

## EFECTO DE LAS SECRECIONES DE ORGANOIDES DE ENDOMETRIO HUMANO SOBRE EL CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIONES BOVINOS

Effect of human endometrial organoid secretions on the *in vitro* culture of bovine embryos

Masegosa-Domínguez, Alicia<sup>1</sup>; Romero-Aguirregomezcorta, Jon<sup>1,2</sup>; Juan, Ángela<sup>1</sup>; Navarro-Serna, Sergio<sup>3</sup>; Pérez-García, Vicente<sup>3</sup>; Coy, Pilar<sup>1,2</sup>

1. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Internacional “Mare Nostrum”, Universidad de Murcia, Murcia, 30100, España.
2. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB-Arrixaca), Murcia, España.
3. Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, España.

**Autores de correspondencia:** Coy, P., p.coy@um.es; Pérez García, V., vperez@cipf.e

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Máster (Máster en Biotecnología de la Reproducción en Mamíferos)

Enviado: 19/10/2023

Aceptado: 08/11/23

### RESUMEN

Durante los últimos 50 años, la fertilidad de las vacas lecheras de alta producción ha disminuido debido a la intensidad de la selección genética. Para superar este obstáculo, se ha recurrido a las técnicas de reproducción asistida. Sin embargo, la producción de embriones *in vitro* es un proceso relativamente ineficiente, con tasas máximas de blastocistos obtenidos de alrededor del 35%. Para solventar este problema, se planteó la hipótesis de añadir al medio de cultivo secreciones de organoides de endometrio, así, los embriones producidos *in vitro* estarían expuestos a un ambiente más fisiológico y el rendimiento de la técnica aumentaría. Para ello, se llevó a cabo la recolección de ovocitos bovinos procedentes de un matadero local, y se procedió a su maduración *in vitro*, fecundación *in vitro* y cultivo embrionario *in vitro*. El medio de cultivo embrionario se suplementó al 1% (v/v) con i) secreciones de organoides de endometrio humano (ya que no existe disponibilidad de secreciones bovinas), ii) medio de cultivo *Boretto*, y ii) gotas de matrigel con medio de cultivo *Boretto*, como controles de

procedimiento. Además, se incluyó un grupo control sin ningún suplemento. Se evaluó el desarrollo embrionario a los días 2, 7 y 8 de cultivo. El porcentaje de blastocistos a día 7 y a día 8 post inseminación fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) cuando se añadió el medio de cultivo *Boretto*. Además, este tratamiento incrementó la cinética de desarrollo de los embriones a día 7 post inseminación, y la calidad de los blastocistos evaluada por el número total de células, con un 85.8% más que el control. Aunque las secreciones de endometrio humano no han dado el resultado esperado, sería necesario comprobar si las secreciones de organoides específicas de endometrio bovino, a distintas concentraciones, podrían incrementar el rendimiento de la producción *in vitro* de embriones bovinos.

**Palabras clave:** producción *in vitro* de embriones, bovino, organoides, endometrio humano

## SUMMARY

Over the last 50 years, the fertility of high-producing dairy cows has declined due to the intensity of genetic selection. To overcome this obstacle, assisted reproductive techniques have been used. However, *in vitro* embryo production is a relatively inefficient process, with maximum blastocyst yield rates of around 35%. To overcome this problem, it was hypothesised that by adding endometrial organoid secretions to the culture medium, embryos produced *in vitro* would be exposed to a more physiological environment and the yield of the technique would increase. For this purpose, bovine oocytes were collected from a local abattoir and matured *in vitro*, fertilised *in vitro* and cultured *in vitro*. The embryo culture medium was supplemented at 1% (v/v) with i) human endometrial organoid secretions (as bovine secretions are not available), ii) *Boretto* culture medium, and ii) matrigel drops with *Boretto* culture medium, as procedural controls. In addition, a control group without any supplementation was included. Embryo development was assessed at days 2, 7 and 8 of culture. The percentage of blastocysts at day 7 and day 8 post insemination was significantly higher ( $P < 0.05$ ) when *Boretto* culture medium was added. In addition, this treatment increased embryo development kinetics at day 7 post insemination, and blastocyst quality as assessed by total cell number, with 85.8% more than the control. Although human endometrial secretions have not given the expected result, it would be necessary to test whether bovine endometrial-specific organoid secretions, at different concentrations, could increase the yield of bovine embryo production *in vitro*.

