

“Efecto del factor estimulante de colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) sobre el crecimiento In Vitro de embriones murinos y su sobrevida luego de ser criopreservados”

Autores: Papayannis, M.M; Eyheremendy, V., Sanjurjo, C., Blaquier, J., Raffo, F.G.E.
Centro Médico FERTILAB

Introducción

Un gran objetivo en la investigación sobre embriones humanos es el desarrollo de un sistema in vitro que replique más fielmente el tracto reproductivo femenino y de este modo sea capaz de sostener el crecimiento de embriones hasta el estadio de blastocisto (Sjöblom et al., 1999). Muchas de las investigaciones sobre embriones humanos apuntan a promover el desarrollo de blastocistos in vitro, con el objetivo de llevar a cabo transferencias de embriones en día 5 en las fertilizaciones in vitro (FIV) (Ménézo et al. 1992a; Kaufman et al., 1995; Olivennes et al., 1995; Martin et al., 1998).

En la fertilización in vitro humana, el cultivo y la transferencia de blastocistos implica un mayor éxito en la implantación y en el embarazo, ya que suministra una manera de identificar el mejor embrión para transferir al paciente (Ménézo et al., 1992a; Olivennes et al., 1994; Gardner and Lane, 1997, 1998; Jones et al., 1998; Sjöblom et al., 1999). A través del hecho de poder elegir un número más pequeño de embriones competentes, la transferencia de blastocistos podría ayudar a reducir la frecuencia de nacimientos múltiples resultantes las técnicas

de reproducción asistida. La transferencia de blastocistos al útero es claramente un proceso más fisiológico que la transferencia en estadios más tempranos de desarrollo, ya que existe una mejor sincronización entre el embrión y el desarrollo del tejido endometrial (Sjöblom et al., 1999).

Estudios en roedores y distintas especies de ganado sugieren que el crecimiento y desarrollo de embriones preimplantatorios está regulado por una serie de citoquinas y factores de crecimiento secretados por las células epiteliales del revestimiento del oviducto y del útero. (Pampfer et al., 1991; Robertson et al., 1994; C. Sjöblom et al., 1999). Su síntesis ocurre bajo patrones regulados espacial y temporalmente y es conducida predominantemente por hormonas esteroideas ováricas pero también por factores del plasma seminal. (Robertson et al., 1996; Tremellen et al., 1998; C. Sjöblom et al., 1999). Embriones de muchas especies han demostrado expresar receptores para la mayoría de los factores de crecimiento secretados por el tracto (Pampfer, et al., 1991; Sharkey et al., 1995), y la adición de estos factores y citoquinas a los medios de cultivo ha demostrado promover el desarrollo de blastocistos en humanos

(Dunghlison et al., 1996; Lighten et al., 1998; Martín et al., 1998) y en un gran número de especies de mamíferos (reviews by Kane et al., 1997).

El factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es una citoquina originalmente identificada como un producto de la activación de los linfocitos -T involucrados en la proliferación y diferenciación de células mieloides hematopoyéticas (Ruef and Coleman, 1990).

El factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos se secreta a partir de las células epiteliales del tracto reproductivo femenino y es inducido durante el embarazo temprano por las hormonas esteroideas y por constituyentes del plasma seminal (Robertson et al., 2001). El apareamiento en los roedores desencadena una reacción inflamatoria dentro del endometrio uterino, caracterizada por una extensa filtración y activación de macrófagos, células dendríticas y granulocitos. Esta respuesta es iniciada cuando los factores derivados de las vesículas seminales en el eyaculado estimulan a las células epiteliales a liberar citoquinas proinflamatorias incluyendo al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. Los fluidos seminales contienen el factor de crecimiento transformante beta1 (TGFbeta1) en niveles suficientes para ser el primer agente causante de la cascada inflamatoria post-apareamiento a través de la inducción de la síntesis de GM-CSF por las células epiteliales uterinas (Tremellen et al. 1998). El factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos es producido por las células epiteliales en el oviducto y útero en diversas especies, como ratón (Robertson et al, 1992), oveja (Imakawa et al., 1993) y humano (Zhao and Chegini, 1994; Giacomini et al., 1995).

El rol de GM-CSF en el desarrollo fisiológico del embrión preimplantatorio en el tracto reproductivo se encuentra sugerido por una expresión temporal de GM-CSF en el oviducto y en el útero, que coincide con el tiempo de la fertilización

y el desarrollo temprano del embrión y su implantación. Se observó que la expresión de GM-CSF en la trompa de Falopio es dependiente del estadio del ciclo menstrual, con un pico de expresión durante la fase proliferativa tardía y la fase secretoria temprana (Zhao and Chegini, 1994). Un patrón similar de síntesis de GM-CSF se observó en el útero, donde GM-CSF es secretado por las células epiteliales endometriales con un moderado aumento durante la fase proliferativa tardía y la fase secretoria temprana (Giacomini et al. 1995).

