



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA Y SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL
Grado en Biotecnología



**Desarrollo y viabilidad de embriones de conejo en
un sistema de cultivo secuencial con células
oviductales**

TRABAJO FIN DE GRADO
Curso académico 2018/2019

Autora: **Noelia Mas Chillida**

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

Valencia, Julio 2019



TÍTULO

Desarrollo y viabilidad de embriones de conejo en un sistema de cultivo secuencial con células oviductales.

RESUMEN

El ambiente en que tiene lugar el desarrollo embrionario tiene una gran influencia en el mismo, tanto a corto como a largo plazo; durante los primeros estadios de desarrollo destaca el oviducto como pieza fundamental, ya que se trata del medio que aporta todos los factores y componentes necesarios para la correcta regulación y comunicación materno-embionaria. Se conoce la importancia del mecanismo pero existe un vacío traslacional entre lo que sucede *in vivo* y el análisis *in vitro*, es por lo que en este estudio se ha comprobado el efecto de la temperatura, un sistema de cultivo secuencial y el co-cultivo con células oviductales de conejo sobre el desarrollo temprano de embriones de conejo.

En primer lugar se evaluó el efecto del medio y la temperatura sobre el desarrollo en embriones de conejo, utilizando un medio simple esencial (MEM) suplementado con piruvato y lactato sódico o con suero en un método continuo y un medio suplementado con piruvato y lactato sódico en un medio secuencial. Tras 96h de cultivo se analizaron los patrones de expresión génica de factores de pluripotencialidad como el OCT4, NANOG y SOX2 para evaluar la calidad de los embriones obtenidos. Se determinó que el medio MEM suplementado con piruvato y lactato sódico en cultivo continuo y la temperatura de 38.5 °C favorecía el desarrollo embrionario hasta blastocisto, permitiendo la eliminación del suero en el medio de cultivo. Se observó que los distintos medios no modificaban los patrones de expresión mientras que la temperatura sí lo hacía. Estos cambios se atribuyeron a la relación entre los niveles de expresión y el estadio de desarrollo embrionario alcanzado, siendo una mayor expresión en embriones con menor desarrollo y una menor expresión en aquellos embriones con mayor desarrollo y por tanto de mayor calidad.

Con estas premisas se llevó a cabo la segunda parte del estudio, en la que se evaluó la eficacia del co-cultivo con células epiteliales de oviducto cunícula (ROECs) en las condiciones establecidas como óptimas (MEM suplementado con piruvato y lactato sódico a 38.5 °C). Se determinó que la presencia de las células oviductales mejoraba la tasa de obtención de blastocistos sin modificar el patrón de expresión.

PALABRAS CLAVE

Temperatura de cultivo, epitelio oviductal, co-cultivo, desarrollo embrionario temprano

SUMMARY

The environment where happen the early embryo development has a great influence itself, in the short and long term; at the first stages the oviduct is being involved in an important role, which is supply the environment with all the factors needed for the right regulatory mechanisms and maternal-embryo communication. Moreover, it is known the importance of the process but there is an empty between what happens *in vivo* and the analysis *in vitro*. The aim of this study was evaluate the effect of the temperature, type of culture (continuous or sequential) and the co-culture with oviduct epithelial cells (ROECs) in order to mimic the environment *in vivo* on early development of rabbit embryos.

The effect of the medium and temperature on development in rabbit embryos were evaluated, using an essential simple medium (MEM) supplemented with pyruvate and sodium lactate or with serum in a continuous method and a medium supplemented with pyruvate and sodium lactate in a sequential medium. After 96h of culture, the gene expression patterns of pluripotency factors such as OCT4, NANOG and SOX2 were analyzed to evaluate the quality of obtained embryos. It was determined that the MEM medium supplemented with pyruvate and sodium lactate in continuous culture and the temperature of 38.5 °C favored the embryonic development until blastocyst, allowing the elimination of the serum in the culture medium. It was observed that the different media did not modify the expression patterns while the temperature did. These changes were attributed to the relationship between expression levels and the stage of embryonic development reached, with greater expression in embryos with less development and lower expression in those embryos with greater development and therefore, of higher quality.

The second part of the study was carried out evaluating the efficacy of co-culture with rabbit oviduct epithelial cells (ROECs) under the conditions established as optimal (MEM supplemented with pyruvate and sodium lactate at 38.5 °C). It was determined that the presence of oviductal cells improved the rate of obtaining blastocysts but the pattern of gene expression was not modified.

KEY WORDS

Culture temperature, epithelium of oviduct, co-culture, early embryo development

DATOS DEL TRABAJO

Alumna: Dña. Noelia Mas Chillida

Tutor académico: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Valencia, Julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Entregar el proyecto fin de grado supone el fin de una etapa que ha sido fantástica gracias a las personas que me han acompañado en este camino. En primer lugar agradecer a todo el personal docente que se ha implicado en los alumnos y nos ha tratado de transmitir su conocimiento y pasión por la materia, la formación continua del científico. Destacar a José, por su dedicación en este proyecto y las mañanas de domingo cambiando los medios de cultivo; pero sobretodo, por la infinita paciencia e interés en nuestro aprendizaje, en definitiva por transmitir su ilusión por la investigación.

Agradecer también a toda la gente del laboratorio, siempre dispuesta a echar una mano. En especial a Amparo, por su disponibilidad e implicación en todo momento. Y a todos los compañeros de TFG por compartir tanto las penas como las alegrías; a Belén, David y Zaida sin los cuales todavía estaría en el laboratorio haciendo las cuantificaciones de expresión génica.

Y por supuesto, gracias a mis chicas, a Protocatecuato, haber vivido estos cuatro años con vosotras es lo mejor que me llevo. A Clara e Irene, por compartir tantas horas dentro y fuera de la biblioteca. Gracias Álvaro, por tu apoyo incondicional. Y por último agradecer a mis padres y hermana, sin vuestra ayuda y confianza no hubiera llegado hasta aquí, si puedo decir que soy una biotecnóloga es gracias a vosotros.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Medios de cultivo de embriones	1
1.1.1. Condiciones del cultivo	2
1.1.2. Métodos de cultivo	4
1.2. Cultivo sobre células oviductales.....	6
1.2.1. El oviducto en la biología reproductiva (anatomía y funciones).....	6
1.2.2. Cultivo de células epiteliales de oviducto	7
1.2.3. Efectos sobre el desarrollo embrionario del ambiente oviductal.....	8
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Diseño experimental.....	12
3.2. Animales.....	14
3.3. Metodología de obtención de embriones	14
3.3.1. Superovulación de las hembras	14
3.3.2. Inseminación artificial e inducción de la ovulación.....	14
3.3.3. Recuperación de los embriones	15
3.4. Procesamiento de los oviductos y obtención de las ROECs	15
3.5. Medios de cultivo.....	16
3.6. Cultivos.....	18
3.6.1 Experimento 1	18
3.6.2. Experimento 2	18
3.7. Valoración de los embriones y procesamiento de la muestra	19
3.8. Extracción RNA y obtención del cDNA.....	19
3.9. Cuantificación de la expresión génica embrionaria: PCR cuantitativa	21
3.10. Análisis estadístico	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23

4.1. Experimento 1: Efecto del medio y la temperatura sobre el desarrollo embrionario y la expresión de marcadores génicos de pluripotencialidad	23
4.2. Experimento 2: Efecto del co-cultivo con células epiteliales sobre el desarrollo embrionario y la expresión de marcadores génicos de pluripotencialidad	28
5. CONCLUSIÓN	31
6. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de los factores físicos (azul) y químicos (rojo) que afectan al desarrollo embrionario in vitro Siendo QC: control de calidad; VOCs: componentes volátiles orgánicos (Wale y Gardner, 2016).....	3
Figura 2. Sistema de microfluidos para el cultivo de embriones. A: imagen microscópica de la cámara de cultivo. B: blastocisto en la cámara de cultivo (Kieslinger et al., 2015).....	5
Figura 3. Desarrollo embrionario de diferentes especies de mamíferos en co-cultivo con células epiteliales de oviducto en interfase aire-líquido. A: blastocisto de murino en “hatching”, d 7(100x). B: blastocisto de porcino, d 4.5 (400x). C: blastocisto de bovino, d 8 (400x) (Chen et al., 2017).....	8
Figura 4. Esquema que representa las interacciones entre el embrión y el ambiente, tanto in vivo como in vitro, así como las posibles respuestas a corto plazo y las consecuencias a largo plazo (Fleming et al., 2004).....	10
Figura 5. Diagrama de flujo del ensayo realizado en el presente estudio. De elaboración propia. Iconos de la plataforma Noun Project.....	13
Figura 6. Oviducto limpio recuperado a las 24 h de la inseminación artificial.....	15
Figura 7. Protocolo de recuperación de células epiteliales de oviducto. A-B: Canulación del oviducto aislado. C: Tras la digestión mecánica, baño del tejido en etanol puro al 70%. D-E-F: lavados del tejido en PBS y etanol puro al 70% de forma secuencial. G: explante del oviducto en tripsina para iniciar la digestión enzimática a 37°C durante 1 hora.....	16
Figura 8. ROECs en medio de proliferación tras 48h de cultivo. Utilizadas en este mismo estudio.....	19
Figura 9. Tasa de blastocistos tras 96h de cultivo en los diferentes medios. Siendo A: MEM 1 (96h); B: MEM 2 (96h); 3: MEM 1 (48h) + MEM 2 (48h); 4: MEM + FBS (CONTROL) (96h). Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas (p -value < 0.05). El valor entre paréntesis indica el número de embriones cultivados en cada medio.	23
Figura 10. A: Tasa de blastocistos tras 96h de cultivo a 37 °C (F) y 38.5°C (C). a y b indica una diferencia estadísticamente significativa (p -value < 0.05). El valor entre paréntesis indica el número de embriones cultivados en cada condición B: Embriones en cultivo a 38.5°C. Siendo 1: 24h; 2: 48h; 3: 72h; 4: 96h, izq.: blastocisto en “hatching” y dcha.: mórula compacta.....	24
Figura 11. Expresión génica embrionaria de los factores OCT4, NANOG, SOX2 tras 96h en diferentes medios. Siendo A: MEM 1 (96h); B: MEM 2 (96h); C: MEM 1 (48h) + MEM 2 (48h); D: MEM + FBS	25
Figura 12. Expresión génica embrionaria de los factores OCT4, NANOG, SOX2 tras 96h en cultivo a 37°C (F) y 38.5 °C (C). Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas (p -value < 0.05).....	26

Figura 13. Diagrama de la regulación OCT4/SOX2 en la expresión génica embrionaria. (Thomson et al., 2011).....27

Figura 14. A: Tasa de blastocistos tras 96h de cultivo en medio MEM 1 a 38.5°C con cultivo o no de células oviductales. Siendo E: presencia de células oviductales en co-cultivo y NE: no hay presencia de células oviductales en co-cultivo. [a y b indica una diferencia estadísticamente significativa (p -value < 0.05). El valor entre paréntesis indica el número de embriones cultivados en cada condición. B: Embriones a las 48h en co-cultivo con monocapa de células oviductales adheridas.....29

Figura 15. A: Expresión génica embrionaria de los factores OCT4, NANOG, SOX2 tras 96h en MEM 1 a 38.5 °C con cultivo o no de células oviductales adheridas (ROECs). Siendo E: presencia de epiteliales; NE: no hay presencia de células epiteliales. B: imagen microscópica del co-cultivo de ROECs con embriones.....30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio simple esencial (MEM) utilizado como medio base en los cultivos.....	17
Tabla 2. Mix PCR (cantidad por muestra).....	20
Tabla 3. Mix RT-PCR (cantidad por muestra).....	20
Tabla 4. Características de los cebadores utilizados en la qPCR.....	21
Tabla 5. Programa para la qPCR.....	21

ABREVIATURAS

ART - Assisted Reproduction Technique (Técnica de reproducción asistida)
BME - Eagle's Basal Medium (Medio Eagle Básico)
BSA - Bovine serum albumin (Suero de albúmina bovina)
cDNA - Complementary Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico complementario)
DNA - Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs - Desoxinucleótidos trifosfato
DTT – Ditioneitol
E2 – Estradiol
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético
ESCs – Embryonic Stem Cells (Células troncales embrionarias)
FBS - Fetal Bovine Serum (Suero Bovino Fetal)
FIV- Fecundación *in vitro*
GnRh - Gonadotropin-releasing hormone (Hormona liberadora de gonadotropina)
Ham's F10 – F10 Nutrient Medium (Medio nutritivo F10)
HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IA - Inseminación artificial
ICSI - Intracytoplasmic sperm injection (Inyección intracitoplasmática de espermatozoides)
MEM - Minimum Essential Medium Eagle (Medio Mínimo Esencial Eagle)
mRNA - Messenger Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico mensajero)
OECs – Oviductal Epithelial Cells (Células Epiteliales de Oviducto)
P4 - Progesterona
P60 - Placa de 60cm de diámetro
PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino)
PCR - Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
poliA – Poliadenilado
POECs – Pig Oviduct Epithelial Cells (Células Epiteliales de Oviducto Porcino)
PSCs - Pluripotential Stem Cells (Células troncales pluripotenciales)
qPCR - Quantitative Polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa)
RNA - Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
RNasa - Ribonucleasa
ROECs - Rabbit Oviduct Epithelial Cells (Células Epiteliales de Oviducto Cunícula)
ROS – Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
RT - Reverse Transcriptase (Transcriptasa Reversa)
SOF- Synthetic Oviductal Fluid (Fluido Oviductal Sintético)
u.i.- Unidad Internacional
EDTA - Ethylenedia-minetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Medios de cultivo de embriones

La eficiencia de las técnicas de reproducción asistida en mamíferos depende en gran medida de la puesta a punto de los sistemas de cultivo de embriones. Desde la obtención de un cigoto mediante la fecundación *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática (ICSI) hasta el momento óptimo para su transferencia, el cigoto es cultivado en medio y condiciones ambientales que deben garantizar una cinética y fisiología de desarrollo similar a las observadas *in vivo*. El periodo en el que el cigoto es cultivado *in vitro* será de entre 5 a 7 días según la especie, dado que se tiende a que éstos alcancen el estadio de blastocisto, ya que este estadio de desarrollo aporta diversas ventajas tanto para su transferencia como para su manipulación en el caso de un biopsia para diagnóstico pre-implantacional en humanos o para la obtención de células madre embrionarias en modelos animales (Biggers y Summers, 2008).

No obstante, es precisamente durante este periodo del desarrollo embrionario en el que con mayor facilidad podría alterarse la expresión génica e incluso introducirse marcas epigenéticas con trascendencia sobre la viabilidad y el desarrollo fetal y, probablemente sobre la vida postnatal (Simopoulou *et al.*, 2018). Algunos factores de transcripción que podrían verse alterados en estas primeras etapas y que podrían generar una cascada de modificaciones son los que participan activamente en los procesos de renovación celular y regulación del desarrollo embrionario temprano en mamíferos, entre ellos destacan OCT4, NANOG y SOX2 (Wang *et al.*, 2012; Xiao-Li *et al.*, 2015). El factor de transcripción OCT4 se asocia al desarrollo del endodermo y mesodermo, el factor NANOG controla la regulación del endodermo primitivo y finalmente el SOX2 se relaciona con el desarrollo del epiblasto y ectodermo (Wang *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013). Además, gracias a estudios epigenéticos como el realizado por Gifford y colaboradores (2013) se conoce que algunos de estos factores transcripcionales están también relacionados con procesos de especificación celular y no solo con la capacidad pluripotencial.

