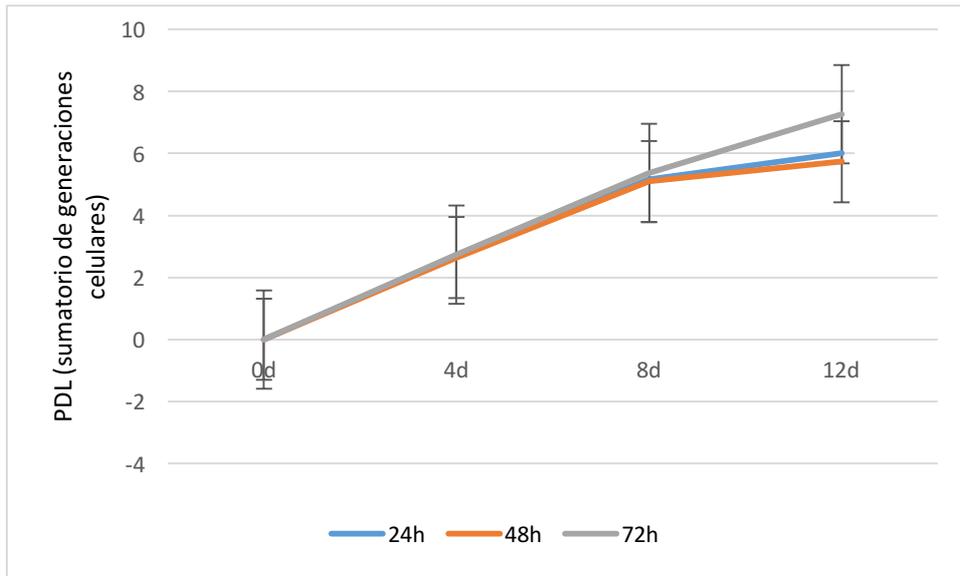


Figura 26 Evolución del PDL en los diferentes subcultivos de líneas de ROECs procedentes de cada uno de los tres tipos de oviducto en función del momento del ciclo de la coneja.

Los resultados de PDL obtenidos en el presente estudio denotan una escasa capacidad proliferativa de las células epiteliales si se compara con otros tipos celulares, lejos de células tumorales obtenidas de hígado con PDL de 230 (Schaeffer et al., 1979), de células madre adultas epiteliales como las limbares con 400 generaciones (PDL acumulado, Okamoto et al., 1995) o células madre mesenquimales de diferentes orígenes entre 10 y 45 generaciones (Kim et al., 2012). En el ámbito en el que se enmarca el presente trabajo, relativamente pocos estudios han registrado la capacidad proliferativa de sus cultivos de OECs en PDL. Un estudio llevado a cabo en un co-cultivo de COECs con ovocitos demostró una tasa de proliferación limitada, PDL de 3 (No et al., 2018). Los resultados de dicho ensayo traducidos a PDL otorgan un PDL medio de 3 generaciones, lo que denota menor potencial proliferativo que los cultivos de ROECs del presente estudio.

4.3 Desarrollo embrionario temprano sobre ROECs.

Para evaluar el potencial del modelo de epitelio oviductal reconstruido in vitro, se analizó el desarrollo alcanzado a las 72 horas de cultivo de embriones en estadio de pronúcleo y 2 células. En la figura 29 se aprecia el aspecto de los embriones al inicio del cultivo. En el ensayo se comparó el efecto que tres tipos de medio ejercían sobre el porcentaje de embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto, 87 embriones en un medio control sin ROECs, 54 embriones en un medio condicionado que contenía secreciones de ROECs y 88 embriones en medio control pero con con ROECs sembradas 7 días antes. Cabe mencionar que las ROECs empleadas tanto en el medio condicionado como en el co-cultivo procedían de una digestión enzimática con tripsina de explantes de oviductos obtenidos de conejas sacrificadas 24h después de la inducción hormonal.



Figura 27 Embriones en estadio de pronúcleo y 2 células obtenidos de conejas inseminadas 24h antes.