Estudios en animales siguieron que el GM-CSF puede actuar como un factor de supervivencia para el desarrollo del embrión. Los embriones de ratón preimplantatorios expresan la cadena del receptor de GM-CSF, y el cultivo en medios recombinantes que contienen GM-CSF tiene efectos beneficiosos sobre el desarrollo embrionario murino hasta el estadio de blastocisto y subsecuentemente en su capacidad de salir de la zona pelúcida (hatching) (Robertson et al., 1991, 2001).

El cultivo in vitro de embriones en GM-CSF recombinante acelera el desarrollo de los blastocistos hacia el hatching y el estadio de implantación, con una respuesta máxima a una concentración de 2ng/ml (77pM) (Robertson et al., 2001). Los máximos efectos de GM-CSF fueron observados a dicha concentración ya que estas concentraciones son comparables con el contenido de GM-CSF de los fluidos uterinos recogidos durante el periodo preimplantatorio, para el cual el rango de valores medio es 15-20 U/útero (equivalente a 60-80 pM, asumiendo un volumen de fluido uterino de 100 μ l) (Robertson et al., 1992).

Los blastocistos cultivados en presencia de GM-CSF obtienen un aumento significativo del número total de células, con un aumento en la proporción de las células localizadas en el macizo celular interno, comparados con blastocistos cultivados durante el mismo período de tiempo en un medio solo. El aumento en el potencial de desarrollo de los embriones cultivados en presencia de GM-CSF

se encuentra asociado con el mejoramiento en la viabilidad del macizo celular interno. GM-CSF promueve la sobrevida de los blastómeros y/o su proliferación, y ese efecto es principalmente ejercido en el macizo celular interno (Sjöblom et al 1999).

La criopreservación puede impactar en el potencial de implantación de los embriones en estadios tempranos cuando pueden ocurrir daños por las temperaturas extremas (lisis celular). Algunos daños pueden resultar en alteraciones autócrinas de factores de crecimiento y por lo tanto elevar el impacto del cultivo post-descongelamiento (Desai et al. 2000). Está claro que los embriones en estadios tempranos descongelados que se encuentran parcialmente intactos pueden resultar en embarazos, pero el potencial de implantación disminuye en paralelo con el aumento del grado de lisis de los blastómeros (Van den Abbel et al., 1997; Burns et al., 1999; Edgar et al 2000; Guerif et al., 2002). Una reducción en el número de blastómeros como resultado de la lisis celular es una consecuencia conocida de la criopreservación de embriones en estadios tempranos. Esto incluye una disminución en el desarrollo preimplantatorio in vitro y una reducción del número total de células en los blastocistos resultantes (Archer et al., 2003). Este fenómeno solo ocurre en una proporción de los embriones descongelados, pero cuando se manifiesta, se asocia con una reducción del potencial del desarrollo (Van den Abbel et al., 1997; Burns et al., 1999; Edgar et al., 2000b; Guerif et al., 2002).

Cuando embriones humanos congelados y descongelados fueron cultivados en medios secuenciales, el 30% se desarrolló a blastocistos con un número total de células de 80, aunque la proporción de blastocistos y el número total de células aumentó con la adición exógena del factor estimulante de colonias de granulocitos y de macrófagos. (Sjöblom et al 1999). Por ello se puede afirmar que el desarrollo post-descongelamiento de los embriones puede ser modulado por la adición de factores de crecimiento (Desai et al 2000).

Objetivos

El objetivo general de este estudio fue detectar el efecto del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) sobre el desarrollo in vitro de embriones murinos desde el estadio de 2 células hasta el estadio de blastocisto. A su vez se propuso evaluar la sobrevida de los blastocistos obtenidos del cultivo en GM-CSF luego de la criopreservación y comprobar si se logra hacerlos más resistentes al congelamiento y descongelamiento o simplemente si se mejora su desarrollo luego del descongelamiento.

Materiales y Métodos

Droga a utilizar: Neutromax-Filgrastim (r-Met-hu-G-CSF = factor estimulante de colonias granulocíticas humano metionilado recombinante no glicosilado)

Para este experimento se utilizó una fuente comercial de G-CSF. El Filgrastim (Neutromax) fue obtenido de SIDUS S.A.

El Filgrastim es una proteína altamente purificada, no glicosilada, que contiene 175 aminoácidos. El Neutromax-Filgrastim se produce en una cepa de laboratorio de la bacteria *Escherichia Coli*, modificada genéticamente por la adición del gen del factor estimulante de colonias granulocíticas.

El factor estimulante de colonias granulocíticas humanas es una glicoproteína que regula la producción y la liberación de neutrófilos desde la médula ósea.

Excipientes: Solución tampón de acetato sódico (pH 4,0), Polisorbato 80, Manitol, Agua destilada estéril. 1 frasco ampolla de Neutromax de 1,0 ml de solución contiene 30 millones de unidades internacionales (=300 μ m) de Filgrastim.

