



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ciencia Animal

Desarrollo de embriones de conejo sobre matriz oviductal y medio condicionado por células oviductales. Efectos sobre la viabilidad y el crecimiento postnatal.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción

AUTOR/A: Lopez Jiménez, María Isabel

Tutor/a: Vicente Antón, José Salvador

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que han hecho posible este trabajo, por el tiempo, el cariño y el apoyo recibido.

Gracias a Jose, director del trabajo, por el tiempo invertido, por la paciencia, confianza y libertad depositadas y por su dedicación por la enseñanza y la investigación. He aprendido muchísimo.

Gracias a mis compañeros del máster, a mis profesores y a todo el personal del departamento y granja por la compañía y por todo lo que me han enseñado. Ha sido un placer coincidir con todos vosotros.

Gracias a mi hermano y a mis amigos, a los de siempre y a las que han aparecido nuevas durante estos dos años, por estar ahí cuando lo he necesitado. Sé que sin vosotros no estaría donde estoy ahora.

Y gracias a mi madre y a mi padre, por apoyarme incondicionalmente todos y cada uno de los días de mi vida. Y por dejarme elegir la herencia que nunca nadie me va a poder quitar: mi formación.

TÍTULO

Desarrollo de embriones de conejo sobre matriz oviductal y medio condicionado por células oviductales. Efectos sobre la viabilidad y el crecimiento postnatal.

RESUMEN

Los embriones producidos *in vitro* alteran su desarrollo con repercusiones en su fisiología que pueden comprometer su viabilidad inmediata o introducir cambios que serán observables durante su etapa postnatal. Estas alteraciones son el resultado del proceso adaptativo que los embriones desencadenan para hacer frente al ambiente y composición de los medios de cultivo. El objetivo del estudio es evaluar nuevos sistemas de cultivo para embriones de conejo en estadio de 2 células que ayuden a paliar los efectos adversos del cultivo. Para ello se estudió, en un primer experimento, un sistema de co-cultivo basado en la reconstrucción de un epitelio oviductal homólogo sobre dos tipos de hidrogeles (colágeno tipo I y matriz oviductal de 24h) y dos medios de cultivo (medio base que contaba con piruvato y lactato sódico y un segundo medio que fue suplementado adicionalmente con EGF e ITS). En el segundo experimento, se utilizó el medio base condicionado con el cultivo previo de dos tipos de epitelio oviductal que diferían en la edad desde que se indujo la ovulación (48h y 72h). En ambos experimentos los embriones se obtuvieron de conejas donantes 24 horas después de su inseminación (IA) e inducción de la ovulación con acetato de buserelina. Las conejas donantes habían sido tratadas 72h previas a la IA con coriolfolitropina alfa para incrementar su respuesta ovulatoria. Las condiciones y periodo de cultivo fueron iguales en ambos experimentos, 38.0°C, 5% CO₂, humedad a saturación y 72h de cultivo. Al finalizar el cultivo se catalogó el estadio de desarrollo alcanzado por los embriones.

En el primer experimento, los embriones fueron transferidos a conejas receptoras inducidas a ovular 60 horas antes en grupos de entre 15 y 20 embriones en cada hembra. Además, se prepararon dos grupos control de conejas, uno de ellos por IA con el fin de evaluar el impacto del cultivo y transferencia en el crecimiento postnatal y otro con conejas transferidas con embriones en estadio de mórula no cultivados con el fin de observar el efecto del cultivo sobre la supervivencia y el crecimiento postnatal. En el segundo bloque experimental, en el que se estudiaron los medios condicionados con los epitelios oviductales de 48h y 72h, se evaluó además del desarrollo *in vitro*, la expresión

de los genes de pluripotencialidad (OCT4 y SOX2) como parámetros de calidad embrionaria.

El cultivo embrionario en los medios condicionados produjo un retraso en el desarrollo embrionario temprano, así como baja expresión de los genes analizados. Los distintos hidrogeles con el cultivo de ROECs combinados con los medios de cultivo indujeron un retraso en el desarrollo embrionario temprano produciendo una reducción de la tasa de supervivencia fetal, principalmente en los grupos en los que se utilizó medio específico para el cultivo epitelial suplementado con EGF e ITS. Sin embargo, los análisis del desarrollo postnatal mostraron pesos superiores para los grupos en los que se utilizó este medio, mientras que en el resto de los grupos los pesos fueron comparables a los controles. No se observó ninguna alteración en el desarrollo postnatal.

PALABRAS CLAVE

Cultivo embrionario; Desarrollo embrionario; Matriz oviductal; Células oviductales; Hidrogel; Conejo.

TITLE

Development of rabbit embryos on oviductal matrix and oviductal cell-conditioned medium. Effects on viability and postnatal growth.

ABSTRACT

Embryos produced *in vitro* alter their development with repercussions in their physiology that can compromise their immediate viability or introduce changes that will be observable during their postnatal stage. These alterations are the result of the adaptive process that embryos trigger to cope with the environment and composition of the culture media. The aim of the study is to evaluate new culture systems for 2-cell stage rabbit embryos that help to mitigate the adverse effects of culture. For this purpose, in a first experiment, a co-culture system based on the reconstruction of a homologous oviductal epithelium on two types of hydrogels (type I collagen and 24h oviductal matrix) and two culture media (base medium containing pyruvate and sodium lactate and a second medium additionally supplemented with EGF and ITS) was studied. In the second experiment, the base medium was used conditioned with the previous culture of two types of oviductal epithelium that differed in their age since ovulation was induced (48h and 72h). In both experiments embryos were obtained from donor rabbits 24h after insemination (AI) and ovulation induction with buserelin acetate. Donor rabbits had been treated 72h before AI with coriofollitropin alpha to increase their ovulatory response. The conditions and culture period were the same in both experiments, 38.0°C, 5% CO₂, saturation humidity and 72h of culture. At the end of the culture, the stage of development reached by the embryos was catalogued.

In the first experiment, embryos were transferred to recipient rabbits induced to ovulate 60 hours earlier in groups of 15 to 20 embryos in each female. In addition, two control groups of rabbits were prepared, one of them by AI to evaluate the impact of culture and transfer on postnatal growth and the other with transferred rabbits with uncultured morula stage embryos in order to observe the effect of culture on survival and postnatal growth. In the second experiment, in which conditioned media with 48h and 72h oviductal epithelia were studied, the expression of pluripotency genes (OCT4 and

SOX2) was evaluated as parameters of embryo quality in addition to *in vitro* development.

Embryo culture in the conditioned media produced a delay in early embryonic development, as well as low expression of the analysed genes. The different hydrogels with ROECs culture combined with the culture media induced a delay in early embryonic development producing a reduction in the foetal survival rate, mainly in the groups in which specific medium for epithelial culture supplemented with EGF and ITS was used. However, postnatal developmental analyses showed higher weights for the groups in which this medium was used, while in the other groups the weights were comparable to the controls. No alteration in postnatal development was observed.

KEY WORDS

Embryo culture; Embryo development; Oviductal matrix; Oviductal cells; Hydrogel; Rabbit.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Técnicas de Reproducción Asistida.....	1
1.2. Cultivo embrionario.....	3
1.2.1. Oviducto y desarrollo embrionario temprano.....	3
1.2.2. Métodos y medios de cultivo para embriones.....	6
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1. Diseño experimental.....	11
3.2. Animales.....	13
3.3. Producción de embriones.....	13
3.4. Medios de cultivo.....	14
3.5. Preparación de hidrogeles.....	15
3.6. Procesamiento de oviductos y obtención de ROECs.....	15
3.7. Medios de cultivo condicionados.....	17
3.8. Cultivo embrionario.....	17
3.9. Preparación de hembras receptoras y controles.....	17
3.10. Transferencias embrionarias.....	18
3.11. Diagnóstico de la gestación y desarrollo postnatal.....	18
3.12. Cuantificación de la expresión génica embrionaria.....	19
3.13. Análisis proteómico.....	21
3.14. Análisis estadístico.....	22
3.14.1. Análisis desarrollo embrionario.....	23
3.14.2. Análisis supervivencia <i>in vivo</i>	23
3.14.3. Análisis desarrollo postnatal.....	23
3.14.4. Análisis expresión génica.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Efecto del medio de cultivo, tipo de hidrogel y cultivo de ROECs.....	24
4.1.1. Desarrollo <i>in vitro</i>	24
4.1.2. Desarrollo <i>in vivo</i> y crecimiento postnatal.....	30
4.2. Efecto de los medios de cultivo condicionados.....	34
4.2.1. Desarrollo <i>in vitro</i>	34

4.2.2.	Cuantificación de la expresión génica.....	36
4.3.	Análisis proteómico de los hidrogeles.....	37
5.	CONCLUSIONES.....	40
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Imagen de embriones frescos de conejo de dos células (24 horas).

Imagen 2. Imagen del cultivo de ROECs sobre el hidrogel.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del oviducto, sus partes anatómicas y las fases de desarrollo ovocito-embrión (Maillo et al., 2016).

Figura 2. Desarrollo embrionario temprano desde la fecundación hasta el estadio de blastocisto. Imagen diseñada con BioRender.

Figura 3. Representación gráfica del primer bloque experimental. Desarrollo de diferentes medios de cultivo e hidrogeles y cultivo de ROECs y su efecto en embriones de 24 horas tras 72 horas de cultivo, así como en el desarrollo postnatal. Imagen diseñada con BioRender.

Figura 4. Representación gráfica del segundo bloque experimental. Desarrollo de medios de cultivo condicionados con ROECs con una sincronización oviductal de 48h y 72h y su efecto tras 72 horas de cultivo en embriones de 24 horas. Imagen diseñada con BioRender.

Ecuación 1. Cuantificación de los niveles de expresión génica (N) siendo E_f la eficiencia de los cebadores y C_t el valor obtenido en la qPCR.

Figura 5. Efectos de los distintos medios de cultivo, hidrogeles y cultivo de ROECs sobre el desarrollo de embriones tras 72h de cultivo. ET COL: medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; ET control: control de medio ET; EP COL: medio ET suplementado con EGF e ITS (medio EP), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial; EP MOV: medio EP, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; EP control: control de medio EP. Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados, el error estándar de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de mórula y número de embriones valorados (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Figura 6. Efectos de los distintos medios de cultivo, hidrogeles y cultivo de ROECs sobre el desarrollo de embriones tras 72h de cultivo. ET COL: medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; ET control: control de medio ET; EP COL: medio ET suplementado con EGF e ITS (medio EP), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial; EP MOV: medio EP, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; EP control: control de medio EP. Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados, el error estándar de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de blastocisto y número de embriones valorados (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Figura 7. Efecto de los distintos medios de cultivo sobre la tasa de supervivencia tras la gestación. ET + MOV: medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET), hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal; ET + COL: medio ET, hidrogel de colágeno y

cultivo epitelial oviductal; control ET: control de medio ET; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS (medio EP); control transferencias: control de transferencias. Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados, el error estándar de las tasas de nacidos con respecto a las transferencias realizadas y el tamaño muestral (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Figura 8. Efecto de los distintos medios de cultivo utilizados sobre el peso al nacimiento (g) de los gazapos. IA: control de inseminación; control transferencia: control de transferencias; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS; control ET: control de medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET); ET+COL: medio ET, hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET+MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal. Se muestra la media ajustada por mínimos cuadrados, el error estándar del peso (g) de cada grupo y el número de gazapos medidos (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Figura 9. Efecto de los distintos medios de cultivo utilizados sobre el peso al destete (g) de los gazapos. IA: control de inseminación; control transferencia: control de transferencias; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS; control ET: control de medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET); ET+COL: medio ET, hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET+MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal. Se muestra la media ajustada por mínimos cuadrados, el error estándar del peso (g) de cada grupo y el número de gazapos medidos (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Figura 10. Efecto de distintos medios de cultivos condicionados sobre el desarrollo de embriones tras 72h de cultivo. Por orden: medio condicionado con oviductos de 48h (48h); medio condicionado con oviductos de 72h (72h); medio suplementado con piruvato y lactato sódico (control). Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados y el error estándar de las tasas de embriones de cada grupo que han alcanzado el estadio de mórula y blastocisto. El número de embriones se muestra entre paréntesis (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Figura 11. Tasas de expresión génica del factor de transcripción OCT4 en los diferentes tipos de medios de cultivo condicionados: 48h, 72h y medio suplementado con piruvato y lactato sódico (control).

Figura 12. Proporciones del tipo de proteínas detectadas en el análisis proteómico de los hidrogeles de 24h, 48h y 72h analizados.

Figura 13. Proporciones de los subtipos de proteínas específicas de la matriz extracelular detectadas en el análisis proteómico de los hidrogeles de 24h, 48h y 72h.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reproducción de la “Tabla 1” sobre el efecto del co-cultivo in vitro en el desarrollo de cigotos de Joo et al., 2001.

Tabla 2. Mix RT-PCR por cada muestra.

Tabla 3. Programa RT-PCR.

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

Tabla 5. Programa qPCR.

Tabla 6. Efectos de los diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto. ET: medio suplementado con piruvato y lactato sódico; EP: medio ET suplementado con EGF e ITS. Se muestran el número de embriones valorados (N), las medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsm.) y el error estándar (s.e.) de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de mórula y blastocisto.

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Tabla 7. Efecto de los diferentes tipos de hidrogel junto con el cultivo de ROECs sobre el desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto. COL: hidrogel de colágeno, MOV: hidrogel de matriz oviductal; control: grupos en los que no se utilizó hidrogel ni cultivo de ROECs. Se muestran el número de embriones valorados (N), las medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsm.) y el error estándar (s.e.) de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de mórula y blastocisto.

^{a, b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Tabla 8. Efecto de los distintos medios de cultivo y controles utilizados sobre el peso (g) de los individuos en las semanas 7 y 16. IA: control de inseminación; control transferencia: control de transferencias; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS; control ET: control de medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET); ET+COL: medio ET, hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET+MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal. Se muestra la media ajustada por mínimos cuadrados, el error estándar del peso (g) de cada grupo y el número de gazapos medidos (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

*No todos los animales alcanzaron la edad de 16 semanas al finalizar el experimento.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

µg: microgramos	ism: media ajustada por mínimos cuadrados
µL: microlitro	M: molar
BSA: albúmina sérica bovina	MEC: matriz extracelular
cDNA: complementary desoxyribonucleic acid	mg: miligramos
CIV: cultivo <i>in vitro</i>	min: minutos
CO₂: dióxido de carbono	mL: mililitro
COL: colágeno	mM: milimolar
Ct: cycle threshold	MOV: matriz oviductal
CTP: péptido carboxi-terminal	N: tamaño muestral
DMSO: dimetil sulfóxido	O₂: oxígeno
DNA: desoxyribonucleic acid	°C: grados centígrados
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato	OVGP-1: glicoproteína específica de oviducto u oviductina o gen de la oviductina
eCG: gonadotropina coriónica equina	PBS: tampón fosfato salino
EGF: epidermal growth factor	PCR: polymerase chain reaction
EP: medio suplementado con EGF e ITS	qPCR: quantitative polymerase chain reaction
ET: medio suplementado con piruvato y lactato sódico	RNA: ácido ribonucleico
FBS: suero fetal bovino	RNasa: ribonucleasa
FSH: hormona folículo estimulante	ROECs: células epiteliales oviductales de conejo
Fw: forward (directo)	ROS: reactive oxygen species
g: fuerza centrífuga relativa o fuerza g	rpm: revoluciones por minuto
g: gramos	RT: reverse transcriptase
GADPH: gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Rv: reverse (inverso)
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas	s.e: error estándar
h: hora/s	s: segundos
hCG: gonadotropina coriónica humana	SDS: dodecilsulfato sódico
IA: inseminación artificial	SNs: sphingomyelin nanosystems
ITS: insulina-transferrina-selenio	SOF: Synthetic Oviductal Fluid
kg: kilo gramos	TRA: técnicas de reproducción asistida
LH: hormona luteinizante	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Técnicas de Reproducción Asistida

Las técnicas de reproducción asistida en animales facilitan su reproducción y permiten en algunos casos optimizar el potencial reproductivo y productivo de los animales, por lo que el uso de las técnicas de sincronización, inseminación, producción de embriones *in vivo* e *in vitro* se ha incrementado en los últimos años tanto en especies de compañía como en especies ganaderas como son el conejo, el porcino, pequeños rumiantes y vacuno. Así, la inseminación artificial es habitual tanto en las especies ganaderas como en las de compañía, mientras que la producción y transferencia de embriones es especialmente destacable en vacuno, en la que se obtienen cerca de 1 millón de embriones anualmente y se transfieren en torno al 75.9% (International Embryo Technology Society, 2020). Con respecto a la especie humana su uso está centrado en medicina reproductiva, donde el avance de las técnicas ofrece la posibilidad de solucionar problemas de infertilidad, reducir o eliminar la transmisión de enfermedades genéticas y preservar gametos. En torno al 10% de los nacidos en España lo son por la aplicación de las técnicas de reproducción asistida (Ministerio de Sanidad, 2018; Instituto Nacional de Estadística 2018).