Tabla 3. Tasa de desarrollo embrionario en los diferentes cultivos. Valores con diferente superíndice difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

Método de cultivo	Nº embriones cultivados	Nº de Blastocistos (%)
Control	87	14 (16.1) ^b
Cultivo con medio condicionado por ROECs	54	17 (31.5) ^a
Co-cultivo con ROECs	88	30 (34.1) ^a

Como se observa en la tabla 3 y en la figura 30, los resultados de este experimento demostraron que tanto el medio condicionado con secreciones de ROECs como el co-cultivo con ROECs permite que una mayor proporción de los embriones inicialmente cultivados alcance el estadio de blastocisto.

En la figura 24 se puede apreciar una ampliación del co-cultivo de embriones con ROECs donde se observa como los embriones han llegado a blastocisto. Además, se puede apreciar el empedrado de células epiteliales en el fondo de las imágenes.

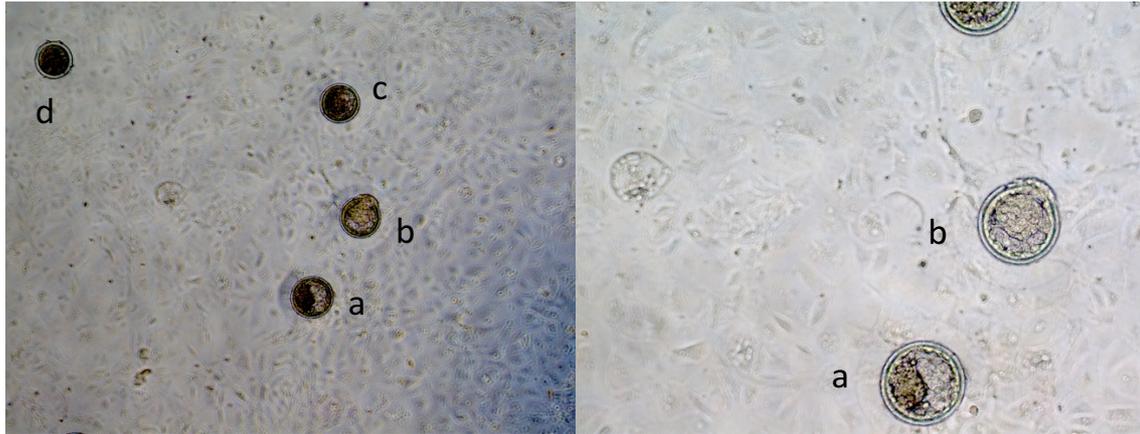


Figura 28. Desarrollo alcanzado tras 72h de co-cultivo de embriones en estadio de pronúcleos y 2 células en ROECs de 24h. Blastocistos (a, b y c). Mórula (d)

Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros estudios, ya que en un estudio llevada a cabo por Fukaya et al. (1996) en la que se comparó la tasa de desarrollo a blastocisto entre un co-cultivo con una monocapa de ROECs junto con embriones de ratón y un co-cultivo con un *insert* de cultivo celular en contacto con embriones de ratón, no se encontraron diferencias significativas entre un caso y otro, concluyendo que el contacto directo entre célula y célula no era un factor determinante a la hora de promover un desarrollo óptimo del embrión (Fukaya et al., 1996). Sin embargo, ya en este estudio se apuntaba a la necesaria presencia de factores específicos secretados por el epitelio oviductal para favorecer el desarrollo embrionario (Kurzrock et al., 1991). Se trata de una conclusión similar a la del presente estudio, ya que la presencia de las células epiteliales no genera una tasa de llegada al blastocisto significativamente superior a la del cultivo con el medio condicionado. El único estudio previo en el que se haya evaluado la mejora del desarrollo embrionario temprano de embriones de conejo en ROECs es una investigación llevada a cabo a principios de los años 90 donde se comparó la utilización de diferentes medios para co-cultivar embriones con ROECs (Carney et al., 1990). Entre los medios utilizados en dicho estudio se encuentra el M199, con el que la tasa de desarrollo a blastocisto fue similar a la que se obtiene en el presente trabajo.

