



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro de embriones
utilizando matrices oviductales descelularizadas como
soporte biomimético

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Esteban Chavarría, Lucía

Tutor/a: Marco Jiménez, Francisco

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

Desarrollo de un sistema de cultivo in vitro de embriones utilizando matrices oviductales descelularizadas como soporte biomimético

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Trabajo Final de Grado

Grado en Biotecnología

Autor: Lucía Esteban Chavarría

Tutor: Francisco Marco Jiménez

CURSO ACADÉMICO 2024/2025

València, junio 2025

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que, de una u otra forma, han contribuido no solo al desarrollo de este trabajo, sino también a mi crecimiento personal y profesional a lo largo de este camino.

En primer lugar, quiero agradecer a las personas que forman parte del Departamento de Ciencia Animal de la Universitat Politècnica de València, con quienes he compartido estos meses y me han abierto las puertas al fascinante mundo de la reproducción. En especial, a mi tutor Francisco Marco, por su confianza, orientación y acompañamiento a lo largo de todo este proceso.

A Emilio Francés-Herrero e Irene Cervelló, de la Fundación IVIRMA, por su colaboración en el desarrollo experimental y por brindarme la oportunidad de participar y aprender junto al equipo de Bioingeniería del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

A mis hermanos y referentes, Bea, Yosua y Moi, por recorrer este camino conmigo, sosteniéndome en mis dudas y miedos. Ojalá sigamos acompañándonos siempre, celebrando cada logro juntos. Todo lo que soy empieza también en vosotros.

A Mario, por recordarme, una y otra vez, todo lo que soy capaz de conseguir. Por valorar mi esfuerzo, entender mis innumerables horas de estudio y motivarme para seguir siempre hacia adelante.

A Emma, por llegar al mundo para llenar de alegría mi vida y convertirme en tu tata. Gracias por esos abrazos que curan el alma. Siempre juntitas.

A mi tío, por quererme y apoyarme como a una hija. Gracias por estar presente en cada momento importante de mi vida.

A mis amigas, Gema, Mar y Silvia, por enseñarme que la felicidad sabe mejor cuando se comparte, sin importar la distancia ni el tiempo. Especialmente a Nerea, porque la amistad verdadera es hogar, y tú eres el mío. Gracias por tu apoyo incondicional, siempre.

A Laura Laguna, por ser una fuente inagotable de consejos y motivación a lo largo de este camino. He podido descubrir que no solo eres una gran investigadora, sino también una gran persona. Gracias por tu generosidad.

A mis padres, a quienes dedico con especial cariño todo mi esfuerzo de estos años. Gracias por enseñarme que la vida solo puede entenderse mirando hacia atrás, pero debe vivirse hacia delante. Por regalarme con vuestro sacrificio, el privilegio de poder estudiar, y por nunca dejar de verme capaz, incluso cuando yo no lo veo. Siempre seré, con orgullo, vuestra huella en este mundo. Esto es para vosotros.

Y, finalmente, a quienes confiaron, me apoyaron y en silencio me acompañaron, con todo mi cariño, os dedico este trabajo y cada pequeño logro que la ciencia me permita alcanzar.

ÍNDICE

Resumen	v
Abstract	vi
Resum	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Infertilidad y tecnologías de reproducción asistida.....	1
1.2. Modelo animal: conejo.....	1
1.3. Dinámica del tracto reproductivo femenino	2
1.4. Composición de los medios de cultivo embrionario preimplantacional.....	4
1.5. Comparación de sistemas de cultivo secuenciales frente a sistemas de cultivo únicos.....	5
1.6. Aplicaciones actuales y futuras de la matriz extracelular en bioingeniería reproductiva	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Declaración ética	9
3.2. Diseño experimental.....	9
3.3. Descelularización de oviductos	10
3.4. Preparación de hidrogeles de matriz oviductal descelularizada	11
3.5. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones	12
3.6. Transferencia de embriones	14
3.7. Análisis estadístico.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1. Evaluación del efecto del uso de OviECM como recubrimiento en el desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	16
4.2. Evaluación del efecto del uso de OviECM como recubrimiento en la tasa de implantación embrionaria	19
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES.....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24
8. ANEXOS.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de descelularización aplicado a oviductos (Francés-Herrero <i>et al.</i> , 2021)	11
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo embrionario <i>in vivo</i> en el tracto materno en modelo de conejo. Creado con BioRender.com	3
Figura 2. Procedimiento experimental para el estudio del efecto de matrices oviductales sincrónicas descelularizadas (OviECM) en el desarrollo embrionario y en la tasa de implantación. Creado con BioRender.com	10
Figura 3. Proceso de obtención del hidrogel OviECM. Creado con BioRender.com	12
Figura 4. Representación visual del sistema de cultivo embrionario empleado.....	13
Figura 5. Representación visual de la placa Kitazato empleada para el cultivo embrionario <i>in vitro</i> . Creado con BioRender.com	13
Figura 6. Embrión de conejo en estadio de dos células a las 20 horas post-inseminación	14
Figura 7. Transferencia embrionaria guiada por laparoscopia	15
Figura 8. Evaluación tras 24 horas de cultivo embrionario <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones (OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72, control)	16
Figura 9. Evaluación tras 48 horas de cultivo embrionario <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones (OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72, control)	17
Figura 10. Evaluación tras 72 horas de cultivo embrionario <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones (OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72, control)	18
Figura 11. Porcentaje de blastocistos tras 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones (OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72, control)	18
Figura 12. Imágenes laparoscópicas de embriones implantados a los 11 días post-transferencia	19
Figura 13. Porcentaje de embriones implantados en el día 11 post-transferencia cultivados <i>in vitro</i> bajo diferentes condiciones (OviECM-24, OviECM-72, control)	19

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados; unidad de temperatura
μL	Microlitro; unidad de volumen
AA	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ART	Tecnologías de Reproducción Asistida
BSA	Albúmina sérica bovina
cm	Centímetros; unidad de longitud
dECM	Matriz extracelular descelularizada
ECM	Matriz extracelular
ED	Energía digestible
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ETs	Embriotropinas
FBS	Suero fetal bovino
FSH	Hormona foliculoestimulante
G	Gauge; unidad de calibre de agujas hipodérmicas
g	Gramo; unidad de masa
GAGs	Glicosaminoglicanos
GLM	Modelo Lineal Generalizado
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
IA	Inseminación artificial
Kcal	Kilocaloría; unidad de energía
Kg	Kilogramo; unidad de masa
KSOM	Medio de optimización de potasio simplex
LSM	Media de los mínimos cuadrados
mL	Mililitro; unidad de volumen
mm	Milímetro; unidad de longitud
n	Tamaño de muestra
OvaECM	Matriz extracelular derivado de corteza ovárica
OviECM	Matriz extracelular derivada de oviducto

PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
p-valor	Valor de probabilidad
p/v	Peso / Volumen
rpm	Revoluciones por minuto; unidad de velocidad angular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
UI	Unidad internacional
VEs	Vesículas extracelulares
v/v	Volumen / Volumen

Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de embriones utilizando matrices oviductales descelularizadas como soporte biomimético

Resumen

La dificultad para replicar *in vitro* el complejo entorno materno limita el éxito de las tecnologías de reproducción asistida. Con el objetivo de desarrollar plataformas biomiméticas, este estudio evaluó, en un modelo conejo, el potencial de hidrogeles de matriz oviductal extracelular descelularizada (OviECM), obtenidos sincrónicamente con la edad embrionaria (24 y 72 horas post-ovulación), como soporte para el cultivo embrionario y su efecto sobre la implantación. Para ello, se obtuvieron oviductos de hembras inducidas a ovular a las 24 y 72 horas, que fueron descelularizados y almacenados hasta su uso. Los OviECM resultantes se utilizaron como recubrimiento superficial en el cultivo *in vitro* de embriones de conejo durante 72 horas, generando los siguientes grupos experimentales: (i) cultivo en OviECM-24, (ii) cultivo en OviECM-72, (iii) cultivo secuencial: OviECM-24 durante 36 horas seguido de OviECM-72 durante otras 36 horas y (iv) cultivo en condiciones estándar sin OviECM. El medio de cultivo base empleado fue KSOM suplementado, bajo una atmósfera con un 5% de CO₂ a 38,5 °C. Para el estudio del efecto de cultivo en OviECM-24 y OviECM-72 sobre la tasa de implantación (ensayo pre-clínico), se transfirieron embriones en estado de blastocisto tras el cultivo a hembras receptoras mediante laparoscopia. Para el estudio del efecto de cultivo en OviECM sobre el desarrollo embrionario *in vitro*, se cultivaron un total de 442 embriones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo embrionario entre ninguno de los grupos experimentales ($79 \pm 3,8\%$, $85 \pm 3,5\%$, $74 \pm 4,2\%$ y $78 \pm 3,8\%$, para OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72 y control, respectivamente. $P = 0.197$). Para el estudio del efecto de cultivo en OviECM-24 y OviECM-72 sobre la tasa de implantación se transfirieron un total de 216 embriones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de implantación entre los diferentes grupos experimentales ($20 \pm 4,7\%$, $27 \pm 5,3\%$ y $24 \pm 5,6\%$, para OviECM-24, OviECM-72 y control, respectivamente. $P = 0,619$). La conclusión de nuestro estudio indica que el uso de hidrogeles derivados de matrices oviductales sincrónicas descelularizadas (24 y 72 horas post-ovulación) en el cultivo embrionario *in vitro* en un sistema de cultivo de un solo paso o de forma secuencial no influye en el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto y no influye en la capacidad de implantación embrionaria en el modelo de conejo. En conjunto, estos hallazgos subrayan la necesidad de realizar más estudios que permitan conocer el potencial de matrices oviductales descelularizadas en el cultivo embrionario *in vitro*, con el fin de imitar con mayor exactitud las condiciones del entorno materno *in vivo*.

PALABRAS CLAVE

Matriz extracelular; oviductos; recubrimiento; cultivo embrionario; blastocisto; implantación.

Autor: Lucía Esteban Chavarría

Tutor: Francisco Marco Jiménez

València, junio 2025

Development of an *in vitro* embryo culture system using decellularized oviductal matrix as a biomimetic scaffold

Abstract

The difficulty of replicating the complex maternal environment *in vitro* limits the success of assisted reproductive technologies. With the aim of developing biomimetic platforms, this study evaluated, in a rabbit model, the potential of decellularized extracellular oviductal matrix (OviECM) hydrogels, obtained synchronously with embryonic age (24- and 72-hours post-ovulation), as support for embryo culture and its effect on implantation. To this end, pooled oviducts were obtained from females induced to ovulate at 24 and 72 hours, then decellularized and stored until use. The resulting OviECMs were used as a surface coating in the *in vitro* culture of rabbit embryos for 72 hours, generating the following experimental groups: (i) culture in OviECM-24, (ii) culture in OviECM-72, (iii) sequential culture: OviECM-24 for 36 hours followed by OviECM-72 for another 36 hours and (iv) culture under standard conditions without OviECM. The base culture medium used was supplemented KSOM, under an atmosphere with 5% CO₂ at 38.5 °C. For the study of the effect of culture in OviECM-24 and OviECM-72 on the implantation rate (pre-clinical trial), embryos in the blastocyst stage were transferred after culture to recipient foster mothers by laparoscopy. For the study of the effect of culture in OviECM on embryonic development *in vitro*, a total of 442 embryos were cultured. No statistically significant differences in embryonic development were observed between any of the experimental groups ($79 \pm 3.8\%$, $85 \pm 3.5\%$, $74 \pm 4.2\%$ and $78 \pm 3.8\%$, for OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72 and control, respectively. $P = 0.197$). For the study of the effect of culture in OviECM-24 and OviECM-24+72 on the implantation rate, a total of 216 embryos were transferred. No statistically significant differences were observed between experimental groups ($20 \pm 4.7\%$, $27 \pm 5.3\%$ and $24 \pm 5.6\%$, for OviECM-24, OviECM-72 and control, respectively. $P = 0.619$). The conclusion of our study indicates that the use of hydrogels derived from decellularized synchronous oviductal matrices (24- and 72-hours post-ovulation) in *in vitro* embryo culture in a single-step or sequential culture system does not influence embryo development up to the blastocyst stage and does not influence embryo implantation capacity in the rabbit model. Taken together, these findings underscore the need for further studies to understand the potential of decellularized oviductal matrices in *in vitro* embryo culture, in order to more accurately mimic the conditions of the maternal environment *in vivo*.