Estas técnicas implican el control endocrino de las donantes y la manipulación de gametos y embriones, a veces, en condiciones muy distantes de las fisiológicas. La etapa embrionaria es un periodo crítico en el desarrollo de los individuos, por lo que procedimientos como el cultivo *in vitro* (CIV), criopreservación o el simple manejo, implican la exposición a agentes estresantes como pueden ser la luz, cambios de temperatura, cambios de pH o metabolitos tóxicos que pueden llevar a alteraciones posteriores a nivel genético y fenotípico (McEvoy, 2003; Wale & Gardner, 2016). Este hecho encaja con la hipótesis de reprogramación fetal de Barker (2007), en la que sostiene que cualquier estímulo estresante o daño producido en los primeros estadios de desarrollo de un individuo, puede influir en la estructura y/o fisiología del individuo de manera permanente a lo largo de su vida y además podría ser transmisible a las generaciones posteriores. Ejemplos de ello se han demostrado en especies como bovino, donde el cultivo *in vitro* se asocia a un incremento del tamaño del feto debido a un desarrollo excesivo del músculo esquelético y de los vasos sanguíneos, produciendo “síndrome de descendencia grande”, (LOS, *large offspring syndrome*), así como una alteración en los

patrones de expresión génica, entre ellas la expresión del gen IGF2 involucrado en el desarrollo fetal y necesario para su crecimiento normal (Thompson *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1998; Farin *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2013).

En ratón, el manejo *in vitro* se asocia a menores tasas de implantación, niveles bajos en el desarrollo y disminución de la viabilidad embrionaria. En conejo y rata se registran menores pesos al nacimiento debido a alteraciones genéticas como son menores tasas de expresión del factor de crecimiento insulínico y pérdida de los patrones de metilación del gen PEG3, encargado de controlar el crecimiento fetal (Khosla *et al.*, 2001; Olexiková *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2016).

En humanos se han demostrado también alteraciones asociadas al CIV. Aunque no sea sencillo de establecer la relación entre el cultivo *in vitro* de embriones con los cambios fenotípicos y la salud de los individuos nacidos a partir de TRA, se han descrito ciertas alteraciones genéticas que podrían ser derivadas del CIV (Sunde *et al.*, 2016). Estas se relacionan principalmente con modificaciones en el crecimiento inicial o aumento en la predisposición de padecer enfermedades en la edad adulta derivadas de alteraciones metabólicas relacionadas con la presión arterial o la obesidad (El Hajj & Haaf, 2013; Simpoulou *et al.*, 2018). Así, se ha observado un aumento en la incidencia de los síndromes de Prader Willi y el síndrome de Angelman, producidos por alteraciones en el gen SNPRN y UBE3A, respectivamente (Ludwig *et al.*, 2005; Market-Velker *et al.*, 2010). También alteraciones en genes reguladores del crecimiento situados en el cromosoma 11, causantes del síndrome de Beckwith-Wiedemann (Maher *et al.*, 2003).

Técnicas de criopreservación, como la congelación y la vitrificación también han demostrado afectar a las tasas de supervivencia de los embriones, de implantación, de embarazo y al peso al nacimiento en humanos (Liu Q *et al.*, 2014; Kaartien *et al.*, 2016.) También se relaciona con complicaciones durante el embarazo y aumento del número de partos pre-término (Wong *et al.*, 2017; Alviggi *et al.*, 2018).

Debido a la dificultad para establecer las relaciones entre las técnicas de reproducción asistida con las alteraciones comentadas tanto a nivel genético como fenotípico y a los impedimentos para realizar ciertos procedimientos y análisis en la especie humana, diferentes especies son usadas como modelos experimentales. En España, después del ratón (84%) y la rata (7%), el conejo (4%) es la tercera especie de

mamífero más utilizada en investigación (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

Algunos de los motivos para la utilización del conejo como modelo experimental son el bajo coste de mantenimiento, facilidad de manejo y docilidad, y amplios conocimientos acerca de la anatomía y fisiología de la especie. Además, esta especie cuenta con características que lo hacen especialmente útil como modelo para la salud reproductiva humana debido a las similitudes entre ambas especies en cuanto a desarrollo embrionario y fetal similares, metabolismo durante la fase prenatal, así como similitud de las secuencias génicas y tasa de activación genómica. Además, es posible el control temporal de los procesos de estimulación ovárica, ovulación, fecundación y recuperación y transferencia de embriones, por lo que la convierte en una especie idónea para el estudio de nuevas técnicas de reproducción asistida (Fischer *et al.*, 2012).

1.2. Cultivo embrionario

Los medios y las condiciones de cultivo de embriones intentan mimetizar el ambiente oviductal con la finalidad de obtener una cronología y fisiología del desarrollo embrionario óptima. No obstante, resulta difícil reproducir los cambios que suceden en el ambiente oviductal como consecuencia tanto de las variaciones en el perfil de las secreciones de las células oviductales como los que derivan de las interacciones con los embriones en desarrollo.

1.2.1. Oviducto y desarrollo embrionario temprano

El oviducto, también llamado tubo de Falopio en primates, es el lugar donde se da el transporte de gametos, la fecundación y desarrollo temprano del embrión en mamíferos (Li & Winuthayanon, 2017). Se trata del conducto de unión entre el útero y el ovario y presenta varias regiones que, dependiendo de la especie, están divididas según sus características histológicas y su fisiología. En el caso del conejo, el oviducto queda dividido en cinco regiones: fimbrias, infundíbulo, ampulla, istmo e intersección útero-tubal (Pedrero-Badillo *et al.*, 2013).

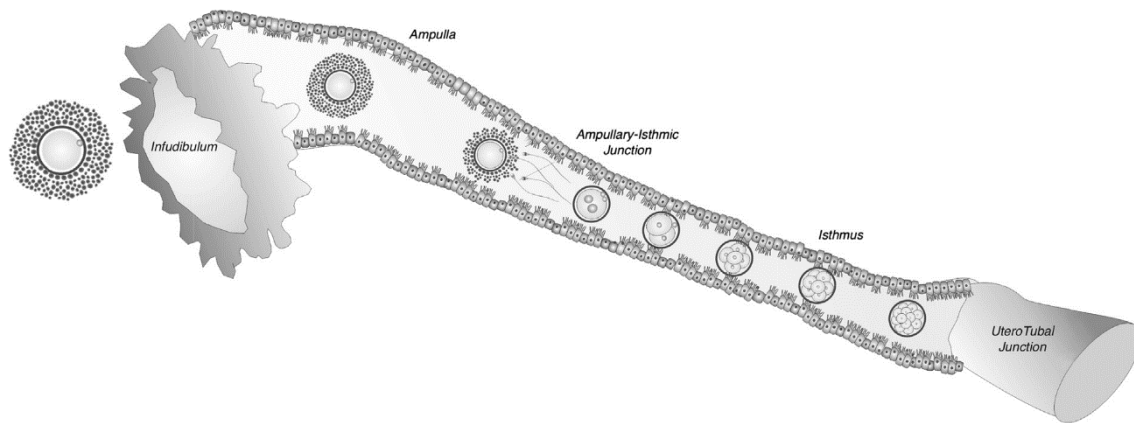


Figura 1. Representación esquemática del oviducto, sus partes anatómicas y las fases de desarrollo ovocito-embrión (Maillo *et al.*, 2016).

Desde un punto de vista anatómico e histológico, el oviducto es una estructura tubular formado por tres capas: mucosa, muscular y serosa. La mucosa oviductal se compone de un epitelio pseudoestratificado formado por dos tipos celulares: células ciliadas y secretoras. Las células ciliadas son las encargadas de generar un flujo que servirá de impulso para el transporte de los gametos, embriones y secreciones oviductales en dirección al útero (Yániz *et al.*, 2013). Las células secretoras o intercalares por su parte se encargan de generar los factores proteicos que permiten los procesos de capacitación espermática, y desarrollo de ovocitos y embriones. La proporción de ambos tipos celulares varía dependiendo de la región oviductal, siendo mayor el contenido de células ciliadas en el infundíbulo y el ámpula y mayor la de células secretoras en el istmo.

Las células oviductales mantienen y regulan el fluido oviductal, generando las condiciones idóneas para los procesos de ovulación, fecundación y transporte espermático. La composición del fluido oviductal es compleja: contiene carbohidratos, iones, lípidos, fosfolípidos y proteínas (Áviles *et al.*, 2010; Maillo *et al.*, 2016). Estos componentes varían a lo largo del ciclo acompañando la transición de metabolismo oxidativo a metabolismo glucolítico por la que pasa el embrión a través del oviducto (Li & Winuthayanon, 2017). Algunos sustratos metabólicos como el piruvato se mantienen constantes en torno a 0.24mM, el lactato por su parte se incrementa de 4.9mM en la fase folicular hasta 10.5mM en la ovulación y vuelve a bajar a 6.2mM en la fase lútea. La glucosa desciende de 3.1mM en la fase folicular hasta 0.5mM y vuelve a aumentar hasta 2.3mM (Gardner *et al.*, 1996).

El oviducto, por tanto, no se trata de un conducto pasivo dedicado únicamente al transporte si no que participa activamente en las funciones de transporte de gametos y

embriones, así como en funciones reguladoras en capacitación espermática, fecundación y desarrollo embrionario temprano. Las funciones de transporte son llevadas a cabo gracias al movimiento ciliar sincrónico de las células epiteliales ciliadas, así como de la musculatura oviductal, que generan un movimiento unidireccional favoreciendo el desplazamiento hacia el útero (Killian, 2004). Para que se lleve a cabo la fecundación debe mantenerse la viabilidad de los espermatozoides y producirse su capacitación. Para ello, las células epiteliales de la intersección útero-tubal y el istmo controlan la entrada de células espermáticas, generando un reservorio de esperma que permite la liberación controlada, así como un revestimiento de protección para las cabezas espermáticas. Numerosas proteínas del epitelio oviductal, están involucradas en la adhesión y capacitación de los espermatozoides, procesos necesarios para la posterior fecundación. La interacción de receptores espermáticos B-catenina con los respectivos ligandos del epitelio E-cadherinas del istmo del oviducto, generan la extracción de Ca^{2+} intracelular, reduciendo los niveles intracelulares de este e incrementándolos en el fluido preovulatorio (Hunter, 2012; Caballero *et al.*, 2014). Además de esos procesos de capacitación y protección, en el fluido oviductal están presentes proteínas solubles como glutatión-peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, que regulan los niveles de especies reactivas de oxígeno en el esperma, crucial para la viabilidad y motilidad espermática (Lapointe *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 2014).

Tras el proceso de fecundación, que se da en el ampulla a las 12-16 horas post coito (h.p.c.), comienza el desarrollo embrionario. Durante las primeras 68-72 horas el embrión recorre el oviducto, mientras que los blastómeros se dividen cada 7-8h, pasando por los estadios de 16 células (36-41 h.p.c), mórula (60 h.p.c. aprox.), compactación (68 h.p.c) y formación del blastocisto (72 h.p.c); donde se puede observar la formación del blastocele y la diferenciación del embrioblastema y trofoblastema. En ese momento, únicamente el 10% de los embriones han salido del oviducto, será en el día cuatro post coito cuando los embriones se encontrarán en el útero donde continuarán su desarrollo embrionario (Fischer *et al.*, 2012; Niakan *et al.*, 2012).

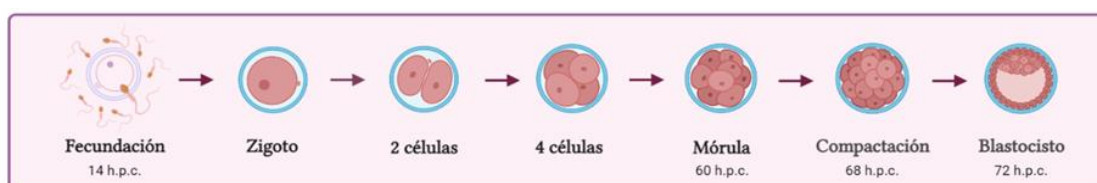


Figura 2. Desarrollo embrionario temprano desde la fecundación hasta el estadio de blastocisto. Imagen diseñada con BioRender.

Durante este periodo a través del oviducto, cada vez son más las evidencias de que existe una interacción materno-embriónica. Se ha demostrado que el paso de los embriones por el oviducto activa la expresión de genes específicos regulando el propio microambiente y cambios epigenéticos como la metilación del DNA y modificación de histonas (Ulbrich *et al.*, 2010; Almiñana *et al.*, 2012) así como cambios a nivel de transcripción observados en experimentos realizados en ratones y en embriones humanos (Lee *et al.*, 2002; Vanessa *et al.*, 2011).

Debido a estos cambios epigenéticos producidos por la interacción oviducto-embrión en etapas tan sensibles para el desarrollo, numerosos estudios sugieren que el cultivo *in vitro* puede alterar estos cambios produciendo efectos en el individuo a largo plazo (Fernández-Gonzalez *et al.*, 2007). Experimentos realizados en ratón y conejo han demostrado cambios en los patrones de transcripción y metilación de histonas en las primeras etapas de desarrollo de embriones cultivados *in vitro* con respecto a los observados *in vivo* (Shi & Haaf, 2002; Reis e Silva *et al.*, 2012), incluso cambios de comportamiento en ratón asociados al cultivo de embriones (Ecker *et al.*, 2004). En bovino, cultivos comparativos entre condiciones *in vitro* e *in vivo* también han demostrado diferencias tanto en el desarrollo y calidad de los embriones como en los resultados de análisis de proteoma y metaboloma. Estos hechos confirman que la interacción entre oviducto y embriones es un hecho a tener en cuenta en la puesta a punto de la tecnología de cultivo embrionaria (Rottmayer *et al.*, 2006; Maillo *et al.*, 2016).

1.2.2. Métodos y medios de cultivo para embriones

Los avances en el conocimiento del desarrollo embrionario en mamíferos han generado la necesidad de estudiar y desarrollar nuevos métodos para la mejora en los procedimientos de cultivo de embriones. Los métodos han ido evolucionando con el fin de imitar las condiciones *in vivo*, aumentando tanto la tasa de ovocitos que se desarrollan a blastocistos como la calidad de estos, ya sea para su transferencia, para su manipulación en diagnóstico preimplantacional o con fines experimentales (Lonergan *et al.*, 2003; Aldarmahi, 2017).

Los medios utilizados para el CIV varían desde soluciones salinas simples como puede ser el fluido oviductal sintético (SOF), hasta medios más complejos como TCM-199 o Ham's F10 (Quinn, 2000).

En cuanto al sistema de cultivo podemos encontrar continuos (simples) o secuenciales. En los sistemas continuos, los embriones se mantienen en el mismo medio durante todo el desarrollo ya que el dicho medio contiene todos los componentes necesarios para el cigoto hasta el estado de blastocisto. Esto permite eliminar el estrés producido por el manejo y evita agentes estresantes como pueden ser la luz o los cambios de temperatura (Machtinger & Racowsky, 2012). Con respecto a los secuenciales, estos se basan en el hecho de que las condiciones en el oviducto materno varían a lo largo del desarrollo, principalmente a nivel de metabolitos: glucosa, piruvato y lactato. Además, el tercer día de desarrollo es un punto clave en el desarrollo: tiene lugar la compactación celular de las uniones estrechas en las membranas plasmáticas de los blastómeros para la formación del blastocisto (Quinn, 2014; Sfontouris *et al.*, 2016). En humanos tiene lugar la activación del genoma embrionario, que hasta este momento dependía únicamente de la madre, lo que supone grandes cambios a nivel metabólico (Gardner *et al.*, 2002). Con este método se realiza un cambio en el medio de cultivo al tercer día que imita las condiciones fisiológicas, lo que permite una mejora en la calidad y desarrollo del embrión (Quinn, 2014).

Los co-cultivos se tratan de otro sistema en el que el embrión es cultivado sobre un epitelio reconstruido de células oviductales. Este método se basa en el hecho comentado anteriormente de que existe una interacción materno-embionaria necesaria para el desarrollo y permite imitar las condiciones *in vivo* gracias a los factores secretados por las células oviductales (Chen *et al.*, 2013; Ferraz *et al.*, 2016). Estudios realizados durante décadas en especies como ratón, conejo y bovino, han demostrado que el soporte bioactivo que ofrece el cultivo de células oviductales es capaz de aportar factores de crecimiento que favorecen tanto la maduración ovocitaria como el desarrollo embrionario temprano. Según estos estudios, el cultivo de células del epitelio oviductal supone un incremento del número de blastocistos, además de una mejora en la calidad de estos (Carney *et al.*, 1990; Joo *et al.*, 2001; Rottmayer *et al.*, 2006). Los resultados de las pruebas realizadas con humanos demuestran que la presencia de las células del epitelio oviductal favorecen la eliminación de residuos secretados por el embrión, y produce un

incremento del número de blastómeros y de la tasa de implantación (Kattal *et al.*, 2008; Vithoulkas *et al.*, 2017).

TABLA 1					
Efectos de co-cultivo en el desarrollo de cigotos <i>in vitro</i>					
Condiciones de cultivo	N	2-células	N (%) desarrollo a		
			4-8 células	blastocisto	hatching
Control	75	73 (97%)	15 (20%) ^a	2 (3%) ^a	0 (0%) ^a
Co-cultivo	75	72 (96%)	54 (72%) ^b	47 (63%) ^b	32 (43%)

^{a,b} Los diferentes superíndices dentro de las columnas indican diferencias significativas (P<.05)
Los resultados fueron las medias de tres experimentos

Tabla 1. Reproducción de la "Tabla 1" sobre el efecto del co-cultivo *in vitro* en el desarrollo de cigotos de Joo *et al.*, 2001.