Por ello en los últimos años se han propuesto diversas aproximaciones con la finalidad de obtener o simular las condiciones óptimas para el desarrollo embrionario temprano: el cultivo continuo, que contiene todos los metabolitos que podrían ser necesarios para el desarrollo embrionario y se conoce por el concepto de “permitir al embrión escoger”; y el cultivo secuencial, que trata de simular el ambiente *in vivo* utilizando diferentes medios según la etapa de desarrollo y se conoce por el concepto de “vuelta a la naturaleza”. Ambos métodos son utilizados ampliamente así como los medios en los que se basan, generalmente medios comerciales como TC199, MEM o B2 (Biggers y Summers, 2008; Ménéz *et al.*, 2015; Sfontouris *et al.*, 2016).

A pesar de las diferencias que presentan ambos métodos, ninguno de los dos ha demostrado una eficacia superior en cuanto a la calidad embrionaria (Mantikou *et al.*, 2013).

1.1.1. Condiciones del cultivo

Para obtener unos blastocistos de calidad es necesario evitar cualquier tipo de estrés físico o químico que pueda sufrir el embrión durante el desarrollo; no solo la composición del medio base y los suplementos utilizados pueden modificar las pautas de desarrollo embrionario, sino que otros factores ambientales como el nivel de oxígeno, temperatura o la luz tendrán repercusión directa sobre la fisiología del embrión en desarrollo (ver **Fig. 1**; Swain *et al.*, 2016).

En general los medios de cultivo para células cubren suficientemente con las necesidades de desarrollo embrionario aunque no necesariamente pueden ser considerados como óptimos, ya que su desarrollo es más eficiente en presencia de sustratos específicos. Así por ejemplo, se ha definido un medio basado en fluido oviductal denominado Synthetic Oviductal Fluid (SOF), el cual trata de satisfacer específicamente las necesidades metabólicas del embrión en las primeras etapas de división, ajustando los niveles de glucosa, piruvato, lactato, aminoácidos y vitaminas a las de la composición del oviducto (Takahashi y First, 1992; Li *et al.*, 2007). A pesar de haber sido demostrado que el cultivo de embriones con concentraciones de aminoácidos equivalentes al fluido oviductal presentan un mayor desarrollo embrionario, estos medios tan solo logran imitar una parte del ambiente *in vivo* (Biggers, 2001; Li *et al.*, 2006).

Por otra parte, si bien los medios cubren un amplio rango de necesidades proporcionando sustratos energéticos, minerales, iones, ácidos grasos, vitaminas, bases nucleicas, factores de crecimiento o aminoácidos, la cantidad generalmente en exceso y el periodo de cultivo de algunos de ellos pueden resultar a la larga problemáticos. Por ejemplo, la presencia de aminoácidos en el medio de cultivo presenta grandes beneficios en primera instancia, cuanto mayor es el periodo de cultivo mayores probabilidades de descomposición de estas macromoléculas, liberando grupos amonio que se han demostrado altamente perjudiciales para la actividad metabólica del mismo y por ende, una repercusión directa en el patrón de desarrollo (Wale y Gardner, 2016).

Entre los suplementos más habituales de los medios de cultivo está el suero que, no solo proporciona una mezcla de factores de crecimiento, ácidos grasos, proteínas sino que también ayuda a estabilizar el pH y parece reducir el estrés fisiológico de los embriones, lo que finalmente resulta en una mayor tasa de obtención de blastocistos (Lim *et al.*, 1994; Gómez y Díez 2000). Sin embargo, en diferentes modelos animales se ha demostrado que enmascara posibles problemas a lo largo del cultivo, además de provocar alteraciones en la expresión génica que originan modificaciones a nivel fenotípico. Por todo ello se propone el uso de otros componentes como puede ser el BSA pero surge la disyuntiva de generar un cultivo altamente sensible a los cambios o situaciones de estrés, lo cual a largo plazo puede ocasionar alteraciones en las células embrionarias (Pinyopummintr y Bavister, 1994; Gandhi *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 2006).

La temperatura es uno de los agentes físicos más estudiados y los efectos que provoca dependen en gran medida del tiempo de exposición al estrés térmico, la especie y el estadio

de desarrollo embrionario, ya que la termo-resistencia varía entre los diferentes niveles de desarrollo (Olexiková *et al.*, 2007). Tomando como referencia la continua búsqueda de imitar las condiciones naturales, los cultivos de embriones de diferentes modelos animales se cultivan en torno a 37°C para equiparar a las condiciones fisiológicas. Los embriones humanos como los de ratón se cultivan eficientemente a 37 °C (Hong *et al.*, 2014), aunque recientemente se están realizando estudios con temperaturas de cultivo variables siguiendo las variaciones circadianas o atendiendo a la temperatura oviductal (36 a 37 °C) (Wale y Gardner, 2015; Swain *et al.*, 2016).

La temperatura también juega un papel fundamental en la regulación del pH, un descenso de la misma puede originar una alcalinización del medio (Swain y Pool, 2009) y cualquier variación del pH neutro supone una alteración en el desarrollo. Para lograr el mantenimiento del pH es necesario establecer en primer lugar el equilibrio con la concentración de CO₂ y ello se consigue añadiendo bicarbonato sódico al medio. La atmósfera durante el periodo de incubación suele enriquecerse en CO₂ y por el contrario, reducir los niveles de oxígeno, lo que se ha demostrado favorecer el desarrollo embrionario y con ello la tasa de obtención de blastocistos. Si además el medio contiene suero, los embriones soportan mejor los niveles atmosféricos de oxígeno (Gardner, 2016).

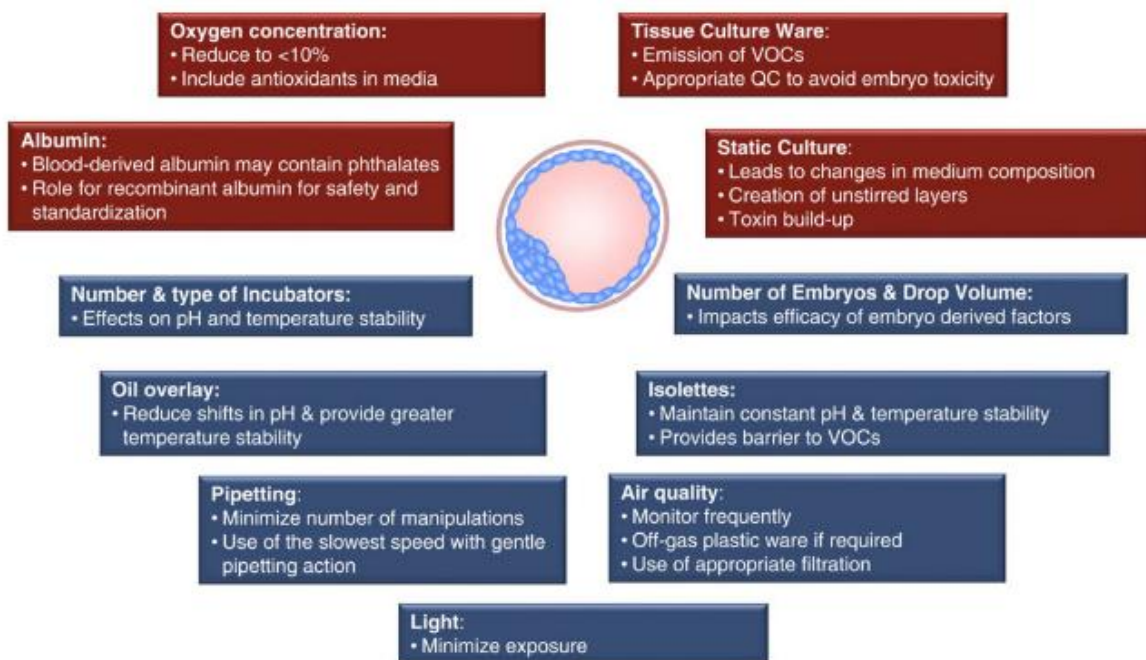


Figura 1. Resumen de los factores físicos (azul) y químicos (rojo) que afectan al desarrollo embrionario in vitro. Siendo QC: control de calidad; VOCs: componentes volátiles orgánicos (Wale y Gardner, 2016).

1.1.2. Métodos de cultivo

Los sistemas de cultivo más habituales son: simple, secuencial y microfluidos con o sin co-cultivo celular.

1.1.2.1. Cultivo simple

En este método los embriones son cultivados en un mismo medio desde el estadio de cigoto hasta alcanzar el nivel de desarrollo de blastocisto, esto implica que no se da una renovación del medio durante el proceso; dicho medio contiene todos los componentes necesarios para el crecimiento embrionario temprano (Meseguer y Pellicer, 2017). Es necesario destacar que se trata de un aspecto que rechazan los detractores de este sistema ya que se considera que algunos componentes pueden afectar negativamente al embrión en ciertas fases del desarrollo (Matchinger y Racowsky, 2012) y es por ello que se propone renovar el medio al tercer día de cultivo (Biggers y Summers, 2008), permitiendo de nuevo la utilización de componentes ya agotados durante las primeras fases del desarrollo, así como eliminar productos de desecho producidos por propio metabolismo del embrión.

Desde un punto de vista teórico, la ventaja que presenta la utilización de un mismo medio durante todo el período de cultivo es la reducción del estrés del embrión asociado al cambio de medio en el día tres y, por ende, de los componentes a los que va a estar expuesto; pudiendo llegar a originar un shock osmótico o de origen paracrino o endocrino, causado por los propios factores liberados en las primeras fases (Matchinger y Racowsky, 2012). Sepulveda y colaboradores (2009) obtuvieron resultados favorables al cultivo simple frente al secuencial en embriones humanos.

1.1.2.2. Cultivo secuencial

Se trata de un sistema de cultivo que permita el crecimiento embrionario en unas condiciones equiparables al ambiente *in vivo*, en otras palabras, un método que sea capaz de aportar los requerimientos nutricionales y metabólicos de los embriones, que son variables, desde el primer hasta quinto o sexto día de desarrollo (Quinn, 2012; Sfontouris *et al.*, 2016). Con este método se exponen los embriones a un primer medio de cultivo y al tercer día de desarrollo se trasladan a un medio de cultivo distinto; con ello se pretende proporcionar un medio específico para el estadio en el que se encuentra el embrión en base a las diferencias observadas *in vivo*, en cuanto a los niveles de piruvato, lactato y glucosa se refiere (ver **Fig 2.**) (Sfontouris *et al.*, 2016). El cambio la composición del medio permite aumentar la calidad embrionaria, siendo de gran importancia la suplementación con componentes que se encuentren de forma natural en el oviducto, tales como: iones inorgánicos, por ejemplo el ión fosfato o los equilibrios Na^+/K^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$; sustratos energéticos, como el caso de la glucosa, piruvato, lactato y aminoácidos; vitaminas y factores de crecimiento entre otros (Quinn, 2012). Aunque se está tratando de mimetizar el ambiente, se ha comprobado que la adición al medio de componentes no presentes en el tracto reproductivo como es la albúmina o el ácido hialurónico, mejoran el desarrollo embrionario (Gardner, 2008).

A nivel fisiológico, es importante el tercer día de desarrollo embrionario ya que sucede diferentes eventos de gran relevancia; lo que podría justificar la necesidad de cambiar el cultivo a un medio más complejo. Tiene lugar la compactación celular de las uniones estrechas de las membranas plasmáticas de los blastómeros, y por lo tanto un requisito fundamental para la formación del blastocisto (Quinn, 2012). Además, en los embriones humanos tiene lugar la activación del genoma embrionario, lo que supone cambios a nivel metabólico especialmente en lo que a requerimientos energéticos se refiere (Lane y Gardner, 2001).

Otros motivos que acreditan el cultivo secuencial son el efecto inhibitor del EDTA en el desarrollo del blastocisto y en la masa celular interna (Gardner y Lane, 1997); así como los efectos negativos que causa la acumulación de amonio en el desarrollo embrionario (Gardner y Lane, 2002).

1.1.2.3. Microfluidos

La tecnología de los microfluidos se define como “la ciencia y tecnología de los sistemas que procesan o manipulan una pequeña cantidad de líquidos (10^{-9} a 10^{-18} litros) utilizando canales con dimensiones de decenas a cientos de micrómetros” según Whitesides (2006). Cuando se aplica al cultivo de embriones, permite el desarrollo de sistemas de cultivo que mimetizan las condiciones *in vivo* para proporcionar un ambiente óptimo en el desarrollo embrionario *in vitro* (Le Gac y Nordhoff, 2017); esto sucede gracias al diseño de sistemas caracterizados por la simplicidad y fácil reproducibilidad (ver **Fig. 2**) (Young y Beebe, 2010).

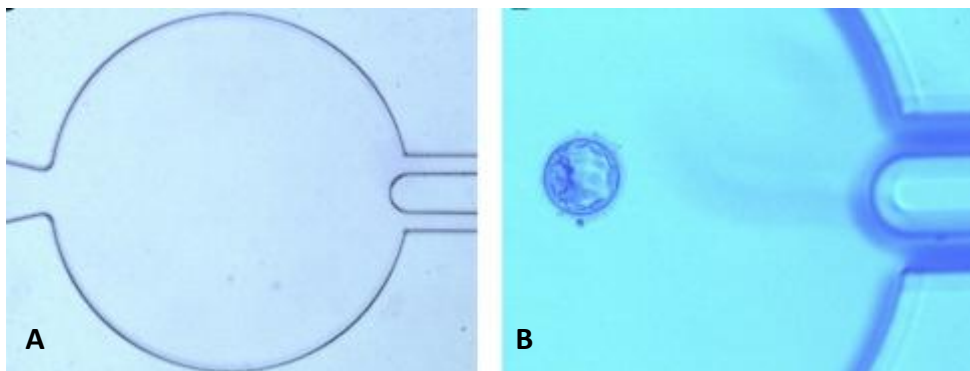


Figura 2. Sistema de microfluidos para el cultivo de embriones. A: imagen microscópica de la cámara de cultivo. **B:** blastocisto en la cámara de cultivo (Kieslinger et al., 2015).

La principal ventaja que presentan estos sistemas es el menor volumen de medio de cultivo requerido lo que permite al embrión una mayor regulación del propio microambiente (Wheeler et al., 2007), además de reducir la tensión superficial de oxígeno de forma localizada (Swain y Pool, 2008). Por otro lado, el uso de esta tecnología de forma aplicada permite la miniaturización y automatización del proceso, por lo que se reduce de forma drástica el factor humano que podría tener un efecto significativo en los resultados (Ma et al., 2011).

1.1.2.4. Co-cultivos

Se trata de un sistema desarrollado en la década del 1990 que originalmente utilizaba todos los tipos celulares posibles, tanto humanos como de otras especies, hasta que en el 2002 la FDA reguló la normativa, limitando el uso de las líneas celulares para técnicas de FIV (Swain *et al.*, 2016). Este método permite imitar de una forma sencilla las condiciones *in vivo* gracias a los factores secretados por las células que constituyen un soporte bioactivo para el desarrollo embrionario (Le Saint *et al.*, 2019).

Existen numerosos parámetros que afectan a la eficiencia y por consiguiente, a la calidad de los blastocistos obtenidos, como son el tipo celular utilizado, el medio, factores exógenos como la temperatura, cantidad de oxígeno disponible o período de cultivo, presencia de suero para la suplementación del medio entre otros (Orsi y Reischl, 2007). Además, ha sido demostrado como el soporte bioactivo es capaz de mantener la capacidad secretora de factores de crecimiento que van a favorecer tanto la maduración ovocitaria como el desarrollo embrionario temprano (Vithoukias *et al.*, 2017). Más concretamente, ha sido probada que la interacción en el co-cultivo de embriones con células endometriales humanas favorece la eliminación de residuos secretados por el propio embrión durante el desarrollo, lo que mejora notablemente la formación de blastocistos (Bochev *et al.*, 2016).