El Neutromax se utilizó diluido a una concentración de 2ng/ml pero cuando éste se diluye se adsorbe al vidrio y a los materiales plásticos. Sin embargo, si se diluye correctamente, en una solución de glucosa al 5% con 20% de HSA, el preparado es compatible con el vidrio y diversos materiales plásticos como PVC, pliolefina (copolímero del polipropileno y el polietileno) y polipropileno.

Recolección de embriones

Se utilizaron para el estudio una cepa de ratones F1 de BalbC, tanto machos como hembras. Las hembras fueron superovuladas inyectando intraperitonealmente 5 IU de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) y a las 48 horas se les inyectaron 5 IU de hCG. Inmediatamente luego de la inyección de hCG, se colocó una hembra dentro de una jaula con un solo macho. Las hembras que presentaron tapón vaginal, fueron sacrificadas por dislocación cervical 36 horas después de la inyección de hCG y los embriones de dos células fueron recolectados de los oviductos en medio HTF hepes previamente incubado a 37°C.

Cultivo in vitro

Se utilizaron 872 embriones de ratón en dos células los cuales fueron distribuidos en los diferentes grupos de estudio. El medio utilizado para el cultivo de los embriones fue: G1 versión 3 (Vitrolife, AB, Kungsbacka, Sweden) suplementado con 0.05% de albúmina sérica humana (SAGE Biopharma, Human albumin solution, 100mg/ml in normal saline).

Los embriones obtenidos se incuban en microgotas de 100 μ l bajo aceite mineral (Sigma) durante 72 horas en la incubadora (Forma Scientific) a 37°C y con una atmósfera con 6% de CO₂ (Sjöblom et al., 1999).

Los embriones cultivados fueron divididos en 3 grupos según el medio de cultivo utilizado:

- **G1**
- **G1 + dilución**
- **G1 + 2ng/ml de GM-CSF**

Monitoreo de los resultados

Los embriones fueron observados en intervalos de 24 horas bajo microscopio invertido (Nikon TMS) con un aumento de 200-400X. Las observaciones debieron ser rápidas para evitar cambios en el pH y temperatura del medio, ya que estos cambios pueden retardar el desarrollo embrionario (Gerrity, 1988).

Los embriones preimplantatorios fueron monitoreados en los estadios de dos células, cuatro células, ocho células, mórula, blastocistos tempranos y blastocistos expandidos, y blastocistos haciendo hatching (Robertson et al., 2001).

Los parámetros evaluados fueron número de embriones que se desarrollaron a blastocistos y la morfología de los blastocistos observando la expansión del blastocele (Desai et al., 2000).

Evaluación del número total de células

El número de células de los blastocistos desarrollados in vitro fue determinado utilizando una modificación del método descrito por Tarkowski. (Tarkowski, 1966).

Los blastocistos fueron incubados en una solución hipotónica de 1% de citrato de sodio durante 90 segundos a 37°C. Luego, los blastocistos fueron transferidos durante unos pocos segundos a una cápsula de cultivo que contenía una solución fijadora inicial 5:1:4 metanol: ácido acético: agua destilada. A continuación, los blastocistos fueron transferidos a un portaobjetos. Dos o tres gotas de una segunda solución fijadora 3:3:1 metanol: ácido acético: agua destilada se dejan caer sobre los blastocistos. Se coloca un cubreobjetos y se tiñe con hematoxilina durante unos segundos, la cual se lava con agua corriente.

Este procedimiento fue realizado bajo control visual directo utilizando un microscopio invertido (Olympus CK).

El número total de núcleos celulares fue contado con un aumento de 400X. Esto fue realizado por dos personas, las cuales no tenían conocimiento del grupo de estudio al cual pertenecía cada blastocisto, para evitar incidir en los resultados. (Fig 1)

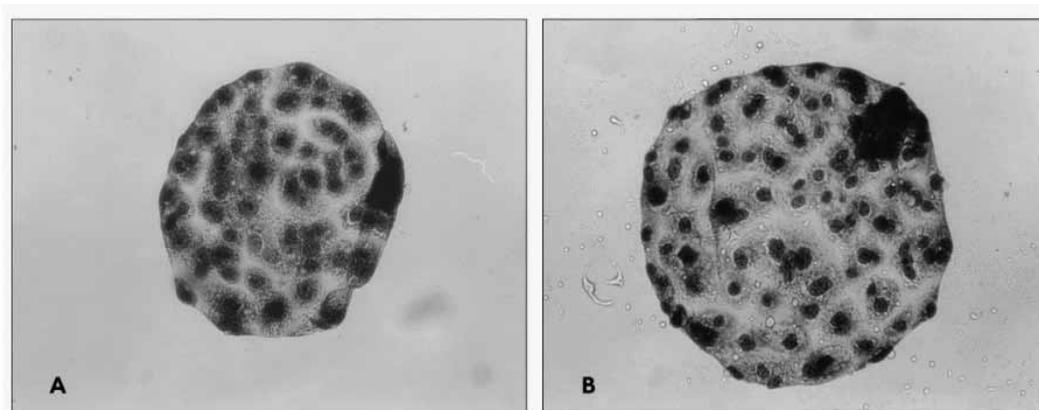


Figura 1: Tinción de los blastocistos mediante una modificación del método de Tarkowsky: Se utilizó esta coloración para contar el nfm de células de los blastocistos incubados en GM-CSF (Neutromax) o medio control. (resultados tabla 1).