KEY WORDS

Extracellular matrix; oviducts; coating; embryo culture; blastocyst; implantation.

Author: Lucía Esteban Chavarría

Tutor: Francisco Marco Jiménez

València, june 2025

Desenvolupament d'un sistema de cultiu *in vitro* d'embrions utilitzant matrius oviductals descel·lularitzades com a suport biomimètic

Resum

La dificultat per replicar *in vitro* el complex entorn matern limita l'èxit de les tecnologies de reproducció assistida. Amb l'objectiu de desenvolupar plataformes biomimètiques, aquest estudi va avaluar, en un model conill, el potencial d'hidrogels de matriu oviductal extracel·lular descel·lularitzada (OviECM), obtinguts sincrònicament amb l'edat embrionària (24 i 72 hores post-ovulació), com a suport per al cultiu embrionari i el seu efecte sobre la implantació. Per a això, es van obtenir oviductes de femelles induïdes a ovular a les 24 i 72 hores, que van ser descel·lularitzats i emmagatzemats fins al seu ús. Els OviECM resultants es van utilitzar com a recobriment superficial en el cultiu *in vitro* d'embrions de conill durant 72 hores, generant els següents grups experimentals: (i) cultiu en OviECM-24, (ii) cultiu en OviECM-72, (iii) cultiu seqüencial: OviECM-24 durant 36 hores seguit d'OviECM-72 durant altres 36 hores i (iv) cultiu en condicions estàndard sense OviECM. El medi de cultiu base emprat va ser KSOM suplementat, sota una atmosfera amb un 5% de CO₂ a 38,5 ° C. Per a l'estudi de l'efecte de cultiu en OviECM-24 i OviECM-72 sobre la taxa d'implantació (assaig pre-clínic), es van transferir embrions en estat de blastocist després del cultiu a femelles receptores mitjançant laparoscòpia. Per a l'estudi de l'efecte de cultiu en OviECM sobre el desenvolupament embrionari *in vitro*, es van cultivar un total de 442 embrions. No es van observar diferències estadísticament significatives en el desenvolupament embrionari entre cap dels grups experimentals ($79 \pm 3,8\%$, $85 \pm 3,5\%$, $74 \pm 4,2\%$ i $78 \pm 3,8\%$, per a OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72 i control, respectivament. $P = 0.197$). Per a l'estudi de l'efecte de cultiu en OviECM-24 i OviECM-72 sobre la taxa d'implantació es van transferir un total de 216 embrions. No es van observar diferències estadísticament significatives en la taxa d'implantació entre els diferents grups experimentals ($20 \pm 4,7\%$, $27 \pm 5,3\%$ i $24 \pm 5,6\%$, per a OviECM-24, OviECM-72 i control, respectivament. $P = 0,619$). La conclusió del nostre estudi indica que l'ús d'hidrogels derivats de matrius oviductals sincròniques descel·lularitzades (24 i 72 hores post-ovulació) en el cultiu embrionari *in vitro* en un sistema de cultiu d'un sol pas o de forma seqüencial no influeix en el desenvolupament embrionari fins a l'estadi de blastocist i no influeix en la capacitat d'implantació embrionària en el model de conill. En conjunt, aquestes troballes subratllen la necessitat de realitzar més estudis que permetin conèixer el potencial de matrius oviductals descel·lularitzades en el cultiu embrionari *in vitro*, per tal d'imitar amb més exactitud les condicions de l'entorn matern *in vivo*.

PARAULES CLAU

Matriu extracel·lular; oviductes; recobriment; cultiu embrionari; blastocist; implantació.

Autor: Lucía Esteban Chavarría

Tutor: Francisco Marco Jiménez

València, juny 2025

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Infertilidad y tecnologías de reproducción asistida

La infertilidad está reconocida por la Organización Mundial de la Salud como un problema de salud pública global (World Health Organization, 2024). Esta condición se define como la incapacidad de establecer un embarazo clínico después de 12 meses de relaciones sexuales regulares y sin protección, y se estima que afecta entre el 8 y 12% de las parejas en edad reproductiva a nivel mundial (Vander Borgh & Wyns, 2018). En respuesta a este desafío, las tecnologías de reproducción asistida (ART, por sus siglas en inglés) destacan como una alternativa eficaz para muchas personas y parejas, siendo el cultivo embrionario *in vitro* uno de los avances más significativos en las últimas décadas. Gracias a estos avances, se calcula que actualmente el número de niños nacidos mediante ART ha superado los 10 millones en todo el mundo (Pinborg *et al.*, 2023).

Desde sus inicios en la década de 1970, se han llevado a cabo modificaciones en el cultivo embrionario *in vitro* con la finalidad de optimizar el desarrollo embrionario y aumentar el número de embriones de “buena calidad” disponibles para su transferencia, mejorando las tasas de embarazo (Sciorio & Rinaudo, 2023). Si bien numerosos estudios han investigado la influencia de factores como la composición y las condiciones del cultivo en la calidad embrionaria (Fischer *et al.*, 2012), sigue existiendo la posibilidad de mejorar sus formulaciones para tratar de imitar mejor las condiciones naturales y mejorar el desarrollo embrionario y los resultados clínicos, ya que la tasa de nacidos vivos por transferencia embrionaria continúa siendo relativamente baja, situándose entre el 30% y el 40% (Suebthawinkul *et al.*, 2024).

En este contexto, la evolución y la optimización de los medios de cultivo *in vitro* han desempeñado un papel clave en el avance de las ART, impulsando mejoras en las tasas de embarazo al optimizar la sincronización uterina y embrionaria (Glujovsky *et al.*, 2022). Actualmente, existe una amplia oferta de medios de cultivo comerciales y se plantean debates sobre la eficacia de los sistemas de medios únicos frente a los secuenciales. Sin embargo, pese a que se han realizado estudios comparativos, se han realizado pocos ensayos aleatorizados y controlados adecuadamente, y la variabilidad en la población de pacientes y en la interpretación de los resultados entre laboratorios dificultan la obtención de conclusiones definitivas (López-Martínez *et al.*, 2021).

No obstante, más allá de la aplicación en humanos, la producción *in vitro* de embriones se ha convertido en una herramienta esencial en la reproducción animal, permitiendo aumentar la eficiencia reproductiva, favorecer la mejora genética y reducir el ciclo reproductivo en especies ganaderas (Elomda *et al.*, 2018).

1.2. Modelo animal: conejo

El conejo es un modelo animal ampliamente utilizado en estudios reproductivos debido a su cercanía filogenética a los seres humanos (García-Domínguez *et al.*, 2020), el tamaño de sus oviductos y su alto rendimiento reproductivo (Fischer *et al.*, 2012). Una de las ventajas más interesantes es la posibilidad de controlar con precisión el momento exacto de las etapas de fecundación y gestación. Esto es posible porque pertenece al reducido grupo de especies en las que la ovulación es inducida en el apareamiento (Marco-Jiménez *et al.*, 2024), lo que permite establecer con exactitud el inicio de la gestación y la edad embrionaria, además de presentar un breve ciclo reproductivo (Fischer *et al.*, 2012).

Durante el desarrollo embrionario, el conejo destaca por ser el único animal de laboratorio en el que ocurre un crecimiento muy considerable antes de la implantación. En este periodo preimplantacional, el contenido de proteínas de las células embrionarias puede aumentar hasta 300

veces, y el blastocisto llega a contener más de 100.000 células (Kane, 2019). En el tercer día tras la fecundación, el embrión ya alcanza un blastocisto que presenta 128 células.

Estas características hacen del conejo un modelo excelente para estudiar la embriología, ya que los blastocistos formados presentan más células en la masa celular interna en comparación con los de ratón, lo cual resulta especialmente útil para estudios complejos. Además, se ha conseguido cultivar embriones de conejo desde el estadio de una célula hasta blastocisto, en una variedad de medios complejos, incluidos medios de composición mayormente conocida. Sin embargo, estas células embrionarias son sensibles tanto a las condiciones ambientales del cultivo como a la fase gaseosa y a la temperatura del medio (Sultana *et al.*, 2009).

A su vez, se tiene un conocimiento amplio de las etapas de gástrula, y su placenta es de tipo hemoquerial, con una estructura similar a la de la placenta humana (Fischer *et al.*, 2012), lo que refuerza aún más su valor como modelo en investigaciones sobre desarrollo y reproducción.

1.3. Dinámica del tracto reproductivo femenino

El tracto reproductivo es un entorno dinámico que responde continuamente a señales hormonales, lo cual produce cambios periódicos en sus tejidos a lo largo del ciclo menstrual. Estas señales hormonales, especialmente a través del estradiol y la progesterona, producidas en el ovario durante los procesos de desarrollo folicular y luteinización, intervienen en la regulación de las fases proliferativa y secretora del tejido endometrial (Memi *et al.*, 2024), preparando así el entorno uterino para la implantación y el posterior desarrollo fetal (Francés-Herrero *et al.*, 2022a).

En este contexto, el sistema reproductivo femenino debe coordinar la dinámica uterina en respuesta a estas hormonas ováricas. Los ovocitos maduros, tras su ovulación son fecundados en los oviductos, y el embrión resultante es transportado hacia el útero a contracorriente (Figura 1), donde se implantará si el endometrio se encuentra en un estado receptivo adecuado (Francés-Herrero *et al.*, 2022a). El transporte embrionario en el oviducto es un proceso clave, y comprender su dinámica *in vivo* es esencial para optimizar las condiciones del cultivo embrionario *in vitro* (Gualtieri *et al.*, 2024).

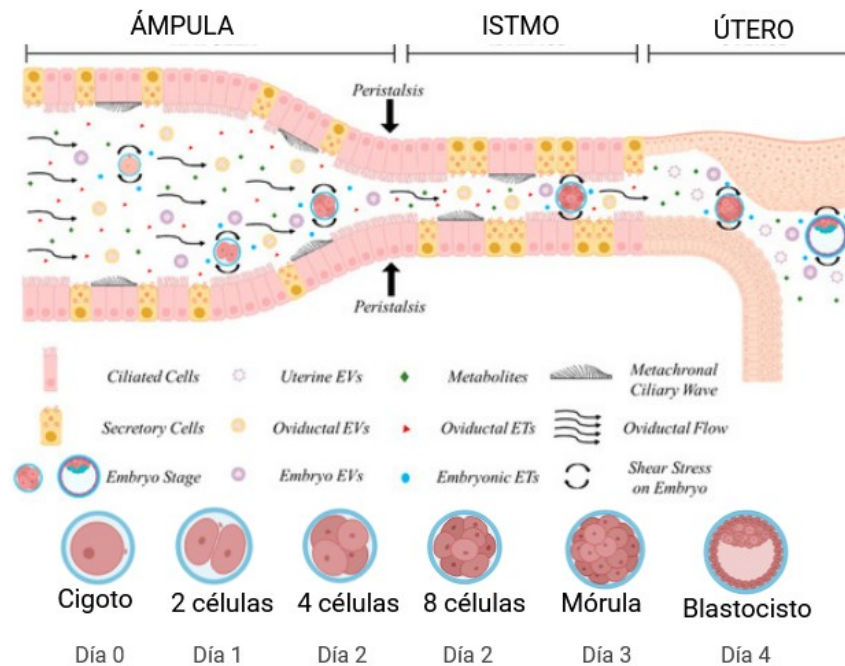


Figura 1. Desarrollo embrionario in vivo en el tracto materno en modelo de conejo: comunicación entre el embrión y el entorno materno. En este ambiente se concentran secreciones procedentes del oviducto, el endometrio y el propio embrión. Estas secreciones incluyen embriotropinas (ETs) y diversos factores de señalización, encapsulados o no en vesículas extracelulares (EVs). Además del intercambio bioquímico, el embrión en desarrollo está expuesto a fuerzas biomecánicas generadas por la secreción de fluidos maternos, las ondas ciliares y las contracciones peristálticas del tracto reproductivo. Estos estímulos físicos, junto con las señales moleculares, regulan y acompañan su desarrollo a lo largo de su recorrido por el sistema reproductor femenino. El embrión progresa desde el estadio de cigoto hasta blastocisto a lo largo de los días 0 a 4 post-fertilización, transitando por el ámpula, el istmo y el útero. Adaptado de Gualtieri et al. (2024). Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

El oviducto, clave en este proceso, está compuesto por el infundíbulo, recubierto por células epiteliales ciliadas que retienen el complejo cúmulo-ovocito ovulado; el ámpula, donde ocurre la fecundación y donde predominan las células ciliadas; la unión istmo-ámpula; y finalmente, la unión útero-tubal (Gualtieri et al., 2024).