Resultados similares fueron los obtenidos por Carney y colaboradores (1990) en los primeros estudios de co-cultivo con células epiteliales de oviducto cunícula (ROECs), en dicho estudio se demostró que el co-cultivo propiciaba una mejora en la tasa de obtención de blastocistos.

1.2. Cultivo sobre células oviductales

1.2.1. El oviducto en la biología reproductiva (anatomía y funciones)

En una gran parte del reino animal la fecundación tiene lugar en una región específica del tracto reproductivo femenino, éste se conoce como oviducto o también llamado tubo de falopio en los primates. Se trata de un conducto entre el útero y el ovario que presenta variaciones anatómicas a nivel macroscópico según la especie, así como modificaciones en su estructura y secreciones a lo largo del ciclo reproductivo (Coy *et al.*, 2018). En los euterios (mamíferos placentarios) está formado por cuatro regiones, estas divisiones se realizan en base a las diferencias histológicas y son el infundíbulo, que a su vez contiene las fimbrias, el ámpula, de paredes largas y finas; el istmo, de un mayor grosor y finalmente la intersección útero-tubal (Hwang y Song, 2004; Hunter, 2012).

El oviducto está conectado a las paredes de la cavidad abdominal mediante el mesosalpinx, constituyente del ligamento ancho del útero. Por lo que respecta a la estructura interna, la pared del oviducto está formada por distintas capas que son la túnica mucosa, caracterizada por no ser glandular y conocida como endosalpinx; se trata de la capa en contacto con el lumen y que por tanto tiene un revestimiento epitelial que contiene células ciliadas y secretoras; también la constituye un túnica muscular, conocida como myosalpinx y que está constituida por músculo liso de doble capa; finalmente se encuentra la capa serosa que

cumple una función protectora (Brüssow *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2017). Es necesario destacar que cada capa es de diferente grosor según la región anatómica del oviducto (Avilés *et al.*, 2015).

Durante la fase estral y especialmente en la ovulación, se condensa la vasculatura en el oviducto haciendo el tejido más tónico y uniforme, formando crestas y pliegues en el mismo que dan lugar a una menor permeabilidad en algunas regiones como el istmo. Por lo que respecta a la porción de células ciliadas también sufren ciertos cambios, principalmente se observa una sincronización en la batida ciliar, de modo que el movimiento se vuelve unidireccional y acompasado; lo que favorece el desplazamiento del ovocito hacia el ámpula y posteriormente del embrión. La porción de células no ciliadas, está distribuida uniformemente por el ámpula en proporción variable según especies; se trata de células secretoras también llamadas células Peg (Hunter, 2012; Carretero *et al.*, 2017). Todos estos eventos tienen lugar como consecuencia del aumento de las hormonas esteroideas ováricas, en otras palabras, el aumento de progesterona (P4) y estradiol (E2) provoca cambios en la morfología superficial, en la función muscular y regulación nerviosa, así como en la cantidad y composición de fluidos en el lumen (Adissu *et al.*, 2007; Hunter, 2012). Li *et al.* (2018), comprobaron que bajos niveles de P4 reducen los niveles de batida ciliar en el epitelio oviductal, lo que origina una retención del embrión a su paso.

Las células del epitelio oviductal participan en el transporte de nutrientes, de oxígeno, fluidos e iones; además de otros componentes y ciertas señales (Aldarmahi, 2017). Las principales funciones del oviducto son la maduración final de los gametos tanto masculinos como femeninos, su transporte, la selección y capacitación espermática, el control de la poliespermia y la fecundación y, el desarrollo embrionario temprano (Gualtieri *et al.*, 2012; Palma-Vera *et al.*, 2014; Avilés *et al.*, 2015).

1.2.2. Cultivo de células epiteliales de oviducto

Los métodos *in vitro* de cultivo para estas células tienen tres objetivos principales: en primer lugar conseguir dilucidar los mecanismos moleculares que están directamente relacionados con las funciones en las que están implicados; por otro lado, proporcionar las herramientas necesarias para los test de toxicidad reproductiva y soporte bioactivo del proceso reproductivo (Spielmann, 2009; Chen *et al.*, 2013); y finalmente analizar las secreciones de las células Peg, cuyo estudio a partir de la obtención *in vivo* resulta extremadamente dificultoso (Jingu *et al.*, 2018). El co-cultivo de embriones con células oviductales ha demostrado un mayor potencial de desarrollo en comparación a cultivos con medios convencionales (Joo *et al.*, 2001; Kattal *et al.*, 2012).

El cultivo de células oviductales *in vitro* se obtiene a partir de tres métodos. El primero de ellos consiste en explantes de tejido, utilizados para cultivos a corto plazo ya que a partir de las 24 h se inicia un proceso de desdiferenciación. El segundo método, parte de la obtención de una monocapa de células oviductales por proliferación en la que se producen alteraciones a nivel morfológico como son la pérdida de la polaridad en las células, del movimiento ciliar, la

capacidad secretora y la respuesta hormonal; además las células muestran signos de estrés entre las 24 h - 48 h posteriores a alcanzar la confluencia (Rottmayer *et al.*, 2006; Miessen *et al.*, 2011; Gualtieri *et al.*, 2012).

En vista a las dificultades que presentan los dos primeros, se plantea un tercer método que utiliza un sistema de cultivo compartimentalizado para llegar a inducir la diferenciación celular *in vitro* tras la etapa de proliferación; con ello se consigue un compartimento apical y otro basolateral que permite a las células epiteliales acceder al suministro de hormonas de forma comparable a las condiciones naturales (Palma-Vera *et al.*, 2014). Este experimento fue llevado a cabo con éxito por Miessen *et al.* (2011) con células epiteliales de oviducto porcino (POECs) utilizando un sistema compartimentalizado en una interfase aire-líquido; como resultado obtuvieron un cultivo a largo plazo que mantenía las características fenotípicas típicas de células *in vivo*. Resultados similares fueron obtenidos por Chen *et al.* (2017) utilizando el sistema de cultivo con interfase aire-líquido a largo plazo, llegando a producir las secreciones propias del tejido; además se comprobó la viabilidad del co-cultivo con embriones, llegando a obtener el estadio de blastocisto sin la necesidad de añadir un medio de cultivo específico para los embriones (ver Fig. 3).

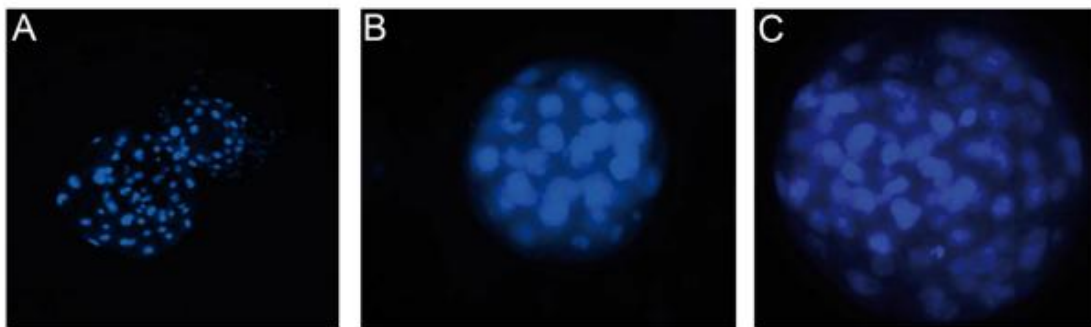


Figura 3. Desarrollo embrionario de diferentes especies de mamíferos en co-cultivo con células epiteliales de oviducto en interfase aire-líquido. A: blastocisto de murino en “hatching”, d 7(100x). **B:** blastocisto de porcino, d 4.5 (400x). **C:** blastocisto de bovino, d 8 (400x) (Chen *et al.*, 2017).

Continuando en esta línea de investigación, también se plantea el desarrollo de cultivos 3D que permitan mantener *in vitro* las condiciones y factores que requiere el tejido para su correcto funcionamiento, realidad que no se ha logrado alcanzar con los típicos cultivos en placa (Gualtieri *et al.*, 2012). Estos cultivos tridimensionales restablecen las interacciones fisiológicas célula-célula y célula-matriz extracelular por lo que se consigue imitar mejor la especificidad de los tejidos reales en comparativa a los cultivos bidimensionales (Pampaloni *et al.*, 2007).

1.2.3. Efectos sobre el desarrollo embrionario del ambiente oviductal

Tanto los gametos como los embriones en estadios tempranos sufren cambios epigenéticos en el oviducto, como es la metilación del DNA y modificaciones en las histonas;

por lo que las variaciones en los estímulos ambientales y metabólicos del oviducto pueden tener un impacto significativo en el desarrollo embrionario temprano tanto a corto como a largo plazo (Ulbrich *et al.*, 2010; Maillo *et al.*, 2016). Por lo tanto, llegar a dilucidar los mecanismos intrínsecos que tienen lugar supondría un gran avance en las técnicas de reproducción asistida, ya que optimizaría el proceso de obtención de embriones de calidad; y no solo eso, sino que también ayudaría a resolver problemas de infertilidad, reducir la pérdida de embarazo e identificar factores que puedan afectar al potencial de desarrollo del nuevo individuo hasta la edad adulta, tanto en humanos como en ganadería (Almiñana *et al.*, 2012). Podrían surgir detractores acerca de la necesidad de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y las primeras interacciones materno-embrionarias que suceden en el oviducto, alegando el éxito de embarazos con el desarrollo *in vitro* de embriones hasta el séptimo día y la posterior transferencia embrionaria; sin embargo ha sido demostrado que la calidad de estos embriones es inferior a la de aquellos desarrollados *in vivo* (Maillo *et al.*, 2016).

El paso de los embriones por el oviducto activa la expresión de genes específicos, de modo que se produce una regulación del propio ambiente (Vassena *et al.*, 2011; Almiñana *et al.*, 2012). Esto fue probado en ratones por Lee *et al.* (2002) que demostraron que sucedían cambios transcripcionales en el oviducto tras el paso del embrión y que estos no estaban asociados a los cambios hormonales generados por el embarazo, sino que se debían al cross-talk materno-embrionario; además el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido cuantificar las respuestas embrionarias frente al ambiente, mediante la caracterización transcriptómica, proteómica, metabólica y patrones epigenéticos. Se ha comprobado que los embriones son altamente sensibles a factores estresantes y alteraciones exógenas, lo que confirma la gran influencia del ambiente en el desarrollo del mismo (Fleming *et al.*, 2004; Ulbrich *et al.*, 2010).

Para que estos procesos se lleven a cabo con normalidad las condiciones de cultivo en los estudios deben cumplir lo más de cerca posible los criterios necesarios para el buen desarrollo celular (ver **Fig. 4**) como es la preservación de la morfología celular de dos tipos celulares, el mantenimiento de características estructurales como son las conexiones intercelulares, la polaridad celular, la expresión de marcadores específicos de células, actividades enzimáticas y las reacciones a estímulos externos (Ulbrich *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013). Para llegar a alcanzar tal grado de similitud a las condiciones *in vivo* es necesario añadir al medio factores como citoquinas, prostaglandinas y ciertos factores de crecimiento (Wolf *et al.*, 2003).

En el ensayo realizado por Chen y colaboradores (2013) realizaron cultivos de POECs variando los niveles de progesterona y estradiol para imitar las condiciones del estro y diestro. Observando que al aumentar los niveles de progesterona y mantener los de estradiol, lo que equivaldría a la fase del diestro, aumentaba significativamente la proporción de células secretoras. Además, con el análisis de la impedancia celular se determinó que era significativamente más elevada respecto a los controles o el experimento que simulaba el estro; por lo que estas variaciones en la conductividad eléctrica celular se podrían asociar a una mayor actividad secretora o de transporte transcelular/paracelular.

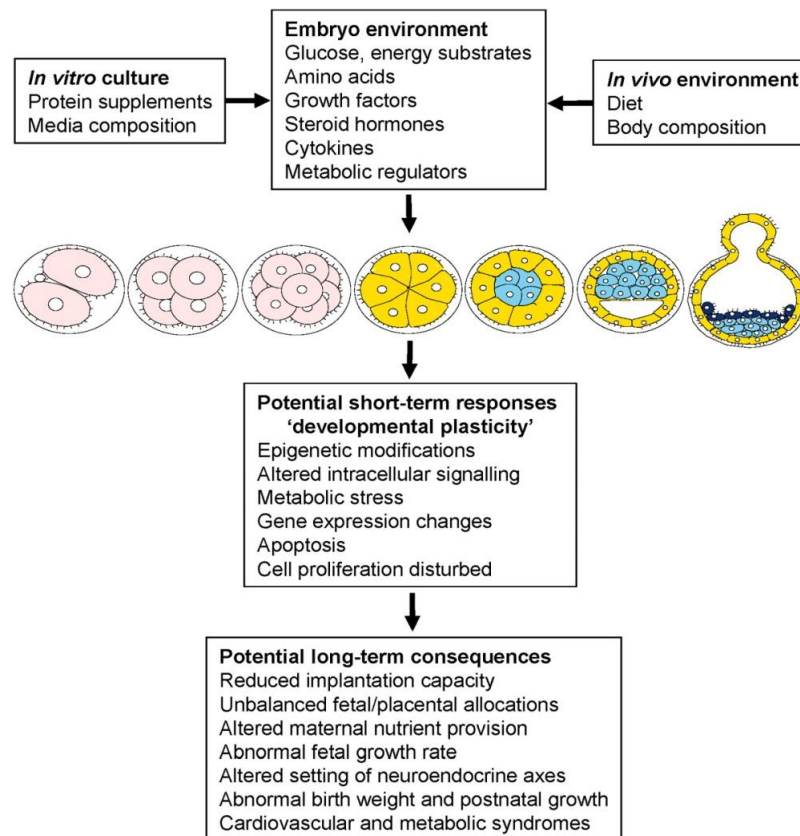


Figura 4. Esquema que representa las interacciones entre el embrión y el ambiente, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como las posibles respuestas a corto plazo y las consecuencias a largo plazo (Fleming et al., 2004).

2. OBJETIVOS

El ambiente en el que tiene lugar el desarrollo embrionario temprano tiene una gran influencia en el mismo, tanto a corto como a largo plazo. Se conoce la importancia del oviducto en esta primera comunicación materno-embrionaria pero existe un vacío traslacional entre los mecanismos que suceden *in vivo* y el análisis *in vitro*. Es por ello que en este estudio se va a estudiar un sistema de cultivo secuencial a dos temperaturas y un sistema con o sin células oviductales de conejo, con la finalidad de evaluar:

- En primer lugar el efecto de un medio simple esencial (MEM) suplementado con piruvato o suero en modo continuo y un medio secuencial con piruvato y lactato sódico en las primeras 48h y el efecto de la temperatura de cultivo, sobre el desarrollo y la expresión de los marcadores OCT4, NANOG y SOX2 en embriones de conejo.
- En segundo lugar, la eficacia del co-cultivo con células oviductales adheridas sobre el desarrollo y la expresión de los marcadores OCT4, NANOG y SOX2 en embriones de conejo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

El estudio consta de una primera fase en la que se evaluó la eficacia de diferentes medios de cultivo para el desarrollo embrionario temprano, así como el efecto de la temperatura en los mismos. Y una segunda, en la que sobre la mejor temperatura y uno de los mejores medios se estudió la contribución del cultivo en monocapa de células oviductales al desarrollo embrionario y a la expresión génica de OCT4, NANOG y SOX2. Para ello el grupo de hembras recibió un tratamiento de superovulación, siendo a las 72h inseminadas e inducidas a ovular. Tras las 24 h se recuperaron los embriones en estadio de pronúcleos o 2 células y se inició su cultivo en las diferentes condiciones durante 96h (ver **Fig. 5**).