Congelamiento y descongelamiento

Los blastocistos se criopreservaron utilizando un protocolo glycerol freeze que se basa en dos etapas (Ménézo et al., 1992b). La criopreservación fue llevada a cabo utilizando glycerol y sacarosa como crioprotectores.

El programa de congelación utilizado comienza con enfriamiento lento hasta llegar a -7°C . En esta etapa se realiza el seeding que tiene por objeto provocar la nucleación de cristales de hielo en el medio externo de la célula. El enfriamiento lento continúa hasta -30°C . En este punto se ha liberado la mayor parte del agua y el remanente se vitrifica con una caída rápida de la temperatura hasta -42°C , momento en el cual los embriones se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C .

Las pajuelas conteniendo los blastocistos se descongelaron y rehidrataron siguiendo un protocolo basado en tres etapas. Las pajuelas retiradas del tanque de nitrógeno líquido deben ser mantenidas a temperatura ambiente durante 30 segundos antes de ser colocados en un baño de agua a 30°C durante 40 segundos. Lentamente se expulsan los blastocistos bajo la lupa en una solución que

contiene 0,5M de sacarosa en HTF hepes (SAGE Biopharma) + 20% de Suero Sintético Sustituto (SSS : SAGE Biopharma). Luego se transfieren a una solución 0,2M de sacarosa en HTF hepes (SAGE Biopharma) + 20% de Suero Sintético Sustituto (SSS : SAGE Biopharma) y a continuación se transfieren a una solución de lavado que contiene HTF hepes (SAGE Biopharma) + 20% de Suero Sintético Sustituto (SSS : SAGE Biopharma).

Por último se transfieren los embriones al medio de cultivo previamente calentado a 37°C y gaseado con 6% de CO_2 y se colocan en la incubadora a 37°C .

Los blastocistos descongelados fueron distribuidos en los grupos de tratamiento. Los blastocistos que habían sido cultivados previamente en medio G1, ya sea sólo, con la dilución o con 2ng/ml de GM-CSF; fueron cultivados en los tres grupos de tratamiento (Fig. 13):

- G1
- G1 + dilución
- G1 + 2 ng/ml de GM-CSF

Los blastocistos fueron cultivados durante 24 horas en gotas de 100 μl del

medio correspondiente bajo aceite mineral a 37°C, 6% de CO₂ y 78% de humedad.

Luego de realizado el descongelamiento de los blastocistos, se evalúa la sobrevida y reexpansión de los mismos.

Análisis estadístico

La proporción de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto y la morfología embrionaria fueron comparados mediante el análisis de la varianza (ANOVA). El total de número de células en los blastocistos, su sobrevida luego de la criopreservación y su desarrollo luego de descongelamiento fueron evaluados utilizando el Test exacto de Fisher.

Resultados

1. Efecto del GM-CSF en el desarrollo in vitro de embriones murinos

Los 872 embriones de dos células fueron cultivados en los medios G1 y divididos en los tres grupos de estudio. Para cada uno de estos grupos se evaluó el porcentaje de blastocistos expandidos. Los resultados se muestran en la tabla 1 donde se observa que de los 236 embriones de dos células cultivados en el medio G1 control, el 85.5% alcanzó el estadio de blastocisto; de los 296 cultivados en el medio G1 + dilución, el 84.5% alcanzó el estadio de blastocisto y de forma similar, de los 344 embriones de dos células cultivados en presencia del GM-CSF, el 85.5% se desarrolló hasta el estadio de blastocisto luego de 72 horas de cultivo.

Los resultados obtenidos demuestran que el GM-CSF no influencia el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto.

2. Efecto del GM-CSF sobre el número de células en los embriones en estadio de blastocisto

Una proporción de los blastocistos que llegaron a dicho estadio habiendo sido cultivados durante 72 horas en los diferentes grupos de estudio fueron teñidos, en lugar de ser criopreservados, para determinar su número de células. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Al comparar en número de células en los blastocistos obtenidos al cultivarlos en medio G1, se ha observado que contienen un mayor número de células aquellos cultivados en el medio G1 + 2ng/ml GM-CSF, logrando una diferencia estadísticamente significativa al comparar con los otros dos grupos de estudio ($P < 0.05$) (G1 solo vs. G1 + dilución vs. G1 + 2ng/ml GM-CSF: $63,6 \pm 13,58$ vs. $56,4 \pm 6,67$ vs. $81,1 \pm 12,03$).