Desde la perspectiva de la ingeniería tisular es fundamental considerar las propiedades mecánicas dinámicas de estos tejidos reproductivos, ya que las hormonas no solo regulan funciones fisiológicas, sino que también influyen en sus características biomecánicas (Franko et al., 2024), lo cual plantea una dificultad añadida en el diseño de tejidos biomiméticos funcionales. Además, pese a que los modelos animales y humanos proporcionan recursos útiles para el estudio de la biología reproductiva, existen diferencias innatas entre sus respectivos tractos reproductivos. A esto se suma la limitación de las técnicas convencionales de cultivo celular y tisular en 2D, que no reflejan adecuadamente la complejidad del entorno *in vivo*. Por ello, se reconoce la necesidad de desarrollar plataformas *in vitro* dinámicas y más complejas (Francés-Herrero et al., 2022a), lo que ha impulsado a la bioingeniería a ampliar las fronteras del estudio de la reproducción mediante nuevas aplicaciones y modelos preclínicos, con un enfoque cada vez más traslacional.

1.4. Composición de los medios de cultivo embrionario preimplantacional

El cultivo *in vitro* supone una fase determinante en el desarrollo de los embriones que se implantarán y darán lugar al inicio de una gestación. Uno de los principales retos en este proceso consiste en diseñar un medio de cultivo que “reproduzca” las condiciones del entorno *in vivo* para favorecer el crecimiento y desarrollo (Miraki *et al.*, 2022). En este marco, la composición del medio de cultivo es un factor importante para mejorar las condiciones actuales, ya que influye directamente en la calidad embrionaria, por lo que incluir componentes que reduzcan el estrés celular y mantengan la homeostasis celular podrían contribuir positivamente al desarrollo embrionario óptimo (Quinn, 2012).

Entre estos componentes, los sustratos energéticos han sido ampliamente estudiados. El conjunto formado por piruvato-lactato-glucosa se utiliza de manera casi universal en los medios comerciales empleados en ART (Gardner *et al.*, 1996). En las etapas iniciales del desarrollo, como la segmentación, el embrión depende principalmente del piruvato y el lactato como fuentes energéticas, mientras que la glucosa adquiere mayor relevancia después de la compactación. Este cambio en el metabolismo coincide con el entorno *in vivo*, donde el embrión temprano está expuesto a niveles bajos de glucosa y altos de lactato a medida que se desplaza por el tracto ovárico (Gardner *et al.*, 1996).

Los aminoácidos también desempeñan un papel relevante. Estudios previos han demostrado que ciertos aminoácidos no esenciales, como asparagina, aspartato, glicina, serina y taurina, abundantes en el líquido cefalorraquídeo femenino, estimulan el desarrollo del blastocisto desde la etapa de cigoto. En cambio, algunos aminoácidos esenciales, como cisteína, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina, han mostrado efectos inhibitorios (Quinn, 2012). Esta diferencia refleja el perfil bioquímico de la trompa de Falopio, donde predominan los aminoácidos no esenciales durante los primeros días de desarrollo embrionario (Gao *et al.*, 2023). Sin embargo, la inclusión de aminoácidos en los medios de cultivo plantea desafíos como la acumulación de amonio, que puede perjudicar el desarrollo embrionario y fetal, aunque este efecto puede reducirse mediante sistemas de cultivo secuenciales que permiten renovar el medio a medida que avanza el desarrollo (Fischer *et al.*, 2012). En este sentido, un medio bien formulado debe mantener un equilibrio adecuado entre sales orgánicas e inorgánicas, proporciones correctas de sustratos energéticos y niveles óptimos de aminoácidos, ya que estos actúan como metabolitos, reguladores osmóticos y antioxidantes. Asimismo, agregar antioxidantes al medio de cultivo ayuda a reducir la relación apoptótica, relacionada con un menor éxito en el desarrollo embrionario (Wang *et al.*, 2022).

Además de la composición química del medio, las condiciones físicas dentro de las estufas de cultivo, como la tensión de oxígeno (idealmente entre 5% y 6%), la acidez y la estabilidad de la temperatura (37-38,5 °C según especie) son críticas para mantener un entorno fisiológicamente estable (Swain *et al.*, 2016). De hecho, se ha determinado que el pH óptimo varía a lo largo del desarrollo embrionario desde 7,2 en etapas iniciales hasta 7,3-7,4 durante la formación del blastocisto (Quinn, 2012).

Finalmente, muchos estudios se han centrado en diseñar medios definidos, que eliminen la necesidad de utilizar fuentes séricas o proteicas como la albúmina sérica bovina (BSA), ya que estos introducen notable variabilidad. En este sentido, se ha demostrado que los cigotos de conejo son capaces de completar su desarrollo hasta el estadio de blastocisto en medios definidos libres de proteínas, lo que evidencia la necesidad de identificar con precisión los requerimientos bioquímicos del embrión para lograr cultivos más estables y reproducibles (Li *et al.*, 1997).

1.5. Comparación de sistemas de cultivo secuenciales frente a sistemas de cultivo únicos

Uno de los pasos más críticos en los tratamientos de reproducción asistida es el cultivo embrionario. Hasta la fecha, se han desarrollado diversos protocolos, siendo uno de los más consolidados y utilizados el denominado sistema secuencial. Este enfoque está diseñado para adaptarse a los cambios en los requerimientos metabólicos y nutricionales del embrión durante su desarrollo *in vitro* (Geber *et al.*, 2012). En este sistema, los embriones se cultivan inicialmente durante los días 1 a 3 en un primer medio de crecimiento, y luego se transfieren a un segundo medio adaptado a la etapa de segmentación (Sfontorius *et al.*, 2016). Este cambio de medio es especialmente importante en torno al tercer día, momento en que el embrión inicia dos procesos clave: la compactación y la activación del genoma embrionario (Quinn, 2012). El objetivo con este enfoque es reflejar los cambios fisiológicos que ocurren *in vivo*, como las fluctuaciones en los niveles de piruvato, lactato y glucosa a lo largo del tracto reproductivo, desde el oviducto hasta el útero (López-Martínez *et al.*, 2021).

En contraposición, se ha promovido el uso de medios únicos o de un solo paso, que permiten mantener al embrión en el mismo entorno desde el día 1 hasta el día 5 o 6. Tradicionalmente, se ha utilizado un sistema de cultivo estático, basado en gotas o pocillos de medio cubiertos con aceite, alcanzando tasas de éxito clínico satisfactorias (Quinn, 2012). Estos medios están diseñados para minimizar el estrés inducido por el cambio de entorno en el día 3, permitiendo que el embrión seleccione los nutrientes que necesita en cada etapa de su desarrollo (Sfontorius *et al.*, 2016). Uno de los primeros medios únicos exitosos fue el medio de optimización de potasio simplex (KSOM), originalmente desarrollado para embriones de ratón, pero que ha demostrado ser eficaz también para el cultivo de embriones humanos (López-Martínez *et al.*, 2021). El KSOM es producto de una serie de formulaciones desarrolladas a través de métodos de optimización. La inclusión de potasio (K^+) en su formulación se fundamentó en estudios que demostraron que aumentar la concentración de K^+ en el medio permitía regular la concentración intracelular de K^+/Na^+ , favoreciendo un entorno osmótico más adecuado para el desarrollo embrionario (Summers, 2014). Además, el KSOM contiene glutamina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), componentes que han demostrado fomentar el crecimiento embrionario (Baltz, 2012).

No obstante, aunque tanto los sistemas secuenciales como los estáticos parecen proporcionar un entorno adecuado, los datos disponibles aún no permiten establecer conclusiones definitivas sobre cuál ofrece mejores resultados (Sfontouris *et al.*, 2016). Algunos estudios han demostrado que el cultivo continuo puede aumentar la tasa de blastulación, sugiriendo una mayor eficiencia en el desarrollo temprano. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en las tasas acumuladas de nacimientos por ciclo finalizado, lo cual indica que un mayor número de blastocistos no se traduce necesariamente en una mayor tasa de nacidos vivos (Cimadomo *et al.*, 2018). Esta observación refuerza la idea de que, desde una perspectiva clínica, no existe disparidad significativa entre ambos enfoques. En este contexto, parece necesario generar nuevos estudios que permitan optimizar las condiciones de cultivo embrionario de manera más y eficaz (Sfontouris *et al.*, 2016, Geber *et al.*, 2012).

1.6. Aplicaciones actuales y futuras de la matriz extracelular en bioingeniería reproductiva

Las metodologías de cultivo embrionario han evolucionado notablemente, sin embargo, aún persiste una brecha significativa entre el desarrollo embrionario *in vivo* e *in vitro* (Lee *et al.*, 2016), lo que subraya la necesidad de optimizar las condiciones de cultivo para acercarlas lo máximo posible al entorno fisiológico natural. Recientemente se ha destacado la necesidad de establecer una conexión adecuada entre el embrión en estado de blastocisto y el útero materno, para que el

embrión pueda seguir desarrollándose y recibiendo el soporte físico necesario desde el entorno uterino (Rossant & Tam, 2022). En este contexto, se ha descrito el uso de derivados biológicos como alternativa para superar las limitaciones de los cultivos *in vitro* convencionales, siendo uno de los componentes más relevantes la matriz extracelular (ECM), que retiene señales estructurales y biológicas derivadas del tejido nativo (Francés-Herrero *et al.*, 2024). Los resultados sugieren que el desarrollo de biomateriales basados en ECM podría mejorar en gran medida el desarrollo embrionario, al generar un entorno más biomimético.

La ingeniería de tejidos, disciplina que integra principios de biología, química e ingeniería, ha puesto un foco especial en los tejidos reproductivos debido a su papel esencial como entorno para la maduración de células germinales, la fecundación y el desarrollo embrionario. Una de las técnicas más innovadoras en este ámbito es la descelerización, que permite generar andamiajes derivados de tejidos biológicos (Franko *et al.*, 2024). A través de esta técnica, se han generado órganos reproductivos descelerizados con el objetivo de optimizar las estrategias empleadas en reproducción asistida. En este contexto, la descelerización representa un paso fundamental para la obtención de una matriz extracelular funcional. Este proceso puede realizarse mediante métodos físicos (congelación/descongelación, agitación, presurización), químicos (detergentes, solventes, soluciones iónicas) y enzimáticos (tripsina, colagenasa), con el objetivo de eliminar el contenido celular preservando al mismo tiempo la estructura del andamiaje proteico y reduciendo al mínimo la presencia de epítomos antigénicos (Francés-Herrero *et al.*, 2022b). Este proceso se divide en tres fases: lavado (descomposición del tejido), enjuague (retirada de agentes químicos) y esterilización (eliminación de agentes inmunogénicos).