Tras estas 96h de cultivo se valoró el nivel de desarrollo alcanzado siendo el estadio de blastocisto o mórula compacta el que se esperaba observar. Posteriormente, las muestras fueron procesadas para extraer el mRNA y realizar seguidamente una RT-PCR con el cDNA obtenido a partir del mismo. Con las muestras ya amplificadas, se procedió a realizar un análisis de la expresión génica, de ciertos factores de transcripción seleccionados, mediante una qPCR. Finalmente se realizaron los correspondientes análisis estadísticos para valorar los resultados (ver **Fig. 5**).

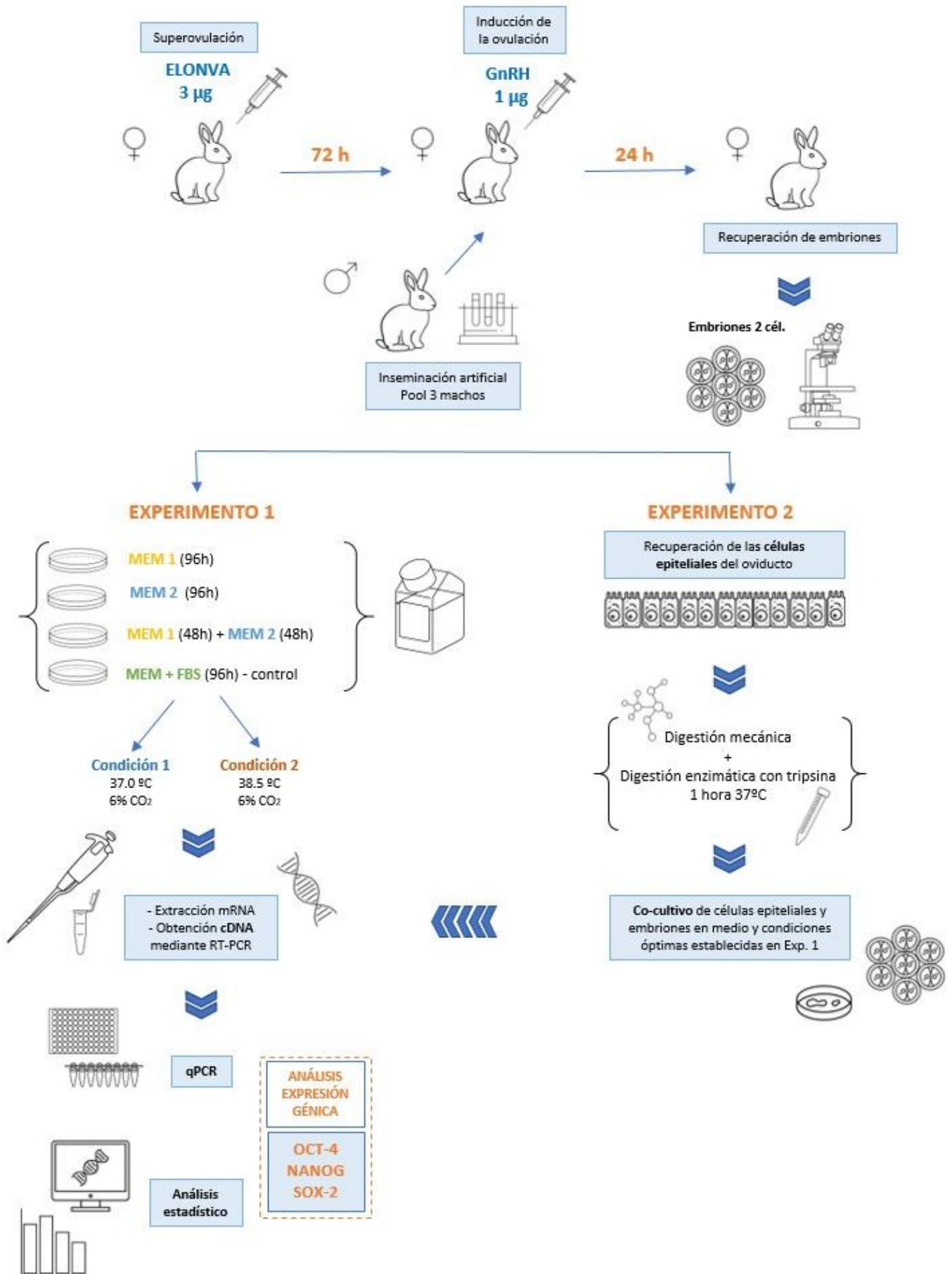


Figura 5. Diagrama de flujo del ensayo realizado en el presente estudio. De elaboración propia. Iconos de la plataforma Noun Project

3.2. Animales

Los conejos utilizados provenían de las instalaciones cunícolas del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Animal) en el campus de Vera de la Universitat Politècnica de València. Se utilizaron un total de 19 conejas de 18-20 semanas de edad y 5 machos fértiles de 8 a 12 meses de edad de origen California. Los procedimientos experimentales 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).

Todos los animales fueron alojados en jaulas individuales, con agua y alimento *ad libitum* y en condiciones ambientales controladas, atendiendo a la legislación sobre experimentación animal del Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013).

3.3. Metodología de obtención de embriones

3.3.1. Superovulación de las hembras

El grupo de hembras utilizadas se sometió a un tratamiento de superovulación utilizando la hormona FSH recombinante, Corifolitropina alfa (rFSH-CTP; Elonva; 150 µg/mL, Merck Sharp y Dohme S.A.; Spain) en una única dosis de 3 µg administrada vía subcutánea 72 horas antes de la inseminación.

3.3.2. Inseminación artificial e inducción de la ovulación

La obtención de los eyaculados se realizó mediante el método de vagina artificial el mismo día de la inseminación (Vicente *et al.*, 2011). Las dosis seminales se obtuvieron de 3 eyaculados de, al menos, 3 machos diferentes tras ser evaluada la movilidad y el porcentaje de espermatozoides anormales. Brevemente, tras la dilución 1:5 del eyaculado en un tampón Tris-cítrico-glucosa (250 mM tris-hidroximetilaminometano, 83 mM de ácido cítrico y 50 mM de glucosa, pH 6.8 – 7.0) se procedió al análisis de la motilidad espermática, realizado a temperatura ambiente y utilizando un microscopio óptico de contraste de fases a 400x. Los parámetros establecidos atendían al requerimiento mínimo utilizado en inseminación artificial, se trata de una motilidad espermática estimada superior al 70% y un porcentaje de espermatozoides anormales inferior al 25% (Marco *et al.*, 2010). Los eyaculados que cumplían los controles de calidad fueron mezclados, calculada la concentración de la mezcla heteroespermática y ajustada su concentración a 40 millones por mL. Las conejas superovuladas fueron inseminadas con 0.5 mL (20 millones de espermatozoides).

La dosis de inseminación fue introducida mediante una vaina de plástico curvada hasta el fondo de la vagina, lugar en el que se depositó el semen, inmediatamente después se indujo la ovulación inyectando vía intramuscular 1 µg de acetato de buserilina, GnRH (Suprefact; Hoechst Marion Roussed, S.A., Madrid).

3.3.3. Recuperación de los embriones

Tras el sacrificio de las conejas, se trasladaron los tractos reproductivos al laboratorio. En este momento se procedió a la perfusión o lavado de los oviductos desde el ámpula hacia el istmo con 5 mL de medio MEM + HEPES (15 mM) (ver **Fig. 6**). El medio de perfusión fue recogido en una placa P60. A continuación se realizó un rápido conteo y clasificación de los embriones recuperados así como de la tasa de ovulación a partir de los folículos con cicatrices de ovulación en los ovarios. Los embriones fueron catalogados como normales atendiendo a criterios morfológicos y de acuerdo con el estadio de desarrollo correspondiente a la cronología de esta especie. Así se determinaron como aptos para el cultivo aquellos que presentaban el típico estadio de desarrollo a las 24h tras la inseminación, como son embriones de dos células o con formación pronuclear, en ambos casos deben tener un citoplasma homogéneo y una zona pelúcida esférica; en cualquier caso se descartaron óvulos no fecundados o pronúcleos con presencia de vesículas pignóticas en el citoplasma o fragmentados.



Figura 6. Oviducto limpio recuperado a las 24 h de la inseminación artificial.

3.4. Procesamiento de los oviductos y obtención de las ROECs

Tras la recuperación embrionaria se procesaron los oviductos, retirando previamente el tejido adiposo circundante. A continuación, se procedió a canular el ámpula introduciendo un tubo de poliestireno de 1 mm de diámetro desde el infundíbulo en dirección hacia el istmo, de forma que el conducto oviductal recubría el tubo en su totalidad (ver **Fig. 7B**). Esto permitió retirar todo el tejido adiposo y obtener explantes de oviducto de entre 5 y 7 cm de longitud. Alcanzado este punto, sin retirar el explante del tubo de poliestireno se disgregó el tejido de forma mecánica con la ayuda de una hoja de bisturí, para facilitar posteriormente la digestión enzimática. Finalmente para reducir la carga microbiana y posibles contaminaciones se lavó el explante con etanol (70%) y se realizan dos baños alternando el etanol (70%) y tampón fosfato salino (PBS).

Una vez fueron obtenidos los explantes de oviducto se sometieron a una digestión enzimática con tripsina durante 1 hora a 37 °C (con la enzima previamente atemperada) para recuperar las células epiteliales y proceder a su cultivo. Tras la digestión los viales se agitaron con un vórtex y se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente, resuspendiendo a continuación el pellet con 2 mL de medio de proliferación. Además se calculó la concentración celular utilizando una cámara de contaje Thoma.

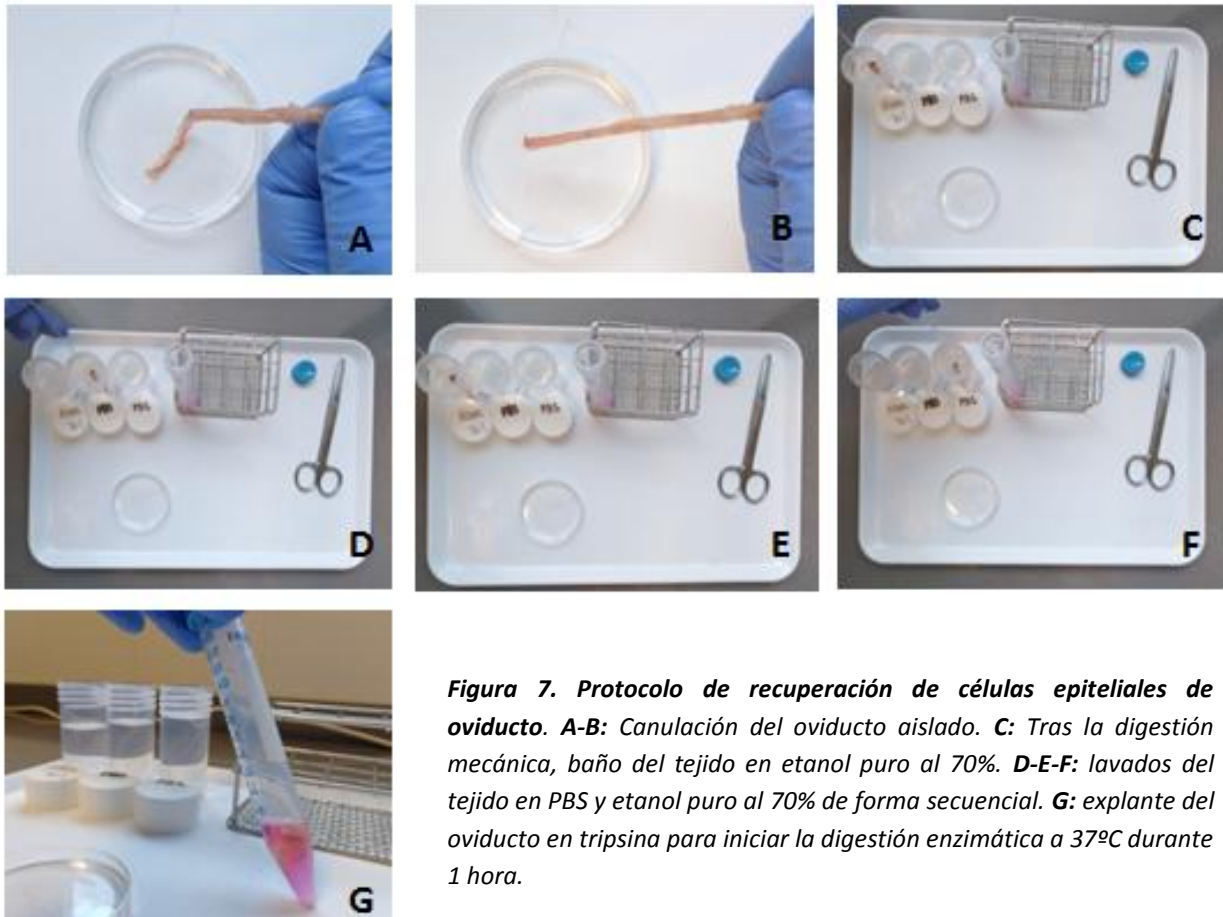


Figura 7. Protocolo de recuperación de células epiteliales de oviducto. *A-B:* Canulación del oviducto aislado. *C:* Tras la digestión mecánica, baño del tejido en etanol puro al 70%. *D-E-F:* lavados del tejido en PBS y etanol puro al 70% de forma secuencial. *G:* explante del oviducto en tripsina para iniciar la digestión enzimática a 37°C durante 1 hora.

3.5. Medios de cultivo

El medio base para el cultivo de embriones se elaboró a partir de MEM (minimal essential medium, Sigma-Aldrich; St. Louis; USA) (ver **Tabla 1**) al que se añadió 2.383 g de HEPES (15 mM) y 10 mL de una solución de antimicóticos y antibióticos que contenían 10.000 u.i. de Penicilina, 10 mg de Streptomina y 25 µg de Anfotericina por mililitro (Antibiotic Antimycotic Solution (100X); Sigma-Aldrich; St. Louis; USA). Los medios elaborados a partir del medio base fueron:

1. MEM 1: a la combinación de MEM con HEPES se añadió 20 µL de piruvato sódico para alcanzar una concentración de 0.3 mM y 80 µL de lactato sódico para alcanzar una concentración de 10.8 mM; además de 0.1 g de BSA.

2. MEM 2: a la combinación de MEM con HEPES tan solo se añadió 0.1 g de BSA.

3. MEM CONTROL: la combinación de MEM con HEPES se suplementó con 10% de suero fetal bovino.

Por otro lado, en lo que respecta al cultivo de las células oviductales se utilizó un medio de proliferación Ham's F12 + MEM con HEPES (15 mM) suplementado con:

- 10 µg/mL de insulina
- 5 µg/mL de transferrina
- 10 pg/mL de estradiol
- 1 ng/mL de progesterona

Así como antimicóticos y antibióticos que contenían 10.000 u.i. de Penicilina, 10 mg de Streptomycin y 25 µg de Anfotericina por mililitro (Antibiotic Antimycotic Solution (100X); Sigma-Aldrich; St. Louis; USA).