3. Efecto del GM-CSF sobre la sobrevida de los blastocistos luego de la criopreservación

Un total del 329 blastocistos derivados de los tres grupos de estudio fueron criopreservados de acuerdo a Ménéz et al., 1992b. Los embriones fueron criopreservados, mantenidos en nitrógeno líquido por lo menos por 60 días y luego descongelados para permanecer en cultivo por 24 horas en el medio G1 en presencia y ausencia del GM-CSF.

GRUPO	N	% Blast. expandidos	No. de células
G1	236	85.5	63.6
G1 + dilución	296	84.5	54.6
G1 + 2 ng/ml GM-CSF	344	85.5	81.1

TABLA 1

Efecto del GM-CSF sobre el cultivo de embriones de 2 células hasta el estadio de blastocisto y su número de células.

La sobrevida de los embriones inmediatamente luego del descongelamiento, de acuerdo al medio en el cual fueron cultivados antes del congelamiento, fue similar en los tres grupos de estudio (81% G1 control; 88% G1 + dilución; 79% G1 + 2 ng/ml GM-CSF). Los resultados se muestran en la tabla 2.

4. Efecto del GM-CSF sobre el desarrollo in vitro de blastocistos luego de la criopreservación

Los blastocistos que fueron criopreservados luego de haber sido cultivados en los distintos medios de cultivo hasta llegar a dicho estadio se dividieron en tres grupos de estudio. La tasa de re-expansión del blastocele en los blastocistos que sobrevivieron al congelamiento varía de acuerdo al tratamiento recibido durante la fase de crecimiento previa a la criopreservación y fue influenciada por la presencia del GM-CSF en el cultivo post-descongelamiento. Los resultados se muestran en la tabla 3.

De los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto siendo cultivados

en el medio G1, el 38% se re-expandieron al cultivarse luego del descongelamiento nuevamente en el mismo medio. Un resultado similar fue obtenido para los embriones cultivados pre y post congelamiento en el medio G1 + dilución (33% de re-expansión, dato no presentado). Cuando el GM-CSF es agregado al medio de cultivo post-descongelamiento la tasa de re-expansión aumentó a 65% en ambos casos ($P < 0.005$).

Los embriones cultivados originalmente en presencia de GM-CSF y que luego del descongelamiento fueron cultivados en el medio G1 control durante 24 horas se re-expandieron a una tasa del 17% ($P < 0.05$). En contraste, cuando el medio post-descongelamiento fue suplementado con el GM-CSF la tasa de re-expansión aumentó a 56% ($P < 0.001$). No hubo diferencia en la tasa de re-expansión de los blastocistos cultivados previamente en los tres grupos de estudio cuando el medio de cultivo post-descongelamiento fue suplementado con 2 ng/ml de GM-CSF.

GRUPO PRE-CONGELAMIENTO	N	% Sobrevida luego del descongelamiento
G1	74	81
G1 + dilución	119	88
G1 + 2 ng/ml GM-CSF	146	79

TABLA 2
Sobrevida de los blastocistos luego de la Criopreservación.

GRUPO PRE-CONGELAMIENTO	GRUPO POST-DESCONGELAMIENTO		P
	G1	G1 + 2 ng/ml GM-CSF	
G1	38	65	<0.005 vs G-1
G1 + 2 ng/ml GM-CSF	17*	56	<0.001 vs G-1

TABLA 3
Efecto del GM-CSF en la re-expansión de los blastocistos luego del descongelamiento.

* $P < 0.05$ vs G1

Discusión

Sjöblom (Sjöblom et al., 1999) ha reportado que la adición del GM-CSF al medio de cultivo promueve la formación de blastocistos humanos con un aumento en el número de células que forman el macizo celular interno del embrión. Este mecanismo es mediado por la captación de glucosa a través de uniones al receptor de baja afinidad estimulando así el metabolismo de las células (Robertson et al., 1991, 1999, 2001).

La idea de este trabajo fue estudiar si el factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos mejora el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto y si hay una mejora en la tasa de expansión luego de la criopreservación y descongelamiento de los mismos.

En este trabajo se ha utilizado como modelo para estudiar la influencia del GM-CSF en el desarrollo embrionario murino una fuente comercial de dicho factor; el Filgrastim (Neutromax) de SIDUS S.A que es un recombinante de preparación farmacéutica disponible en el mercado. La concentración de droga utilizada fue de 2ng/ml lo que implicó una dilución del material stock de 1:75.000, concentración similar a la utilizada por Sjöblom et al 1999., quien no encontró diferencias en sus resultados utilizando otro recombinante de preparación farmacéutico, Molgramostin (Leucomax), comparándolo con el recombinante humano de alto grado de pureza. La utilización de una fuente comercial del GM-CSF tiene como ventajas la fácil disponibilidad del mismo y el bajo costo, cuando lo comparamos con el factor recombinante de laboratorio puro.