Durante el proceso se eliminan ADN y ARN, conservando al mismo tiempo componentes clave de la matriz, como colágeno, elastina, proteoglicanos, laminina, fibronectina, integrinas, glicosaminoglicanos (GAGs) y factores de crecimiento (Choudhury *et al.*, 2020; Godfrey, 2009). La conservación de la estructura tridimensional de la matriz permite mantener interacciones entre las células y su entorno, esenciales para el crecimiento, diferenciación y función celular (Sanguansook *et al.*, 2024), además de preservar las propiedades mecánicas y la porosidad necesarias para imitar el entorno biomecánico *in vivo*.

El útero ha sido descelerizado en múltiples especies, incluyendo porcino, rata, oveja, conejo y humanos, y sus derivados han sido utilizados para generar hidrogeles compatibles con tejidos específicos, como sustratos para cultivo celular y embrionario. Un ejemplo de ellos es el hidrogel obtenido del oviducto de conejo descelerizado (Francés-Herrero *et al.*, 2021a), diseñado para reproducir el ambiente oviductal nativo en el cultivo de embriones de dos células.

Los hidrogeles derivados de ECM son microambientes tridimensionales compuestos por polímeros reticulados con más del 90% de contenido acuoso. Su maleabilidad, naturaleza no adhesiva y compatibilidad biológica los convierten en herramientas valiosas en medicina regenerativa y reproductiva (Francés-Herrero *et al.*, 2022b). La obtención de estos hidrogeles se inicia con la solubilización enzimática del pregel, utilizando pepsina en solución ácida. A continuación, la mezcla se neutraliza hasta alcanzar el pH fisiológico y finalmente se somete a gelificación a 37 °C (Francés-Herrero *et al.*, 2022b). Cabe destacar que las propiedades físico-químicas de estos hidrogeles no solo dependen del tejido original, sino también del protocolo específico de descelerización, por lo que una caracterización correcta es imprescindible antes de su aplicación. En este marco, un estudio centrado en tejidos bovinos desarrolló hidrogeles de matriz extracelular descelerizada (dECM) altamente biocompatibles, que soportaron el desarrollo embrionario sin necesidad de factores de crecimiento gracias a sus propiedades biomecánicas (Ribes Martínez *et al.*, 2025). Los derivados de ECM además presentan una alta conservación entre especies, lo cual reduce riesgos de rechazo inmunológico incluso en contextos xenogénicos. En consecuencia, la investigación en esta área podría mejorar las plataformas actuales de cultivo y suponer un cambio de paradigma en las clínicas de reproducción asistida, como sugieren estudios preclínicos (Ribes Martínez *et al.*, 2025).

Los hidrogeles derivados de matriz extracelular también son considerados como opciones terapéuticas prometedoras para la regeneración de órganos específicos (Zhang *et al.*, 2017), incluidos el miocardio, el músculo esquelético, el cerebro y el páncreas, ya sea solos o combinados con células madre o biomoléculas (López-Martínez *et al.*, 2021). Actualmente se han desarrollado hidrogeles basados en matriz extracelular ovárica (Chiti *et al.*, 2022), endometrio descelularizado (Francés-Herrero *et al.*, 2021b) y vagina descelularizada (Zhang *et al.*, 2017).

Pese a que se ha enfocado ampliamente en hidrogeles naturales como alginato, colágeno y fibrina, estos tienden a ser biológicamente inertes o demasiado simples. Por lo tanto, el desarrollo de hidrogeles biomiméticos derivados de ECM de corteza ovárica (OvaECM) o de oviducto (OviECM) ofrece un entorno bioquímico más complejo, ideal para el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria (Francés-Herrero *et al.*, 2023). Uno de los enfoques más prometedores es precisamente el uso de hidrogeles basados en tejido oviductal, ya que este proporciona el soporte físico, nutricional y molecular al embrión en etapas tempranas (Francés-Herrero *et al.*, 2021a).

El hidrogel OviECM ha demostrado resultados prometedores en el cultivo embrionario, evidenciando una regulación de genes implicados en la presentación de antígenos y la activación inmunológica, en comparación con los medios estándar (Francés-Herrero *et al.*, 2021a). Esta capacidad podría estar relacionada con la presencia de epítomos específicos en su estructura. El OviECM también favorece el mantenimiento de la homeostasis celular, promoviendo la sobreexpresión de rutas celulares asociadas a la respuesta fisiológica del embrión (Francés-Herrero *et al.*, 2021a). Además, la interacción entre embrión y oviducto no solo influye en su propio transporte, sino que también afecta a los patrones de expresión genética y fisiológica del oviducto, lo que refuerza la necesidad de replicar esta relación bidireccional en modelos *in vitro* (Lee *et al.*, 2006).

Finalmente, la capacidad de cultivar embriones *ex útero* durante periodos más largos ha abierto nuevas oportunidades para la investigación en reproducción, permitiendo estudiar los efectos directos de agentes externos y sus metabolitos en condiciones altamente controladas, lo cual no tiene precedentes en comparación con estudios *in vivo* (Ozolinš, 2019).

2. OBJETIVOS

En este estudio, nuestro objetivo principal fue evaluar el potencial de los hidrogeles oviductales sincrónicos derivados de matriz extracelular (OviECM), aplicados como recubrimiento en placas de cultivo, sobre el desarrollo embrionario *in vitro* y su efecto en la tasa de implantación. Con este fin, establecimos dos objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del recubrimiento de OviECM, obtenidos de oviductos a las 24 y 72 horas post-ovulación, sobre la tasa de desarrollo a blastocisto de embriones de conejo. Para ello, se emplearán cultivos únicos (OviECM de 24h y OviECM de 72h) y secuenciales (OviECM de 24h por 36h, seguido de OviECM de 72h por otras 36h), en un periodo total de 72 horas de cultivo.
- Determinar el efecto de cultivos únicos con recubrimiento de OviECM (obtenidos a las 24h y 72h post-ovulación) sobre la tasa de implantación embrionaria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Declaración ética

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE EEC sobre el uso de animales en experimentación. El procedimiento experimental empleado fue aprobado por el comité de ética de la Universitat Politècnica de València, con el código de autorización por el órgano competente 2021/VSC/PEA/0270.

3.2. Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en la granja experimental de la Universitat Politècnica de València, con animales propios de origen Neozelandés. Para este estudio se emplearon un total de 53 hembras alojadas individualmente y mantenidas bajo un fotoperiodo controlado de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. A los animales se les proporcionó una dieta estándar que contenía 17,5% de proteína bruta, 2,3% de extracto etéreo, 16,8% de fibra bruta y 2600 Kcal de ED/kg, con acceso libre al agua.

Un total de 24 hembras fueron sincronizadas mediante la administración de 12.5 UI de PMSG vía intramuscular. A las 48 horas, todas las hembras fueron inducidas a ovular mediante la administración intramuscular de 1 ug de GnRh (acetato de buserelina). A las 24 horas, los oviductos de 12 hembras fueron obtenidos y descelularizados (OviECM-24). A las 72 horas, los oviductos de las otras 12 hembras fueron igualmente procesados (OviECM-72). Todo el tejido acelular fue posteriormente triturado, liofilizado y almacenado a 80 °C hasta su uso. Los hidrogeles se generaron siguiendo un protocolo previamente establecido por Francés-Herrero *et al.* (2021a). Los OviECM resultantes se utilizaron como recubrimiento superficial en el cultivo *in vitro* de embriones de conejo durante 72 horas, generando los siguientes grupos experimentales:

- (i) Cultivo en OviECM-24 durante 72 horas
- (ii) Cultivo en OviECM 72 durante 72 horas
- (iii) Cultivo secuencial: OviECM-24 durante 36 horas seguido de OviECM-72 durante otras 36 horas
- (iv) Cultivo en condiciones estándar sin OviECM durante 72 horas.

Para el estudio del efecto de cultivo en OviECM sobre el desarrollo embrionario *in vitro*, se obtuvieron un total de 442 embriones en estadio de 2 células (24 horas post-ovulación) de 9 hembras. Tras el cultivo en los diferentes grupos experimentales se evaluó el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto.

Para el estudio del efecto de cultivo en OviECM-24 y OviECM-72 sobre la tasa de implantación (ensayo pre-clínico), se transfirieron un total de 216 embriones en estado de blastocisto obtenidos de 6 hembras donantes a 14 hembras receptoras. La transferencia embrionaria se realizó mediante laparoscopia. La Figura 2 muestra un esquema completo de la metodología.

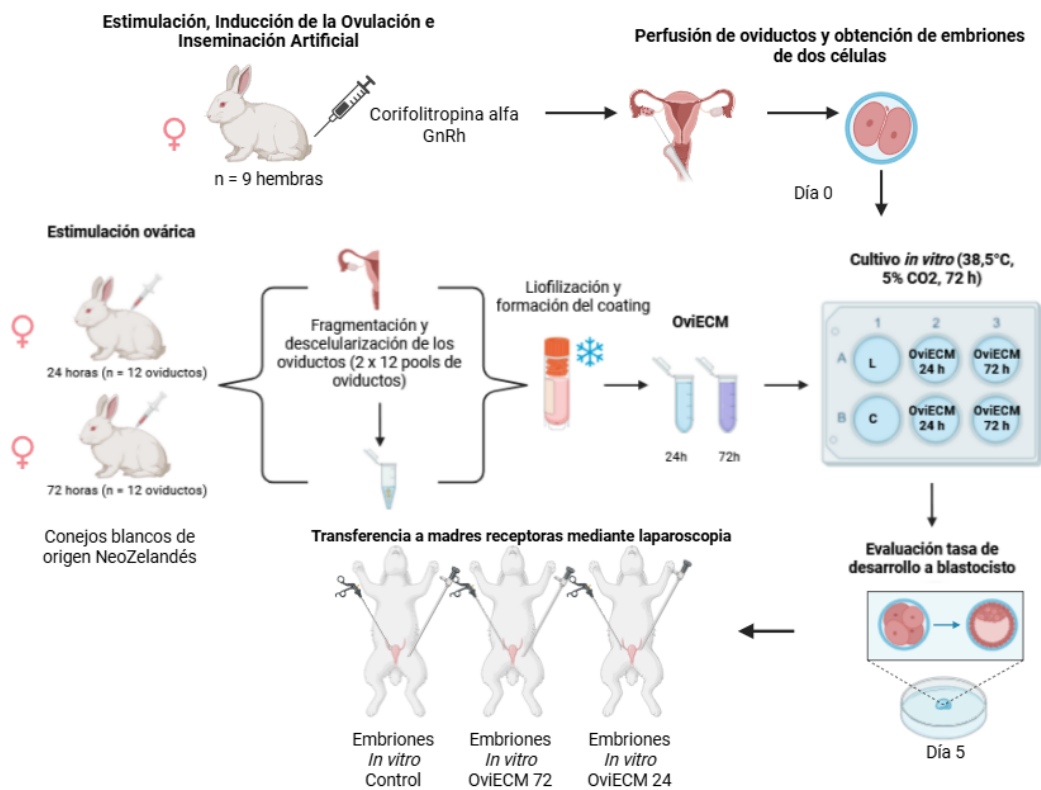


Figura 2. Procedimiento experimental para el estudio del efecto de OviECM en el desarrollo embrionario. Se recolectaron oviductos a las 24 y 72 horas post-estimulación ovárica. Posteriormente fueron descelularizados y solubilizados para generar hidogeles que fueron empleados como recubrimiento en el cultivo in vitro de embriones en estadio de dos células. Para la obtención de estos embriones se perfundieron los oviductos de hembras previamente sincronizadas e inducidas a ovular. Tras 72 horas de cultivo en cuatro condiciones diferentes (sistema único con OviECM-24, sistema único con OviECM-72, sistema secuencial con OviECM-24 y OviECM-72, y sistema único sin OviECM) se evaluó la tasa de desarrollo a blastocisto. Embriones obtenidos bajo condiciones de cultivo OviECM-24, OviECM-72 y condiciones estándar (grupo control) fueron transferidos a través de laparoscopia a hembras receptoras para analizar la tasa de implantación. Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.3. Descelularización de oviductos

Se empleó el protocolo para descelularización de oviductos desarrollado por Francés-Herrero *et al.* (2024). A continuación, se describen brevemente los pasos más relevantes del proceso. La ovulación fue inducida en 24 hembras mediante tratamiento hormonal compuesto por 1g de acetato de buserelina (Hoechst Marion Roussel S.A., Madrid, España). Después de 24 horas (n = 12) y 72 horas (n=12) se obtuvieron los oviductos. Se procedió a la eliminación del exceso de grasa y a su lavado en una solución de suero salino fosfatado (PBS), generando fragmentos de 3-5 mm. Los oviductos de cada grupo (OviECM-24 y OviECM-72) fueron mezclados obteniendo una única muestra por grupo.