Tabla 1. Composición del medio simple esencial (MEM) utilizado como medio base en los cultivos.

SALES INORGÁNICAS (g/L)		AMINOÁCIDOS (g/L)	
CaCl ₂ · H ₂ O	0,2	L-Alanina	0,0089
MgSO ₄ (anhídrico)	0,09767	L-Arginina · HCl	0,126
KCl	0,4	L-Asparagina · H ₂ O	0,015
NaCl	6,8	L-Ácido aspártico	0,0133
NaH ₂ PO ₄ (anhídrico)	0,122	L-Cisteína · 2 HCl	0,0313
VITAMINAS (g/L)		L-Ácido Glutámico	0,0147
Cloruro de clorina	0,001	L-Glutamina	0,292
Ácido fólico	0,001	Glicina	0,0075
myo- Inositol	0,002	L-Histidina · HCl · H ₂ O	0,042
Niacinamida	0,001	L-Isoleucina	0,052
D-Ácido pantoténico · 1/2 Ca	0,001	L-Leucina	0,052
Piridoxal · HCl	0,001	L-Lisina · HCl	0,0725
Riboflavina	0,0001	L-Metionina	0,015
Tiamina · HCl	0,001	L-Fenilalanina	0,032
OTROS (g/L)		L-Prolina	0,0115
Glucosa	1,0	L-Serina	0,0105
Rojo de fenol · Na	0,011	L-Treonina	0,048
AÑADIR		L-Triptófano	0,01
NaHCO ₃	2,2	L-Tirosina · 2 Na · 2 H ₂ O	0,0519
		L-Valina	0,046

3.6. Cultivos

3.6.1 Experimento 1

Para realizar los cultivos de embriones y evaluar qué medio es el óptimo para su desarrollo, se utilizaron placas NUNC distribuidas de la siguiente manera:

- Pocillo 1: Cultivo de los embriones con medio MEM 1 durante 96h.
- Pocillo 2: Cultivo de los embriones con medio MEM 2 durante 96h.
- Pocillo 3: Cultivo de los embriones con medio MEM 1 durante 48h y secuencialmente cultivo con MEM 2 durante 48h.
- Pocillo 4: Cultivo de los embriones con medio MEM + FBS durante 96h.

Destacar que antes de introducir los embriones en los medios de cultivo, las placas con los medios debían estar, al menos, 2 horas antes a las condiciones de cultivo:

- Condición 1: temperatura 37 °C; 7% de CO₂ y humedad a saturación.
- Condición 2: temperatura 38.5 °C; 7% de CO₂ y humedad a saturación.

En cada pocillo de la placa Nunc se incubaron entre 13 y 15 embriones, realizando 3 réplicas completas de los medios de cultivo en 3 sesiones de trabajo diferentes. El total de embriones cultivados en este experimento fue de 410.

3.6.2. Experimento 2

Las ROECs fueron sembradas en los pocillos de una placa NUNC que contenía 500 µL del medio de proliferación y adhesión, en cada pocillo NUNC se introdujeron en torno a 40.000 - 50.000 células por cm²; tras 24 h y comprobada la adhesión y formación de colonias se retiró el sobrenadante y las células no adheridas por aspiración; tras dos lavados se añadieron 500 µL del medio específico para ROECs y tras 24- 48 h si se observaba que más del 70% del fondo de la placa estaba revestido con células epiteliales (de forma cuboide y con movimiento ciliar, ver **Fig. 8**), se eliminaba el medio para células epiteliales y se adicionaba 500 µL del medio de cultivo para embriones MEM 1. En este experimento se incubaron dos placas con medio MEM 1, una revestida con células oviductales y la otra sin revestimiento celular. En ambos casos, las placas permanecieron, al menos 2h, a 38.5°C de temperatura, 7 % de CO₂ y humedad a saturación antes de iniciar el cultivo de los embriones. Estas condiciones se mantuvieron durante las 96h del cultivo de los embriones.

En cada pocillo de la placa Nunc se incubaron entre 13 y 15 embriones, realizando 5 réplicas completas de las condiciones de co-cultivo en 3 sesiones de trabajo diferentes. El total de embriones cultivados en este experimento fue de 148.

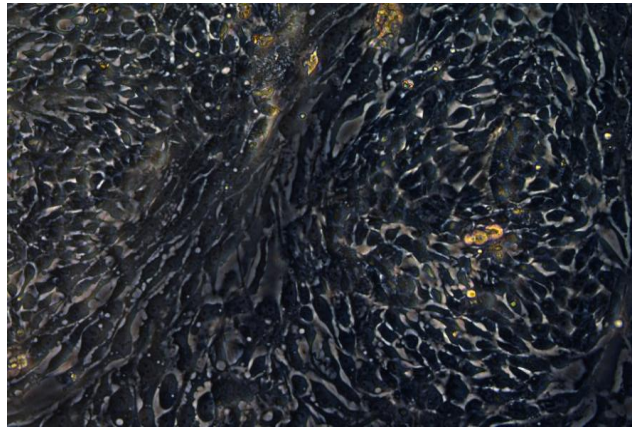


Figura 8. ROECs en medio de proliferación tras 48h de cultivo. Utilizadas en este mismo estudio.

3.7. Valoración de los embriones y procesamiento de la muestra

Tras las 96 h de cultivo se esperaba alcanzar en los embriones un estadio de blastocisto o de mórula compacta; es en este momento cuando se valoró el estado de desarrollo de los mismos y se determinó si habían alcanzado el estadio esperado.

Una vez valorado, se inició el procesamiento de las muestras colocando los embriones de cada una de ellas en 100 μ L de Lysis/Binding Buffer. Se trata de un buffer que procedía del kit Dnyabeads mRNA DIRECT™ que se utilizó posteriormente para la extracción de mRNA. A continuación se introdujeron las muestras en nitrógeno líquido para congelarlas. Tras este paso cabía la posibilidad de almacenar las muestras a -80 °C o realizar el paso de extracción.

3.8. Extracción RNA y obtención del cDNA

El método de extracción se basó en el uso de polímeros magnéticos para la captación del mRNA poliadenilado y su posterior aislamiento, para ello se utilizó el micro kit Dnyabeads mRNA DIRECT™ de Life Technologies.

El funcionamiento del sistema se basa en la hibridación de la cola poliA que poseen los mRNA con la sonda de oligos (dT) complementaria, que se encuentra unida covalentemente a los dnyabeads; por lo tanto otros tipos de RNA no hibridan y son eliminados. Además, estos mismos oligos actúan como cebadores en la reacción de transcripción reversa a cDNA que tiene lugar más adelante.

Siguiendo el protocolo, en primer lugar fue necesario acondicionar las muestras que estaban congeladas a -80 °C en 100 μ L. Para ello tras la descongelación, se procedió a la sonicación de las muestras con un voltaje entre 200 - 240 V utilizando el dispositivo de Hielscher, Ultrasound Technology; con esto se pretendía conseguir una correcta fragmentación y disgregación celular, facilitando por tanto el acceso de las dnyabeads al mRNA cuando se requiriese. Fue

necesario asegurar la correcta limpieza del sonicador tanto antes de empezar el proceso como entre cada muestra, para evitar posibles contaminaciones cruzadas.

El siguiente paso fue el acondicionamiento de los dnyabeads y para ello fue necesario pasar por el vortex el contenido del vial durante 30s aproximadamente; a continuación se preparó en un eppendorf un mix que contenía por muestra: 20 μL de polímeros dnyabeads y 20 μL de Lysis/Binding Buffer. Dicho eppendorf se colocó en un track imantado, de modo que todos los polímeros magnéticos se vieron atraídos; sin retirar el eppendorf del track imantado se eliminó todo el sobrenadante y dejando por tanto solo los dynabeads en el interior. Llegado a este punto se volvieron a añadir 20 μL de Lysis/Binding Buffer por muestra para mezclar el contenido y realizar finalmente alícuotas de 20 μL de mix en cada vial que contenía una muestra distinta.

Con la muestra diluida en Lysis/binding buffer y conteniendo además los dnyabeads, se colocó en un orbital a 200 rpm durante 5 minutos aproximadamente. A continuación se volvieron a colocar los eppendorfs en el track imantado durante 1 minuto para seguidamente retirar el sobrenadante (sin separar el eppendorf del track imantado) y se añadieron 100 μL de Buffer A. Se repitió este paso de reposo en el imán, retirada del sobrenadante y adición de 100 μL de Buffer B; deteniendo el proceso con la última alícuota de 100 μL de Buffer B añadida a la muestra y manteniendo el eppendorf en el track imantado sin retirar el sobrenadante.

Alcanzado este punto finalizada la extracción del mRNA y se inició el protocolo de obtención del cDNA; en este caso se utilizó el kit SuperScript III de Invitrogen. En primer lugar se preparó un mix para la primera PCR (ver **Tabla 2**) en el cual se añadieron cebadores aleatorios para que hibridaran de forma aleatoria, dNTPs que permitieran la síntesis de las nuevas hebras y agua hasta completar la cantidad necesaria. Con el mix ya preparado se eliminó el sobrenadante de las muestras y se resuspendió el pellet de las mismas con 13 μL del mix para PCR preparado. Para la reacción de amplificación se programó el termociclador a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, al finalizar las muestras se conservaron en frío. Entre tanto se elaboró el mix para la RT-PCR (ver **Tabla 3**) que contenía Buffer 5x, DTT (0.1 M), RNasa out y la enzima RT; de este mix se añadieron 7 μL a cada muestra y se realizó un spin en la centrifuga para asegurar que las micro cantidades convergían en el fondo. Finalmente se programó el termociclador para la reacción de transcripción del mRNA a cDNA con distintas etapas: 1. 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min; 2. 55 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 min; 3. 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Al terminar la reacción se conservaron las muestras en nevera a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Tabla 2. Mix PCR (cantidad por muestra)

Random primers (150 ng/ μL)	1 μL
dNTPs (10mM)	1 μL
H ₂ O	11 μL
TOTAL	13 μL

Tabla 3. Mix RT-PCR (cantidad por muestra)

5x buffer	4 μL
DTT (0.1 M)	1 μL
RNaseOUT (40 unidades/ μL)	1 μL
RT	1 μL
TOTAL	7 μL

3.9. Cuantificación de la expresión génica embrionaria: PCR cuantitativa

Partiendo del cDNA de las muestras conservado a 4°C se realizó una PCR cuantitativa. El estudio de expresión se realizó sobre cuatro factores de transcripción: SOX2, OCT4, NANOG y se utilizó GADPH y H2AFZ como genes de referencia. Los cebadores específicos para cada uno de los genes tanto el directo como el reverso se muestran en la **Tabla 4**. Se preparó un mix con 5 µL de cada cebador y 25 µL de SBYR green (Faststart Essential DNA Green Master, Roche) como marcador de fluorescencia para la lectura de la expresión génica.

Tabla 4. Características de los cebadores utilizados en la qPCR.

Gen	Secuencia primers	Nº acceso	Tamaño amplificado	Referencia bibliográfica
H2AFZ	Fw - 5' AGAGCCGGCTGCCAGTTCC	AF030235	85 pb	Mamo et al., 2008
	Rv - 5' CAGTCGCGCCACACGTCC			
GADPH	Fw - 5' GCCGCTTCTTCTCGTGACAG	L23961	144 pb	Navarrete-Santos et al., 2004
	Rv - 5' ATGGATCATTGATGGCGACAACAT			
OCT4	Fw - 5' CGAGTGAGAGGCAACTTGG	NM_001099957	125 PB	Mamo et al., 2008
	Rv - 5' CGGTTACAGAACCACACACG			
SOX 2	Fw - 5' AGCATGATGCAGGAGCAG	NM_003106	270 pb	Wang et al., 2007
	Rv - 5' GGAGTGGGAGGAAGAGGT			
NANOG	Fw - 5' CCAGGTGCCTTTACGACA	ENSOCUT 00000013777	104 pb	Viudes de Castro et al., 2015
	Rv' - TCACTACTCTGGGACTGGGA			

De este mix se añadieron 7 µL por pocillo y posteriormente se adicionaron 3 µL de la muestra, haciendo un total de 10 µL por pocillo. Previamente se diluyó la muestra en agua, 1:20. Para cada gen y placa de qPCR se incluyeron calibradores para asegurar la mínima variabilidad entre placas y por tanto confirmar la reproducibilidad de los datos obtenidos. Para ello se generó un pool de las muestras, que contenía 1 µL de cada muestra, en una dilución 1:20 en agua. En este caso se añadió igualmente 3 µL en cada pocillo y otros 7 µL del mix del gen de referencia; haciendo un total de 10 µL como en el resto de los casos.

Tras completar la placa se cubrió con film y se realizó un spin en la centrifuga; finalmente se colocó en la PCR a tiempo real, LightCycler 96 de Roche Life Science y se programa (ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Programa para la qPCR

	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Preincubación	95	600	1
Amplificación (2 pasos)	95	1	40
	60	30	
Fusión	95	10	1
	65	60	
	97	1	
Enfriamiento	37	30	1

Tras la obtención de los resultados se procedió al análisis de los mismos mediante el software específico del dispositivo. Además, para realizar la cuantificación de los niveles relativos de expresión génica se obtuvo en relación a los cambios en los niveles de expresión de unos genes referencia (GADPH y H2AFZ) utilizando la ecuación descrita en Roche Applied Science, 2001. Technical note No. LC 13. Roche Diagnostics GmbH (ver **Ec. 1**).

$$\text{Ratio } N = E_{f_{\text{target}}}^{(Ct \text{ calibrador} - Ct \text{ muestra})} \cdot E_{f_{\text{Housekeeping}}}^{(Ct \text{ muestra} - Ct \text{ calibrador})}$$

Ecuación 1. Utilizada para la cuantificación de los niveles relativos de expresión génica (N) de los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG, utilizando los factores H2AFZ y GADPH como referencia (Housekeeping). Siendo Ef la eficiencia de los cebadores y Ct el valor obtenido en la qPCR.

3.10. Análisis estadístico

Los análisis se llevaron a cabo utilizando el software estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2002) y se consideraron significativos aquellos resultados con un valor de *p-value* < 0.05 (intervalo de confianza del 95%).

Se utilizó una función probit link en un modelo lineal generalizado para evaluar el efecto del medio, la temperatura y su interacción sobre la variable binaria tasa de blastocistos obtenidas en el experimento 1, y la misma función para analizar el co-cultivo con ROECs sobre la variable binaria tasa de blastocistos obtenidos en el experimento 2.