**Keywords:** *in vitro* embryo production, bovine, organoids, human endometrium

## INTRODUCCIÓN

En España, el sector bovino ocupa el segundo lugar en importancia económica dentro de las actividades ganaderas, después del sector porcino. Los principales usos del ganado bovino son la producción de leche y derivados lácteos y la producción de carne (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023). Estos productos proporcionan aminoácidos esenciales, minerales (calcio, zinc, selenio) y vitaminas (A, B3, B6, B12, D), demostrando la importancia fundamental de la ganadería bovina para los sistemas agroalimentarios humanos (Brito et al., 2021).

La selección genética, la inseminación artificial (IA) y el uso del semen sexado han

sido factores clave en la intensificación de la industria láctea para aumentar la producción de leche (Ferré et al., 2020). Durante los últimos 50 años, la fertilidad de las vacas lecheras de alta producción ha disminuido (Loneragan et al., 2016). Esto es debido a una correlación genética negativa entre la producción de leche y la fertilidad (Cutullic et al., 2012; Pryce et al., 2004).

Una solución para superar la infertilidad y aumentar el número de animales con alto valor genético es recurrir a las técnicas de reproducción asistida (Hansen & Block, 2004). Estas técnicas incluyen la IA con semen fresco, congelado y sexado; y la transferencia de embriones producidos *in vivo* o *in vitro* procedentes de gametos de animales selectos. Esos embriones

se implantan en vacas que sean buenas reproductoras, pero con bajo interés genético o baja productividad láctea (Wrenzycki, 2018). Por otra parte, las vacas lecheras de alta producción deben gestar cíclicamente para producir leche. En este caso, no se busca la descendencia de estas vacas, sino maximizar su capacidad de producción lechera. Para ello, se utilizan gametos de animales de aptitud cárnica, se producen embriones y se transfieren a las vacas lecheras de alta producción (Britt et al., 2021).

Todos estos procesos se consiguen con técnicas de reproducción asistida. La producción *in vitro* de embriones (PIV) y las tecnologías asociadas comenzaron a desarrollarse en el ganado bovino en la década de los 80 y han mostrado importantes avances en los últimos años (Ferré et al., 2020). La producción *in vitro* implica cuatro pasos principales en secuencia: obtención de ovocitos y maduración *in vitro* (MIV); selección espermática; fecundación *in vitro* (FIV); y cultivo *in vitro* (CIV) de embriones tempranos preimplantatorios (Vh et al., 2016). Todos estos procesos pretenden “imitar” *in vitro* lo que ocurre en condiciones *in vivo* en el tracto reproductor de la hembra. Es importante destacar que, en 2016, la cantidad de embriones viables producidos *in vitro* superó la cantidad de embriones transferibles producidos *in vivo* (Viana, 2022).

En la reproducción asistida del ganado bovino, el diseño y la preparación de medios de cultivo *in vitro* han sido fundamentales para conseguir el desarrollo adecuado de ovocitos y embriones (Vh et al., 2016). En términos de eficiencia, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros experimentan una maduración nuclear exitosa y avanzan de la profase I a la metafase II durante la maduración *in vitro* (Lonergan & Fair, 2016). Después de completar la MIV, los ovocitos se coinubaban con los espermatozoides mientras se realiza la FIV. Normalmente, los espermatozoides se seleccionan utilizando gradientes de densidad o mediante la técnica de *swim-up* (Parrish et al., 1988). La

tasa de fecundación, medida como la tasa de división a las 48 horas después de la inseminación suele oscilar entre el 70% y el 85% (Ferré et al., 2020).