En nuestro trabajo, la adición del GM-CSF al medio de cultivo antes del congelamiento produce un aumento en el número de células pero no un aumento en la proporción de los embriones de dos células que alcanzan el estadio de blastocisto. Esto podría ser debido a que la alta tasa en la cual los embriones murinos de la cepa utilizada alcanzan el estadio de blastocisto enmascara cualquier efecto

producido por el GM-CSF. Nuestros resultados concuerdan con los de Robertson et al. (Robertson et al. 2001) quien reportó que el GM-CSF aumenta el número de células de los blastocistos obtenidos pero no altera la tasa por la cual los embriones de 8 células alcanzan el estadio de blastocisto.

En cambio, otros estudios en el cual los cigotos murinos (B6C3F1) fueron cultivados en un medio suplementado con GM-CSF alcanzaron en una tasa más elevada el estadio de blastocisto y se demostró que ocurría una inhibición de la apoptosis (Behr et al., 2001; Wang et al., 2002b; Behr et al., 2005). Kim et al., (Kim et al., 2001) reportó una tasa más elevada de formación de blastocistos en los embriones cultivados en presencia del GM-CSF pero el número de células en los blastocistos resultantes no fue diferente al comparar con el grupo control.

El aumento en el número de células en los embriones está asociado con el aumento en la actividad metabólica. La captación de glucosa se encuentra estimulada en los embriones expuestos al GM-CSF (Robertson et al., 2001).

Mascareño et al., ha demostrado que, en ovocitos, la captación de glucosa en las células que expresan el receptor de alta afinidad del GM-CSF es dependiente de la kinasa PI3. El GM-CSF se une al receptor de baja afinidad del GM-CSF y genera peróxido de hidrógeno extracelular, el cual se difunde a través de la membrana plasmática activando la kinasa PI3 (Mascareño et al., 2003).

Karagenc et al. (Karagenc et al. 2005) ha demostrado recientemente que los efectos beneficiosos del GM-CSF en los embriones de ratón podrían ser enmascarados si la albúmina sérica humana está presente en el medio de cultivo, como en nuestro caso. En dicho estudio argumentan que para observar los efectos beneficiosos del GM-CSF, los embriones deberían crecer en condiciones sub-óptimas de cultivo.

La sobrevivencia de los embriones luego del descongelamiento no presenta diferencia si el GM-CSF ha estado presente o no en el medio durante el desarrollo de los embriones hasta el estadio de blastocisto. Concluyendo que no tiene un efecto crioprotector de los embriones.

Un resultado inesperado en nuestro trabajo fue que la re-expansión post-descongelamiento de los blastocistos que fueron cultivados durante 72 horas en presencia del GM-CSF fue menor con respecto al grupo control. El 37% de los blastocistos del grupo control se re-expandieron luego del congelamiento al haber sido cultivados nuevamente en este medio de cultivo, mientras que el 17% de los blastocistos que se desarrollaron en presencia del GM-CSF se re-expandieron luego del descongelamiento al permanecer 24 horas en el medio G1 control.

Otro resultado que obtuvimos fue que la adición del GM-CSF al medio de cultivo post-descongelamiento fue beneficioso para los embriones. Cuando los embriones del grupo control fueron descongelados, el 37% se re-expandió luego de permanecer 24 horas en cultivo. Pero si el GM-CSF fue adicionado al medio de cultivo post-descongelamiento la proporción de los blastocistos que se re-expandieron aumentó a 65%. De manera similar, los embriones expuestos al GM-CSF antes del congelamiento se re-expandieron a una tasa de 17%, pero si el GM-CSF es incluido en el medio de cultivo post-descongelamiento, la tasa de expansión aumentó a 56%. El stress inducido por la criopreservación podría contribuir a los efectos beneficiosos del GM-CSF observados en los blastocistos.

Gardner et al. ha demostrado que aquellos blastocistos que tienen una alta tasa de captación de glucosa inmediatamente luego del descongelamiento tienen mayor chance de re-expandirse luego de 24 horas de cultivo (Gardner et al., 2001). La tasa de glucosa captada por blastocistos de ratón antes de ser transferidos a hembras receptoras está en relación directa con su habilidad de llegar a

término (Gardner et al 1987).

En bovinos, el consumo de glucosa de los blastocistos que se re-expandieron luego del descongelamiento fue mayor que en aquellos que fallaron en su desarrollo (Gardner et al., 1996).

Podríamos decir que los efectos observados en este trabajo están relacionados con los efectos conocidos del GM-CSF en la captación de glucosa y su utilización (Ding et al 1994; Speilholdz et al 1995; Robertson et al. 1999; Sjöblom et al., 1999; Robertson et al., 2001). La utilización de glucosa en los embriones de ratón, rata y bovinos como fuente de energía para la fosforilación oxidativa o la glucólisis y producción de ATP es un elemento esencial para la compactación, blastulación y formación de la cavidad del blastocelo de los embriones (Leese 1991; Brison and Leese; 1994; Thompson et al 2000).