Para estudiar el efecto de los medios y la temperatura de cultivo en el experimento 1 y del co-cultivo con ROECs sobre la expresión génica se realizó un análisis de la varianza. No obstante, primero se comprobó la normalidad de los datos. En los genes analizados SOX2 y NANOG se obtuvieron datos que presentaban una distribución normal mientras que en el caso del gen OCT4 fue necesaria la normalización de los mismos realizando una transformación angular (Arcotangente).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Experimento 1: Efecto del medio y la temperatura sobre el desarrollo embrionario y la expresión de marcadores génicos de pluripotencialidad

Como puede observarse en la **Fig. 9** el uso del medio MEM suplementado con piruvato y lactato sódico (MEM 1), el sistema secuencial (MEM 1 + MEM 2) y el MEM suplementado con suero fetal durante 96h favorece el desarrollo del embrión desde los estadios de pronúcleos y 2 células al estadio de blastocisto. Estos resultados confirman los resultados obtenidos en embriones de ratón y aplicado en el cultivo de embriones humanos sobre el efecto favorable que la suplementación con piruvato y lactato sódico mimetizando la biodisponibilidad de estos sustratos energéticos en el oviducto en las primeras etapas del desarrollo embrionario y ponen de manifiesto la posibilidad de eliminar la suplementación con suero, cuyo uso es controvertido por su origen y variabilidad (Wolf *et al.* 2003; Camargo *et al.*, 2006; Quinn, 2012; Sfontouris *et al.*, 2016; Li y Winuthayanon, 2017). Sin embargo, el medio simple esencial (MEM 2) que carece de suplementación y que por tanto el sustrato energético fundamental durante el periodo de cultivo es la glucosa y no dispone de los componentes aportados por el suero fetal como vitaminas o factores de crecimiento, proporcionó una menor tasa de blastocistos al final del cultivo.

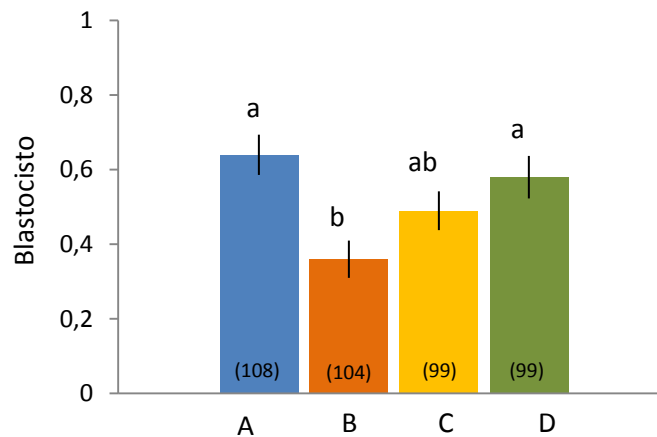


Figura 9. Tasa de blastocistos tras 96h de cultivo en los diferentes medios. Siendo A: MEM 1 (96h); B: MEM 2 (96h); 3: MEM 1 (48h) + MEM 2 (48h); 4: MEM + FBS (96h). Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas (p -value < 0.05). El valor entre paréntesis indica el número de embriones cultivados en cada medio.

Finalmente, se observó que el medio secuencial de MEM 1 + MEM 2 da lugar a una tasa de blastocistos intermedia, similar a la tasa de MEM 1 ó MEM + FBS pero también al medio MEM2. Este resultado podría indicar que el cambio de medio MEM1 a MEM2 no se realizó en el momento adecuado para la cronología y necesidades del embrión de conejo o que fueron eliminados factores autocrinos o paracrinos esenciales producidos por los embriones en el cambio de medio.

De modo que en lo que al medio respecta, el desarrollo embrionario se vio favorecido por el uso de un medio simple esencial suplementado con piruvato y lactato sódico o simplemente un medio simple esencial suplementado con FBS. Es por ello que en la segunda parte del estudio se escogió el MEM 1 como medio óptimo para el desarrollo embrionario y se estudió el efecto del co-cultivo con células oviductales.

La interacción de medio y temperatura no resultó ser estadísticamente significativo en la tasa de desarrollo a blastocisto. Mientras que en cuanto al efecto de la temperatura, se observó tal y como muestra la **Fig. 10 A** que se trata de un factor determinante en el desarrollo embrionario temprano; puesto que se obtuvo una mayor tasa de blastocistos a una temperatura no fisiológica como es 38.5 °C. Algunos autores han fijado la temperatura del oviducto de conejo en torno a 36-37°C (Grinsted *et al.*, 1980; Bahat *et al.*, 2005). Son, además, conocidos los efectos adversos que la temperatura ejerce sobre el desarrollo embrionario, incrementando el nivel de apoptosis celular y reduciendo el número de células por blastocisto cuándo los embriones son cultivados a temperaturas que pueden ser consideradas como generadoras de estrés ambiental (38.5 a 39 °C) (Makarevich *et al.*, 2007; Olexikova *et al.*, 2007). Estos resultados ponen de manifiesto las diferencias no solo entre especies (embriones de ratón, rata y humanos son habitualmente cultivados a 37°C, Ouhibi *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 2014; Wale y Gardner, 2015; Fawzy *et al.*, 2018) sino como las condiciones de cultivo (medio y ambiente) pueden diferir a la hora de favorecer el desarrollo de los embriones y probablemente introducir alteraciones en el mismo. Cabe reseñar que a diferencia de las condiciones fisiológicas y de las de otras especies *in vitro*, el cultivo se realizó con un nivel oxígeno ambiental y un nivel de CO2 similar al del oviducto de conejo.

Tal y como se puede observar en la **Fig. 10 B** los embriones cultivados en la condición C, es decir, a 38.5 °C presentan un buen desarrollo durante todas las etapas del cultivo; alcanzando un estadio de blastocisto avanzado, ya que pudo observarse el fenómeno de “hatching” (**Fig. 10 B4**). Consiste en el inicio de la transformación de la zona pelúcida previa a los procesos que desencadenan la elongación del blastocisto (Sathananthan *et al.*, 2003).

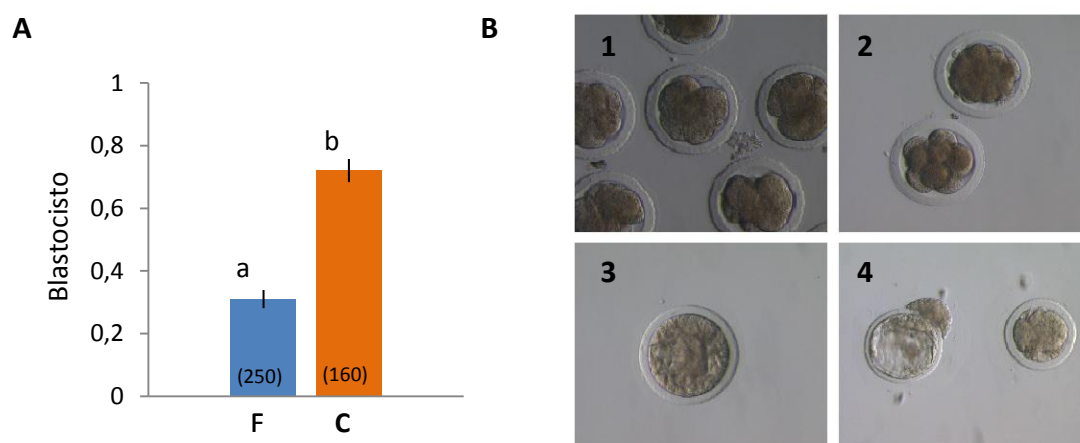


Figura 10. A: Tasa de blastocistos tras 96h de cultivo a 37 °C (F) y 38.5 °C (C). a y b indica una diferencia estadísticamente significativa (p -value < 0.05). El valor entre paréntesis indica el número de embriones

cultivados en cada condición. **B: Embriones en cultivo a 38.5°C.** Siendo **1:** 24h; **2:** 48h; **3:** 72h; **4:** 96h, izq.: blastocisto en “hatching” y dcha.: mórula compacta.

Tal y como se puede observar en la **Fig. 10 B** los embriones cultivados en la condición C, es decir, a 38.5 °C presentan un buen desarrollo durante todas las etapas del cultivo; alcanzando un estadio de blastocisto avanzado, ya que pudo observarse el fenómeno de hatching (**Fig. 10 B4**). Consiste en el inicio de la transformación de la zona pelúcida previa a los procesos que desencadenan la elongación del blastocisto (Sathananthan *et al.*, 2003).

A partir de los embriones obtenidos al final del cultivo,, se realizó un análisis de la expresión génica embrionaria. Con ello se pretendía determinar si el efecto del medio o temperatura suponía un cambio significativo en la calidad de los embriones obtenidos. Para el análisis se escogieron tres factores de transcripción (OCT4, NANOG, SOX2) que son marcadores característicos de la capacidad de pluripotencialidad de las células troncales embrionarias (Wang *et al.*, 2012).

En referencia al efecto del medio en la expresión génica embrionaria, tal y como representa la **Fig. 11** no se observan diferencias estadísticamente significativas, por lo que el patrón de expresión no sufre modificaciones en los distintos medios. De modo que se deduce que los medios descritos en el estudio no presentan diferencias en cuanto al potencial para obtener blastocistos de calidad aunque si en la proporción que alcanzan este estadio.

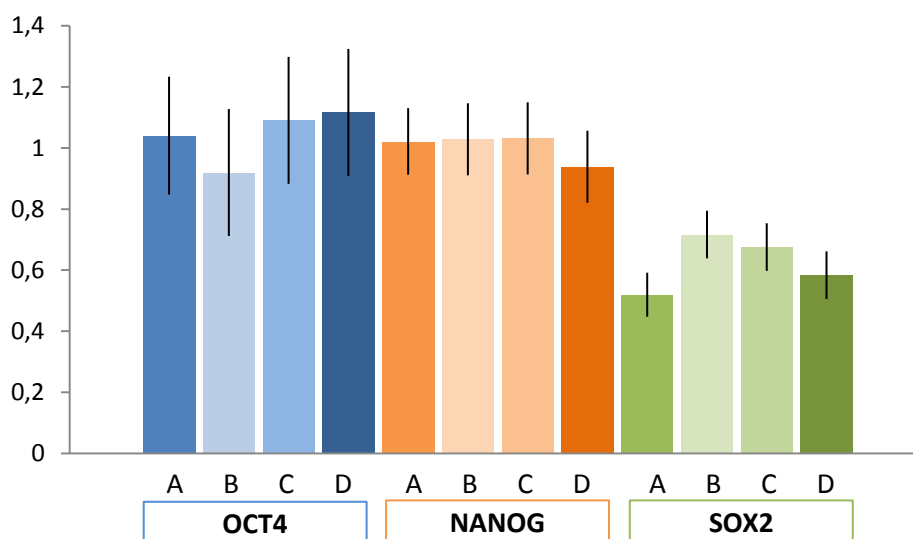


Figura 11. Expresión génica embrionaria de los genes OCT4, NANOG, SOX2 tras 96h en cultivo en diferentes medios. Siendo A: MEM 1 (96h); B: MEM 2 (96h); C: MEM 1 (48h) + MEM 2 (48h); D: MEM + FBS (CONTROL).

Otro factor a tener en cuenta, es la presencia de suero que podría alterar la detección de problemas en el desarrollo normal del cultivo, además se ha visto que los medios que no contienen suero presentan una menor variación en la expresión génica respecto de los que sí que se encuentran suplementados; lo que sugiere que la presencia del suero promueve la heterogeneidad en los cultivos (Gandhi *et al.*, 2000; Camargo *et al.*, 2006; Guoji *et al.*, 2015). En este caso, la ausencia de suero (medios A, B y C) o presencia (medio D) no supone un hecho relevante en la obtención de los resultados ya que el patrón de expresión génica es similar.

Es notable comentar que uso de un sistema de cultivo simple o secuencial en este caso no parece presentar diferencias significativas en cuanto a la calidad de los blastocistos. A pesar de que utilizando un método secuencial se consigue aportar los componentes necesarios para cada estadio del desarrollo (Sfontouris *et al.*, 2016); mientras que en el cultivo simple se aboga por evitar situaciones de estrés que puedan alterar el crecimiento como es el cambio de los componentes del medio (Matchinger y Racowsky, 2012). Tal y como Mantikou y colaboradores (2013) demostró, ninguno de los dos métodos de cultivo presenta una eficacia superior en cuanto a la calidad embrionaria.

Por lo respecta al efecto de la temperatura, tal y como se aprecia en la **Fig. 12** presenta diferencias tanto entre las dos condiciones como entre los genes. En primer lugar, el factor OCT4 presenta una media estadísticamente significativa entre ambas condiciones térmicas, obteniendo una mayor expresión para 37 °C.

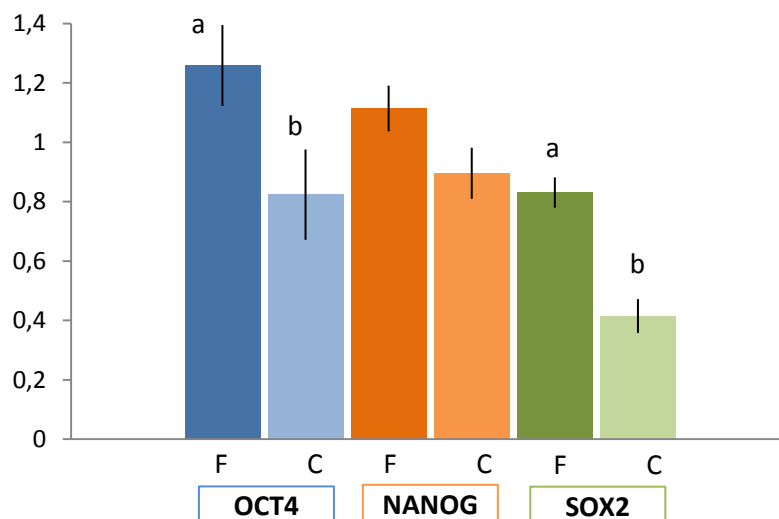


Figura 12. Expresión génica embrionaria de los genes OCT4, NANOG, SOX2 tras 96h en cultivo a 37°C (F) y 38.5 °C (C). Columnas con diferente letra indican diferencias estadísticamente significativas (p -value < 0.05).

La misma situación se ha dado en el caso de SOX2, alcanzando una mayor expresión a 37 °C; mientras que para NANOG no se dan diferencias significativas en la expresión entre ambas condiciones. Resultados similares fueron obtenidos por Thomson y colaboradores (2011), en los que se determinó que la relación inversa de estos dos factores en cuanto a su regulación. En aquellas células con predisposición a la formación del mesodermo y en aquellas con una represión al desarrollo del ectodermo neural, el factor OCT4 está sobreexpresado; mientras que en el SOX2 sucede a la inversa, se encuentra sobreexpresado en aquellas células con predisposición a formar el ectodermo neural y en aquellas células con represión al desarrollo del mesodermo. Por lo que se podría decir que estos factores actúan como marcadores celulares continuos sobre la futura especificación en las capas germinales. Aplicado a este estudio, se podría lanzar la hipótesis sobre el posible efecto de la temperatura en la regulación del equilibrio OCT4/SOX2 (ver Fig. 13), siendo por tanto la temperatura de 37 °C un agente ventajoso para la formación del mesodermo en células con sobreexpresión de OCT4 y la formación del ectodermo neural en las células con sobreexpresión de SOX2.

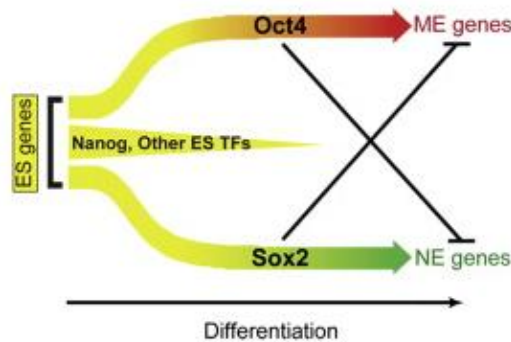


Figura 13. Diagrama de la regulación OCT4/SOX2 en la expresión génica embrionaria
(Thomson et al., 2011)

Otra hipótesis que puede tener relación con las diferencias significativas en la expresión de SOX2 estaría asociada a las especies reactivas de oxígeno (ROS). Se conoce que en los blastocistos de conejo, entre los 4 y 5 días de desarrollo, se generan elevadas cantidades de ROS, más específicamente de O_2^- y H_2O_2 . Estas especies reactivas de oxígeno, inducen a su vez la peroxidación lipídica que tienen un efecto directo en la regulación de las divisiones celulares y transporte de metabolitos entre otros (Guérin et al., 2001). Puesto que SOX es una enzima peroxidasa, se plantea que la variación de ROS generada por el propio embrión, regule la expresión los factores de transcripción de SOX y por ende de SOX2 (Rizos et al., 2002). En conclusión, se podría pensar que la temperatura de 37 °C favorece la formación de ROS por parte del embrión, como elemento natural de la actividad metabólica del mismo, y por consiguiente aumentar la expresión de SOX2.