Un estudio más reciente donde se comparó la tasa de desarrollo embrionario en co-cultivos de OECs de diferentes especies como el ratón, la cabra y el pollo con embriones de ratón, demostró que las OECs de cada especie proporcionan factores, metabolitos y secreciones a los medios más o menos favorables para el desarrollo de los embriones según la especie de origen de las OECs. Cabe destacar que en el conejo, las células epiteliales poseen capacidad de síntesis de lectinas y otros glicosacáridos que les confieren un rol fundamental en la formación de la capa de mucoproteínas o mucina que recubre los blastocistos, lo que es imprescindible para la óptima implantación en el útero (Biermann et al., 2014). Por lo que el cultivo de embriones temprano de conejo hasta el estadio reduce considerablemente las posibilidades de implantación y supervivencia de estos embriones *in vivo*. Un modo de mejorar las posibilidades de desarrollo posterior de los embriones cultivados *in vitro* sería por tanto el co-cultivo sobre ROECs diferenciadas y capaces de producir estas envueltas *in vitro*. Además probablemente será necesario incorporar las técnicas de microfluído a estos cultivos para reproducir fielmente las condiciones de desarrollo embrionario oviductal (Hattori et al., 2014).

5. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en este estudio experimental y preliminar, se puede concluir que:

- Los oviductos de hembras de conejo de 24h y el empleo de tripsina como enzima para el aislamiento de las ROECs permite alcanzar un mayor rendimiento y suficiente viabilidad celular para establecer un cultivo primario de ROECs.
- Las ROECs resisten a la congelación, sin merma de viabilidad, siendo capaces de establecer un cultivo primario, aunque tanto el periodo en el que alcanza la confluencia celular y el de mantenimiento de actividad ciliar se ven afectados negativamente.
- El PDL alcanzado denota una capacidad proliferativa limitada de los cultivos obtenidos de ROECs.
- La expresión del gen de la oviductina (OVGP-1) fue similar tanto en las ROECs congeladas como en fresco, observando su reducción tras 2 días de cultivo, mientras que la expresión de OCT-4 estuvo afectada por el proceso de congelación, observándose un patrón de expresión diferencial en los primeros 2 días de cultivo.
- Tanto el co-cultivo de ROECs con embriones como en el cultivo de medio condicionado por ROECs con embriones mejora la tasa de desarrollo embrionario temprano, demostrando la contribución de las secreciones de las células epiteliales cultivadas al desarrollo embrionario temprano.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., & Hoshi, H. (1995). Bovine oviduct-specific glycoprotein: A potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 42(2), 226–232.

AETE 2014 Statistics of Embryo Transfer Activity in Europe National data collectors (2014) Country Collector N° of approved ET teams N° of ET teams providing data. Retrieved from <http://www.aete.eu/index.php/statistics/year-2014/file>

Alexandra PH, Nihar RN, & Linda CG. (2005). Oviduct and Endometrium: Cyclic Changes in the Primate Oviduct and Endometrium. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J. Neill, Eds.), vol. 9, 3rd ed. New York: Raven Press; 337-382.

Aldarmahi, A. (2017). Establishment and characterization of female reproductive tract epithelial cell culture. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(2), 105–110.

Anzaldúa, S.R., Camacho-Arroyo, I. & Cerbón, M.A., (2002). Histomorphological changes in the oviduct epithelium of the rabbit during early pregnancy. *Anat. Histol. Embryol.* 31, 308–312.

Ball, B. A., Altschul, M., & Ellington, J. E. (1991). In vitro development of Day-2 equine embryos co-cultured with oviductal explants or tropho- blastoc vesicles. *Theriogenology* 35(3), 669–682.

Bendixen E, Danielsen M, Larsen K & Bendixen C. (2010). Advances in porcine genomics and proteomics—a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Brief Funct Genomics*; 9:208–19.

Biermann, L., Gabius, H. J., & Denker, H. W. (1997). Neoglycoprotein-binding sites (endogenous lectins) in the Fallopian tube, uterus and blastocyst of the rabbit during the preimplantation phase and implantation. *Acta Anatomica*, 160(3), 159–171.

Binelli, M., Gonella-Diaza, A., Mesquita, F., & Membrive, C. (2018). Sex Steroid-Mediated Control of Oviductal Function in Cattle. *Biology*, 7(1), 15.

Bläuer, M., Heinonen, P. K., Martikainen, P. M., Tomás, E., & Ylikomi, T. (2005). A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Human Reproduction*, 20(4), 864–871.

Boling, J.L. & Blandau, R.J., (1971). The role of estrogens in egg transport through the ampullae of oviducts of castrate rabbits. *Fertil. Steril.* 22, 544–551.