Otro sistema de cultivo en el que se está investigando en los últimos años es el cultivo sobre hidrogeles. Estos se definen como materiales poliméricos altamente hidratados, concretamente con más de un 30% de su peso en agua. Estos geles mantienen su integridad física y química debido a los enlaces tridimensionales que se dan entre los polímeros que lo forman, que pueden ser sintéticos o naturales. Estos últimos permiten imitar mejor el tejido y permiten crear interacciones célula-matriz, lo que favorece el mantenimiento celular, así como sus propiedades mecánicas, adhesión y diferenciación celular. Los polímeros más usados son principalmente proteínas como como alginato, quitosán, elastina, colágeno o ácido hialurónico. Es por ello por lo que en la industria biotecnológica se usan como soporte en numerosas aplicaciones clínicas para el estudio de interacciones entre moléculas, nuevos medicamentos o cultivos de células y tejidos (Saldin *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2020). En el caso de los cultivos embrionarios, se ha planteado el uso de hidrogeles derivados de la matriz extracelular del tejido uterino u oviductal con el fin simular *in vitro* las interacciones que se dan entre la matriz, el epitelio y los embriones (Miles *et al.*, 2017; Campo *et al.*, 2019; Francés-Herrero *et al.*, 2021).

La matriz extracelular es la red tridimensional de macromoléculas que da soporte físico y bioquímico a todos los tejidos del organismo siendo única de cada tejido. El contenido de esta matriz son polímeros de elastina, fibrilina, laminina, fibronectina, fibrinógeno y trombospondinas principalmente (Halper & Kjaen, 2014). Estos forman una matriz entrecruzada cuyo porcentaje varía dependiendo del tejido y que puede ser

utilizada para la formación de hidrogeles. Para ello, los tejidos deben ser descelularizados y una vez obtenida la matriz, deben ajustarse las condiciones de temperatura y pH para que se pueda dar el entrecruzamiento entre polímeros, formando el hidrogel (Brown *et al.*, 2017).

Los estudios realizados sobre hidrogeles derivados de matriz extracelular han demostrado tener capacidades fisicoquímicas adecuadas para soportar cultivos celulares. Los análisis de porcentajes y concentración de polímeros, turbidimetría, pH, concentración salina, así como aspecto macroscópico resultan favorables de acuerdo con las condiciones fisiológicas. Esto genera las condiciones bioquímicas adecuadas para el desarrollo de cultivos celulares, obteniendo resultados positivos de viabilidad y actividad celular, demostrando que existe interacción entre ambos (Zagris, 2001; Wolf *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2020).

Estas características han permitido el desarrollo de matrices como soporte de cultivo de epitelios oviductales o uterinos para el desarrollo de embriones. En experimentos llevados a cabo en ratas y en ratones, la realización de pruebas inmunohistoquímicas, así como de interacciones físicas basadas en la presión que generan los blastocistos durante el *hatching* han demostrado que existe una interacción entre los embriones y los hidrogeles (Kaloglu & Onarlioglu, 2010; Chen *et al.*, 2017; Leonavicius *et al.*, 2018). En conejo, se ha observado que las matrices obtenidas contienen los componentes adecuados para el correcto desarrollo de los embriones hasta blastocisto, siendo este comparable a los obtenidos con métodos estándar, aunque también se ha comprobado una ralentización en el metabolismo de estos (Campo *et al.*, 2019; Francés-Herrero *et al.*, 2020). En porcino y humano también se han generado hidrogeles derivados de matriz oviductal y, aunque los componentes de la matriz y sus propiedades fisicoquímicas sean adecuados para el cultivo y se den interacciones entre factores de crecimientos, hormonas y ligandos, tanto los organoides desarrollados como los embriones muestran diferencias en cuanto al tamaño, morfología y tasa de supervivencia celular (Miles *et al.*, 2017; Francés-Herrero *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es evaluar el efecto de las células del epitelio oviductal de conejo cultivadas sobre dos tipos de hidrogel sobre el desarrollo embrionario de embriones en estadio de 2 células durante 72 horas de cultivo.

Los objetivos específicos fueron estudiar los efectos de:

- La suplementación del medio de cultivo con factores que favorecen la proliferación del epitelio oviductal (EGF y ITS) sobre el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de embriones de conejo cultivados 72 horas.
- El tipo de hidrogel sobre el que proliferan y mantienen su actividad las células oviductales sobre el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de embriones de conejo cultivados 72 horas.
- La utilización de medios condicionados a partir de la actividad de las células oviductales sobre el desarrollo *in vitro* de embriones cultivados durante 72 horas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

El trabajo consta de dos bloques experimentales que evalúan la utilización de hidrogeles y células oviductales sobre el desarrollo embrionario temprano de conejo, así como el efecto en el desarrollo postnatal. En el primer experimento, se observó el desarrollo embrionario en dos medios de cultivo y en presencia de células oviductales que habían sido cultivadas sobre dos tipos de hidrogel: colágeno (COL) y compuesto por matriz oviductal de 24 horas (MOV). Los medios de cultivo utilizados fueron un medio suplementado con piruvato y lactato sódico específicamente para embriones tempranos (ET) y un medio diseñado para la proliferación de células epiteliales oviductales (EP), medio ET suplementado además con EGF e ITS. Los controles estaban formados únicamente por los medios de cultivo.

En el segundo experimento los grupos estaban formados por el medio de cultivo ET condicionado con el medio en el que se cultivaron células oviductales de conejas inducidas a ovular 48h y 72h antes. Como control se utilizó medio ET.

Los embriones fueron cultivados durante 72 horas en ambos experimentos valorándose el estadio de desarrollo alcanzado. En el caso del primero, los embriones fueron transferidos a hembras receptoras para evaluar su viabilidad *in vivo* y su crecimiento hasta las 16 semanas de vida. En el segundo experimento, los embriones tras finalizar el periodo de cultivo fueron congelados a -80°C para el posterior análisis de los genes OCT4 y SOX2.

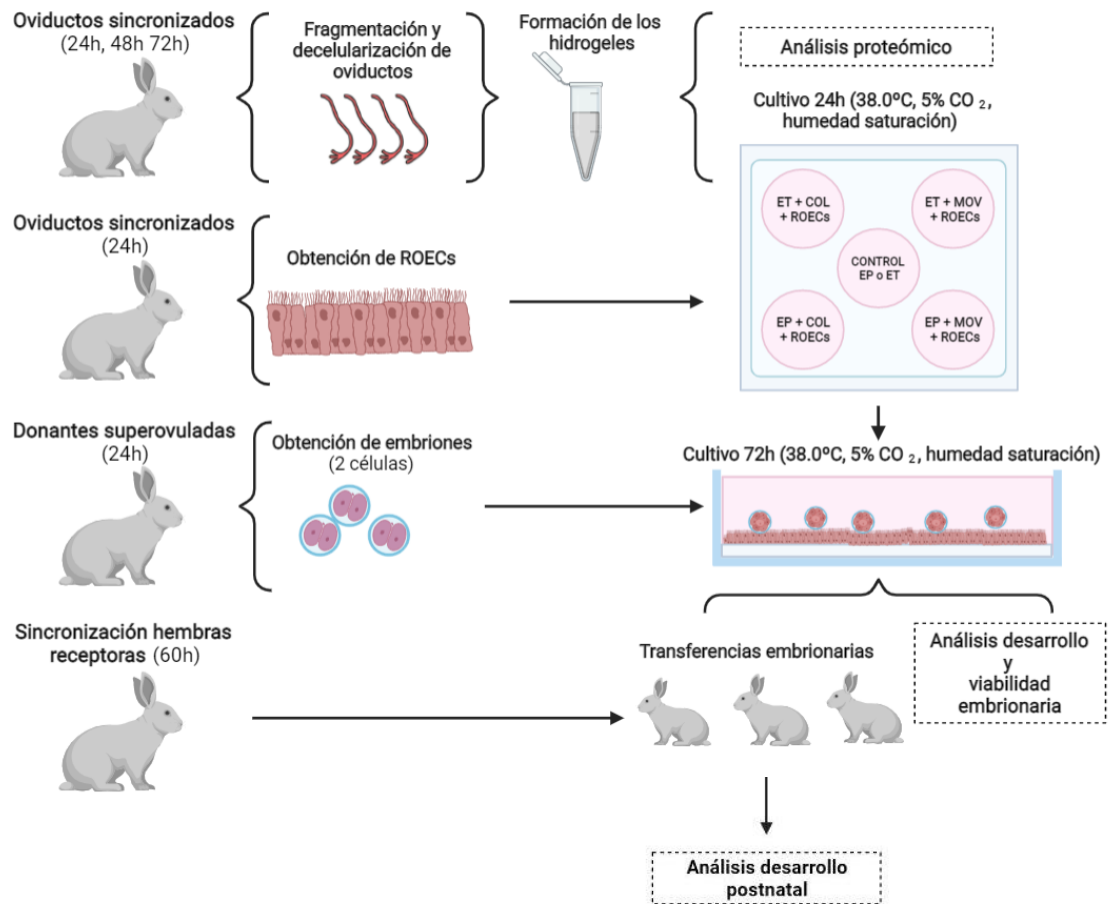


Figura 3. Representación gráfica del primer bloque experimental. Desarrollo de diferentes medios de cultivo e hidrogeles y cultivo de ROECs y su efecto en embriones de 24 horas tras 72 horas de cultivo, así como en el desarrollo postnatal. Imagen diseñada con BioRender.

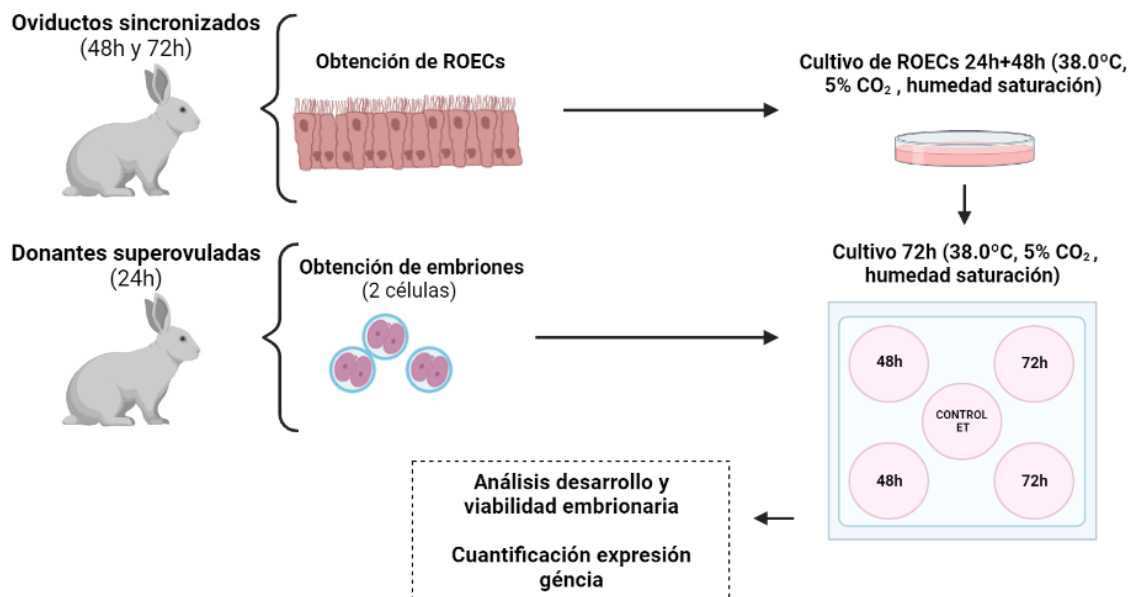


Figura 4. Representación gráfica del segundo bloque experimental. Desarrollo de medios de cultivo condicionados con ROECs con una sincronización oviductal de 48h y 72h y su efecto tras 72 horas de cultivo en embriones de 24 horas. Imagen diseñada con BioRender.

3.2. Animales

Las actividades llevadas a cabo con animales fueron aprobadas por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Politécnica de Valencia y de acuerdo con la legislación vigente (Real Decreto 53/2013, Ley 32/2007 y Orden ECC/566/2015).

Se utilizaron un total de 97 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de una línea seleccionada por caracteres maternales neozelandés blanco de 20 semanas de edad aproximadamente.

Los animales se encontraban alojados en la granja experimental de la Universidad Politécnica de Valencia en jaulas individuales con fotoperiodo, ventilación y alimentación controlada.

3.3. Producción de embriones

Las hembras donantes de embriones fueron sometidas a un tratamiento de superovulación con 0.75µg/kg de coriofolitropina-α de larga duración (Elonva, Merck Sharp & Dohme B.V.) vía subcutánea. La inseminación se realizó 72 horas más tarde con 0.5mL de una mezcla de semen fresco diluido 1:3 con Tris-cítrico-glucosa, procedente de mínimo tres machos fértiles de la misma línea. Este presentaba motilidad superior al 70% y porcentaje de anomalías morfológicas inferior al 25%. A continuación, se indujo la ovulación con 1µg de acetato de buserelina (1mg/mL, Suprefact, Sanofi Aventis S.A.) vía intramuscular.

Las hembras donantes fueron sacrificadas 24 horas más tarde mediante aturdimiento eléctrico de bajo voltaje (49V y 179Hz) y posterior desangrado.

Los embriones fueron recuperados mediante perfusión de los oviductos y la primera sección del cuerno del útero con 10mL de medio DMEM/F-12 50/50, 1X (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Hams F-12 50/50 Mix; Corning) atemperado.

Se realizó una mezcla de los embriones procedentes de, al menos, 3 conejas donantes, con el fin de disminuir el efecto de la donante. Posteriormente se seleccionaron únicamente los embriones con morfología normal para el estadio de 24 horas: citoplasma homogéneo con dos pronúcleos y dos corpúsculos polares o estadio de dos células. Cualquier embrión anormal u ovocitos fueron descartados.

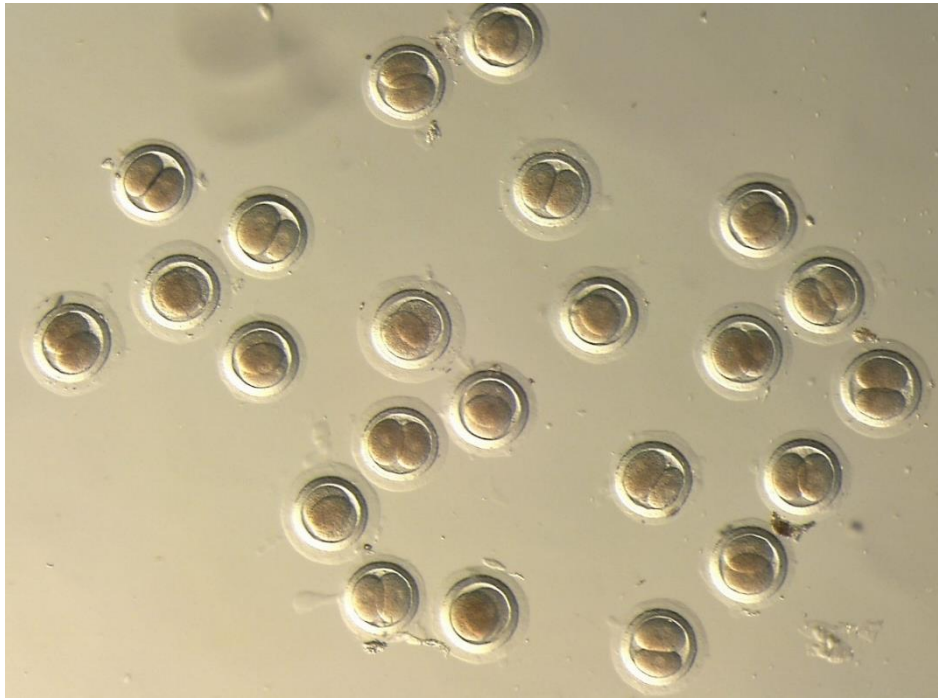


Imagen 1. Imagen de embriones frescos de conejo de dos células (24 horas).

3.4. Medios de cultivo

El medio base utilizado para la elaboración de los 2 medios ensayados fue DMEM/F-12 50/50, 1X (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Hams F-12 50/50 Mix; Corning). En el primer medio (medio ET), diseñado específicamente para el desarrollo de embriones tempranos, se añadió 1% (v/v) de antibiótico (Penicillim Streptomycin 10.000 U/mL, Gibco™), 10% (v/v) de FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrick), 0.3mmol/L piruvato (Sodium pyruvate, Sigma-Aldrich) y 0.1 mmol/L de lactato.

Para el segundo medio (medio EP), el medio ET fue suplementado con un 5% (v/v) FBS (Gibco), 1%(v/v) de ITS (1.0 mg/mL recombinant human insulin, 0.55mg/mL human transferrin, y 0.5 µg/mL sodium selenite, Merck) y 25ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor, Merck). Este medio fue utilizado para favorecer la proliferación de las células oviductales sobre los hidrogelens ensayados y para el cultivo de embriones.

3.5. Preparación de hidrogeles

Los hidrogeles de colágeno se prepararon a partir de una solución comercial de colágeno (PureCol™ EZ Gel solution, Sigma-Aldrich). Se emplearon 200µL de solución en cada pocillo de la placa Nunc, procurando cubrir toda la superficie de este y evitando la formación de burbujas. El proceso se realizó en frío y a continuación se llevó a incubación en estufa a 38.0°C, 5% de CO₂ y humedad saturada para su gelificación.