En general, los marcadores de pluripotencia alcanzan su máxima expresión durante los primeros días tras la fertilización, abarcando también algunos ciclos celulares. Sin embargo se reducen significativamente al alcanzar el estadio de blastocisto, momento en el que las células se diferencian en trofoectodermo y células de la masa celular interna. Se conoce que el

genoma embrionario está transcripcionalmente silenciado y es por tanto el patrón de expresión génica materno el que regula los primeros eventos del desarrollo embrionario; esto cambia tras sucesivas divisiones del embrión, momento en el cual se vuelve transcripcionalmente activo y es el propio genoma el que controla los eventos de diferenciación y maduración (Latham, 1999; Niwa, 2007; Léandri *et al.*, 2009). En humanos la activación del genoma embrionario sucede al tercer día tras la fertilización; mientras que en cada modelo animal hay diversidad en cuanto al estadio de desarrollo embrionario en el que tiene lugar. En el caso del conejo ocurre de un forma muy progresiva y adquiere especial importancia para promover el desarrollo del embrión a partir del estadio de 8 a 16 células (Lane y Gardner, 2001; Léandri *et al.*, 2009). De modo que los resultados obtenidos en este estudio podrían estar relacionados con una mayor expresión de marcadores de pluripotencialidad en las primeras etapas del desarrollo y en embriones de menor desarrollo, lo que se relaciona con una temperatura de 37°C que ha resultado ser menos favorable en la tasa de obtención de blastocistos. Por otro lado, menores niveles de expresión asociados a un mayor desarrollo embrionario y por tanto a blastocistos de mayor calidad se corresponderían a una temperatura no fisiológica de 38.5 °C.

4.2. Experimento 2: Efecto del co-cultivo con células epiteliales sobre el desarrollo embrionario y la expresión de marcadores génicos de pluripotencialidad

Según los resultados obtenidos en el experimento 1, las condiciones óptimas para el desarrollo embrionario temprano son el medio MEM 1, es decir, un sistema de cultivo simple con medio esencial suplementado con piruvato y lactato sódico durante 96h; y una temperatura de 38.5°C. Con esta premisa se realizan los co-cultivos de células epiteliales de oviducto cunícula con los embriones para estudiar el posible efecto del soporte bioactivo en el desarrollo embrionario. Tal y como se puede observar en la **Fig. 14 A** la tasa de blastocistos presenta una diferencia estadísticamente significativa teniendo la presencia de células oviductales en co-cultivo un efecto favorable para el desarrollo embrionario. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por (Joo *et al.*, 2001; Kattal *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017), y son debidas a las secreciones de las células oviductales y a su participación activa en el transporte de componentes favorecen el desarrollo embrionario (Palma-Vera *et al.*, 2014; Avilés *et al.*, 2015; Aldarmahi, 2017; Le Saint *et al.*, 2019).

En este estudio se ha utilizado un cultivo primario de células oviductales durante un breve periodo de cultivo que garantizaba la presencia de movimiento ciliar durante el período de cultivo aunque no se evaluó la presencia de marcadores típicos de su actividad como puede ser la oviductina. No obstante, el efecto favorable observado podría indicar que mantuvieron sus características durante este breve cultivo (ver **Fig 14 B**).

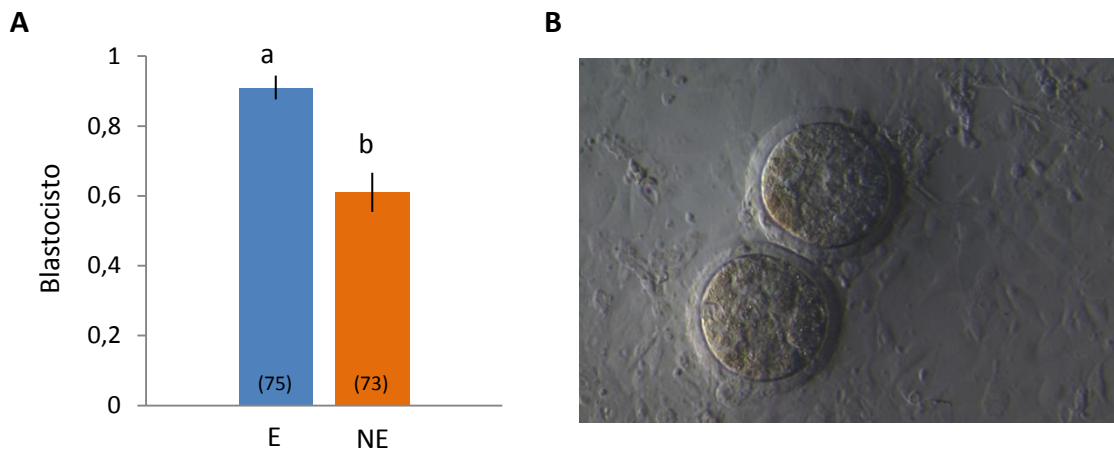


Figura 14. A: Tasa de blastocistos tras 96h de cultivo en medio MEM 1 y 38.5°C con cultivo o no de células oviductales adheridas. Siendo E: presencia de células oviductales en co-cultivo y NE: no hay presencia de células oviductales en co-cultivo. [a y b indica una diferencia estadísticamente significativa (p -value < 0.05). El valor entre paréntesis indica el número de embriones cultivados en cada condición. B: Embriones a las 48h en co-cultivo con monocapa de células oviductales adheridas.

Esto podría tener relación con los resultados obtenidos por Chen y colaboradores (2013), donde se realizó un estudio utilizando POECs con un tratamiento de progesterona y estradiol para simular las diferentes fases del ciclo estral y comprobar la eficacia de las células epiteliales en cada una de estas fases. Se comprobó que en la fase que simulaba al diestro, con niveles de progesterona más elevados y un nivel basal de estradiol, aumentaba de forma significativa el número de células secretoras epiteliales. En este estudio las ROECs han tenido un medio suplementado con 10 pg/mL de estradiol y 1 ng/mL de progesterona, lo que equivaldría a una simulación del diestro y por tanto una mayor cantidad de células secretoras totalmente funcionales que hayan favorecido tanto el desarrollo embrionario como el mantenimiento de las mismas.

Por último comentar el efecto del co-cultivo con las células epiteliales adheridas en monocapa con la calidad de los blastocistos generados. Según las relaciones descritas en la **Fig. 15 A** no existe ninguna diferencia significativa al realizar el análisis estadístico, en cuanto a la expresión de los factores transcripcionales se refiere, y en correlación al uso de células epiteliales en co-cultivo los embriones obtenidos tienen patrones de expresión similares.

En un co-cultivo intervienen muchos parámetros que comprometen la eficiencia del mismo y por ende, la calidad de los blastocistos generados; tales como el medio, el tipo celular, factores físicos como la temperatura o el tiempo de cultivo y químicos como la cantidad de oxígeno o suplementación del medio con suero u otros componentes (Orsi y Reischl, 2007; Chen *et al.*, 2013). De modo que es difícil determinar cuál ha sido el factor causante de la equiparidad de los resultados entre un co-cultivo (ver **Fig. 15 B**) que aporta grandes ventajas al desarrollo, como el mantenimiento de la función secretora de las células y con lo cual favorece el desarrollo embrionario (Vithoukias *et al.*, 2017); y un sistema simple que evita posibles

situaciones de estrés asociadas a los cambios en los componentes del medio y que tienen una repercusión negativa en los embriones (Matchinger y Racowsky, 2012) puesto que no hay modificaciones en el patrón de expresión.

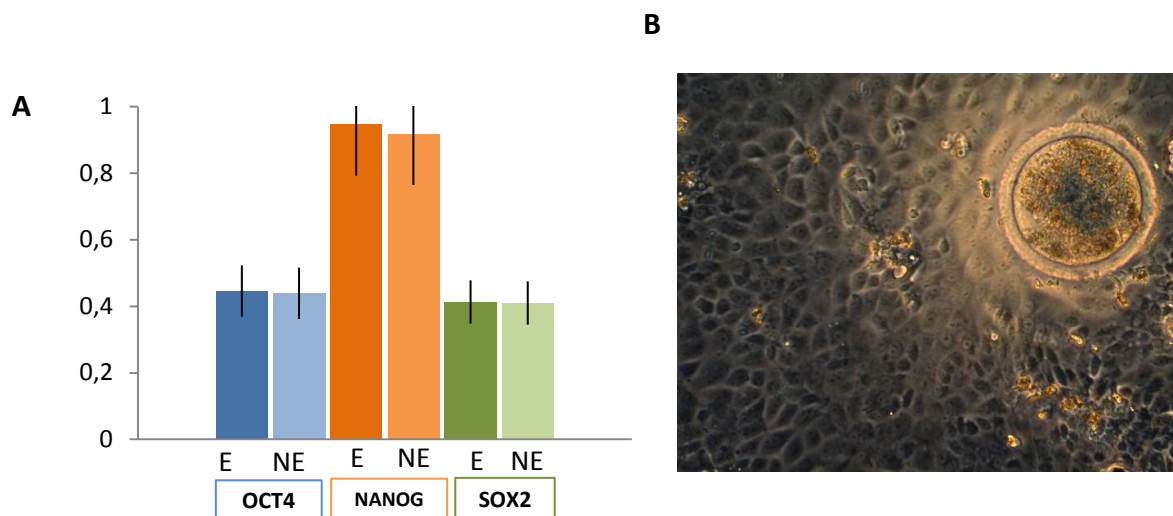


Figura 15. A: Expresión génica embrionaria de los factores OCT4, NANOG, SOX2 tras 96h en cultivo en MEM 1 a 38.5 °C con cultivo o no de células oviductales adheridas (ROECs). Siendo E: presencia de epiteliales; NE: no hay presencia de células epiteliales. **B:** imagen microscópica del co-cultivo de ROECs con embriones.

En el transcurso del embrión por el oviducto se activa la expresión génica en ciertas regiones del genoma, produciéndose así una auto-regulación del microambiente. Esta gran influencia del entorno en el embrión, origina una elevada sensibilidad de los embriones a situaciones de estrés o alteraciones externas (Ulbrich *et al.*, 2010; Almiñana *et al.*, 2015; Maillo *et al.*, 2016). En conjunto el concepto de mimetización en el cultivo, para alcanzar unas condiciones comparables al ambiente natural, no ha resultado ser el factor determinante para obtener una mayor calidad en los embriones generados; pero sí lograr una mayor tasa de formación de blastocistos gracias a la presencia del co-cultivo con células epiteliales adheridas. Asimismo como determinaron Kattal y colaboradores (2012), el co-cultivo de embriones con células oviductales ha probado tener un mayor potencial de formación de blastocistos en comparación a sistemas tradicionales.

5. CONCLUSIÓN

Tras el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que:

- La temperatura es un factor determinante en el desarrollo embrionario temprano de conejo, siendo a 38.5 °C la condición más favorable. La menor tasa de expresión de los factores de pluripotencialidad (OCT4, NANOG y SOX2) a esta temperatura se asocia a una mayor tasa de desarrollo embrionario y, por tanto, a una mayor calidad de los blastocistos obtenidos.
- El medio MEM suplementado con piruvato y lactato sódico favorece la tasa de formación de blastocistos desde el estadio de pronúcleos y 2 células; lo que permite eliminar el suero (FBS) como suplemento del medio de cultivo.
- El co-cultivo con células oviductales adheridas mejora la tasa de blastocistos desarrollados sin modificar el patrón de expresión de los genes OCT4, NANOG y SOX2.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adissu, H.A.; Asem, E.K. y Lelievre, S.A. (2007). Three-dimensional cell culture to model epithelia in the female reproductive system. *Reproductive Sciences*, 14(8): 11–19.

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

Almiñana, C.; Heath, P.R.; Wilkinson, S.; Sanchez-Osorio, J.; Cuello, C.; Parrilla, I., Gil, M.A.; Vázquez, J.L.; Vázquez, J.M.; Roca, J.; Martinez, E.A. y Fazeli, A. (2012). Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract. *PloS one*, 7(3): e33625.

Avilés, M.; Coy, P. y Rizos D. (2015). The oviduct: a key organ for the success of early reproductive events. *Animal Frontiers*, 5 (1): 25-31.

Bahat, A.; Eisenbach, M. y Tur-Kaspa, I. (2005). Periovulatory increase in temperature difference within the rabbit oviduct. *Human Reproduction*, 20(8): 2118-2121.

Biggers, J. y Summers, M. (2008). Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertility and Sterility*, 90(3): 473-483.

Bochev, I.; Belemezova, K.; Shterev, A. y Kyurkchiev, S. (2016). Effect of cryopreservation on the properties of human endometrial stromal cells used in embryo co-culture systems. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(4): 473-480.

Brüssow, K.P.; Rátky, J. y Rodriguez-Martinez, H. (2008). Fertilization and Early Embryonic Development in the Porcine Fallopian Tube. *Reproduction in domestic animals*, 43(2): 245-251.

Camargo, L.S.A.; Viana, J.H.M.; Sá, W.F.; Ferreira, A.M.; Ramos, A.A y Vale Filho, V.R. (2006). Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction*, 3(1): 19-28.

Carney, E.W.; Tobback, C. y Foote, R.H. (1990). Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In vitro Cellular y Developmental Biology*, 26(6): 629-635.

Carretero, A.; Ruberte, J. y Navarro, M. (2017). Female genital organs, in: *Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging*. Ed. Academic Press.

Chen, S.; Einspanier, R. y Schoen, J. (2013). *In vitro* mimicking of estrous cycle stages in porcine oviduct epithelium cells: estradiol and progesterone regulate differentiation, gene expression, and cellular function. *Biology of reproduction*, 89(3): 54.