Caballero, J. N., Gervasi, M. G., Veiga, M. F., Dalvit, G. C., Perez-Martínez, S., Cetica, P. D., & Vazquez-Levin, M. H. (2014). Epithelial cadherin is present in bovine oviduct epithelial cells and gametes, and is involved in fertilization-related events. *Theriogenology*, 81(9), 1189–1206.

Carney, E. W., Tobback, C., & Foote, R. H. (1990). Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association*, 26(6), 629–635.

Chen, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2013a). In Vitro Mimicking of Estrous Cycle Stages in

Porcine Oviduct Epithelium Cells: Estradiol and Progesterone Regulate Differentiation, Gene Expression, and Cellular Function¹. *Biology of Reproduction*, 89(3), 54.

Chen, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2013b). Long-term culture of primary porcine oviduct epithelial cells: Validation of a comprehensive in vitro model for reproductive science. *Theriogenology*, 80(8), 862–869.

Chen, S., Palma-Vera, S. E., Langhammer, M., Galuska, S. P., Braun, B. C., Krause, E., ... Schoen, J. (2017). An air-liquid interphase approach for modeling the early embryo-maternal contact zone. *Scientific Reports*, 7, 42298.

Cox, C. I., & Leese, H. J. (1997). Retention of functional characteristics by bovine oviduct and uterine epithelia in vitro. *Animal Reproduction Science*, 46(3–4), 169–178.

Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144(6), 649–660.

Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA, (1997). Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intra- cellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 56, 861–869.

Dobrinski, I., Jacob, J. R., Tennant, B. C., and Ball, B. A. (1999). Generation of an equine oviductal epithelial cell line for the study of sperm–oviduct interactions. *Theriogenology* 52, 875–885.

Eckhard Wolf Supervisor, U.-P., & Stefan Hiendleder, P. (2006). A short-term suspension culture system for bovine oviduct epithelial cells suitable for the study of embryo-maternal communication processes.

Eddie, S. L., Quartuccio, S. M., Zhu, J., Shepherd, J. A., Kothari, R., Kim, J. J., ... Burdette, J. E. (2015). Three-dimensional modeling of the human fallopian tube fimbriae. *Gynecologic Oncology*, 136(2), 348–354.

Erikson, D. W., Way, A. L., Bertolla, R. P., Chapman, D. A., & Killian, G. J. (2007). Influence of osteopontin, casein and oviductal fluid on bovine sperm capacitation. *Anim. Reprod.*

Ferraz, M. A. M. M., Henning, H. H. W., Stout, T. A. E., Vos, P. L. A. M., & Gadella, B. M. (2017). Designing 3-Dimensional In Vitro Oviduct Culture Systems to Study Mammalian Fertilization and Embryo Production. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(7), 1731–1744.

Fukaya, T., Chida, S., Murakami, T., & Yajima, A. (1996). Is direct cell-to-cell contact needed to improve embryonic development in co-culture? *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 180(3), 225–232.

Gonçalves, R. F., Chapman, D. A., Bertolla, R. P., Eder, I., & Killian, G. J. (2008). Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 108(3–4), 375–383.

Hattori, K., Sugiura, S., & Kanamori, T. (2014). Microfluidic Perfusion Culture. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1104, pp. 251–263).

Holm, P., Walker, S. K., and Seamark, R. F. (1996). Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro- matured and in vitro-fertilized zygotes cultured

in vitro or in vivo. *J. Reprod. Fertil.* 107(2), 175–181.

Hung, P. H., & Suarez, S. S. (2010). Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 67, 257–266.

Hunter, R. H., & Léglise, P. C. (1971). Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the rôle of the isthmus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 24(2), 233–246.

Hwang, T.-S., & Song, J. (2004). Morphometrical changes of the human uterine tubes according to aging and menstrual cycle. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 186(3), 263–269.

Jansen, R. P., & Bajpai, V. K. (1982). Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biology of Reproduction*, 26(1), 155–168.

Kaeffer, B. (2011). Survival of Exfoliated Epithelial Cells: A Delicate Balance between Anoikis and Apoptosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–9.

Kervancioglu, M. E., Saridogan, E., Aitken, R. J., & Djahanbakhch, O. (2000). Importance of sperm-to-epithelial cell contact for the capacitation of human spermatozoa in fallopian tube epithelial cell cocultures. *Fertility and Sterility*, 74(4), 780–784.

Killian, G. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 141–153.