Para la preparación de hidrogeles de matriz extracelular de oviductos de 24, 48 y 72h post inducción de la ovulación, se siguió el protocolo utilizado por Francés-Herrero *et al.* (2021). En primer lugar, se llevó a cabo la descelularización de los oviductos previamente almacenados. Para ello, tras la descongelación se llevó a cabo una digestión química con detergentes y sucesivos lavados durante 2 días en agitación con agitador magnético a 300 rpm: lavado en PBS 1X (PBS 1X, Sigma-Aldrich) 1h, SDS 0.1% (Sodium dodecyl sulfate, Sigma-Aldrich) durante 22h, lavado en PBS 1X (PBS 1X, Sigma-Aldrich) por 3min, digestión en Triton X-100 0.5% (Triton™ X-100, Sigma-Aldrich) durante 2h, y lavado en PBS 1X 30min. Llegados a este punto, los oviductos podían ser almacenados y congelados a -80°C o continuar con el proceso. Los oviductos descelularizados fueron triturados en PBS hasta conseguir una mezcla homogénea y liofilizados (LyoQuest -85, Telstar) durante 24h a 20Pa y -80°C y posterior almacén a -20°C. Para la formación del pre-hidrogel, el polvo resultante fue pesado y digerido en una solución al 1% de pepsina en HCl 0.01M (pH 2) de 6h a 24h en agitador magnético. La neutralización a pH fisiológico se realizó con 10% (v/v) de NaOH 0.1M (Hidróxido sódico, Baker Analyzed, J.T. Baker) y 10% (v/v) de PBS10X. El pre-gel resultante fue alicuotado y almacenado a -20°C. Para la formación del hidrogel, se emplearon de la misma forma que en el caso anterior, 200µL de la solución descongelada sobre los pocillos de la placa Nunc y fue incubado a 38.0°C, 5% CO₂ y humedad a saturación durante 24 horas.

3.6. Procesamiento de oviductos y obtención de ROECs

En el primer experimento, los oviductos procesados para la obtención de ROECs procedían de hembras inducidas a ovular 24 horas antes de su obtención. En primer lugar, fueron limpiados introduciendo una cánula de poliestireno de 1mm de diámetro a través del infundíbulo hacia el istmo y a continuación se retiró el tejido adiposo circundante. Sin

retirar la cánula, los oviductos fueron cortados longitudinalmente con ayuda de un bisturí y se cortaron en trozos de 2 cm para facilitar la posterior digestión.

A continuación, se realizaron una serie de lavados en diferentes medios con el fin de reducir la carga microbiana y posible contaminación: un lavado con PBS suplementado con antibióticos (PBSA, 1%, Penicillim Streptomycin 10.000 U/mL, Gibco™), tres lavados en etanol al 70% y de nuevo en PBSA.

Los fragmentos fueron sometidos a digestión enzimática con tripsina 1% (Trypsin solution 10x, Merck) durante 1 hora previamente atemperada a 37°C. Tras la digestión, el tejido fue retirado y el contenido resultante fue filtrado con maya de nylon con diámetro de poro de 150µm para eliminar los restos de tejido. A continuación, el contenido fue centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en medio de cultivo suplementado con EGF e ITS para las células epiteliales (medio EP) previamente preparado. Las células obtenidas fueron puestas a cultivar 24 horas previas al cultivo embrionario sobre los hidrogeles preparados anteriormente en placas Nunc de 4 pocillos (38.0°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación). Antes de introducir los embriones se aspiró el medio de cultivo y las células no adheridas. Inmediatamente después, se sustituyó el medio de cultivo por 500µL medio de cultivo para células epiteliales o por medio de cultivo para embriones tempranos, según el grupo.

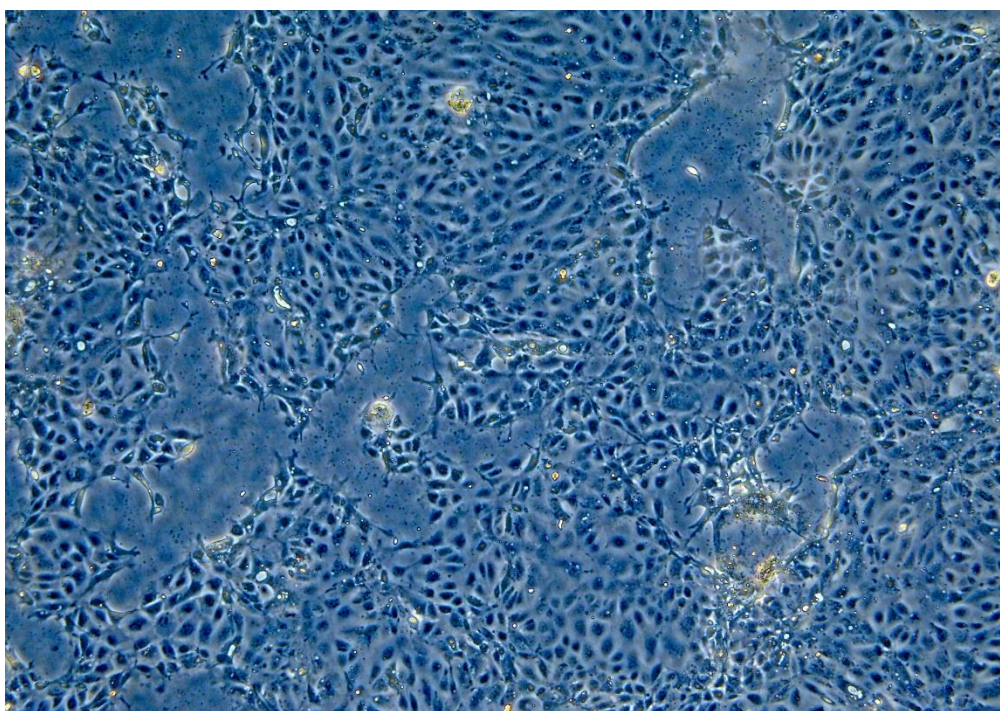


Imagen 2. Imagen del cultivo de ROECs sobre el hidrogel.

3.7. Medios de cultivo condicionados

En el segundo experimento, para la preparación de estos medios se recuperó el medio en el que se habían cultivado los ROECs que provenían de oviductos de conejas inducidas 48h y 72h antes de la eutanasia. 24h después de la extracción de las células e inicio del cultivo sobre placas de cultivos para células P35 pretratadas con gelatina al 1% (Mas, 2019), el medio y las células no adheridas fueron aspirados. Posteriormente, se introdujo en 500 μ L de medio suplementado con EGF e ITS diseñado para células epiteliales y se cultivaron durante 48h en las condiciones habituales (38.0°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación) antes de obtener el medio condicionado. Pasadas las 48h, fueron filtrados y almacenados a -20°C para su posterior uso.

3.8. Cultivo embrionario

Los embriones fueron cultivados en grupos de entre 15 y 20 embriones. Para el primer experimento, se cultivaron en placas Nunc preparadas 24h antes con el hidrogel y las células oviductales. Como se ha descrito anteriormente, entre 1 y 2 horas antes de introducir los embriones, las células oviductales no adheridas fueron eliminadas y fue añadido 500 μ L de medio de cultivo correspondiente a cada grupo. En el caso del segundo experimento, los embriones fueron cultivados en placas Nunc preparadas entre 1 y 2 horas previas al cultivo de embriones con el medio de cultivo condicionado mezclado 50% (v/v) con medio ET. Las condiciones de cultivo en ambos casos fueron 38.0°C, 5% de CO₂ y humedad saturada durante 72h.

Una vez finalizado el cultivo, se realizó la valoración embrionaria siendo descartados los de menor calidad morfológica (desarrollo anormal con fragmentación o estadios de desarrollo inferiores a mórula).

3.9. Preparación de hembras receptoras y controles

Las hembras receptoras fueron inducidas a ovular 60 horas antes de las transferencias con 1 μ g de acetato de buserelina vía intramuscular. Se comprobó su receptividad mediante la visualización de la vulva, solo aquellas con una vulva turgente y roja fueron utilizadas.

Los controles fueron inseminados el mismo día con 0.5mL de una mezcla de semen diluido 1:3 procedente de mínimo tres machos fértiles de la misma línea. A continuación, se indujo la ovulación mediante la administración de 1µg de acetato de buserelina vía intramuscular.

3.10. Transferencias embrionarias

Las transferencias embrionarias se realizaron mediante laparoscopia según el protocolo descrito por García-Domínguez *et al.* (2019). Brevemente, las hembras receptoras se anestesiaron con 16mg/kg de hidrocloreuro de xilacina (Xilagesic, Calier), 35mg/kg de hidrocloreuro de ketamina (Ketamidor, Richter Pharma) y 0.01mg/kg buprenorfina (Bupaq 0.3%, Richter Pharma). El abdomen fue rasurado y limpiado con povidona yodada. Los animales fueron posicionados verticalmente cabeza abajo en la mesa de trabajo y a continuación se procedió a insertar el endoscopio en la zona abdominal. Con un catéter epidural introducido a través de una aguja epidural vía inguinal, se accedió al oviducto a través del infundíbulo, donde se transfirieron los embriones.

Se transfirieron un total de 457 embriones, usando seis hembras para cada grupo experimental. Se realizaron un total de 30 transferencias.

3.11. Diagnóstico de la gestación y desarrollo post natal

Tomando el día de inseminación de los controles como día cero, doce días después se realizó el diagnóstico de la gestación por palpación.

Al nacimiento de los gazapos, fueron registradas las fechas de nacimiento, peso y número de gazapos nacidos vivos, nacidos muertos y nacimientos totales. Los pesos fueron registrados cada semana durante 16 semanas consecutivas.

A la cuarta semana se realizó el tatuado y destete de los gazapos y fueron trasladados a jaulas de engorde en grupos de 7 gazapos por jaula.

En la novena semana se realizó el sexaje y selección de las hembras.

3.12. Cuantificación de la expresión génica embrionaria

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo a partir de una extracción de RNA, paso a cDNA y posterior qPCR.

Para la extracción de RNA se siguió el protocolo establecido en RNeasy Kits de Quiagen. A cada muestra de embriones previamente congelados en 50 μ L de PBS + BSA se añadió 350 μ L de tampón de lisis y 4 μ L de mercaptoetanol. A continuación, fueron añadidos 350 μ L de etanol 70%. Las muestras fueron transferidas a una columna situada en un tubo colector de 2mL. Se realizó una centrifugación durante 20s a 14000g y se eliminó el filtrado. Se añadieron 350 μ L de tampón RW1, se centrifugó 20s a 14000g y se eliminó del filtrado. A continuación, se añadieron 80 μ L de DNasa de una solución previamente preparada con 10 μ L de DNasa y 70 μ L de tampón RDD. Las muestras se mantuvieron en incubación durante 15 minutos en un rango de temperatura de 20-30°C. Posteriormente se añadieron 350 μ L de tampón RW1 y se llevó a centrifugación 20s a 14000g. La columna fue cambiada a un nuevo tubo colector de 2mL, se añadieron 500 μ L de tampón RPE y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El filtrado fue eliminado, se añadieron 500 μ L de etanol 80% y se llevó a centrifugación 2 minutos a 14000g. Las columnas fueron colocadas en nuevos tubos colectores y se llevó a centrifugación durante 5 minutos a 14000g con las columnas abiertas. Por último, las columnas fueron transferidas a un tubo ependorf de 1.5mL y se añadieron 14 μ L de agua libre de ARNasa en el centro de la columna. Las muestras se centrifugaron a 36000g durante 1 minuto.

La concentración y calidad de RNA obtenido de las muestras fueron evaluadas mediante espectrofotometría con Nanodrop 200 (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) antes de obtener el cDNA. Las concentraciones de ARN oscilaban entre 1 y 5ng/ μ L por lo que las muestras no fueron diluidas para realizar el paso a cDNA.

Para obtener cDNA, cada muestra fue preparada como se indica en la *Tabla 2* con el kit qScript™ cDNA Synthesis Kit de Quanta BioSciences, Inc. y la reacción se realizó con el termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems™ con el programa que se muestra en la *Tabla 3*.

ARN	13µL
qMAX	4µL
RT	1µL
Agua	2µL
TOTAL	20µL

Tabla 2. Mix RT-PCR por cada muestra.

Tiempo	Temperatura
5 min	25°C
30 min	60°C
5 min	85°C
Sin tiempo	4°C

Tabla 3. Programa RT-PCR.

A partir del cDNA obtenido y conservado a 4°C se realizó una PCR cuantitativa. El estudio de expresión se realizó en dos factores de transcripción: OCT4 y SOX2 y se utilizó el gen GADPH como referencia. Los cebadores para cada uno de los genes se muestran en la *Tabla 4*.

Gen	Secuencia cebador	Tamaño amplificado	N.º acceso	Referencia bibliográfica
GADPH	Fw - 5' GCCGCTTCTTCTCGTGCAG	144pb	L23961	Navarrete-Santos <i>et al.</i> , 2004
	Rv-5'ATGGATCATTGATGGCGACAACAT			
OCT4	Fw - 5'CGAGTGAGAGGCAACTTGG	125pb	NM_001099957	Mamo <i>et al.</i> , 2008
	Rv - 5' CGGTTACAGAACCACACACG			
SOX2	Fw - 5' AGCATGATGCAGGAGCAG	104pb	NM_003106	Wang <i>et al.</i> , 2007
	Rv - TCACTACTCTGGGACTGGGA			

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

Para cada gen de estudio, se elaboró una mezcla de 1µL del cebador *Forward*, 1µL del cebador *Reverse* y 5µL SYBR Green (Faststart Essential DNA Green Master, Roche) por cada muestra. En cada pocillo se añadieron 7µL de la mezcla y 3µL de la muestra de cDNA, realizando duplicados para cada muestra y para cada gen.

La placa se cubrió con un film y se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real en LightCycle 96 de Roche Life Science con el programa mostrado en la *Tabla 5*.

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

Tabla 5. Programa qPCR.

Tras la obtención de los resultados, se realizó la cuantificación de los niveles relativos de expresión génica según los cambios en los niveles de expresión con respecto del gen de referencia GADPH usando la ecuación descrita en Roche Applied Science, 2001. Technical note No. LC 13. Roche Diagnostic GmbH (*Ecuación 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. Cuantificación de los niveles relativos de expresión génica (*N*) siendo *E_f* la eficiencia de los cebadores y *Ct* el valor obtenido en la qPCR.

3.13. Análisis proteómico

Para determinar la composición proteica de los hidrogeles producidos a partir de matriz oviductal, 3 muestras de cada tipo de hidrogel de matriz oviductal procedentes de 3 hembras diferentes cada una de ellas, fueron enviadas a la Sección de Proteómica del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental de la Universitat de València para ser analizadas.

Se combinaron 50µL de cada solución de partida con 50µL de tampón de lisis del kit EasyPep Mini MS Sample Prep Kit (Thermo Fisher). Se cuantificaron 5µL de la mezcla con Qubi (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. A continuación, se prepararon aproximadamente 20 µg de cada muestra para ser analizada mediante SDS PAGE-1D. A cada muestra se añadió tampón Laemmli con mercaptoetanol y fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó usando Any KD (Bio-Rad) a 200V durante 5 minutos. El gel se fijó con etanol al 40% y ácido acético al 10% durante una hora. Se tiñó con Coomassie coloidal (Bio-Rad) durante una hora y se destiñó con H₂O milliQ.

Cada muestra fue digerida con tripsina de grado de secuenciación Promega como se describe en el protocolo de Shevchenko *et al.* (1996). Cada muestra fue digerida con 500ng de tripsina y la digestión fue detenida con ácido trifluoroacético con una concentración final del 10%. Los geles fueron deshidratados con acetonitrilo puro y las nuevas soluciones peptídicas fueron combinadas con sus correspondientes SNs. Las mezclas peptídicas se secaron y fueron resuspendidas en 20µL de acetonitrilo al 2% y trifluoroacético al 0.1%.

Para la cromatografía, 2µL de cada mezcla de péptidos digeridos se cargaron en una columna (3 µL C18-CL, 350mm x 0.5mm; Eksigent) junto con TFA al 0.1% a 5

$\mu\text{L}/\text{min}$ durante 3 min en un sistema nanoLC 425 (Eksigent). Las cargas fueron aleatorias para evitar sesgos en el análisis. A continuación, los péptidos se eluyeron en una columna analítica (3 μL C18-CL 120 Å, 0.075 x 150 mm; Eksigent) equilibrada con acetonitrilo al 5% y 0.1% de ácido fórmico (FA). La elución se realizó con un gradiente lineal del 7% al 40% B en 45 min (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) para un caudal de 300nl/min. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qQTOF (6600plus TripleTOF, SCIEX). La muestra se ionizó en Optiflow < 1 μL Nano aplicando 3.0kV al 200°C. El TripleTOF se operó en modo Swath, en el que se realizó un barrido TOF MS de 0.050-s desde 350-1250m/z. El producto ionizado fue escaneado en 100 rangos diferentes de 400 a 1250m/z durante todo el experimento, siendo el tiempo total del ciclo de 2.79s.

Para la cromatografía líquida y la espectrometría de masas, los péptidos se cargaron en una columna (columna Lc, Luna Omega 3 μm Polar C18, 150mm x 0.3 mm, Capillary Phenomenex) y se analizaron en un espectrómetro micro ESI qQTOF (TripleTOF 6600plus, AB SCIEX).

Para la cuantificación de las proteínas los archivos resultantes fueron analizados con Peak View 2.1 (Sciex) con una biblioteca de espectros generada por la digestión del gel. Los péptidos compartidos y modificados fueron excluidos del análisis. Las diferentes muestras se alinearon utilizando los péptidos de las proteínas principales. Los ajustes utilizados para la selección de péptidos fueron: 20 péptidos por proteína; 6 transiciones por péptido; 95% “Peptide Confidence Threshold” y 1% “False Discovery Rate Threshold”.