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

- Chen, S.; Einspanier, R. y Schoen, J. (2013). Long-term culture of primary porcine oviduct epithelial cells: Validation of a comprehensive *in vitro* model for reproductive science. *Theriogenology*, 80(8): 862-869.
- Cheng, H.; Dooley, M. P.; Hopkins, S. M.; Anderson, L. L.; Yibchok-Anun, S. y Hsu, W. H. (1999). Development of rabbit embryos during a 96-h period of *in vitro* culture after superovulatory treatment under conditions of elevated ambient temperature. *Animal Reproduction Science*, 56(3-4): 279-290.
- Coy, P.; Avilés, M. y Latorre, R. (2018). Female Reproduction, in: *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd Ed. Academic Press. 276-281.
- Fawzy, M.; Emad, M.; Gad, M.G.; Sabry, M.; Kasem, H.; Mahmoud, M. y Bedaiwy, M.A. (2018). Comparing 36.5 °C with 37 °C for human embryo culture: a prospective randomized controlled trial. *Reproductive BioMedicine Online*, 36(6): 620-626.
- Fernández-González, R.; Moreira, P.; Bilbao, A.; Jiménez, A.; Pérez-Crespo, M.; Ramírez, M.A.; Rodríguez, F.; Pintado, B. y Gutiérrez-Adán, A. (2004). Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16): 5880-5885.
- Fleming, T.P.; Kwong, W.Y.; Porter, R.; Ursell, E.; Fesenko, I.; Wilkins, A.; Miller, D.J.; Watkins, A.J. y Eckert, J.J. (2004). The embryo and Its future. *Biology of Reproduction*, 71(4): 1046-1054.
- Gandhi, A.P.; Lane, M.; Gardner, D.K. y Krisher, R.L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reproduction*, 15(2): 395-401.
- Gardner, D.K. (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1): 9-18.
- Gardner, D.K. (2016). The impact of physiological oxygen during culture, and vitrification for cryopreservation on the outcome of extended culture in human IVF. *Reproductive BioMedicine Online*, 32(2): 137-141.
- Gardner, D.K. y Lane, M. (1997). Culture and selection of viable human blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Human Reproduction Update*, 3: 367-82.
- Gardner, D.K. y Lane, M. (2002). Development of viable mammalian embryos *in vitro*: evolution of sequential media, in: *Principles of cloning*. Academic Press, New York, 187-213.
- Gifford, C.A.; Ziller, M.J.; Gu, H.; Trapnell, C.; Donaghey, J.; Tsankov, A.; Shalek, A.K.; Kelley, D.R.; Shishkin, A.A.; Issner, R.; Zhang, X.; Coyne, M.; Fostel, J.L.; Holmes, L.; Meldrim, J.; Guttman, M.; Epstein, C.; Park, H.; Kohlbacher, O.; Rinn, J.; Gnirke, A.; Lander, E.S.; Bernstein, B.E. y Meissner, A. (2013). Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell*, 153(5): 1149-1163.

- Gómez, E. y Diez, C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 58(1-2): 23-37.
- Grinsted, J.; Blendstrup, K.; Andreasen, M.P. y Byskoy, A.G. (1980). Temperature measurements of rabbit antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60: 149-155.
- Gualtieri, R.; Mollo, V.; Braun, S.; Barbato, V., Fiorentino, I. y Talevi, R. (2012). Long-term viability and differentiation of bovine oviductal monolayers: Bidimensional versus three-dimensional culture. *Theriogenology*, 78 (7): 1456-1464.
- Guérin, P.; El Mouatassim, S. y Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against species in the pre-implantation embryo surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2): 175-189.
- Guoji, G.; Pinello, L.; Han, X.; Lai, S., Shen, L.; Lin, T.-W.; Zou, K.; Yuan, G-C. y Orkin, S.H. (2015). Serum-based culture conditions provoke gene expression variability in mouse embryonic stem cells as revealed by single-cell analysis. *Cell reports*, 14(4): 956-965.
- Hwang, T.-S. y 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.
- Hong, K.H.; Lee, H.; Forman, E.J.; Upham, K.M. y Scott, R.T. (2014). Examining the temperature of embryo culture in *in vitro* fertilization: a randomized controlled trial comparing traditional core temperature (37°C) to a more physiologic, cooler temperature (36°C). *Fertility and Sterility*, 102(3): 767-773.
- Hunter, R.H.F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological reviews*, 87(1): 244-255.
- Jingu, N.; Minghui, Z.; Seunghoon, L.; Sun, A.O.; Yoonseok, N. y Tai-Young, H. (2018). Enhanced *in vitro* maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology*, 105(1): 66-74.
- Joo B.S.; Kim M.K.; Na Y.J.; Moon H.S.; Lee K.S. y Kim H.D.K. (2001). The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertility and Sterility*, 75(1): 193-199.
- Kattal, N.; Cohen, J. y Barmat, L.I. (2008). Role of co-culture in human *in vitro* fertilization: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 90(4): 1069-1076.
- Kieslinger, D.C.; Hao, Z.; Vergouw, C.G.; Kosteljik, E.H.; Lambalk, C.B. y Le Gac, S. (2015). *In vitro* development of donated frozen-thawed human embryos in a prototype static microfluidic device: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 103(3): 680-686.
- Lane, M. y Gardner, D.K. (2001). Blastomere homeostasis. In: *ART and the human blastocyst*. Springer-Verlag, New York, NY.
- Latham, K.E. (1999). Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *International review of cytology*, 193: 71-124.

Le Gac, S. y Nordhoff, V. (2017). Microfluidics for mammalian embryo culture and selection: where do we stand now? *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 23(4): 213-226.

Le Saint, C.; Crespo, K.; Bourdieu, A.; Bissonnette, F.; Buzaglo, K.; Couturier, B.; Bisotto, S.; Phillips, S.J.; Stutz, M.; Gouze, J.-N.; Sampalis, J.S.; Hamamah, S. y Kadoch, I.J. (2019). Autologous endometrial cell co-culture improves human embryo development to high-quality blastocysts: a randomized controlled trial. *Reproductive BioMedicine Online*, 38(3): 312-329.

Léandri, R.D.; Archilla, C; Bui, L.C; Peynot, N.; Liu, Z.; Cabau, C.; Chastellier, A.; Renard, J.P. y Duranthon, V. (2009). Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiological Genomes*, 36(2): 98-113.

Lee, K.-F.; Yao, Y.-Q.; Kwok, A.-L.; Xu, J.-S. y Yeung, S.B. (2002). Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2): 564-570.

Li, C.; Zhang, H.-Y.; Liang, Y.; Xia, W.; Zhu, Q.; Zhang, D.; Huang, Z.; Liang, G.-L.; Xue, R.-H.; Qi, H.; He, X.-Q.; Xue, R.-H.; Qi, H.; He, X.-Q.; Yuan, J.-J.; Tan, Y.-J.; Huang, H.-F. y Zhang, J. (2018). Effects of levonorgestrel and progesterone on oviductal physiology in mammals. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16: 59.

Li, R.; Whitworth, K.; Lai, L.; Wax, D.; Spate, L.; Murphy, C.N.; Rieke, A.; Isom, C.; Hao, Z.; Katayama, M.; Schatten, H. y Prather, R.S. (2007). Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular reproduction and development*, 74(9): 1228-1235.

Li, S. y Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Journal of Endocrinology*, 232(1): R1-R26.

Lim, J.M.; Okitsu, O.; Okuda, K. y Niwa, K. (1994). Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41(5):1091-1098.

Ma, R.; Xie, L.; Han, C.; Su, K.; Qiu, T.; Wang, L.; Huang, G.; Xing, W.; Qiao, J.; Wang, J. y Cheng, J. (2011). *In vitro* fertilization on a single-oocyte positioning system integrated with motile sperm selection and early embryo development. *Analytical Chemistry*, 83(3): 2964-2970.

Machtinger R. y Racowsky C. (2012). Culture Systems: Single Step. In: *Embryo Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 912. Humana Press, Totowa, NJ.

Maillo, V.; Lopera-Vasquez, R. y Hamdi M. (2016). Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence form *in vivo* and *in vitro* studies. *Theriogenology*, 86(1): 443-450.

Makarevich, A.V.; Olexiková, L.; Chrenek, P.; Kubovicová, E.; Fréharová, K. y Pivko, J. (2007). The effect of hyperthermia *in vitro* on vitality of rabbit preimplantation embryos. *Physiological Research*, 56: 789-796.

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

Mantikou, E.; Youssef, M.A.F.M.; Van Wely, M.; Van der Veen, F.; Al-Inany, H.G; Repping, S. y Mastenbroek, S. (2013). Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 19(3): 210-220.

Marco, F.; Vicente, J.S.; Lavara, R.; Balasch S. y Viudes de Castro, M.P. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5): 118-123.

Ménézo, Y.; Guérin, P. y Elder, K. (2015). The oviduct: a neglected organ due for re-assessment in IVF. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(3): 233-240.

Meseguer, M. y Pellicer, A. (2017). The most well kept secret, embryo culture media : a smart reveal from an expert. *Fertility and Sterility*, 107(4): 910.

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

Navarrete-Santos, A.; Tonak, S.; Kirstein, M.; Kietz, S. y Fischer, B. (2004). Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit pre-implantation embryos. *Reproduction Research*, 128(5): 503-515.

Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134: 635-646.

Olexikova, L.; Makarevic, A.V.; Chrenek, P.; Kunovicova, E. y Pivko, J. (2007). Development of rabbit pre-implantation embryos under thermal stress *in vitro*. *Animal Science*, 40(2): 63-65.

Orsi, N.M. y Reischl, J.B. (2007). Mammalian embryo co-culture: 'Trials and tribulations of misunderstood method. *Theriogenology*, 67(3): 441-458.

Ouhibi, N.; Menezes, Y.; Benet, G. y Nicollet, B. (1989). Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Human Reproduction*, 4(3): 229-235.

Ouhibi, N.; Warren, J.; English, J. y Sullivan, N. (1994). A culture system for the development of the preimplantation rat embryo. *Theriogenology*, 41(2): 535-551.

Palma-Vera, S.; Einspanier, R. y Schoen, J. (2014). Bovine oviductal epithelial cells: Long term culture characterization and impact of insulin on cell morphology. *Reproductive Biology*, 14(3): 206-212.

Pampaloni, F.; Reynaud, E.G. y Stelzer, E.H.K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10): 839-845.

Pinyopummintr, T. y Bavister B.D. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41(6), 1241-1249.

Quinn, P. (2012). Culture Systems: Sequential. In: *Embryo Culture: Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 912. Humana Press, Totowa, NJ.

Ratajczak, M.Z.; Liu, R.; Ratajczak, J.; Kucia, M. y 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.

Rizos, D.; Lonergan, P.; Boland, M.P.; Arroyo-Garcia, R.; Pintado, B.; de la Fuente, J. y Gutierrez-Adan, A. (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction*, 66(3): 589-595.

Rottmayer, R.; Ulbrich, S.E.; Kölle, S.; Prella, K.; Neumueller, C.; Sinowatz, F.; Meyer, H.H. y Hiendleder, S. (2006). A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*, 132(4); 637-648.

Sathanathan, H.; Menezes, J. y Gunasheela, S. (2003). Mechanics of human blastocyst hatching *in vitro*. *Reproductive Biomedicine*, 7(2): 228-234.

Sepulveda, S.; Garcia, J.; Arriaga, E.; Diaz, J.; Noriega-Portella, L. y Noriega-Hoces, L. (2009). *In vitro* development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertility and Sterility*, 91(5): 1765-1770.

Sfontouris, I.A.; Martins, W.P.; Nastri, C.O.; Viana, I.G.; Navarro, P.A.; Raine-Fenning, N.; Van der Poel, S.; Rienzi, L. y Racowsky, C. (2016). Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Assisted. Reproduction and Genetics*, 33(10): 1261-1272.

Simopoulou, M.; Sfankianoudis, K.; Antoniou, N.; Maziotis, E.; Rapani, A.; Bakas, P.; Anifandis, G.; Kalampokas, T.; Bolaris, S.; Pantou, A.; Pantos, K. y Koutsiliers, M. (2018). Making IVF more effective through the evolution of prediction models: is prognosis the missing piece of the puzzle? *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(5): 305-323.

Snegovskikh, V.; Mutlu, L.; Massasa, E. y Taylor, H.S. (2014). Identification of Putative Fallopian Tube Stem Cells. *Reproductive Sciences*, 21(12): 1460-1464.

Spielmann, H. (2009). The way forward in reproductive/developmental toxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 37(6): 641-656.

Swain, J.E. (2010). Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(1): 6-16.

Swain, J.E. y Pool, T.B. (2008). Microfluidics in ART: time to go with the flow? *Fertility Magazine*, 9: 15-20.

- Swain, J.E. y Pool, T.B. (2009). New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online*, 18(6): 799-810.
- Swain, J.E.; Carrell, D.; Cobo, A.; Meseguer, M.; Rubio, C. y Smith, G.D. (2016). Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertility and Sterility*, 105(3):571-587.
- Takahashi, Y. y First, N.L. (1992). *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37(5): 963-978.
- Thomson, M.; Liu, S.J.; Zou, L.-N.; Smith, Z.; Meissner, A. y Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, 145(6): 875-889.
- Ulbrich, S.E.; Zitt, K.; Hiendleder, S. y Wolf, E. (2010). *In vitro* systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 73(6): 802-816.
- Vassena, R.; Boue, S.; Gonzalez-Roca, E.; Aran, B.; Auer, H.; Veiga, A. y Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138(17): 3699-3709.
- Vicente, J.S.; Lavara, R.; Marco, F. y Viudes de Castro, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6): 1120-1125.
- Vithoulkas, A.; Levanduski, M.; Goudas, V.T. y Illmensee, K. (2017). Co-culture of human embryos with autologous cumulus cell clusters and its beneficial impact of secreted growth factors on preimplantation development as compared to standard embryo culture in assisted reproductive technologies (ART). *Middle East Fertility Society Journal*, 22(4): 317-322.
- Viudes de Castro, M.P.; Pomares, A.; Saenz de Juano i Ribes, A.; Marco-Jiménez, F. y Vicente, J.S. (2015). Effect of lutrinizing hormone on rabbit ovarian superstimulation and embryo developmental potential. *Theriogenology*, 84(3): 446-451.
- Wale, P.L. y Gardner, D.K. (2016). The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human Reproduction Update*, 22(1): 2-22.
- Wang, S.; Tang, X.; Niu, Y.; Chen, H.; Li, B.; Li, T.; Zhang, X.; Hu, Z.; Zhou, Q. y Ji, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25(2): 481- 489.
- Wang, Z.; Oron, E.; Nelson, B.; Razis, S. y Ivanova, N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10(4): 440-454.
- Wheeler, M.B.; Walters, E.M. y Beebe, D.J. (2007). Toward culture of single gametes: the development of microfluidic platforms for assisted reproduction. *Theriogenology*, 68 suppl 1: S178-189.
- Whitesides, G.M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442: 368-373.

Wolf, E.; Arnold, G.; Bauersachs, S.; Beier, H.; Blum, H.; Einspanier, R.; Fröhlich, T.; Herrler, A.; Hiendleder, S.; Kölle, S.; Prella, K.; Reichenbach, H.; Stojkovic, M.; Wenigerkind, H. y Sinowatz, F. (2003). Embryo-Maternal Communication in Bovine – Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(4): 276-289.

Xiao-Li, Y.; Xiao-E, Z.; Wang, H. y Ma, B.-H. (2015). Expression patterns of OCT4, NANOG, and SOX2 in goat preimplantation embryos from *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(7): 1398-1406.

Xie, W.; Schultz, M.D.; Lister, R.; Hou, Z.; Rajagopal, N.; Ray, P.; Whitaker, J.W.; Tian, S.; Hawkins, R.D.; Leung, D.; Yang, H.; Wang, T.; Lee, A.Y.; Swanson, S.A.; Zhang, J.; Zhu, Y.; Kim, A.; Nery, J.R.; Urich, M.A.; Kuan, S.; Yen, C.-A.; Klugman, S.; Yu, P.; Sukununtha, K.; Propson, N.E.; Chen, H.; Edsall, L.E.; Wagner, U.; Li, Y.; Ye, Z.; Kulkarni, A.; Xuan, Z.; Chung, W.-Y.; Chi, N.C.; Antosiewicz-Bourget, J.E.; Slukvin, I.; Stewart, R.; Zhang, M.Q.; Wang, W.; Thomson, J.A.; Ecker, J.R. y Ren, B. (2013). Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell*, 153(5): 1134-1148.

Young, E. W. y Beebe, D. J. (2010). Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chemical Society reviews*, 39(3): 1036-1048.