A continuación, se mantuvieron en agitación magnética con dodecil sulfato de sodio (SDS) durante 2 días a 300 rpm. Posteriormente, se sometió a un tratamiento con detergentes (Triton X-100, SDS;

Sigma-Aldrich), a su digestión (DNasa 1 D4513-1VL diluida en 1,3 mM MgSO₄ y 2 mM CaCl₂) y finalmente a lavados consecutivos con PBS (Thermo Fisher Scientific), tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de descelularización aplicado a oviductos aislados de 12 hembras tras 24 y 72 horas de estimulación ovárica; reactivos utilizados, sus concentraciones y duración de cada paso.

Componente	Concentración	Duración
PBS	1x	1 h
SDS	0.1%	22 h
PBS	1x	3 min
Triton X-100	0.5%	2 h
PBS	1x	30 min (x 2)
PBS	1x	O/N
Solución DNasa I	30 µg/ml	4 h
PBS	1x	30 min (x 2) + 22 h O/N

O/N: Toda la noche; PBS: solución salina tamponada con fosfato; SDS: dodecil sulfato de sodio. Tabla modificada del protocolo descrito por Francés-Herrero *et al.* (2021a).

3.4. Preparación de hidrogeles de matriz oviductal descelularizada

Tras la descelularización, los fragmentos de oviductos fueron sometidos a un proceso de liofilización (LyoQuest – 85, Telstar) durante 48 horas a 20 Pa y -100°C (LyoQuest -85, Telsar) y posteriormente fueron conservados a -20 °C hasta su utilización.

Los hidrogeles se obtuvieron siguiendo el protocolo previamente descrito por Francés-Herrero *et al.* (2021a). Para llevar a cabo la digestión, el polvo liofilizado se suspendió al 1% (p/v) en HCl 0.01 M (Sigma-Aldrich) con 0.1% (p/v) de pepsina (Sigma-Aldrich) y se digirió durante 48 horas a temperatura ambiente (20-24°C), manteniéndose en agitación constante con un agitador magnético esterilizado. Para detener la digestión, la solución se enfrió y se neutralizó hasta pH fisiológico con una solución al 10% (v/v) de NaOH 0.1 M (Sigma-Aldrich) y PBS 10X. El pH se verificó mediante tiras indicadoras registrándose un valor de 7,3 en ambos preparados. El pregel obtenido se alicuotó y se almacenó a -80°C (Figura 3).

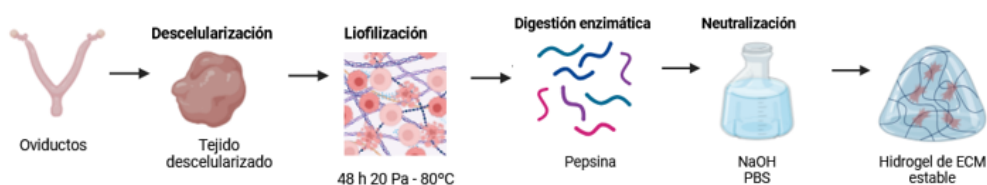


Figura 3. *Proceso de obtención del hidrogel derivado de matriz oviductal sincrónica descelularizada (OviECM). El proceso empieza con la descelularización de los oviductos aislados para eliminar el contenido celular. Seguidamente se produce la liofilización durante 48 horas a 20 Pa y – 80°C, obteniendo una ECM seca que se somete a digestión con pepsina para solubilizar los componentes estructurales. Por último, se neutraliza con NaOH y PBS permitiendo la formación de un hidrogel de ECM estable para emplearse como recubrimiento en el cultivo in vitro de embriones. Protocolo descrito por Francés-Herrero et al. (2021a). Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)*

3.5. Cultivo *in vitro* de embriones

Nueve hembras núlparas de conejo de origen Neozelandés blanco de 5 meses de edad fueron sometidas a un tratamiento de superestimulación ovárica mediante la administración subcutánea de 0,5 mL de hormona folículo estimulante recombinante (corifolitropina alfa, 3 µg/hembra; Elonva, Merck Sharp & Dohme S.A.). Trascurridas 72 horas, las hembras fueron inseminadas artificialmente (IA) utilizando una dosis seminal con una concentración de 30 millones de espermatozoides/mL, depositada en el fondo de la vagina mediante cánulas curvas estándar (24 cm). En el momento de la IA se administró por vía intramuscular 0,3 mL de un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH (acetato de buserelina, 3 µg; Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, España) para inducir la ovulación. Las dosis seminales se recuperaron el mismo día de la inseminación mediante una vagina artificial. Se observó la motilidad a temperatura ambiente utilizando un microscopio de contraste de fases a una magnitud de 200 aumentos. Sólo se emplearon eyaculados que presentaron más del 70% de movilidad espermática y menos del 25% de anomalías morfológicas.

Veinte horas post-inseminación, las hembras fueron eutanasiadas, obteniendo el tracto reproductor del que se obtuvieron los embriones mediante el lavado de los cuernos uterinos con 10 mL de medio de lavado (Euroflush; IMV Technologies, Spain).

Para generar las placas de cultivo, un vial de pregel de OviECM fue descongelado y sometido a una centrifugación rápida. A continuación, se añadieron 100 µL de la solución pregel de OviECM a cada pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche, para favorecer la adhesión no específica de proteínas (Figura 4).

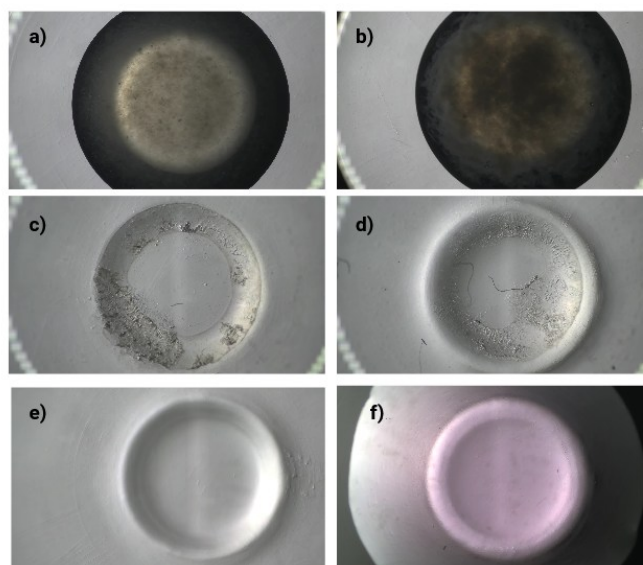


Figura 4. Representación visual de una placa Kitazato de seis pocillos utilizados en el cultivo embrionario *in vitro* tras el recubrimiento con pregel de OviECM y su posterior aspiración. Se muestran: (a) Recubrimiento con hidrogel OviECM-24; (b) Recubrimiento con hidrogel OviECM-72; (c) Restos de OviECM-24 tras aspiración posterior a incubación overnight a 4 °C; (d) Restos de OviECM-72 tras aspiración posterior a incubación overnight a 4 °C; (e) Pocillo sin recubrimiento con OviECM (control); (f) Condición final con medio de cultivo KSOM suplementado y cobertura con aceite mineral. Imágenes capturadas con un aumento de 1.6X.

A primera hora de la mañana, se aspiró la solución pregel de OviECM, lavando cada pocillo con el medio de cultivo KSOM suplementado. A continuación, se añadieron 100 µL de medio de cultivo a cada pocillo, cubriéndolos con aceite mineral (Sigma-Aldrich). La placa fue introducida en la estufa de cultivo bajo una atmósfera con un 5% de CO₂ a 38.5 °C al menos 2 horas antes de su uso para garantizar las condiciones ambientales. La Figura 5 presenta un esquema ilustrativo del montaje en la placa de 6 pocillos.



Figura 5. Fotografía y esquema representativo del montaje de la placa Kitazato de 6 pocillos para el cultivo embrionario *in vitro* bajo diferentes condiciones con OviECM. Las condiciones de cultivo se distribuyeron de forma: **L** (pocillo de lavado, utilizado como transición entre la recuperación embrionaria y la colocación de los embriones en su pocillo correspondiente, pocillo A1); **24** (OviECM-24 durante 72 horas, pocillo A2); **72** (OviECM-72 durante 72 horas, pocillo A3); **C** (control sin OviECM, pocillo B1); **24** (OviECM-24 durante 36 horas, pocillo B2); **72** (OviECM-72 durante 36 horas, pocillo B3). Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Una vez recuperados los embriones, estos fueron evaluados mediante un estereomicroscopio en base a los criterios de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, considerándose adecuados aquellos que presentaban una masa simétrica y esférica, compuesta por dos blastómeros de tamaño, color y densidad uniformes (Figura 6). Los embriones procedentes de todas las hembras fueron mezclados para minimizar el efecto individual de la donante. Los embriones fueron cultivados en grupos de 15 embriones durante 72 horas en placas Kitazato de 6 pocillos (Kitazato), bajo una atmósfera con 5% de CO₂ a 38.5 °C y humedad saturada.



Figura 6. Embrión de conejo en estadio de dos células a las 20 horas post-inseminación. Se observa la zona pelúcida rodeando al embrión y la división entre los dos blastómeros. Imagen capturada con un aumento de 5X.

Se evaluaron cuatro condiciones experimentales de cultivo embrionario *in vitro*:

- Control: embriones cultivados en KSOM (n = 115)
- OviECM-24: cultivo único en KSOM sometido a OviECM-24 (n = 114)
- OviECM-72: cultivo único en KSOM sometido a OviECM-72 (n = 102)
- Cultivo secuencial en KSOM sometido a OviECM-74 durante las primeras 36 horas de cultivo y OviECM-72 las últimas 36 horas (n = 111)

El medio de cultivo utilizado en todos los grupos fue EmbryoMax® KSOM suplementado con aminoácidos, D-glucosa y Rojo de Fenol (EMD Millipore Corp., USA), 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich) y 1% (v/v) de solución antibiótica penicilina/estreptomicina (penicilina G sodio 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI, y sulfato de dehidroestreptomicina 1250 mg; Penivet 1; Divasa Farmavic, Barcelona, España).

3.6. Transferencia de embriones

Un total de 224 embriones (74 OviECM-24, 70 OviECM-72 y 58 grupo Control) fueron transferidos a 14 animales hembras adultas (5 meses de edad) inducidas a ovular 42 horas antes (asíncronía de 30 horas). Se transfirieron blastocistos compactos, homogéneos en tamaño, color y densidad mediante laparoscopia al oviducto de hembras receptoras sincronizadas, siguiendo el protocolo descrito por Besenfelder & Brem (1993) para determinar la tasa de implantación embrionaria. Para ello, las hembras fueron preanestesiadas por vía intramuscular con una combinación de xilazina (2,5 mg/kg) (Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y clorhidrato de ketamina (12,5 mg/kg) (Imalgene 500, Merial SA, Lyon, Francia), y colocadas en posición de Tredelenburg. A continuación, se administró por vía intravenosa 1 mL de clorhidrato de ketamina (25 mg/kg) (Imalgene 500, Merial SA, Lyon, Francia) para inducir anestesia general completa. Como medida analgésica, se utilizó clorhidrato de buprenorfina (0,01 mg/kg) por vía subcutánea. Además, se administraron antibióticos,

bencilpenicilina procaína monohidrato (18,7 mg/kg) y bencilpenicilina benzatina tetrahidrato (15,6 mg/kg), así como meloxicam (0,5 mg/kg) como antiinflamatorio.