3.14. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS versión 25.0. No se aplicó ningún criterio de exclusión de datos. Se realizaron análisis exploratorios previos en todos los casos. Se fijó el p-valor en 0.05 y, por lo tanto, un intervalo de confianza del 95%.

3.14.1. Análisis desarrollo embrionario

Para el análisis del desarrollo embrionario tras 72 horas de cultivo se utilizó un modelo lineal generalizado de respuesta binaria (1 determinando el éxito y 0 fracaso), estableciendo como variable dependiente la llegada no a estadio de mórula o blastocisto, según el análisis, y como efectos fijos el tipo de medios de cultivo e hidrogeles utilizados y su interacción.

3.14.2. Análisis supervivencia *in vivo*

La tasa de supervivencia *in vivo* se evaluó con respecto al número de embriones transferidos. Se utilizó un modelo lineal generalizado de respuesta binaria (1 determinando el éxito “nacido” y 0 “no nacido”), estableciendo como variable dependiente el número de nacidos y como efecto fijo el grupo en el que se habían cultivado los embriones.

3.14.3. Análisis desarrollo postnatal

En cuanto al desarrollo postnatal, se analizaron los pesos al nacimiento y al destete (4ª semana). Se utilizó un modelo mixto lineal utilizando como variable dependiente el peso de los individuos, el grupo de cultivo como efecto fijo, la hembra receptora como efecto aleatorio y el número de nacidos totales (vivos y muertos) como covariable. A partir de la 4ª semana la covariable utilizada fue el número de gazapos destetados.

3.14.4. Análisis expresión génica

Para el análisis de la expresión génica en primer lugar se cuantificaron los niveles de expresión génica utilizando la fórmula descrita anteriormente (*Ecuación 1*). Los datos no mostraban una distribución normal por lo que se realizó una transformación arco tangente de los datos y se analizaron con una prueba ANOVA a una vía, definiendo como efecto fijo el grupo de cultivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del medio de cultivo, tipo de hidrogel y cultivo de ROECs

4.1.1. Desarrollo *in vitro*

Los embriones cultivados en medios en los que se utilizó medio ET (DMEM/HAM'S F-12) suplementado con piruvato y lactato sódico para favorecer el desarrollo de embriones tempranos alcanzaron mayores tasas de desarrollo hasta el estadio de mórula y blastocisto tras 72h de cultivo que el mismo medio suplementado además con EFG e ITS (*Tabla 6*).

Medio de cultivo	N	Mórula		Blastocisto	
		lsm.	± s.e.	lsm.	± s.e.
ET	546	0.52	± 0.021 ^a	0.17	± 0.017 ^a
EP	296	0.25	± 0.032 ^b	0.00	± 3.224 ^b
Total	842				

Tabla 6. Efectos de los diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto. ET: medio suplementado con piruvato y lactato sódico; EP: medio ET suplementado con EGF e ITS. Se muestran el número de embriones valorados (N), las medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsm.) y el error estándar (s.e.) de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de mórula y blastocisto.

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

En un estudio realizado por Das *et al.* (2014) en embriones de porcino en los que utilizan diferentes concentraciones de ITS (insulina-transferrina-selenio), demostraron que niveles del 1% (v/v) mejoraban el desarrollo embrionario de esta especie, alcanzando la tasa de blastocisto el 45.3% frente a un 27.1% en el control. Los autores sugieren que el ITS podría reducir el nivel intracelular de ROS y con ello favorecer el desarrollo embrionario. Los resultados de este estudio muestran que la suplementación con ITS en embriones de conejo y con el medio y condiciones de cultivo ensayadas reduce notablemente el desarrollo embrionario. No obstante, es necesario indicar que en el estudio de Das *et al.* (2013), el cultivo embrionario se desarrolló tras una fecundación *in vitro* en la que los ovocitos fueron cultivados en el mismo medio, por lo que la suplementación con ITS podría ser beneficiosa para los ovocitos antes que para el desarrollo embrionario. Además, en nuestro estudio el medio EP también fue suplementado con EGF por lo que sería conveniente evaluar si este efecto es debido a la utilización conjunta, a una concentración inadecuada de ITS o a las condiciones de cultivo y su interacción con este suplemento (temperatura y composición de la atmósfera).

Carney & Foote (1991) cultivaron embriones de conejo de 20-22h durante 65h en medio DMEM suplementado con EGF, ITS e insulina a 39.0°C y 5% CO₂, no observando diferencias significativas en el porcentaje de desarrollo a blastocisto, que fue un 59% cuando se utilizan EFG + ITS y de un 61% y 65% cuando se utilizan solos (ITS y EGF respectivamente) frente al 68% del medio DMEM suplementado tan solo con piruvato y lactato. La inclusión de insulina tampoco mejoró las tasas de desarrollo. Como se puede observar, las tasas de desarrollo alcanzados en el estudio de Carney y Foote (1991) fueron notablemente mayores a las obtenidas en nuestro estudio, ello podría ser debido al tratamiento con las hembras donantes para superovular. En el trabajo de Carney y Foote (1991) se utiliza un tratamiento en el que la tasa de superovulación obtenida apenas supera dos veces la tasa de ovulación normal de unas conejas, mientras que el utilizado en este trabajo cuadruplica, al menos, la tasa de ovulación (Viudes de Castro *et al.*, 2017 y 2019). Además, otra diferencia es la temperatura de cultivo, Mas (2019) observó que 1.5°C de diferencia en la temperatura de cultivo daba lugar a una diferencia en el desarrollo a blastocisto de en torno a un 40% tras 96h de cultivo a partir de embriones de 2 células.

Recientemente Wang *et al.*, (2021) diseñaron un medio para el cultivo de embriones de conejo superovulados con eCG de 20-22h, obteniendo unas tasas de desarrollo a blastocisto de 52.6% tras 96h de cultivo, la duración del periodo de cultivo 24 horas más y 0.5°C en la temperatura de cultivo (38.5°C) explicarían la diferencia de desarrollo observadas con respecto a nuestro trabajo. Además, los autores sugieren un efecto positivo si se renueva parcialmente el medio de cultivo a las 72h con el fin de disminuir la presencia de ROS y alcanzar tasas superiores.

Con respecto los hidrogeles utilizados, colágeno y matriz oviductal, junto con el cultivo de ROECs. Los embriones cultivados en hidrogel COL alcanzaron tasas similares al control sin hidrogel (*Tabla 7*). Sin embargo, las tasas de desarrollo a blastocisto en el grupo COL fueron de 0.05 ± 0.016 , significativamente menores que en el control, que fueron de 0.25 ± 0.025 . Por su parte, las tasas de desarrollo de los grupos cultivados en hidrogel MOV son significativamente más bajas con respecto a los otros dos grupos tanto en el desarrollo hasta mórula como a blastocisto como se muestra en la *Tabla 7*.

Hidrogel	N	Mórula			Blastocisto		
		lsm.	±	s.e.	lsm.	±	s.e.
COL	275	0.42	±	0.034 ^a	0.05	±	0.016 ^a
MOV	249	0.24	±	0.041 ^b	0.00	±	0.439 ^a
control	318	0.50	±	0.028 ^a	0.25	±	0.025 ^b
Total	842						

Tabla 7. Efecto de los diferentes tipos de hidrogel junto con el cultivo de ROECs sobre el desarrollo embrionario hasta los estadios de mórula y blastocisto. COL: hidrogel de colágeno; MOV: hidrogel de matriz oviductal; control: grupos en los que no se utilizó hidrogel ni cultivo de ROECs. Se muestran el número de embriones valorados (N), las medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsm.) y el error estándar (s.e.) de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de mórula y blastocisto.
^{a, b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas

Estudios similares realizados por Francés Herrero *et al.* (2021) en los que se han cultivado embriones de conejo sobre hidrogeles desarrollados a partir de matriz de oviductos 72h post-ovulación muestran resultados diferentes. El desarrollo embrionario desde 2 células hasta mórula tardía/blastocisto fue similar en el control y en el cultivo realizado en un *coating* de hidrogel de matriz oviductal alcanzando tasas del 95.9% tras 48h de cultivo. Sin embargo, las condiciones con respecto a nuestro estudio fueron diferentes: los parámetros de incubación fueron de 38.5°C y 7% CO₂ y el medio utilizado fue SAGE 1-Step de Cooper Surgical, específico para embriones humanos. Además, el tratamiento de las placas con el hidrogel se realizó añadiendo la solución de pre-gel a las placas y retirando el sobrenadante tras incubación a 4°C durante toda la noche, resultando en un *coating*, en lugar de un soporte como tal. Estos cambios pueden sugerir que mayores cantidades de hidrogel y por lo tanto de matriz extracelular puedan ser perjudiciales para el desarrollo embrionario (toxinas derivadas del proceso de hidrólisis proteica para la obtención del hidrogel), mientras que cantidades menores podrían evitar este efecto y aprovechar algunos de los componentes extracelulares que sean necesarios para el desarrollo. Además, debe tenerse en cuenta la presencia de las células epiteliales, sus secreciones y la posible transformación de los hidrogeles durante el cultivo.

En otras especies como porcino en las que también se han desarrollado cultivos 3D de hidrogel de alginato suplementados con factores de la matriz extracelular, se muestran tasas de supervivencia embrionarias de 50.0% - 62.5%, similares a los medios de cultivo tradicionales (55.6%) (Miles *et al.*, 2017). Sin embargo, la naturaleza química del hidrogel de alginato y el hecho de que, en ninguno de estos estudios el cultivo

embrionario se realizó junto con células oviductales hace difícil su comparación con el actual estudio.

Con respecto al co-cultivo con células epiteliales oviductales, un estudio análogo fue realizado Carney *et al.* (1990) donde realizaron un experimento con embriones de conejo de 2 células durante 5 días (120h) con y sin cultivo de ROECs procedentes de lavado oviductal en medio Basal Synthetic Medium II (BMS-II). El 77-93% de embriones alcanzaron el estado de blastocisto, valores similares al control, donde lo alcanzaron el 90% de embriones. Recientemente, Mas (2019) observó que el cultivo de embriones sobre ROECs que habían sido cultivadas sobre placas Nunc tratadas con gelatina para favorecer su adherencia, proporcionaban un mayor porcentaje de desarrollo a blastocisto (85% frente al 62% del control sin ROECs tras 96h de cultivo).

Estudios más recientes realizados en bovino, demuestran que el cultivo epitelial suplementado con ITS elimina sustancias embriotóxicas como el amoníaco y reduce los niveles de glucosa e iones perjudiciales para el embrión (Ulbrich *et al.*, 2010; Maillo *et al.*, 2016). En humano, el cultivo de células epiteliales oviductales estimula el desarrollo embrionario secretando factores de crecimiento como *epidermal grow factor* (EGF), vascular *endotelial growth factor* A, C y D (VEGFA, FEGF-C y VEGF-D) y *insulin-like growth factor* I y II (IGF-I y EGFII) produciendo tasas de desarrollo hasta blastocisto de 65% (Vithoulkas *et al.*, 2017). Por lo que es probable que, en la composición de los hidrogeles, su modificación por la proliferación de células oviductales o la actividad metabólica y secretora de las células en presencia de los hidrogeles liberen sustancias de carácter embriotóxico (como por ejemplo amonio) que reduzcan la capacidad de desarrollo de los embriones de conejo.

Con respecto a la interacción entre los diferentes factores utilizados que podemos ver reflejada en las *Figuras 5 y 6*, los embriones obtenidos tras 72h de cultivo en los diferentes grupos en los que se usó medio ET junto con los distintos hidrogeles y el cultivo de ROECs, alcanzaron el estadio de mórula con tasas de 52% en el grupo (ET + COL) y 55% (ET + MOV) sin mostrar diferencias significativas con respecto al control con medio ET. Sin embargo, en el desarrollo hasta blastocito sí que se registraron diferencias entre los grupos en los que se ha utilizado hidrogel: ET COL y ET MOV, con tasas de 37% y 25%, respectivamente, presentando valores significativamente más bajos que el control, que alcanzó una tasa de 37% de desarrollo a blastocisto.

Los grupos en los que se usó medio EP, el desarrollo hasta mórula fue alcanzado por un 32% de embriones en el caso del cultivo sobre hidrogel de colágeno (EP + COL) y un 6% sobre hidrogel de matriz oviductal (EP + MOV), mientras que el control formado exclusivamente por medio EP mostró valores del 50%, sin diferencias significativas con respecto a los grupos mencionados anteriormente en los que se había utilizado medio ET. El desarrollo a blastocisto registró tasas muy bajas en estos grupos con un 3% en el grupo de hidrogel de colágeno (EP + COL) mientras que el grupo de hidrogel de matriz oviductal (EP + MOV) la tasa fue cero. El control formado únicamente con medio EP registró tasas de desarrollo a blastocisto de 17%, que, aunque son significativamente superiores al resto de grupo, no alcanzaron la tasa de control ET.

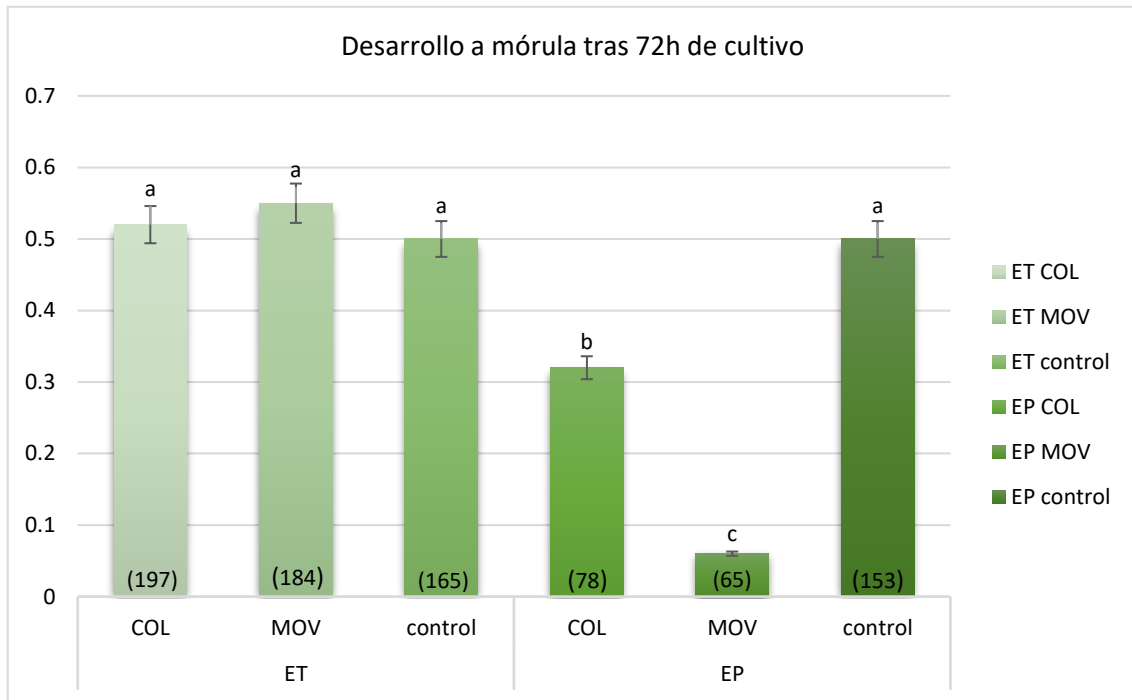


Figura 5. Efectos de los distintos medios de cultivo, hidrogeles y cultivo de ROECs sobre el desarrollo de embriones tras 72h de cultivo. ET COL: medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; ET control: control de medio ET; EP COL: medio ET suplementado con EGF e ITS (medio EP), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial; EP MOV: medio EP, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; EP control: control de medio EP. Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados, el error estándar de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de mórula y número de embriones valorados (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

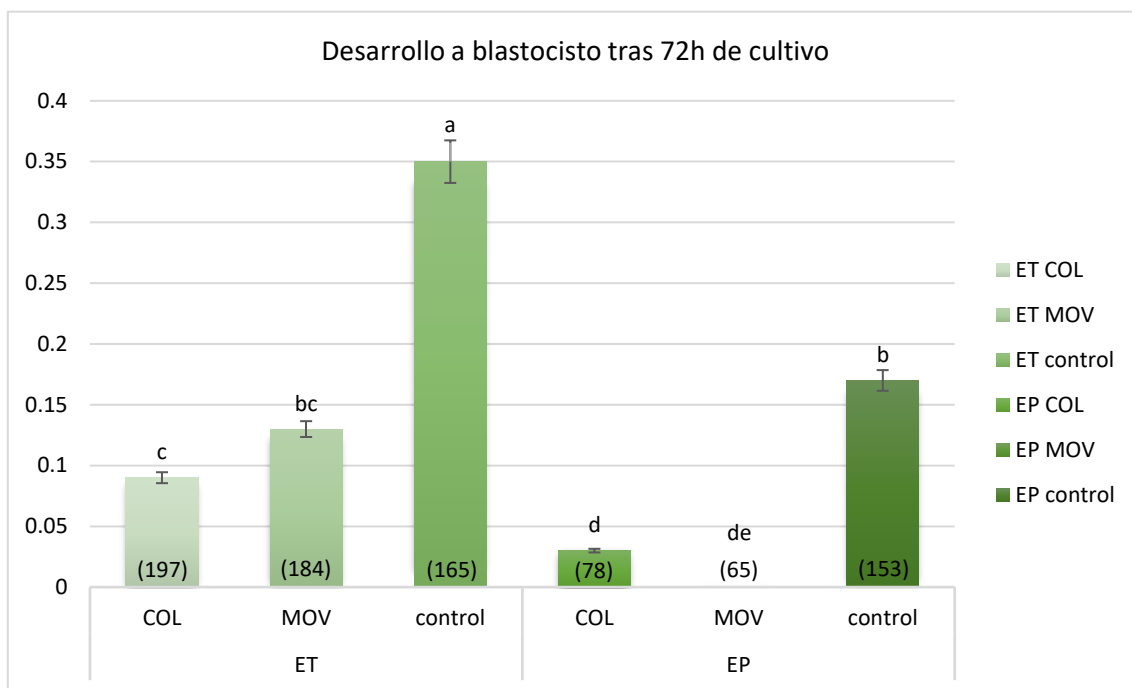


Figura 6. Efectos de los distintos medios de cultivo, hidrogeles y cultivo de ROECs sobre el desarrollo de embriones tras 72h de cultivo. ET COL: medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; ET control: control de medio ET; EP COL: medio ET suplementado con EGF e ITS (medio EP), hidrogel de colágeno y cultivo epitelial; EP MOV: medio EP, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial; EP control: control de medio EP. Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados, el error estándar de las tasas de embriones que han alcanzado el estadio de blastocisto y número de embriones valorados (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Los resultados mostraron que el desarrollo embrionario al estadio de mórula se vio beneficiado en los grupos controles sin hidrogeles ni cultivo de ROECs así como en los grupos en los que se ha utilizado el medio ET combinado con los distintos hidrogeles. Sin embargo, el desarrollo a blastocisto se ve favorecido principalmente en los grupos donde se utilizó únicamente medio ET, mientras que el grupo control con medio EP, muestra tasas de desarrollo a blastocisto superiores al resto, aunque no tan elevadas como el control con medio ET. Estos resultados sugieren que la presencia de ITS, así como EGF ya sean añadidos al medio o producidos por el cultivo de ROECs no aportan mejoras para el desarrollo embrionario, siendo sus resultados peores cuando se utilizan en presencia de hidrogeles cultivados con células oviductales.