Sin embargo, la producción de embriones *in vitro* sigue siendo un proceso relativamente ineficiente, con tasas de blastocistos de alrededor del 30-40% (Kepkova et al., 2011; Lonergan & Fair, 2016). Sería interesante prestar atención a esta fase del proceso debido a su baja eficiencia y por ello a su margen de mejora. Los factores que contribuyen a este problema incluyen la calidad de los ovocitos, las condiciones de maduración de los ovocitos *in vitro* y las condiciones de cultivo del embrión (Lonergan & Fair, 2008).

Los medios de CIV carecen de componentes esenciales que permiten el correcto funcionamiento de las vías fisiológicas necesarias para el desarrollo de embriones bovinos (Vh et al., 2016). Para solventar este problema, comúnmente se ha utilizado el suero fetal bovino (SFB) en el medio de MIV y de CIV, para aumentar la eficiencia de la maduración de los ovocitos y el cultivo embrionario. El SFB suministra a los medios de cultivo nutrientes, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y compuestos antioxidantes. Sin embargo, las actividades biológicas del SFB varían dependiendo de cada lote y hay riesgos de infección por virus o por micoplasmas (Hoshi, 2003). Además, algunos estudios han mostrado que la adición del SFB al medio de cultivo altera la morfología y la cinética de los embriones (Van Langendonck et al., 1997). También, se ha sugerido que el uso del SFB puede causar el síndrome del ternero gigante en la especie bovina (Young et al., 1998), en el cual se observa un crecimiento excesivo, lengua agrandada, hernias umbilicales, malformaciones musculares y esqueléticas, crecimiento anormal de órganos y desarrollo placentario alterado (Li et al., 2019).

Debido a los problemas que presenta el SFB en los medios de cultivo embrionario, se debe buscar otra alternativa para que los embriones

producidos *in vitro* tengan un ambiente lo más fisiológico posible y para superar la baja eficiencia que tienen las técnicas de reproducción asistida (Coy et al., 2022). De esta manera, el ambiente al que se exponen en el laboratorio sería menos estresante. Un modo de lograr este objetivo sería mediante la adición de fluidos reproductivos de fases específicas del ciclo estral en los medios de cultivo. Los fluidos folicular, oviductal y uterino contienen diversos elementos reguladores específicos, como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Block et al., 2011; Cajas et al., 2021), carbohidratos, iones, lípidos, fosfolípidos y proteínas (Avilés et al., 2010), que, al ser agregados a los medios de cultivo, son capaces de mejorar el desarrollo de los embriones preimplantatorios obtenidos por FIV (Hamdi et al., 2018).

Pero la composición de esos fluidos reproductivos depende del animal del que proceden, de la fase del ciclo estral en la que esté este animal, así como de su perfil proteómico (Itze-Mayrhofer & Brem, 2020; Pryce et al., 2004) y metabolómico (Wang et al., 2022), entre otros. Por ello, lo ideal sería realizar un *pool* de fluidos reproductivos estandarizados y homogéneos. Para conseguir este objetivo, en los últimos años se han desarrollado sistemas de organoides tridimensionales (3D) del tracto reproductor femenino, los cuales ofrecen modelos experimentales cruciales que recapitulan la heterogeneidad celular y las propiedades fisiológicas, anatómicas y funcionales del órgano *in vivo* (Chumduri & Turco, 2021). Estos organoides serían modelos fiables y reproducibles que evitarían la variabilidad individual anteriormente comentada.

Durante el desarrollo preimplantatorio, el embrión bovino pasa los primeros 4 días en el oviducto. Durante este período, ocurren cambios morfológicos y metabólicos importantes, incluyendo la primera división mitótica y la activación del genoma embrionario (Duranthon et al., 2008). Luego, el embrión ingresa al útero y permanece flotando libremente en el

fluido uterino hasta el inicio de la implantación, aproximadamente en los días 19-22 post inseminación (Bazer et al., 2009). Por ello, el endometrio, que representa el revestimiento interno del útero, juega un papel crucial en la reproducción de los mamíferos (Kobayashi & Behringer, 2003).