Los embriones se introdujeron en un catéter epidural de calibre 16G, introducido a través de una aguja epidural de 17G en la región inguinal de las hembras. La transferencia fue guiada mediante laparoscopia de puerto único, introduciendo el catéter en el oviducto a través del infundíbulo para depositar los embriones (n = 14 por hembra) (Figura 7).



Figura 7. Transferencia embrionaria guiada por laparoscopia. Los embriones (n =14 por hembra) fueron cargados en un catéter epidural de calibre 16G, que se introdujo a través de una aguja epidural de 17G en la región inguinal. El catéter fue dirigido hacia el oviducto a través del infundíbulo para depositar los embriones.

Once días después de la transferencia, se llevó a cabo una nueva laparoscopia de recuento siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el que se registraron los embriones implantados.

3.7. Análisis estadístico

El análisis del desarrollo embrionario in vitro e in vivo (tasa implantación) para cada uno de los grupos experimentales (OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72 y control) se llevó a cabo mediante un Modelo Lineal Generalizado (GLM), asumiendo una distribución binomial utilizando la función de enlace *probit*. Los datos binomiales para la tasa de desarrollo a blastocisto y la tasa de implantación se codificaron con un valor de 1 cuando se registró un desarrollo positivo, o 0 cuando no se registró. Los datos se presentan como medias de mínimos cuadrados \pm error estándar de las

medias de mínimos cuadrados (LSM \pm SEM). Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con un valor de $P < 0,05$. Los análisis se realizaron empleando un programa de software comercial (paquete de software SPSS Statistics 27.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación del efecto del uso de OviECM como recubrimiento en el desarrollo embrionario *in vitro*

Un total de 442 embriones fueron cultivados en este experimento (114 para OviECM-24, 102 para OviECM-72, 111 para OviECM-24+72h y 115 para el grupo control). Tras 24 horas de cultivo, todos los embriones, independientemente del grupo experimental, presentaron una morfología adecuada, correspondiente al estadio de 4 a 8 células (Figura 8).

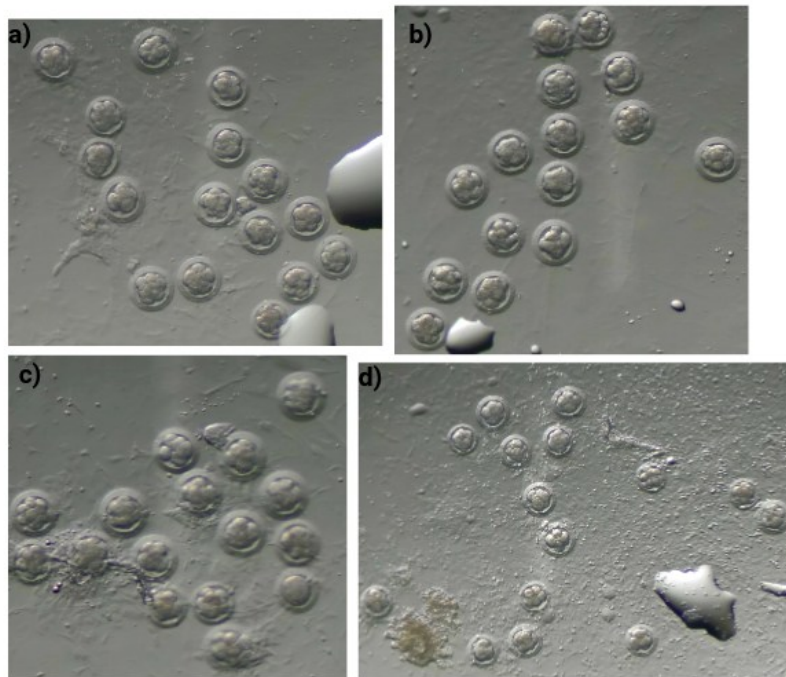


Figura 8. Evaluación tras 24 horas de cultivo embrionario *in vitro*. Se muestran: (a) Control; (b) OviECM-24; (c) OviECM-72; (d) OviECM-24+72h. Imágenes capturadas con un aumento de 5X.

Resultado similar tras 48 horas de cultivo, observando el estadio de mórula (Figura 9).

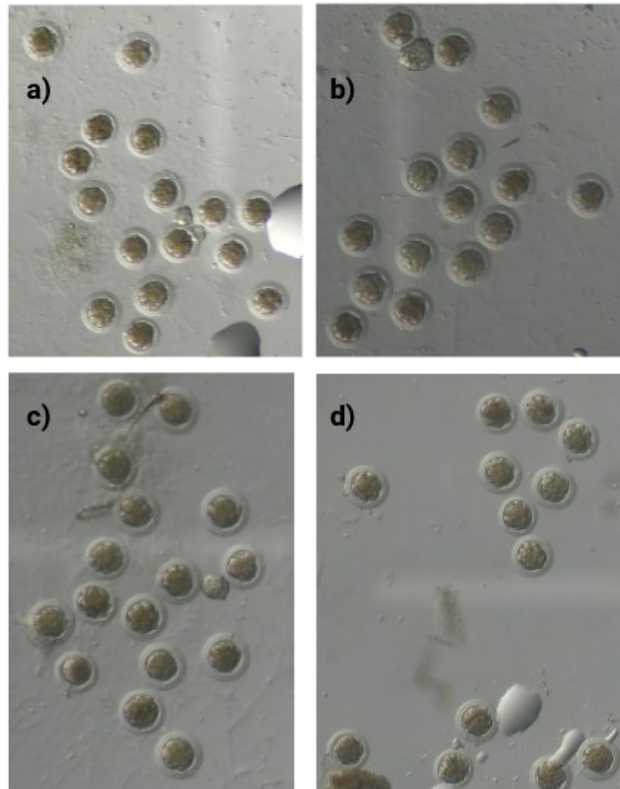


Figura 9. Evaluación tras 48 horas de cultivo embrionario *in vitro*. Se muestran: (a) Control; (b) OviECM-24; (c) OviECM-72; (d) OviECM-24+72h. Imágenes capturadas con un aumento de 5X.

Tras 72 horas de cultivo, se observó que todos los grupos experimentales alcanzaron el estadio de blastocisto, con distinto grado de expansión (Figura 10).

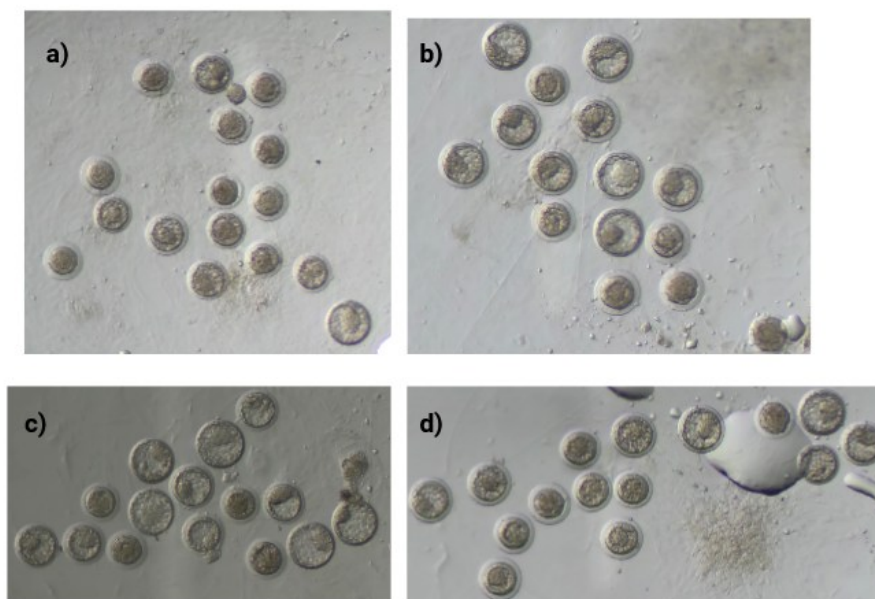


Figura 10. Evaluación tras 72 horas de cultivo embrionario in vitro. Se muestran: (a) Control; (b) OviECM-24; (c) OviECM-72; (d) OviECM-24+72. Imágenes capturadas con un aumento de 5X.

Los resultados de desarrollo embrionario determinado en base a aquellos que alcanzaron el estadio de blastocisto se muestra en la Figura 11. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales ($P > 0.05$). En todos los grupos, más del 70% de los embriones alcanzaron el estadio de blastocisto.

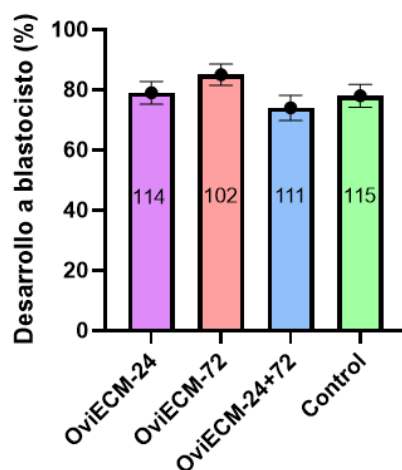


Figura 11. Porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto tras 72 horas de cultivo in vitro bajo las distintas condiciones evaluadas: OviECM-24, OviECM-72, OviECM-24+72h y grupo control. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando un modelo probit, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos ($P = 0.197$). El número de embriones por grupo se indica dentro de cada barra.

4.2. Evaluación del efecto del uso de OviECM como recubrimiento en la tasa de implantación embrionaria

Un total de 224 embriones (74 OviECM-24, 70 OviECM-72 y 58 Control) fueron transferidos a 14 hembras receptoras. Tras once días, se observaron múltiples sitios de implantación embrionaria en el útero de las hembras receptoras. Estos sitios aparecen como estructuras redondeadas y vascularizadas sobre la superficie uterina (Figura 12).



Figura 12. Imágenes representativas de una laparoscopia para el control de la tasa de implantación en una hembra receptora de conejo a los 11 días post-transferencia embrionaria. Se observan múltiples sitios de implantación que aparecen como estructuras uterinas redondas vascularizadas.

La proporción de embriones implantados a los 14 días de gestación se muestra en la Figura 13. El análisis de la tasa de implantación no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales ($P > 0.05$).

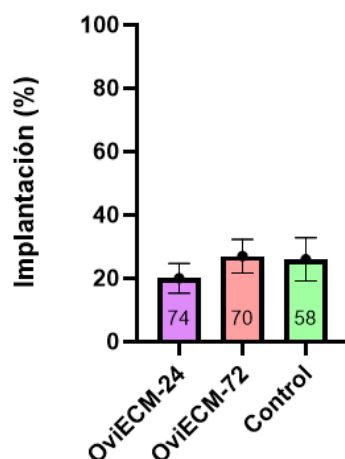


Figura 13. Porcentaje de embriones implantados tras 14 días de gestación bajo las distintas condiciones evaluadas: OviECM-24, OviECM-72 y grupo control. El análisis estadístico se llevó a cabo

*utilizando un modelo probit, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos ($P = 0.619$).
El número de embriones por grupo se indica dentro de cada barra.*

5. DISCUSIÓN

El cultivo *in vitro* del embrión preimplantacional es un pilar fundamental de la reproducción asistida (Xue *et al.*, 2024). Por ello, su continua optimización es de vital importancia tanto en la clínica humana como en la reproducción animal, impulsando la investigación hacia nuevas y mejores metodologías. La eficacia de estos tratamientos depende de la calidad del embrión, un aspecto que cobra aún mayor relevancia ante la tendencia actual de transferir un menor número de embriones. Sin embargo, los embriones desarrollados en condiciones *in vitro* presentan desafíos, mostrando tasas de formación de blastocistos y de gestación inferiores, así como mayores pérdidas fetales en comparación con los embriones que se desarrollan *in vivo* (Xue *et al.*, 2024). De hecho, diversos estudios clínicos han señalado que la transferencia de embriones de baja calidad es una de las principales causas del fallo en la implantación (Abel *et al.*, 2019) por lo que es crucial mejorar las condiciones que influyen en el desarrollo embrionario.