La aplicación clínica de estos resultados en FIV humanas deberá esperar a obtener nuevos resultados de nuevos experimentos para dilucidar el mecanismo de acción del GM-CSF en el embrión, y para evaluar los efectos del cultivo con GM-CSF en el potencial de desarrollo in vitro consecuente de blastocistos en distintos modelos animales. Finalmente, cualquier transferencia a pacientes de blastocistos cultivados con GM-CSF u otro factor de crecimiento deberá ser llevada a cabo con precaución, ya que se sabe que los eventos durante el desarrollo preimplantatorio tienen consecuencias a largo plazo en la salud del individuo (Seamark and Robinson, 1995).

Bibliografía

1. Archer J., Gook D.A. and Edgar D.H. (2003) Blastocyst formation and cell numbers in human frozen-thawed embryos following extended culture. *Hum. Reprod.* 18, 1669-1673.
2. Behr B., Dasig D., Gebhardt J. (2001) Use of growth factors to stimulate mouse embryo development in the absence of protein. *Fertil Steril* 75, (Suppl 1), 1.

3. Behr B., Mooney S., Wen Y., Polan M.L., Wang H. (2005) Preliminary experience with low concentration of granulocyte macrophage colony stimulating growth factor: a potential regulator in preimplantation mouse embryo development and apoptosis. *J Assist Reprod Genet.* 22, 25-32.
4. Burns W.N., Gaudet T.W., Martin M.B., Leal Y.R., Schoen H., Eddy C.A. and Schenken R.S. (1999) Survival of cryopreservation and thawing with all blastomeres intact identifies multicell embryos with superior frozen embryo transfer outcome. *Fertil Steril.* 72, 527-532.
5. de Morales A.A. and Hansen P.J. (1997) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. *Biol Reprod.* 57, 1060-1065.
6. Desai N., Lawson J. and Goldfarb J. (2000) Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 15, 410-418.
7. Ding D.X., Rivas C.I., Heaney M.L., Raines M.A., Vera J.C., Golde D.W. (1994) The alpha subunit of the human granulocyte macrophage colony stimulating growth factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 2537-2541.
8. Dunlison G.F., Barlow D.H. and Sargent, I.L. (1996) Leukimia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultures in serum-free medium. *Hum Reprod.* 11, 191-196.
9. Edgar D.H., Bourne H., Speirs A.L. and McBain J.C. (2000). A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. *Hum Reprod.* 15, 175-179.
10. Gardner D.K., Leese H.J. (1987) Assessment of embryo viability prior to transfer by the non-invasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool.* 242,103-5.
11. Gardner D.K., Lane M., Calderon I., Leeton J. (1996) Environment of the preimplantation embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril.* 65, 349-353.
12. Gardner D.K. and Lane M. (1997) Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update.* 3, 367-382.
13. Gardner D.K. and Lane M. (1998) Culture of viable human blastocyst in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod Update.* 13, (Suppl. 3), 148-159.
14. Gardner D.K., Weissman A., Howles C.M., Shoham Z. (2001) Cryopreservation of human embryos. In: *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*, 1st edn. Martin Dunitz Ltd, The Livery House, pp 243-256.
15. Gerrity M. (1988) Mouse embryo culture bioassay. In: *In vitro Fertilization and Embryo transfer. Manual of Basic Techniques.* (D. P. Wolf, ed.) Plenum Press. New York and London. 57-76.
16. Giacomini G., Tabibzadeh S.S., Satyaswaroop P.G. et al. (1995) Epithelial cells are the major source of biologically active granulocyte macrophage colony-stimulating growth factor in human endometrium. *Hum Reprod.* 10, 3259-3263
17. Guerif F., Bidauly R., Cadoret v., Couet M.L., Lansac J. and Royere D. (2002) Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation a reappraisal. *Hum Reprod.* 17, 1321-1326.
18. Imakawa K., Helmer S.D., Nephew K.P. et al. (1993) A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon production, ovine trophoblast protein-1. *Endocrinology.* 132, 1869-1871.
19. Imakawa K., Helmer S.D., Nephew K.P. et al. (1993) A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon production, ovine trophoblast protein-1. *Endocrinology.* 132, 1869-1871.
20. Jones G.M., Trounseon A.O., Gardner D.K et al. (1998) Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod.* 13, 169-177.
21. Kane M.T., Morgan P.M. and Coonan C. (1997) Peptide growth factors and