Kim, S. H., Lee, K. S., Lee, S. J., Seul, K. H., Kim, S. Z., & Cho, K. W. (2001). C-type natriuretic peptide system in rabbit oviduct. *Peptides*, 22(7), 1153–1159.

Kim, S.-J., Choi, Y.-S., Ko, E.-S., Lim, S.-M., Lee, C.-W., & Kim, D.-I. (2012). Glucose-stimulated insulin secretion of various mesenchymal stem cells after insulin-producing cell differentiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(6), 771–777.

Kurzrock, R., Estrov, Z., Wetzler, M., Gutterman, J.U. & Talpaz, M. (1991) LIF: Not just a leukemia inhibitory factor. *Endocr. Rev.*, 12, 208-217.

Lapointe, S., Sullivan, R., & Sirard, M. A. (1998). Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 58(3), 747–753.

Larsen, M., Wei, C., & Yamada, K. M. (2006). Cell and fibronectin dynamics during branching morphogenesis. *Journal of Cell Science*, 119(16), 3376–3384.

Lyng, R., & Shur, B. D. (2009). Mouse oviduct-specific glycoprotein is an egg-associated ZP3-independent sperm-adhesion ligand. *Journal of Cell Science*, 122(21), 3894–3906.

Machado, S. A., Kadirvel, G., Daigneault, B. W., Korneli, C., Miller, P., Bovin, N., & Miller, D. J. (2014). LewisX-Containing Glycans on the Porcine Oviductal Epithelium Contribute to Formation of the Sperm Reservoir1. *Biology of Reproduction*, 91(6).

Mamo, S.; Gal, A.B.; Polgar, Z.; Dinnyes, A. (2008) Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5f1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*, 9: 67

Medvedev, S. P., Shevchenko, A. I., Mazurok, N. A., & Zakian, S. M. (2008). OCT4 and NANOG are

the key genes in the system of pluripotency maintenance in mammalian cells. *Russian Journal of Genetics*, 44(12), 1377–1393.

Miessen, K., Sharbati, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2011). Modelling the porcine oviduct epithelium: a polarized in vitro system suitable for long-term cultivation. *Theriogenology*, 76(5), 900–910.

Miller, D. (2015). Regulation of Sperm Function by Oviduct Fluid and the Epithelium: Insight into the Role of Glycans. *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 50 Suppl 2).

Mishra, S., Lei, Z. M., & Rao, C. V. (2003). A Novel Role of Luteinizing Hormone in the Embryo Development in Cocultures¹. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1455–1462.

Monaco, E., Gasparri, B., Boccia, L., De Rosa, A., Attanasio, L., Zicarelli, L., & Killian, G. (2009). Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, 71(3), 450–457.

Nakanishi, T., Isotani, A., Yamaguchi, R., Ikawa, M., Baba, T., Suarez, S. S., & Okabe, M. (2004). Selective Passage Through the Uterotubal Junction of Sperm from a Mixed Population Produced by Chimeras of Calmegin-Knockout and Wild-Type Male Mice¹. *Biology of Reproduction*, 71(3), 959–965.

Navarrete Santos, A., Tonack, S., Kirstein, M., Kietz, S., & Fischer, B. (2004). Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction*, 128(5), 503–516.

Nelis, H., D'Herde, K., Goossens, K., Vandenberghe, L., Leemans, B., Forier, K., ... Van Soom, A. (2014). Equine oviduct explant culture: a basic model to decipher embryo–maternal communication. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(7), 954.

No, J., Zhao, M., Lee, S., Ock, S. A., Nam, Y., & Hur, T.-Y. (2018). Enhanced in vitro maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, 105, 66–74.

O'Day-Bowman, M. B., Mavrogianis, P. A., Minshall, R. D., & Verhage, H. G. (2002). In vivo versus in vitro oviductal glycoprotein (OGP) association with the zona pellucida (ZP) in the hamster and baboon. *Molecular Reproduction and Development*, 62(2), 248–256.

Okamoto, S., Ohji, M., Kosaku, K., Sundarraj, N., Hassell, J. R., Thoft, R. A., & Pipas, J. M. (1995). Characterization of immortalized rabbit corneal epithelial cells with SV40 large T antigen. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 39(4), 323–333.

Pacey, A. A., Davies, N., Warren, M. A., Barratt, C. L., & Cooke, I. D. (1995a). Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human Reproduction* (Oxford, England), 10(10), 2603–2609.