4.1.2. Desarrollo *in vivo* y crecimiento postnatal

El efecto de los diferentes medios de cultivo sobre la supervivencia embrionaria *in vivo* mostró diferencias significativas en los diferentes grupos experimentales utilizados con respecto al control de transferencia, donde se alcanzó una tasa de individuos nacidos del 32%. Este último resultado es bajo en relación con trabajos anteriores en los que se alcanzan niveles en torno al 50% con embriones de conejas superovuladas con FSH-CTP (Viudes *et al.*, 2017 y 2019), lo que podría indicar que la calidad embrionaria de este lote o grupo de conejas utilizado para este experimento es algo menor de lo habitual.

Los embriones cultivados en el medio ET sobre ROECs con hidrogel de matriz oviductal (ET+MOV), obtuvieron una viabilidad al parto de 19%, significativamente mejor que con el grupo en el que se utilizó hidrogel de colágeno y el medio EP. Mientras que presentó una viabilidad similar al grupo cultivado con el medio control ET (Figura 7).

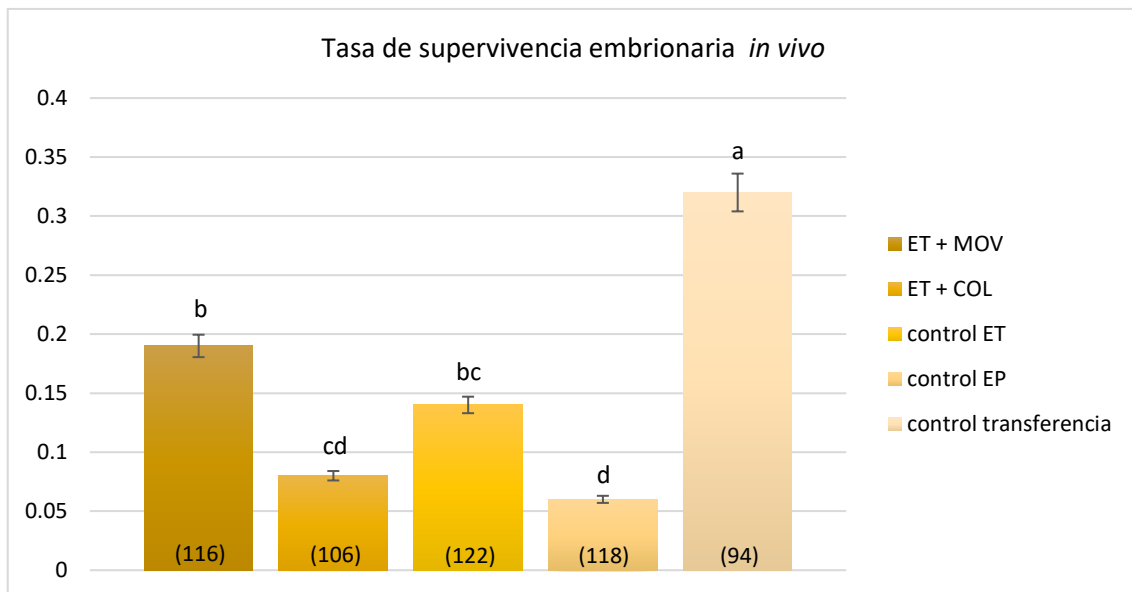


Figura 7. Efecto de los distintos medios de cultivo sobre la tasa de supervivencia tras la gestación. ET + MOV: medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio EP), hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal; ET + COL: medio ET, hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; control ET: control de medio ET; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS (medio EP); control transferencias: control de transferencias. Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados, el error estándar de las tasas de nacidos con respecto a las transferencias realizadas y el tamaño muestral (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Los resultados muestran que, aunque no se alcanzaron las tasas de supervivencia del grupo control de transferencia, sorprendentemente los embriones seleccionados de los cultivados en ET + MOV, tienen la misma capacidad para implantar y desarrollarse *in vivo* que los del medio de control ET, a pesar de que el porcentaje de blastocistos *in vitro* es menor. Los resultados *in vivo* de los otros dos grupos que fueron cultivados en ET + COL y en medio EP son coherentes con las evaluaciones realizadas *in vitro*, en el que estos grupos mostraron menores tasas de desarrollo.

Aunque apenas existen precedentes en cuanto a transferencias embrionarias en conejo tras 72h de cultivo embrionario, Carney *et al.* (1990) realizaron transferencias embrionarias en conejo tras 65 horas de co-cultivo con células epiteliales oviductales en medio M199. Sin embargo, el número de embriones transferidos fue de 70 embriones aproximadamente para cada grupo, de los que solamente entre 10 - 13% sobrevivieron.

Esta reducción de la supervivencia embrionaria debido al manejo de los embriones durante la recuperación y transferencia fue descrita por Saenz-de-Juano *et al.* (2016). En un estudio con embriones de conejo de 72 horas, las tasas de supervivencia gestacional se redujeron de 0.79 ± 0.040 a 0.66 ± 0.056 respecto al control. Aunque los resultados son más favorables que los obtenidos en el presente trabajo, probablemente esto se deba en primer lugar a que los embriones de 24 horas utilizados en nuestro estudio son más sensibles al estrés de la recuperación, lavado y cultivo que los del estudio comentado, ya que eran de 72 horas y no fueron cultivados, si no que únicamente fueron transferidos. Además de que en el estudio citado las donantes no recibieron un tratamiento de superovulación, mientras que la coriofolitropina- α de larga duración utilizada en nuestro estudio, tiene un efecto negativo sobre la calidad ovocitaria (Pérez-García, 2018) y la viabilidad de los embriones y por lo tanto lo tendrá en la implantación y posterior supervivencia embrionaria (Viudes *et al.*, 2017 y 2019).

Con respecto a los pesos al nacimiento (*Figura 8*), en los grupos en los que se utilizó hidrogel: ET + COL y ET + MOV, los pesos registrados (54.8 ± 8.00 g y 60.4 ± 6.26 g, respectivamente) no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles de inseminación artificial (50.7 ± 3.47 g), transferencia (66.41 ± 4.87 g) y medio ET (60.7 ± 6.32 g). Sin embargo, el grupo en el que se utilizó medio EP, los gazapos mostraron pesos significativamente mayores con respecto al resto, con una media de 86.807 ± 8.162 g.

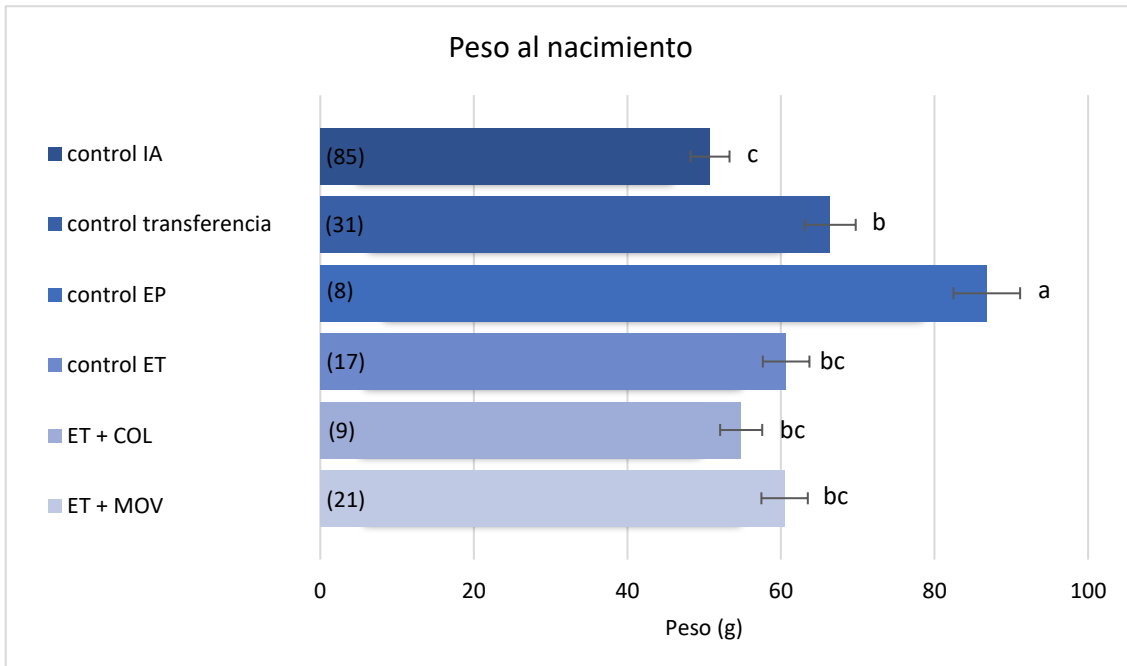


Figura 8. Efecto de los distintos medios de cultivo utilizados sobre el peso al nacimiento (g) de los gazapos. IA: control de inseminación; control transferencia: control de transferencias; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS; control ET: control de medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET); ET+COL: medio ET, hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET+MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal. Se muestra la media ajustada por mínimos cuadrados, el error estándar del peso (g) de cada grupo y el número de gazapos medidos (N).
^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

El desarrollo postnatal tras realizar técnicas de reproducción asistida ha sido analizado en experimentos de vitrificación de embriones de conejo por Marco-Jiménez *et al.* (2020). Se registraron pesos al nacimiento de $56.0 \pm 0.79\text{g}$ en el grupo control de transferencia, significativamente mayor al peso registrado en el grupo control de IA, de $53.0 \pm 1.24\text{g}$. Los embriones que habían sido vitrificados alcanzaban un peso al nacimiento significativamente mayor a los dos controles, siendo este de $59.5 \pm 0.87\text{g}$. Los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren efectos similares para el medio EP, medio que disponía de suplementos específicos para favorecer la proliferación celular.

En los pesos al destete tomados en la cuarta semana, al igual que en el peso al nacimiento, solo se observaron diferencias significativas en el grupo control con medio EP, donde los pesos fueron superiores al resto de grupos (*Figura 9*).

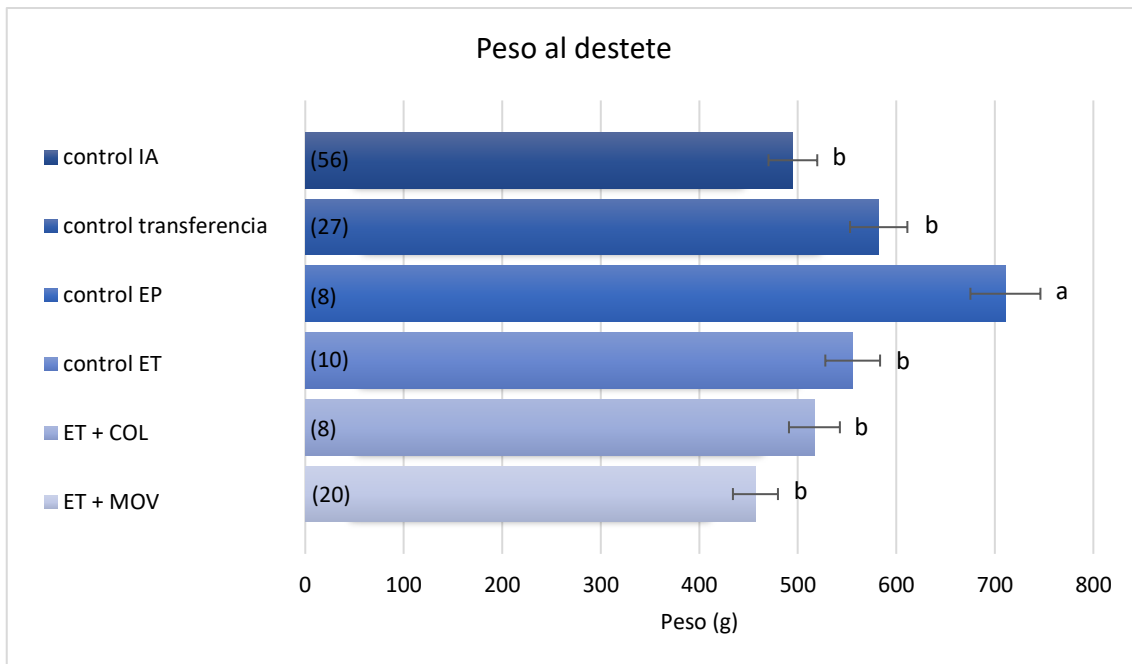


Figura 9. Efecto de los distintos medios de cultivo utilizados sobre el peso al destete (g) de los gazapos. IA: control de inseminación; control transferencia: control de transferencias; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS; control ET: control de medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET); ET+COL: medio ET, hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET+MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal. Se muestra la media ajustada por mínimos cuadrados, el error estándar del peso (g) de cada grupo y el número de gazapos medidos (N).

^{a,b}Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

En nuestro experimento, tanto en los pesos al nacimiento como a las cuatro semanas de edad, el grupo que se desarrolló en medio de cultivo EP muestra pesos significativamente mayores al resto de grupos. Este incremento en el peso puede estar asociado a cambios epigenéticos producidos durante el desarrollo embrionario a causa del estrés que generan las técnicas de reproducción como se ha comprobado en especies como bovino, ovino, ratón o humano (Ramos-Ibeas *et al.*, 2018). Estos hechos también han sido estudiados en conejo por García-Domínguez *et al.* (2019 y 2020), donde el estrés producido por las técnicas de reproducción asistida muestra la plasticidad fenotípica que se da en el desarrollo embrionario, manifestado en variaciones de metilación de ADN, así como cambios metabolómicos y proteómicos que derivan en alteraciones en el metabolismo de lípidos y apoptosis génica, relacionados posiblemente con el aumento de peso en estos grupos de individuos. Sin embargo, no se observó en el resto de los grupos de cultivo por lo que el cultivo en presencia de EGF y/o ITS podría favorecer modificaciones en el patrón de expresión génica de IGFs como IGF-I con efectos en el desarrollo postnatal. No obstante, los resultados deben tomarse con cautela debido a la baja supervivencia obtenida.

Se analizaron también los pesos en la semana 7 y la semana 16. Como se puede observar en la *Tabla 8*, los pesos mostraron diferencias significativas fundamentalmente con los gazapos nacidos de IA, ello podría confirmar que el cultivo y la transferencia embrionaria, así como otras técnicas de reproducción asistida, introducen cambios epigenéticos que alteran a largo plazo el crecimiento postnatal como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, estos datos deben considerarse como preliminares para futuros ensayos dado el tamaño muestral.

GRUPO	Semana 7			Semana 16*		
	N	lsm.	± s.e.	N	lsm.	± s.e.
ET + MOV	19	1222	± 46.9 ^{ac}	2	3650	± 180.9 ^{ac}
ET + COL	8	1294	± 72.9 ^{acd}	0		
control ET	7	1268	± 81.2 ^{ace}	4	3695	± 156.5 ^a
control EP	8	1418	± 87.2 ^{ac}	5	3390	± 189.2 ^{abd}
control transferencia	27	1221	± 41.9 ^{bcd}	9	3283	± 83.6 ^{bc}
control IA	52	1095	± 33.8 ^e	17	3205	± 90.2 ^b
TOTAL	121			37		

Tabla 8. Efecto de los distintos medios de cultivo y controles utilizados sobre el peso (g) de los individuos en las semanas 7 y 16. IA: control de inseminación; control transferencia: control de transferencias; control EP: control de medio ET suplementado con EGF e ITS; control ET: control de medio suplementado con piruvato y lactato sódico (medio ET); ET+COL: medio ET, hidrogel de colágeno y cultivo epitelial oviductal; ET+MOV: medio ET, hidrogel de matriz oviductal y cultivo epitelial oviductal. Se muestra la media ajustada por mínimos cuadrados, el error estándar del peso (g) de cada grupo y el número de gazapos medidos (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

*No todos los animales alcanzaron la edad de 16 semanas al finalizar el experimento.