- preimplantation development. *Hum Reprod Update*. 3, 137-157.
22. Karagenc L., Lane M. and Gardner D. (2005) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor stimulates mouse blastocyst inner cell mass development only when media lack human serum albumin. *Reproductive BioMedicine Online* 10, No. 4. 511-518.
23. Kaufman R.A., Ménéz Y., Hazout A. et al. (1995) Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril*, 64, 1125-1129.
24. Kim D., Kim M., Hang H., Lee H., Park W., Kwon H. (2001) The supplementation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in culture medium improves the pregnancy rate in human ART programs. *Fertil Steril* 76, (Suppl 1), 6.
25. Leese H.J. (1991). Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. In: Milligan SR, ed. *Oxford reviews of reproductive biology*. Oxford: Oxford University Press; 35-72.
26. Lighten A.D., Moore G.E., Winston R.M. et al. (1998) Routine addition of human insuline-like growth factor-1 ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod*. 13, 3144-3150.
27. Martin K.L., Barlow D.H. and Sargent I.L. (1998) Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod*. 13, 1645-1652.
28. Martin K.L., Barlow D.H. and Sargent I.L. (1998) Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod*. 13, 1645-1652.
29. Mascareño M.D., Chen J., Zhang R.H., Cárcamo J.M., Golde D.W (2003). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose transport via Phosphatidylinositol 3-kinase and hydrogen peroxide dependent mechanisms. *J Biol Chem*. 278, 11107-11114.
30. Menez Y., Hazout A., Dumont M. et al. (1992) Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod*. 7, (Suppl.1), 101-106.
31. Menez Y., Nicollet B., Herbaut N., Andre D. (1992b) Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril*. 58, 460-465.
32. Olivennes F., Hazout A., Lelaidier C. et al. (1995) Four indications for embryo transfer at blastocyst stage. *Hum Reprod*. 9, 2367-2373.
33. Pampfer S., Arceci R.J. and Pollard J.W. (1991) Role of colony stimulating factor-1 (CSF-1) and other lympo-hematopoietic growth factors in mouse pre-implantation development. *Bioessays*. 13, 535-540.
34. Robertson S.A., Lavranos T.C. and Seamark R.F. (1991) In vitro models of the maternal fetal interface. In Wegmann, T.G., Nisbett-Brown, E. and Gill, T.G. (eds) *The Molecular and Cellular Immunobiology of the Maternal-Fetal Interface*. Oxford University Press, New York, pp-191-206.
35. Robertson S.A., Mayhofer G. and Seamark R.F. (1992) Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 un pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod*. 46, 1069-1079.
36. Robertson S.A., Mayhofer G. and Seamark R.F. (1996) Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod*. 54, 183-196.
37. Robertson S.A., Roberts C.T., Farr K.L. et al. (1999) Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficiente mice. *Biol Reprod*. 60, 251-261.
38. Robertson S.A., Seamark R.F., Guilbert L.J. et al. (1994) The rol of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol*. 14, 239-292.
39. Robertson S.A., Sjöblom C. Jasper M.J et al. (2001) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and inner cell mass viability in murine blastocysts. *Biol Reprod*. 64, 1206-1215.
40. Robertson S.A., Sjöblom C. Jasper M.J et al. (2001) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and inner cell mass viability

in murine blastocysts. *Biol Reprod.* 64, 1206-1215.

41. Ruef C. and Coleman D.L. (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev Infect Dis.* 12, 41-62.

42. Seamark R.F., Robinson J.S. (1995). Potencial health problems stemming from assisted reproduction programmes. *Hum Reprod.* 10; 1321-1322.

43. Sharkey A.M., Dellow K., Blayney M. et al. (1995) Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 53, 974-981.

44. Sjöblom C., Wikland M., Robertson S.A. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod.* 14, (12), 3069-3076.

45. Spielholz C., Heaney M.L., Morrison M.E., Houghton A.N., Vera J.C., Golde W.E. (1995) Granulocyte macrophage

colony stimulating growth factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. *Blood.* 85, 973-980.

46. Tarkowsky, A.K. (1966) An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenet.*, 5:394-400.

47. Tremellen K.P., Seamark R.F. and Robertson S.A. (1998) Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol Reprod.* 58, 1217-1225.

48. Wang H., Dasig D., Gebhardt J., Polan M.L., Behr B. (2002b) Granulocyte-macrophage colony-stimulating: a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis?. *Fertil Steril* 77, (Suppl 3), 7.

49. Zhao Y. and Chegini N. (1994) Human fallopian tube expresses granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptors and contain immunoreactive GM-CSF protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 79, 662-665.

Brindamos soluciones a sus pacientes con las más modernas herramientas tecnológicas y con el aval de un equipo profesional de amplia trayectoria en el campo de la Medicina Reproductiva, alcanzando los mejores resultados y más altos estándares de calidad.

UNIDAD DE FERTILIDAD ASISTIDA - UNIDAD DE GINECOLOGIA - UNIDAD DE ANDROLOGIA
UNIDAD DE GENETICA - UNIDAD DE INVESTIGACION CIENTIFICA

Cimer
Investigaciones en medicina reproductiva

Directora: Dra. Stella Lancuba

Av. Scalabrini Ortiz 2416 3ro - Cap. Fed. - Buenos Aires - Argentina
(011) 4831-9522 / (011) 4832-9638 - cimer@cimer.com - www.cimer.com