El desarrollo embrionario *in vitro* depende de múltiples factores, entre ellos la densidad embrionaria, la concentración de moléculas secretadas por el embrión en relación con el volumen del medio de cultivo, la presencia de células oviductales o endometriales en sistemas de co-cultivo, la rigidez del sustrato en contacto con el embrión y la estimulación mecánico-fluida, como vibraciones o inclinaciones, imitadas por los sistemas de cultivo dinámico (Gualtieri *et al.*, 2024). Además, la composición del medio de cultivo desempeña un papel fundamental en el desarrollo embrionario, afectando directamente a eventos clave del desarrollo y al potencial de implantación del embrión (Koscinski *et al.*, 2018). Las investigaciones actuales y las tendencias de la industria apuntan al uso de medios químicamente definidos, debido a su idoneidad para los procesos de fabricación y monitorización (Xue *et al.*, 2024), sin embargo, existe evidencia que sugiere que los medios de cultivo empleados actualmente para el desarrollo embrionario *in vitro* son subóptimos y requieren mejoras (Chronopoulou & Harper, 2015; Francés-Herrero *et al.*, 2024).

Estudios recientes han identificado dos alternativas prometedoras para mejorar el cultivo embrionario *in vitro*: el uso de vesículas extracelulares (VEs) (Gualtieri *et al.*, 2024) y la utilización de tejidos descelularizados (Campo *et al.*, 2019; Francés-Herrero *et al.*, 2021a:2024). Por un lado, las VEs constituyen una población heterogénea de partículas rodeadas por membranas, de tamaño nanométrico a micrométrico, secretadas por prácticamente todos los tipos de células. Estas vesículas transportan distintos tipos de moléculas — incluyendo proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y metabolitos — que pueden ser absorbidas por otras células y provocar múltiples respuestas biológicas (Alminana *et al.*, 2017; Alminana & Bausersachs, 2020). Por otro lado, los tejidos reproductivos descelularizados están compuestos principalmente por proteínas estructurales como colágeno, elastina y laminina, así como por GAGs (Campo *et al.*, 2019; Francés-Herrero *et al.*, 2024). Estos componentes pueden regular vías de señalización y suministrar biomoléculas específicas al medio de cultivo. En concreto, en el modelo de conejo OviECM tiene efecto sobre la expresión génica embrionaria, la tasa de implantación y el fenotipo de la descendencia (Francés-Herrero *et al.*, 2024).

En base a todo lo anterior, en este estudio empleamos oviductos descelularizados para generar un recubrimiento en base a estudios previos del grupo (Francés-Herrero *et al.*, 2024), en el que se estudió la influencia de la sincronía entre el OviECM y el desarrollo embrionario en un medio de un solo paso, así como un cultivo secuencial de OviECM ajustando las horas post-ovulación del embrión con el OviECM. Nuestros resultados demuestran que, en términos de desarrollo *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, no se observa ninguna mejora entre el cultivo convencional frente al uso de OviECM, ni entre la sincronía entre el OviECM y el embrión. Resultados similares a los observados por Francés-Herrero *et al.* (2021a:2024), en los que OviECM-72 no mostró mejoras en los

indicadores clásicos de viabilidad embrionaria (tasa de desarrollo a blastocisto, morfología y aspecto), en comparación con un medio de cultivo convencional. Aunque nuestro grupo demostró previamente que los recubrimientos de endometrio descelularizado sincrónico actúan como un soporte biomimético (Campo *et al.*, 2019), los hallazgos actuales indican que esta sincronización (desarrollo embrionario y el tejido oviductal) no parece ser un factor crítico para la tasa de desarrollo a blastocisto con el tejido oviductal. De hecho, la aplicación de un cultivo secuencial con OviECM sincrónico no consiguió mejorar este parámetro. Este resultado coincide con lo descrito en la literatura general sobre cultivo embrionario. Si bien la renovación del medio se ha propuesto como una estrategia para eliminar productos de desecho metabólico, diversos estudios han demostrado que los medios secuenciales no proporcionan una ventaja clara frente a los sistemas de cultivo en un medio de un solo paso (Reed *et al.*, 2009; Sfontorius *et al.*, 2016; Cimadomo *et al.*, 2018).

En términos globales, la tasa de desarrollo hasta blastocisto obtenida en este estudio fue ligeramente inferior que la reportada por Francés-Herrero *et al.* (2021a:2024). Una posible explicación podría atribuirse al medio de cultivo empleado. En este estudio se empleó el medio EmbryoMax® KSOM (EMD Millipore Corp., USA) mientras que Francés-Herrero *et al.* (2021a:2024) emplearon el medio SAGE 1-Step™ HSA (CooperSurgical). El medio EmbryoMax® KSOM ha sido empleado en otras especies como bovinos, demostrando un mayor porcentaje de mórulas compactas y blastocistos tempranos, así como en un aumento en el porcentaje de blastocistos normales y expandidos (Senn *et al.*, 2024). A pesar de su versatilidad, según el conocimiento disponible, no se ha reportado en la literatura ningún estudio que haya comparado de forma directa ambos medios.

Para conocer los resultados de OviECM sincrónico en un entorno pre-clínico, se evaluó la tasa de implantación embrionaria tras la transferencia a hembras receptoras. Para ello se descartó el grupo secuencial, comparando únicamente los cultivos en OviECM en un solo paso frente al cultivo en medio convencional. Nuevamente, los resultados mostraron una respuesta similar entre todos los grupos experimentales. Resultados similares a los mostrados por Francés-Herrero *et al.* (2024). Cabe destacar que, en conejo, el cultivo *in vitro* de embriones desde edades tempranas presenta unas tasas de nacimiento cercanas al 20% (Francés-Herrero *et al.*, 2024). Estos hallazgos *in vivo* refuerzan nuestros resultados *in vitro* y sugieren que la sincronización entre el estadio del embrión y el estado del epitelio oviductal no representa un factor determinante para el desarrollo preimplantacional ni para la implantación. Sin embargo, esta conclusión debe ser corroborada mediante el análisis de la tasa de nacidos vivos.

El uso de matrices oviductales descelularizadas como recubrimiento en el cultivo embrionario *in vitro* es una estrategia innovadora, descrita únicamente en trabajos previos de nuestro grupo (Francés-Herrero *et al.*, 2021a, 2024). Esta originalidad implica que, hasta el momento, no se dispone de datos previos en la bibliografía que permitan establecer comparaciones directas con los resultados obtenidos en este estudio. Por tanto, será esencial llevar a cabo la evaluación de la tasa de nacimientos y el análisis fenotípico de la descendencia para determinar el verdadero potencial de la OviECM como soporte en el cultivo embrionario.

6. CONCLUSIONES

El recubrimiento de las placas de cultivo con hidrogeles derivados de matrices oviductales sincrónicas descelularizadas (24 y 72 horas post-ovulación) no influye en el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto en el modelo de conejo, ya sea en un sistema de cultivo de un solo paso o secuencial.

Asimismo, el uso de matrices oviductales sincrónicas descelularizadas (24 y 72 horas post-ovulación) en un sistema de cultivo embrionario *in vitro* de un solo paso no influye en la capacidad de implantación embrionaria.

Estos resultados indican que las matrices oviductales descelularizadas en el cultivo *in vitro* no superan a los sistemas convencionales basados en medios definidos a nivel prenatal. Futuras investigaciones son necesarias para evaluar el efecto potencial de estas matrices oviductales descelularizadas en el desarrollo post-natal.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, K., Healey, M., Finch, S., Osianlis, T., & Vollenhoven, B. (2019). Associations between embryo grading and congenital malformations in IVF/ICSI pregnancies. *Reproductive biomedicine online*, 39(6), 981–989. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.07.035>
- Alminana, C., Corbin, E., Tsikis, G., Alcantara-Neto, A. S., Labas, V., Reynaud, K., et al. (2017). Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction* 154 (3), 153–168. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0054>
- Alminana, C., and Bauersachs, S. (2020). Extracellular vesicles: multi-signal messengers in the gametes/embryo-oviduct cross-talk. *Theriogenology* 150, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.077>
- Baltz J. M. (2012). Media composition: salts and osmolality. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 912, 61–80. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-971-6_5
- Besenfelder, U., & Brem, G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *Journal of reproduction and fertility*, 99(1), 53–56. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990053>
- Campo, H., García-Domínguez, X., López-Martínez, S., Faus, A., Vicente Antón, J. S., Marco-Jiménez, F., & Cervelló, I. (2019). Tissue-specific decellularized endometrial substratum mimicking different physiological conditions influences in vitro embryo development in a rabbit model. *Acta biomaterialia*, 89, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.004>
- Chiti, M. C., Vanacker, J., Ouni, E., Tatic, N., Viswanath, A., des Rieux, A., Dolmans, M. M., White, L. J., & Amorim, C. A. (2022). Ovarian extracellular matrix-based hydrogel for human ovarian follicle survival in vivo: A pilot work. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 110(5), 1012–1022. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34974>
- Choudhury, D., Yee, M., Sheng, Z. L. J., Amirul, A., & Naing, M. W. (2020). Decellularization systems and devices: State-of-the-art. *Acta biomaterialia*, 115, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.060>
- Chronopoulou, E., and Harper, J. C. (2015). IVF culture media: past, present and future. *Hum. Reprod. Update* 21 (1), 39–55. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu040>
- Cimadomo, D., Scarica, C., Maggiulli, R., Orlando, G., Soscia, D., Albricci, L., Romano, S., Sanges, F., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2018). Continuous embryo culture elicits higher blastulation but similar cumulative delivery rates than sequential: a large prospective study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(7), 1329–1338. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1195-4>
- Elomda, A. M., Saad, M. F., Saeed, A. M., Elsayed, A., Abass, A. O., Safaa, H. M., & Mehaisen, G. M. K. (2018). Antioxidant and developmental capacity of retinol on the in vitro culture of rabbit embryos. *Zygote (Cambridge, England)*, 26(4), 326–332. <https://doi.org/10.1017/S0967199418000308>
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144(1), 1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0091>
- Francés-Herrero, E., De Miguel-Gómez, L., López-Martínez, S., Campo, H., Garcia-Dominguez, X., Diretto, G., Faus, A., Vicente, J. S., Marco-Jiménez, F., & Cervelló, I. (2021a). Development of Decellularized Oviductal Hydrogels as a Support for Rabbit Embryo Culture. *Reproductive*

sciences (Thousand Oaks, Calif.), 28(6), 1644–1658. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00446-6>