El desarrollo de un sistema de organoides de endometrio podría ser usado para la producción *in vitro* de embriones, ya que los organoides de endometrio son capaces de recapitular fielmente las características morfológicas y moleculares de las glándulas endometriales *in vivo* y pueden diferenciarse en células ciliadas y secretoras (Chumduri & Turco, 2021), por lo que, teóricamente, serían capaces de producir secreciones similares al fluido uterino. Actualmente, no se dispone de secreciones de organoides de endometrio bovino para poder corroborar esta hipótesis, pero, gracias a la colaboración con el grupo de investigación “Mecanismos moleculares de invasión placentaria”, del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, disponemos de sus homólogos en la especie humana. Por este motivo, en el presente trabajo nos planteamos la realización de un estudio preliminar para comprobar si las secreciones de organoides endometriales humanos tienen algún efecto beneficioso al emplearse como aditivos en los medios de cultivo para la PIV de embriones bovina.

La hipótesis del estudio es que la adición de secreciones de organoides de endometrio humano al cultivo embrionario *in vitro* bovino mejora la tasa de producción de blastocistos a día 7 y 8 post inseminación. El objetivo central era evaluar la eficacia de las secreciones de organoides de endometrio humano en un sistema de producción *in vitro* de embriones bovinos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el trabajo experimental se llevó a cabo en las instalaciones de EmbryoCloud-Universidad de Murcia (Murcia, España). Todos los

reactivos que se mencionan fueron adquiridos a Sigma Aldrich (Madrid, España) salvo que se especifica lo contrario.

Los medios de maduración *in vitro*, *swim-up*, fecundación *in vitro* y cultivo embrionario *in vitro* fueron cedidos por EmbryoCloud S.L. y empleados siguiendo sus instrucciones de uso. Los medios empleados fueron NaturARTs-COW-IVM-LYO, COW-SUM-LYO, COW-IVF-LYO, y COW-IVC-LYO, respectivamente.

La tarde anterior a su uso, cada vial se reconstituyó con 10 ml de agua Milli-Q filtrada y se dejó cerrado en el incubador de CO<sub>2</sub> (C60, Labotect GMBH, Gotinga, Alemania) a 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> y con una atmósfera saturada de humedad toda la noche para su disolución. Tres horas antes de su uso, el medio se filtró con ayuda de una aguja de 18G, una jeringa de 10 ml y un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm de diámetro y los viales se dejaron abiertos (excepto el medio de COW-SUM-LYO) en el incubador para que se equilibrara el pH.

Toda la manipulación de gametos y embriones se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar con mesa calefactada (IVFtech Clasica 180, IVFtech ApS, Birkerød, Dinamarca) a 38.5°C bajo el estereomicroscopio (Leica S9 E, Leica Microsistemas S.L.U., L'Hospitalet de Llobregat, España).

### **Recogida de ovarios, selección de ovocitos y maduración *in vitro* de los complejos células del *cumulus* – ovocitos (CCOs)**

Los tractos reproductivos de novillas de 12 a 14 meses de edad fueron proporcionados por mataderos locales (Matadero de Orihuela S.A., Orihuela, España y Mercamurcia S.A., Murcia, España). Se recogieron los ovarios, cortándolos y separándolos del resto del tracto reproductor, se introdujeron en un termo con solución salina fisiológica (SSF, 0.9% NaCl) a 38.5°C, y rápidamente se transportaron al laboratorio en un vehículo apropiado para material “SANDACH” (Subproductos Animales No Destina-

dos Al Consumo Humano). Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron dos veces con solución de cetrimida al 0.04% (CETAB) atemperado a 38.5°C y tres veces con SSF atemperada a 38.5°C.