4.2. Efecto de los medios de cultivo condicionados

4.2.1. Desarrollo in vitro

Los embriones desarrollados en medios de cultivo condicionados con cultivo epitelial oviductal procedente de oviductos de 48h y 72h tras la ovulación no mostraron diferencias significativas en el desarrollo hasta el estadio de mórula, alcanzando tasas de 51% y 52% respectivamente con respecto al control, donde se obtuvieron tasas de 67%. Sin embargo, el cultivo con medio condicionado de oviductos de 72h sí que presentó una tasa de desarrollo hasta blastocisto del 17%, significativamente menor que los grupos de 48h y control, donde las tasas fueron de 35% y 42%, respectivamente.

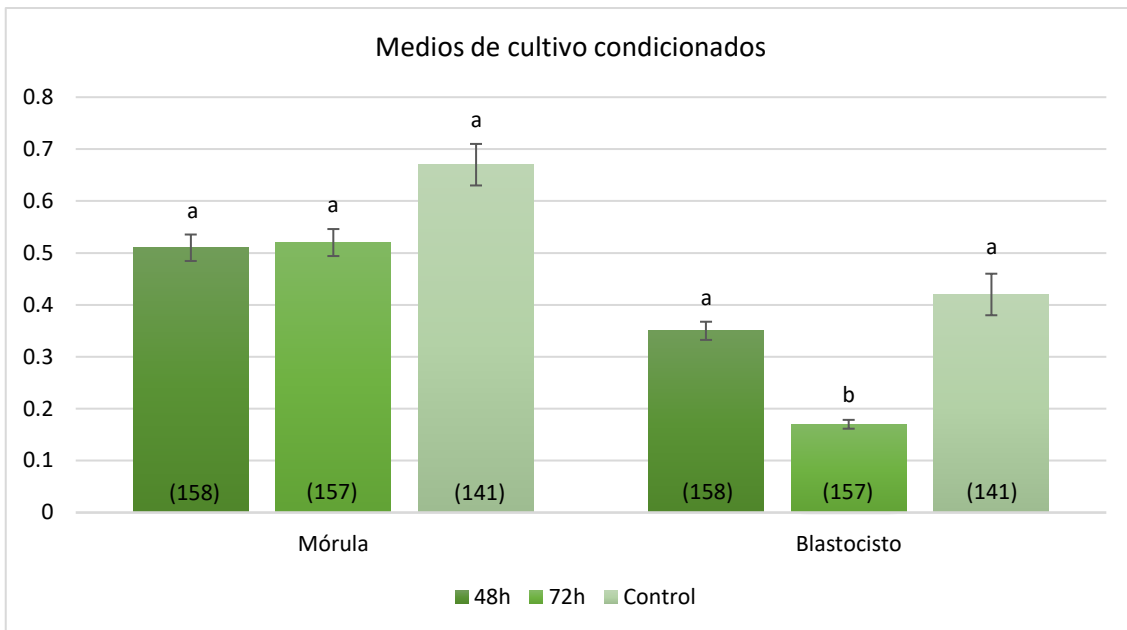


Figura 10. Efecto de distintos medios de cultivos condicionados sobre el desarrollo de embriones tras 72h de cultivo. Por orden: medio condicionado con oviductos de 48h (48h); medio condicionado con oviductos de 72h (72h); medio suplementado con piruvato y lactato sódico (control). Se muestran las medias ajustadas por mínimos cuadrados y el error estándar de las tasas de embriones de cada grupo que han alcanzado el estadio de mórula y blastocisto. El número de embriones se muestra entre paréntesis (N).

^{a,b} Diferentes superíndices muestran diferencias significativas.

Aunque apenas existan estudios similares con esta especie, los resultados mostraron datos comparables a experimentos con medios condicionados que han sido realizados en especies como bovino, ovino o porcino principalmente. En el caso de bovino, los cultivos condicionados con epitelio oviductal muestran tasas de desarrollo de a blastocisto de 24% en embriones desarrollados por fecundación *in vitro* tras 8 días de cultivo (Grisart *et al.*, 1994).

En ovino, Mermillod *et al.* (1993) elaboraron un medio de cultivo condicionado cultivando células epiteliales oviductales procedentes de oviductos de hembras de la misma especie sin sincronizar durante cuatro días en medio TCM199. Los embriones cultivados en este medio demostraron una mejora del desarrollo alcanzando tasas de desarrollo a blastocisto de 50%, frente a un 16% en el control. Además, tras la transferencia de estos embriones se alcanzaron tasas de implantación del 31%.

Estudios más recientes realizados por Fang *et al.* (2022) en porcino muestran una mejora en las tasas de desarrollo a blastocisto de embriones cultivados sobre epitelios oviductales, 40.8% frente a un 24.9% en el control. Además, se detectaron niveles inferiores de especies reactivas del oxígeno y de contenido lipídico en blastocisto, así

como de apoptosis celular en los grupos con medio cultivo condicionado respecto al control. Estos parámetros están relacionados con la calidad y desarrollo embrionario por lo que podemos suponer que la presencia de factores de crecimiento y metabolitos secretados por el epitelio oviductal podrían incrementar la calidad y el desarrollo del embrión. Hecho que no ha sido posible observar en el cultivo de embriones de conejo en este experimento.

4.2.2. Cuantificación de la expresión génica

La expresión del gen SOX2 se da principalmente en las primeras etapas del desarrollo embrionario, manteniendo la pluripotencialidad de las células del epiblasto que posteriormente darán lugar a la formación del ectodermo neural por lo que los niveles comienzan a decrecer en la etapa de blastocisto (Avilion *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). No se obtuvieron resultados de expresión para ninguno de los tres grupos por lo que podemos suponer que no se alcanzó un desarrollo embrionario suficiente para poder detectar su expresión en los distintos medios de cultivo.

En el caso del gen OCT4, la sobreexpresión de este se encuentra asociada a células que darán lugar a la formación del endodermo y mesodermo (Wang *et al.*, 2007) y aunque en ese caso sí que se observa su expresión, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Es necesario resaltar que los Cts obtenidos para el gen *housekeeping* GAPDH y OCT4 son especialmente altos (24 - 38), que reflejan poca cantidad de ARNm obtenido de las muestras y su baja calidad (mezclas de 15 - 20 embriones en estadio mórula-blastocisto temprano). No obstante, los resultados son coherentes tanto con los obtenidos *in vitro* en el presente trabajo (un desarrollo relativamente bajo a blastocisto) como con anteriores trabajos en los que se evaluó la expresión génica sobre embriones cultivados 96h y mayores tasas de blastocistos (Mas, 2019) o sobre blastocistos obtenidos a partir del cultivo o transferencia de mórulas (Saenz-de-Juano *et al.*, 2011; Vicente *et al.*, 2013).

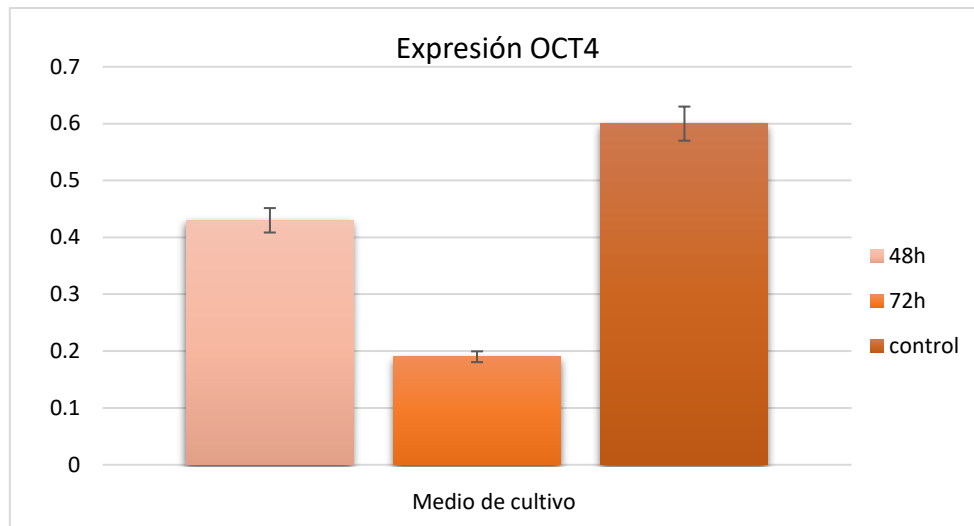


Figura 11. Tasas de expresión génica del factor de transcripción OCT4 en los diferentes tipos de medios de cultivo condicionados: 48h, 72h y medio suplementado con piruvato y lactato sódico (control).

4.3. Análisis proteómico de los hidrogeles

De las 9 muestras analizadas, se cuantificaron un total de 209 proteínas que fueron clasificadas según su función principal en: estructurales, metabólicas, enzimáticas, inmunológicas y de transporte. No se detectó el tipo de proteína ni su función en un 5% de los casos. Las muestras de los tres grupos de hidrogeles mostraron homogeneidad para la mayoría de las proteínas, solamente se encontraron diferencias significativas para 2 proteínas entre los hidrogeles de matriz oviductal de 24h con respecto a los grupos de 48h y 72h.

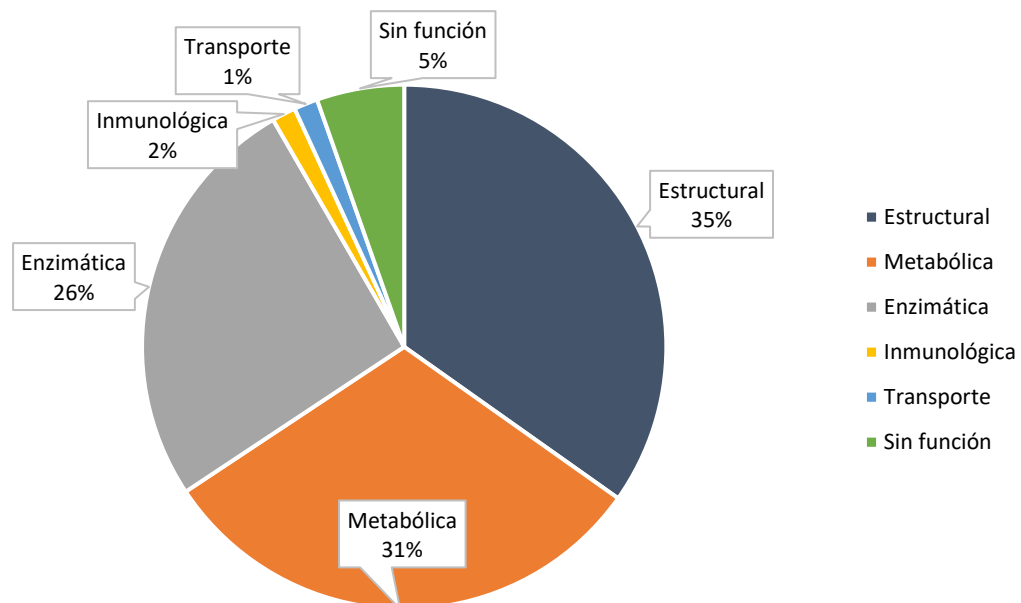


Figura 12. Proporciones del tipo de proteínas detectadas en el análisis proteómico de los hidrogeles de 24h, 48h y 72h analizados.

Los resultados mostraron mayor cantidad para las proteínas Laminin-subunit-beta-1 (ID: G1T7X6) y Nidogen-1 (ID: U3CX36) en el grupo de 24h con respecto al de 72h. La proteína Nidogen-1 se encarga de la unión entre las moléculas de laminina-1 y colágeno tipo IV formando parte del ensamblaje entre membranas (Pujuguet *et al.*, 2000). Por otro lado, la proteína Laminin-subunit-beta-1, sirve como ensamblaje para las distintas subunidades de laminina que forman parte de la matriz extracelular (Colognato & Yurchenco, 2000). Con respecto al grupo de 48h, solo se encontraron diferencias significativas con respecto a la proteína Nidogen-1, presentando también valores superiores en el grupo de 24h. A pesar de estas ligeras diferencias, los tipos y niveles de proteínas se mostraron homogéneos en los distintos tipos de hidrogeles, independientemente de la sincronización de los oviductos.

Se realizó un análisis clasificando las proteínas en diferentes subcategorías específicas de la matriz extracelular, clasificándolas en glicoproteínas, colágenos, proteoglicanos, proteínas asociadas a la matriz extracelular, proteínas reguladoras de la matriz extracelular, y factores de secreción. Las proteínas detectadas que no formaban parte de la MEC fueron clasificadas como “otros”.

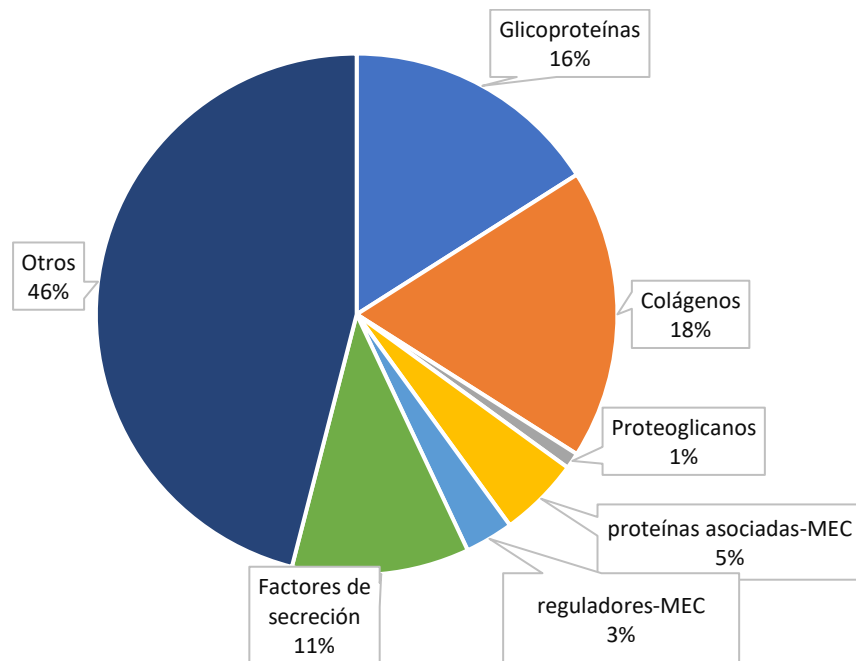


Figura 13. Proporciones de los subtipos de proteínas específicas de la matriz extracelular detectadas en el análisis proteómico de los hidrogeles de 24h, 48h y 72h.

En el estudio de Francés-Herrero *et al.* (2021) realizaron un análisis proteómico de hidrogeles formados a partir de matriz oviductal procedente de oviductos 72 horas post-ovulación frente a hidrogeles producidos a partir de oviductos sin descellularizar. Detectaron un total de 399 proteínas, siendo mayor el número de proteínas en los hidrogeles realizados a partir de oviductos sin descellularizar. Estos mostraron niveles superiores de proteínas metabólicas y enzimáticas, mientras que los formados por oviductos descellularizados mostraron un porcentaje mayor de proteínas estructurales de la MEC. Según estos resultados, la descellularización no elimina la fracción extracelular y queda presente en el hidrogel, sin embargo, no concuerda con nuestros resultados, ya que la fracción metabólica y enzimática es superior al porcentaje de proteínas estructurales.

Por otro lado, la clasificación en subcategorías realizada por el mismo estudio de Francés-Herrero *et al.* (2021) muestra en la mayoría de categorías un porcentaje similar al nuestro. Sin embargo, el porcentaje de colágenos que muestran es de 32%, siendo mucho mayor que en nuestro estudio, por lo que, a pesar de realizar el mismo protocolo para obtener los hidrogeles. Esta diferencia podría conducir a cambios estructurales o de conformación del hidrogel que deberían ser estudiados.

5. CONCLUSIONES

Los medios de cultivo *in vitro* desarrollados con hidrogel de colágeno e hidrogel formado a partir de matriz extracelular oviductal de 24h junto con el cultivo de ROECs, no generaron una ventaja en el desarrollo ni la viabilidad en los embriones de 24 horas con respecto a los medios tradicionales tras un cultivo de 72 horas. Los resultados obtenidos sugieren que la combinación de los hidrogeles junto con el cultivo con ROECs puede suponer un retraso en el desarrollo y viabilidad embrionaria.

Por otro lado, el cultivo *in vitro* de embriones en medios de cultivo condicionados con ROECs muestran mejores resultados en las tasas de viabilidad, comparables con estudios realizados previamente. La presencia de metabolitos y factores de crecimiento secretados por el cultivo epitelial en los medios condicionados, podrían suponer una ventaja en cuanto a la viabilidad embrionaria. Sin embargo, los análisis de expresión génica tras 72h de cultivo muestran una baja calidad del desarrollo embrionario.