Pacey, A. A., Hill, C. J., Scudamore, I. W., Warren, M. A., Barratt, C. L., & Cooke, I. D. (1995b). The interaction in vitro of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. *Human Reproduction* (Oxford, England), 10(2), 360–366.

Paik, D. Y., Janzen, D. M., Schafenacker, A. M., Velasco, V. S., Shung, M. S., Cheng, D., ... Memarzadeh, S. (2012). Stem-like epithelial cells are concentrated in the distal end of the fallopian tube: a site for injury and serous cancer initiation. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 30(11), 2487–2497.

- Palma-Vera, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2014). Bovine oviductal epithelial cells: Long term culture characterization and impact of insulin on cell morphology. *Reproductive Biology*, 14(3), 206–212.
- Paxton, S., Peckham, M., Adele, K., Paxton, S., Adele, K., & Peckham, M. (2003). *The Leeds Histology Guide*.
- Pedrero-Badillo, F., Anaya-Hernández, A., Corona-Quintanilla, D. L., Castelán, F., Pacheco, P., Martínez-Gómez, M., & Cuevas, E. (2013). Morphohistological characteristics of rabbit oviduct: A proposal for a single regionalization. *Animal Reproduction Science*, 143(1), 102–111.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6), 509–515.
- Ratajczak, M. Z., Liu, R., Ratajczak, J., Kucia, M., & Shin, D.-M. (2011). The role of pluripotent embryonic-like stem cells residing in adult tissues in regeneration and longevity. *Differentiation*, 81(3), 153–161.
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J. M., ... Calvete, J. J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63(2), 514–535.
- Rottmayer, R., Ulbrich, S. E., Kölle, S., Prella, K., Neumueller, C., Sinowatz, F., ... Hiendleder, S. (2006). A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132(4), 637–648.
- Saccary, L., She, Y.-M., Oko, R., & Kan, F. W. K. (2013). Hamster Oviductin Regulates Tyrosine Phosphorylation of Sperm Proteins During In Vitro Capacitation¹. *Biology of Reproduction*, 89(2), 38.
- Shaw, W. R., Teodori, E., Mitchell, S. N., Baldini, F., Gabrieli, P., Rogers, D. W., & Catteruccia, F. (2014). Mating activates the heme peroxidase HPX15 in the sperm storage organ to ensure fertility in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 5854–5859.
- Shi, G., & Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(5), 39.
- Snegovskikh, V., Mutlu, L., Massasa, E., & Taylor, H. S. (2014). Identification of putative fallopian tube stem cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 21(12), 1460–1464.
- Spielmann, H. (2009). The way forward in reproductive/developmental toxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 37(6), 641–656.
- Srinivas, S., Goldberg, M. R., Watanabe, T., D'Agati, V., Al-Awqati, Q., & Costantini, F. (1999). Expression of green fluorescent protein in the ureteric bud of transgenic mice: A new tool for the analysis of ureteric bud morphogenesis. *Developmental Genetics*, 24(3–4), 241–251.
- Stewart, C. A., & Behringer, R. R. (2012). Mouse Oviduct Development BT - Mouse Development: From Oocyte to Stem Cells. In J. Z. Kubiak (Ed.) (pp. 247–262). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1), 23–37.

Suarez, S. S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 455–462.

Tan, X.-W., Ma, S.-F., Yu, J.-N., Zhang, X., Lan, G.-C., Liu, X.-Y., ... Tan, J.-H. (2006). Effects of species and cellular activity of oviductal epithelial cells on their dialogue with co-cultured mouse embryos. *Cell and Tissue Research*, 327(1), 55–66.

Töpfer-Petersen, E., Ekhlesi-Hundrieser, M., & Tsoлова, M. (2008). Glycobiology of fertilization in the pig. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 717–736.

Walter, I. (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *The Anatomical Record*, 243(3), 347–356.

Weltzien, F.A., Pasqualini, C., Vernier, P. & Dufour, S. (2005). A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 134–42.

Yániz, J., Carretero, T., Recreo, P., Arceiz, E. and Santolaria, P. (2013). Three-Dimensional Architecture of the Ovine Oviductal Mucosa. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 43(5), pp.331-340.

You, Y., Richer, E. J., Huang, T., & Brody, S. L. (2002). Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells: selection of a proliferative population. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(6), L1315–L1321.