En una placa calefactada (K Sitems T47, CooperSurgical, Ballerup, Dinamarca) a 38.5°C se procedió a la aspiración de los folículos ováricos de entre 2 y 7 mm de diámetro con una aguja de 18G acoplada a una jeringa de 10 ml. El contenido aspirado (el fluido folicular y los complejos células del *cumulus* – ovocitos (CCOs)) se fue introduciendo en tubos Falcon de 15 ml que contenían 2 ml de medio de recolección de ovocitos (OCM: TCM-199 (M0393), de Elabscience (Houston, EEUU) suplementado con estreptomicina/penicilina (S9137/P3032) y glutamina (G-5763)). Se dejó decantar durante diez minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 2 ml de OCM suplementado. El contenido se volcó a una placa Petri de 90 x 15 mm con una cuadrícula para que la búsqueda de los CCOs resultara más sencilla y se seleccionaron los CCOs inmaduros bajo el estereomicroscopio en la cabina de flujo laminar. Se seleccionaron sólo aquellos CCOs que tenían tres, cuatro o más capas de células del *cumulus* compactas alrededor del ovocito y cuyo citoplasma fuera lo más homogéneo posible (Aguila et al., 2020; Telfer et al., 2020). Los CCOs seleccionados se pasaron a una placa Petri de 35 x 10 mm con 2 ml de OCM suplementado con una pipeta Pasteur de vidrio estirada a la llama acoplada a una cánula de silicona. Posteriormente, se separaron grupos de 50-55 CCOs, y se introdujeron en el primer pocillo de una placa de cuatro pocillos que contenía 500 μl de medio NaturARTs-COW-IVM-LYO para el primer lavado. Después se pasaron al segundo pocillo que también contenía 500 μl de medio NaturARTs-COW-IVM-LYO y se incubaron 22 horas a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> y en una atmósfera saturada de humedad en el incubador (Astec AD-3100, Fukuoka, Japón).

### Selección espermática y fecundación *in vitro*

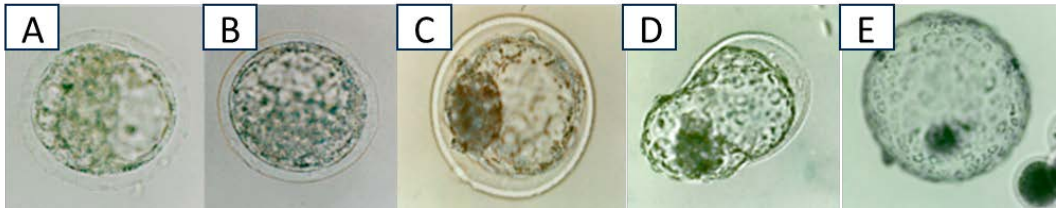
Media hora antes de la fecundación *in vitro*, los CCOs que maduraron correctamente se pasaron del medio de MIV al medio de FIV en grupos de 50-55 ovocitos. Se introdujeron al primer pocillo de una placa de cuatro pocillos que contenía 500  $\mu$ l de medio COW-IVF-LYO para hacer un lavado. Luego se pasaron al segundo pocillo con 500  $\mu$ l de medio COW-IVF-LYO.

Para realizar la FIV se empleó semen bovino congelado de la raza Asturiana de los Valles (ASEAVA, Gijón, España). En concreto se utilizaron pajuelas de 0.25 ml de un semental llamado "Chabolero". Fueron descongeladas introduciéndolas en un baño maría a 38°C durante 30 segundos. En la cabina de flujo, se realizó el *swim-up* para la selección espermática. El contenido de las pajuelas ya descongelado se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se transfirieron cuidadosamente 160  $\mu$ l de semen en el fondo de un tubo Falcon de 15 ml que contenía 1 ml de medio COW-SUM-LYO previamente preparado y equilibrado en la estufa, y se dejó incubar con una inclinación de 45 ° durante una hora a 38.5°C. Pasada la hora de incubación, se recogieron 750  $\mu$ l de la parte superior (aquí estarán los espermatozoides de mejor motilidad), se introdujeron en otro tubo Falcon y se centrifugaron a 300 g durante 7 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf (5720R, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se descartó, dejando aproximadamente 200  $\mu$ l del medio COW-SUM-LYO con el pellet y se resuspendió cuidadosamente. Se evaluaron la motilidad y concentración de los espermatozoides con la ayuda de una cámara Neubauer *improved* en un microscopio óptico (Leica DM750). La concentración se ajustó a  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml para la FIV y se procedió a inseminar. Los gametos se coincubaron durante 22 horas en 500  $\mu$ l de medio COW-IVF-LYO en una placa de cuatro pocillos, en grupos de 50-55 CCOs por pocillo, bajo una

atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en el aire, saturada de humedad y a una temperatura de 38.5°C.