Los embriones cultivados en el medio EP (suplementado con EGF e ITS) mostraron post-transferencia un crecimiento postnatal mayor que en el resto de los grupos, incluidos el control de inseminación y el de transferencia. A pesar de que el tamaño muestral es bajo, estos resultados sugieren que EGF e ITS podría haber modificado el metabolismo embrionario durante el cultivo con repercusiones en el desarrollo postnatal. En el resto de los grupos de cultivo no se observó diferencia alguna en el crecimiento postnatal cuando se comparó con los controles.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aldarmahi A. Establishment and characterization of female reproductive tract epithelial cell culture. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017; 5:105-110.
- Almiñana C, Heath PR, Wilkinson S, Sanchez-Osorio J, Cuello C, Parrilla I, Gil MA, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Fazeli A. Early Developing Pig Embryos Mediate Their Own Environment in the Maternal Tract. *PLoS ONE*. 2012; 7(3):e33625.
- Alviggi C, Conforti A, Carbone IF, Borrelli R, De Placido G, Guerriero S. Influence of cryopreservation on perinatal outcome after blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018; 51(1):54-63.
- Arias ME, Ross PJ, Felmer RN. Culture medium composition affects the gene expression pattern and in vitro development potential of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. *Biological Research*. 2013; 46:452-462.
- Áviles M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs?. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16:896-906.
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Pérez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003; 17(1):126-40.
- Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007; 261(5): 412-7.
- Brown BN, Buckenmeyer MJ, Prest TA. Preparation of decellularized biological scaffolds for 3D cell culture. *Methods Mol Biol*. 2017; 1612:15-27.
- Caballero JN, Gervasi MG, Veiga MF, Dalvit GC, Pérez-Martínez S, Cetica PD, Vazquez-Levin MH. Epithelial cadherin is present in bovine oviduct epithelial cells and gametes, and is involved in fertilization-related events. *Theriogenology*. 2014; 81(9):1189-206.
- Campo H, García-Domínguez X, López-Martínez S, Faus A, Vicente-Antón JS, Marco-Jiménez F, Cervelló I. Tissue-specific decellularized endometrial substratum mimicking different physiological conditions influences in vitro embryo development in a rabbit model. *Acta Biomaterialia*. 2019;89:126-138.
- Carney EW & Foote HR. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *J. Reprod. Fert*. 1991; 91:113-123.
- Carney EW, Tobback C, Ellington JE, Foote RH. Co-culture of Rabbit 2-Cell Embryos With Rabbit Oviduct Epithelial Cells and Other Somatic Cells. *Molecular Reproduction and Development*. 1990; 27:209-215.
- Carney EW, Tobback C, Roote RH. Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1990; 26:629-635.

- Chen S, Einspanier R, Schoen J. Long-term culture of primary porcine oviduct epithelial cells: Validation of a comprehensive in vitro model for reproductive science. *Theriogenology*. 2013; 80:862-869.
- Chen S, Palma-Vera SE, Langhammer M, Galuska SP, Braun BC, Krause E, Lucas-Hahn A, Schoen J. An air-liquid interphase approach for modelling the early embryo-maternal contact zone. *Scientific Reports*. 2017; 7:42298.
- Colognato H & Yurchenco PD. Form and Function: The Laminin Family of Heterodimers. *Developmental Dynamics*. 2000; 218:213-234.
- Das ZC, Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Supplementation of insulin-transferrin-selenium to embryo culture medium improves the in vitro development of pig embryos. *Zygote*. 2014;22(3):411-8.
- Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, Abel T, Schultz RM. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behaviour. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(6):1595-600.
- El Hajj N & Haaf T. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: Implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2013; 99(3): 632–41.
- Fang X, Tanga BM, Bang S, Seong G, Saadeldin IM, Lee S, Cho J. Oviduct epithelial cells-derived extracellular vesicles improve preimplantation developmental competence of in vitro produced porcine parthenogenetic and cloned embryos. *Mol Reprod Dev*. 2022; 89(1): 54-65.
- Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2006; 65:178-191.
- Fernández-González F, Ramirez MA, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F, Gutiérrez-Adán A. *Molecular Reproduction and Development*. 2007;74:1147-1156.
- Ferraz MAMM, Henning HHW, Stout TAE, Vos PLAM, Gadella BM. Designing 3-Dimensional In Vitro Oviduct Culture Systems to Study Mammalian Fertilization and Embryo Production. *Reproductive Tissue Engineering*. 2016; 45(7):1731-1744.
- Fischer B, Palmer-Chavatte P, Viebahn C, Navarrete-Santos A, Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*. 2012; 144:1-10.
- Francés-Herrero E, De Miguel-Gómez L, López-Martínez S, Campo H, Garcia-Dominguez X, Diretto G, Faus A, Vicente JS, Marco-Jiménez F, Cervelló I. Development of Decellularized Oviductal Hydrogels as a Support for Rabbit Embryo Culture. *Reprod Sci*. 2021; 28(6):1644-1658.
- Francés-Herrero E, Juárez-Barber E, Campo H, López-Martínez S, de Miguel-Gómez L, Faus A, Pellicer A, Ferrero H, Cervelló I. Improved Models of Human Endometrial Organoids Based on Hydrogels from Decellularized Endometrium. *J Pers Med*. 2021;11(6):504.

- García-Domínguez X, Diretto G, Peñaranda DS, Frusciante S, García-Carpintero V, Cañizares J, Vicente JS, Marco-Jiménez F. Early Embryo Exposure to Assisted Reproductive Manipulation Induced Subtle Changes in Liver Epigenetics with No Apparent Negative Health Consequences in Rabbit. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(18): 9716.
- García-Domínguez X, Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Vicente JS. Minimally Invasive Embryo Transfer and Embryo Vitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *Journal of Visualized Experiments.* 2019; 147:1-9.
- García-Domínguez X, Vicente JS, Marco-Jiménez F. Developmental Plasticity in Response to Embryo Cryopreservation: The Importance of the Vitrification Device in Rabbits. *Animals (Basel).* 2020 May 6; 10(5): 804.
- Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril.* 1996; Feb;65(2):349-53.
- Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *Journal of Reproductive Immunology.* 2002; 55(1-2):85-100.
- Grisart B, Massip A, Dessy F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1994; 101:257-264.
- Halper J & Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2014; 802: 31-47.
- Hunter RHF. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews.* 2012; 84:244-255.
- Instituto Nacional de Estadística. Notas de prensa: Movimiento Natural de la Población (MNP) Indicadores Demográficos Básicos (IDB). [Intertet]. España, 2018. Disponible en: https://www.ine.es/prensa/mnp_2018_p.pdf
- International Embryo Technology Society. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals [Internet]. EEUU, 2020. Disponible en: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf
- Joo BS, Kim MK, Na YJ, Moon HS, Lee KS, Kim HD. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril.* 2001; 75(1):193-9.
- Kaartinen N, Huhtala H, Keränen S y Tinkanen H. The freezing method of cleavage stage embryos has no impact on the weight of the new-borns. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33(3): 393–9.

- Kaloglu C & Onarlioglu B. Extracellular matrix remodelling in rat endometrium during early pregnancy: the role of fibronectin and laminin. *Tissue and Cell*. 2010; 42:301-306.
- Kattal N, Cohen J, Barmat LI. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008; 90(4):1069-76.
- Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of Preimplantation Mouse Embryos Affects Fetal Development and the Expressions of Imprinted Genes. *Biology of Reproduction*. 2001; 64(3):918-926.
- Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*. 2004; 82-83:141-53.
- Lapointe S, Sullivan R, Sirard MA. Binding of a Bovine Oviductal Fluid Catalase to Mammalian Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 1998; 28(3):747-753.
- Lee KF, Yao YQ, Kwok KL, Xu JS, Yeung WS. Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 292(2):564-70.
- Leonavicius K, Royer C, Preece C, Davies B, Biggins JS, Srinivas S. Mechanics of mouse blastocyst hatching revealed by a hydrogel-based microdeformation assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115(41): 10375-10380.
- Li B, Che S, Tang N, Xiao X, Huang J, Jiang F, Huang X, Sun F, Wang X. Assisted Reproduction Causes Reduced Fetal Growth Associated with Downregulation of Paternally Expressed Imprinted Genes That Enhance Fetal Growth in Mice. *Biology of Reproduction* 2016; 94(2):1–11.
- Li S & Winuthayanon W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Society for Endocrinology*. 2017; 232(1):R1-R26.
- Liu Q, Lian Y, Huang J, Ren X, Li M, Lin S, Liu P, Qiao J. The safe The safety of long-term cryopreservation on slow-frozen early cleavage human embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Apr;31(4):471-5.
- Lonergan P, Rizos D, Adan-Gutierrez A, Fair T, Boland MP. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*. 2003; 38(4):259-67.
- Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to sub fertile couples. *J Med Genet*. 2005; 42: 289–91.
- Machtiger R & Racowsky C. Culture systems: single step. *Methods Mol Biol*. 2012; 912:199-209.
- Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet*. 2003; 40(1): 62-4.

- Maillo V, Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*. 2016; 86:443-450.
- Mamo S, Gal AB, Polgar Z, Dinnyes A. Expression profiles of the pluripotency marker gene PU5fl and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Molecular Biology*. 2008; 9:67.
- Marco-Jimenez F, García-Dominguez X, Domínguez-Martínez M, Viudes-de-Castro MP, Diretto G, Peñaranda DV, Vicente JS. Effect of Embryo Vitrification on the Steroid Biosynthesis of Liver Tissue in Rabbit Offspring. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21:8642.
- Marco-Jiménez F, Lavara R, Jiménez-Trigos E, Vicente JS. *In vivo* development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology*. 2013; 79(7): 1124-9.
- Market-Velker BA, Fernández AD y Mann MR. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod*. 2010; 83: 938–50.
- Mas-Chillida N. Desarrollo y viabilidad de embriones de conejo en un sistema de cultivo secuencial con células oviductales. [Trabajo Fin de Grado, Universidad Politécnica de Valencia]. 2019. <http://hdl.handle.net/10251/125067>
- McEvoy TC. Manipulation of Domestic Animal Embryos and Implications for Development. *Reprod Dom Anim*. 2003; 38: 268-275.
- Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A, Dessy F. Characterization of the Embryotropic Activity of Exogenous Protein-Free Oviduct-Conditioned Medium Used in Culture of Cattle Embryos. *Biology of Reproduction*. 1993; 49(3):582-587.
- Miles JR, Laughlin TD, Sargus-Patino CN, Pannier AK. In vitro porcine blastocyst development in three-dimensional alginate hydrogels. *Molecular Reproduction Development*. 2017; 84:775-787.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España. Informe sobre usos de animales en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia en 2020 [Internet]. España, 2020. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informeestadisticodeanimalesutilizadosen2020_tcm30-580003.pdf
- Ministerio de Sanidad de España. Registro Nacional de Actividad 2018 – Registro SEF [Internet]. España, 2018. Disponible en: https://cnrha.sanidad.gob.es/registros/pdf/Informe_estadistico_SEF_2018_Version_Final.pdf
- Navarrete-Santos A, Tonack S, Kirstein M, Kietz S, Fischer B. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction*. 2004; 128(5):503-516.

- Niakan NK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Reijo-Pera RA. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012; 139:829-841.
- Olexiková L, Makarevic AV, Cherenek P, Kubovicová E, Pivko J. *Slovak Journal of Animal Science*. 2007; 40(2):63-35.
- Pedrero-Badillo F, Anaya-Hernández A, Corona-Quintanilla DL, Castelán F, Pacheco P, Martínez-Gómez M, Cuevas E. Morphohistological characteristics of rabbit oviduct: A proposal for a single regionalization. *Animal Reproduction Science*. 2013; 143: 102-111.
- Pérez-García M. Efecto del tratamiento de superovulación y de la edad de la coneja sobre parámetros de calidad ovocitaria. [Trabajo Fin de Grado, Universidad Politécnica de Valencia]. 2018. <http://hdl.handle.net/10251/107644>
- Pujuguet P, Simian M, Liaw J, Timpl R, Werb Z, Bissell MJ. Nidogen-1 regulates laminin-1-dependent mammary-specific gene expression. *Journal of Cell Science*. 2000; 113:849-858.
- Quinn P. *Culture Media, Solutions, and Systems In Human ART*. Cambridge University Press. 2014.
- Quinn P. Review of Media Used in ART Laboratories. *Journal of Andrology*. 2000; 21(5):610-615.
- Ramos-Ibeas P, Heras S, Gómez-Redondo I, Planells B, Fernández-González, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Pérez-Cerezales S, Gutiérrez-Adán.
- Reis e Silva AR, Bruno C, Fleurot F, Daniel N, Archilla C, Paynot N, Lucci CM, Beaujean N, Duranthon V. Alteration of DNA demethylation dynamics by in vitro culture conditions in rabbit pre-implantation embryos. *Epigenetics*. 2012; 7(5):440-6
- Rottmayer R, Ulbrich SE, Kölle S, Prella K, Neumueller C, Sinowatz F, Meyer HHD, Wold E, Hiendleder S. A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*. 2006;132(4):637-648.
- Saenz-de-Juano MD, Marco-Jiménez F, Vicente JS. Embryo transfer manipulation cause gene expression variation in blastocysts that disrupt implantation and offspring rates at birth in rabbit. *European Journal of Obstetrics & Gynaecology and Reproductive Biology*. 2016; 207 50-55.
- Saenz-de-Juano MD, Naturil-Alfonso C, Vicente JS, Marco-Jiménez F. Effect of different culture systems on mRNA expression in developing rabbit embryos. *Zygote*. 2013; 21(1): 103-109.
- Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels form decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*. 2017; 49: 1-15.

- Sfontouris IA, Martins WP, Nastri CO, Viana IGR, Navarro PA, Raine-Fenning N, Van der Poel S, Rienzi L, Racowsky C. Blastocys culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Gene.* 2016; 33(10):1261-1272.
- Shaw WR, Teodory E, Mitchell SN, Baldini F, Gabrieli P, Rogers DW, Catteruccia F. Mating activates the heme peroxidase HPX15 in the sperm storage organ to ensure fertility in *Anopheles Gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(16):5854-9.
- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Boucherie H, Mann M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:14440-14445.
- Shi W & Haaf T. Aberrat Methylation Patterns at the Two-Cell Stage as an Indicator of Early Developmental Failure. *Molecular Reproduction and Development.* 2002; 63:329-334.
- Simpoulou M, Sfakianoudis K, Rapani A, Giannelou P, Anifaldis G, Bolaris S, Pantou A, Lambropoulou M, Pappas A, Deligeoroglou E, Pantos K, Koutsilieris M. Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: From Media to Epigenetics. *In Vivo.* 2018; 32(3): 451-60.
- Sunde A, Brison D, Dumoulin J, Harper J, Lundin K, Magli C, Van den Abbel E, Veiga A. Time to take human embryo culture seriously. *Human Reproduction.* 2016; 0:1-9.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh A, McMillan WH, Tervit R. Lamb Birth Weight Is Affected by Culture System Utilized during In Vitro Pre-Elongation Development of Ovine Embryos. *Biology of Reproduction.* 1995; 53:1385-1391.
- Ulbrich SE, Zitta K, Hiendleder S, Wolf E. In vitro systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. *Theriogenology.* 2010; 73:802-816.
- Vanessa R, Boué S, González-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, Izpisua-Belmonte JC. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development.* 2011; 138:3699-3709.
- Vicente JS, Saenz-de-Juano MD, Jiménez-Trigos E, Viudes-de-Castro MP, Peñaranda DS, Marco-Jiménez F. Rabbit morula vitrification reduces early foetal growth and increases losses throughout gestation. *Cryobiology.* December 2013; 67(3): 321-326.
- Vithoukias A, Levanduski M, Goudas VT, Illmensee K. Co-culture of human embryos with autologous cumulus cells clusters and its beneficial impact of secreted growth factor son preimplantation development as compared to standard embryo culture in assisted reproductive technologies (ART). *Middle East Fertility Society Journal.* 2017; 22(4):317-322.

- Viudes-de-Castro MP, Marco-Jiménez F, Cedano-Castro JI, Salvador Vicente J. Effect of coriofollitropin alfa supplemented with or without LH on ovarian stimulation and embryo viability in rabbit. *Theriogenology*. 2017; 98: 68-74.
- Viudes-de-Castro MP, Marco-Jiménez F, Más-Pellicer A, García-Dominguez X, Talaván AM, Vicente JS. A single injection of coriofollitropin alfa supplemented with human chorionic gonadotropin increases follicular recruitment and transferable embryos in the rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*. 2019; 54(4):696-701
- Wale PL & Gardnwofer DK. The effects of chemical and physical factor son mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human Reproduction Update*. 2016; 22(1):2-22.
- Wang H, Cao W, Hu H, Zhou C, Wang Z, Alam N, Qu P, Liu E. Effects of changing culture medium on preimplantation embryo development in rabbit. *Zygote*. 2021; 1-6.
- Wang S, Tang X, Niu Y, Chen H, Li B, Li T, Zhang X, Hu Z, Zhou Q, Ji W. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25(2):481-489.
- Wang Z, Oron E, Nelso B, Razis S, Ivanova N. Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(4):440-54.
- Wolf MT, Daly KA, Brennan-Pierce EP, Johnson SA, Carruthers CA, D'Amore A, Nagarkar SP, Velankar SS, Badylak SF. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*. 2012; 33: 7028 – 7038.
- Wong KM, Van Wely M, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017; 3.
- Xing H, Lee H, Luo L, Kyriakides TR. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. *Biotechnology Advances*. 2020; 42:107421.
- Yániz J, Carretero T, Recreo P, Arceiz E, Santolaria P. Three-Dimensional Architecture of the Ovine Oviductal Mucosa. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2013;43(5):331- 340.
- Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*. 1998; 3:155-163.
- Zagris N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron*. 2001; 32:427-438.
- Zhao Z, Vizetto-Duarte C, Moay ZK, Setyawati MI, Rakshit M, Kathawala MH, Ng KW. Composite hydrogels in three-dimensional in vitro models. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; 8:611.