- Francés-Herrero, E., Juárez-Barber, E., Campo, H., López-Martínez, S., de Miguel-Gómez, L., Faus, A., Pellicer, A., Ferrero, H., & Cervelló, I. (2021b). Improved Models of Human Endometrial Organoids Based on Hydrogels from Decellularized Endometrium. *Journal of personalized medicine*, 11(6), 504. <https://doi.org/10.3390/jpm11060504>
- Francés-Herrero, E., Lopez, R., Hellström, M., de Miguel-Gómez, L., Herraiz, S., Brännström, M., Pellicer, A., & Cervelló, I. (2022a). Bioengineering trends in female reproduction: a systematic review. *Human reproduction update*, 28(6), 798–837. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac025>
- Francés-Herrero, E., Rodríguez-Eguren, A., Gómez-Álvarez, M., de Miguel-Gómez, L., Ferrero, H., & Cervelló, I. (2022b). Future Challenges and Opportunities of Extracellular Matrix Hydrogels in Female Reproductive Medicine. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3765. <https://doi.org/10.3390/ijms23073765>
- Francés-Herrero, E., Lopez, R., Campo, H., de Miguel-Gómez, L., Rodríguez-Eguren, A., Faus, A., Pellicer, A., & Cervelló, I. (2023). Advances of xenogeneic ovarian extracellular matrix hydrogels for in vitro follicle development and oocyte maturation. *Biomaterials advances*, 151, 213480. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213480>
- Francés-Herrero, E., Lorenzo-Rebenaque, L., Casto-Rebollo, C., Vicente, J. S., Sebastian-Leon, P., Bueno-Fernandez, C., Rodríguez-Eguren, A., Gómez-Álvarez, M., Faus, A., Díaz-Gimeno, P., Marco-Jiménez, F., & Cervelló, I. (2024). Oviductal extracellular matrix hydrogels enhance in vitro culture of rabbit embryos and reduce deficiencies during assisted reproductive technologies. *Scientific reports*, 14(1), 27579. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77583-4>
- Franko, R., Franko, Y., Ribes Martinez, E., Ferronato, G. A., Heinzelmann, I., Grechi, N., Devkota, S., Fontes, P. K., Coeti, R., Oshiro, T. S. I., & Ferraz, M. A. M. M. (2024). Mechanical properties of native and decellularized reproductive tissues: insights for tissue engineering strategies. *Scientific reports*, 14(1), 7347. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57867-5>
- Gao, L., Zhang, C., Zheng, Y., Wu, D., Chen, X., Lan, H., Zheng, X., Wu, H., & Li, S. (2023). Glycine regulates lipid peroxidation promoting porcine oocyte maturation and early embryonic development. *Journal of animal science*, 101, skac425. <https://doi.org/10.1093/jas/skac425>
- Garcia-Dominguez, X., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D. S., & Vicente, J. S. (2020). Long-Term Phenotypic and Proteomic Changes Following Vitrified Embryo Transfer in the Rabbit Model. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(6), 1043. <https://doi.org/10.3390/ani10061043>
- Gardner, D. K., Lane, M., Calderon, I., & Leeton, J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and sterility*, 65(2), 349–353. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)58097-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)58097-2)
- Geber, S., Bossi, R., Guimarães, F., Valle, M., & Sampaio, M. (2012). Effects of transfer of embryos independently cultured in essential and sequential culture media on pregnancy rates in assisted reproduction cycles. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(10), 1097–1101. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9835-6>
- Glujovsky, D., Quinteiro Retamar, A. M., Alvarez Sedo, C. R., Ciapponi, A., Cornelisse, S., & Blake, D. (2022). Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive

- technology. *The Cochrane database of systematic reviews*, 5(5), CD002118. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002118.pub6>
- Godfrey, M. (2009). *Chapter 22 – Extracellular matrix*. En P. J. Barnes, J. M. Drazen, S. I. Rennard, & N. C. Thomson (Eds.), *Asthma and COPD* (2.^a ed., pp. 265-274). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374001-4.00022-5>
- Gualtieri, R., De Gregorio, V., Candela, A., Travaglione, A., Genovese, V., Barbato, V., & Talevi, R. (2024). In Vitro Culture of Mammalian Embryos: Is There Room for Improvement?. *Cells*, 13(12), 996. <https://doi.org/10.3390/cells13120996>
- Kane M. T. (2019). Culture of Preimplantation Rabbit Embryos. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2006, 63–91. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_5
- Koscinski, I., Merten, M., Kazdar, N., and Gueant, J. L. (2018). Culture conditions for gametes and embryos: which culture medium? Which impact on newborn? *Gynecol. Obstet. Fertil. Senol.* 46 (5), 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2018.03.010>
- Lee, K. F., & Yeung, W. S. (2006). Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on in vitro culture. *Human fertility (Cambridge, England)*, 9(3), 137–143. <https://doi.org/10.1080/14647270600636467>
- Li, J., Foote, R. H., Liu, Z., & Giles, J. R. (1997). Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology*, 47(5), 1103–1113. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00067-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00067-8)
- López-Martínez, S., Rodríguez-Eguren, A., de Miguel-Gómez, L., Francés-Herrero, E., Faus, A., Díaz, A., Pellicer, A., Ferrero, H., & Cervelló, I. (2021). Bioengineered endometrial hydrogels with growth factors promote tissue regeneration and restore fertility in murine models. *Acta biomaterialia*, 135, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.025>
- Marco-Jiménez, F., Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2024). Why choose the rabbit to work in reproductive technology?. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 59 Suppl 3, e14640. <https://doi.org/10.1111/rda.14640>
- Memi, E., Pavli, P., Papagianni, M., Vrachnis, N., & Mastorakos, G. (2024). Diagnostic and therapeutic use of oral micronized progesterone in endocrinology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 25(4), 751–772. <https://doi.org/10.1007/s11154-024-09882-0>
- Miraki, S., Rashidi, A., Banafshi, O., Alasvand, M., Fathi, F., & Golmohammadi, M. G. (2022). Effects of embryonic stem cell-conditioned medium on the preimplantation development of mouse embryos. *Zygote (Cambridge, England)*, 30(4), 464–470. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000575>
- World Health Organization. (2024). *Infertility*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
- Ozolinš T. R. S. (2019). Rabbit Whole Embryo Culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1965, 219–233. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9182-2_15
- Quinn P. (2012). Culture systems: sequential. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 912, 211–230. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-971-6_13
- Pinborg, A., Wennerholm, U. B., & Bergh, C. (2023). Long-term outcomes for children conceived by assisted reproductive technology. *Fertility and sterility*, 120(3 Pt 1), 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.04.022>

- Reed, M. L., Hamic, A., Thompson, D. J., & Caperton, C. L. (2009). Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertility and sterility*, *92*(5), 1783–1786. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.008>
- Ribes Martinez, E., Franko, Y., Franko, R., Ferronato, G. A., Viana, A. E. S., Windenbach, E., Stoeckl, J. B., Fröhlich, T., & Ferraz, M. A. M. M. (2025). Developing and characterising bovine decellularized extracellular matrix hydrogels to biofabricate female reproductive tissues. *Acta biomaterialia*, *196*, 152–170. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2025.03.009>
- Rossant, J., & Tam, P. P. L. (2022). Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Developmental cell*, *57*(2), 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.12.022>
- Sanguansook, P., Martínez-López, C., Izquierdo-Rico, M. J., Martínez-Cáceres, C., López-Orozco, M., Chatdarong, K., & García-Vázquez, F. A. (2024). Development of decellularization protocols for female cat reproductive organs. *Research in veterinary science*, *173*, 105257. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105257>
- Sciorio, R., & Rinaudo, P. (2023). Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *40*(11), 2591–2607. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02934-5>
- Senn, L. K., Peterson, K. D., Edwards, J. L., Payton, R. R., & Mathew, D. J. (2024). Oviduct and endometrial epithelium improve in vitro produced bovine embryo developmental kinetics. *Reproduction (Cambridge, England)*, *167*(5), e240008. <https://doi.org/10.1530/REP-24-0008>
- Sfontouris, I. A., Martins, W. P., Nastri, C. O., Viana, I. G., Navarro, P. A., Raine-Fenning, N., van der Poel, S., Rienzi, L., & Racowsky, C. (2016). Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *33*(10), 1261–1272. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0774-5>
- Suebthawinkul, C., Numchaisrika, P., Chaengsawang, A., Pilaisangsuree, V., Summat, S., & Sereepapong, W. (2024). Determining Factors Influencing The Successful Embryo Transfer and Pregnancy during The Frozen Cycle of *In Vitro* Fertilization: A Retrospective Cohort Study. *International journal of fertility & sterility*, *18*(4), 352–361. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2023.2009998.1532>
- Sultana, F., Hatori, M., Shimosawa, N., Ebisawa, T., & Sankai, T. (2009). Continuous observation of rabbit preimplantation embryos in vitro by using a culture device connected to a microscope. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *48*(1), 52–56. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2694706/>
- Summers M. C. (2014). A brief history of the development of the KSOM family of media. *Human fertility (Cambridge, England)*, *17* Suppl 1, 12–16. <https://doi.org/10.3109/14647273.2014.919185>
- Swain, J. E., Carrell, D., Cobo, A., Meseguer, M., Rubio, C., & Smith, G. D. (2016). Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertility and sterility*, *105*(3), 571–587. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.01.035>
- Vander Borgh, M., & Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical biochemistry*, *62*, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012>

- Wang, H., Cao, W., Hu, H., Zhou, C., Wang, Z., Alam, N., Qu, P., & Liu, E. (2022). Effects of changing culture medium on preimplantation embryo development in rabbit. *Zygote (Cambridge, England)*, *30*(3), 338–343. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000721>
- Xue, Y., Zheng, H., Xiong, Y., & Li, K. (2024). Extracellular vesicles affecting embryo development *in vitro*: a potential culture medium supplement. *Frontiers in pharmacology*, *15*, 1366992. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1366992>
- Zhang, J. K., Du, R. X., Zhang, L., Li, Y. N., Zhang, M. L., Zhao, S., Huang, X. H., & Xu, Y. F. (2017). A new material for tissue engineered vagina reconstruction: Acellular porcine vagina matrix. *Journal of biomedical materials research. Part A*, *105*(7), 1949–1959. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36066>

8. ANEXOS

ANEXO I. Relación del trabajo con los Objetivos del Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

Tabla A1. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico			X	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades			X	
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles			X	
ODS 12. Producción y consumo responsables		X		
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.			X	

Este trabajo está estrechamente vinculado con varios Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la agenda 2030, entre los que se encuentran la salud y el bienestar, la innovación y la producción responsable, ya que explora mejorar la eficiencia de técnicas de reproducción asistida, el desarrollo de nuevas tecnologías en el cultivo embrionario mediante el uso de OviECM y el uso responsable de recursos biológicos.

En particular, esta investigación se relaciona directamente con el ODS 3: Salud y bienestar, cuyo objetivo es garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades, al proponer mejoras en las técnicas de reproducción asistida, que favorecen la salud reproductiva, y en consecuencia mejoran la calidad de vida. En particular, la implementación de recubrimientos de OviECM durante el cultivo embrionario *in vitro* podría aplicarse tanto en biotecnología animal como en medicina reproductiva humana, promoviendo el desarrollo de soluciones innovadoras y de calidad en el ámbito de la salud humana y el bienestar animal.

En este contexto, el uso de recubrimientos como OviECM puede crear un entorno más biomimético, lo cual se traduce en una mejora en la eficiencia de los tratamientos de fertilidad, repercutiendo en la salud de los pacientes. Por otro lado, esta tecnología puede aplicarse en especies en peligro de extinción, donde garantizar el éxito reproductivo resulta crucial, al ofrecer una alternativa para obtener embriones viables en condiciones de laboratorio.

Además, este estudio también se puede relacionar de manera indirecta con otros ODS. El desarrollo de matrices biomiméticas favorece el diseño de plataformas más eficientes y reproducibles, lo cual representa un avance en el campo de la innovación, representado por el ODS 9: Industria, innovación e infraestructura, cuyo objetivo es construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización sostenible y fomentar la innovación. Asimismo, la formulación de sistemas de cultivos basados en OviECM permite reducir el empleo de productos sintéticos, respondiendo a una necesidad creciente de desarrollar sistemas más sostenibles y responsables, relacionado con el ODS

12: Producción y consumo responsables, cuyo objetivo es garantizar modalidades de consumo y producción sostenible.