### Cultivo embrionario *in vitro*

Pasadas 22 horas tras la inseminación (hpi), los presuntos cigotos se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml con 2 ml de OCM suplementado y se agitaron en un vórtex (TopMix FB15024, Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) a una potencia máxima de 20 Hz durante 4 minutos para decumularlos. Los posibles cigotos se lavaron una vez en OCM suplementado y otra vez en medio de cultivo COW-IVC-LYO antes de transferirlos a microgotas de 50  $\mu$ l de medio COW-IVC-LYO cubiertas con aceite mineral NidOil (Nicadon, Möln dal, Suecia) en grupos de 25 embriones por gota. Las placas del cultivo embrionario se prepararon el día anterior a su uso y se dejaron equilibrando en el incubador. La incubación de los cigotos se realizó a 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub> en una atmósfera saturada de humedad durante 8 días. Las primeras divisiones mitóticas (estadio de 2-4 células) se evaluaron a las 48 hpi y las tasas de desarrollo hasta blastocisto se registraron los días 7 y 8 después de la inseminación (Lopes et al., 2019). La clasificación empleada para categorizar los blastocistos en ambos días fue la descrita por Bo y Mapletoft en 2013 (Bó & Mapletoft, 2013): blastocisto temprano (un embrión que ha formado el blastocele y da una apariencia general de un anillo de sello, el embrión ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino); blastocisto (diferenciación visual del trofoblasto y de la masa celular interna, el blastocele es muy prominente, con el embrión ocupando la mayor parte del espacio perivitelino); blastocisto expandido (el diámetro del embrión aumenta dramáticamente, con un adelgazamiento simultáneo de la zona pelúcida a aproximadamente un tercio de su espesor original); blastocisto eclosionando (el embrión comienza a salir de la zona pelúcida) y blastocisto eclosionado (el embrión ha salido completamente de la zona pelúcida) (Figura 1).



**Figura 1.** Embriones bovinos: ejemplos de etapa de desarrollo. A, B, C, D y E, muestran, respectivamente, un blastocisto temprano, un blastocisto, un blastocisto expandido, un blastocisto eclosionando y un blastocisto eclosionado. Figura obtenida de Bó & Mapletoft, 2013.

Además, los blastocistos se fijaron y se tiñeron para determinar el número de células.

Siguiendo el diseño experimental, se introdujeron 50 cigotos aleatorios en cada uno de los tratamientos experimentales.

### Fijación y tinción de los posibles cigotos para su evaluación

La fijación tuvo lugar a las 22 hpi. Los cigotos se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml con 2 ml de OCM suplementado y se agitaron en vórtex a una potencia máxima de 20 Hz durante 4 minutos para decumularlos. El contenido se pasó a una placa Petri y los cigotos se cambiaron a otra placa de Petri con 2 ml de OCM suplementado limpio. Posteriormente se transfirieron al primer pocillo de una placa de cuatro pocillos que contenía 500  $\mu$ l de PBS (D8662-500ML) para un primer lavado, luego al segundo pocillo con 500  $\mu$ l de PBS y 10  $\mu$ l de glutaraldehído (G6257) para fijarlos y se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de fijarlos, los cigotos se pasaron al tercer pocillo y se volvieron a lavar con 500  $\mu$ l de PBS. Por último, se pasaron al cuarto pocillo que contenía 500  $\mu$ l de PBS y Hoechst (33342; 1  $\mu$ g/ml) y se tiñeron durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. El medio de montaje utilizado fue PBS con glicerol y Hoechst (1:1:0.001) y los portaobjetos se sellaron con esmalte de uñas. La evaluación se realizó con un microscopio

de epifluorescencia (Leica DM4000B LED) con aumentos de X200 y X400.

Los parámetros de FIV evaluados fueron los siguientes: tasa de penetración (porcentaje medio de ovocitos penetrados por al menos un espermatozoide); tasa de monospermia (porcentaje medio de ovocitos penetrados por un solo espermatozoide); formación del pronúcleo masculino (PNM; evaluada por la presencia de al menos dos pronúcleos); y eficiencia de FIV (porcentaje de ovocitos que fueron penetrados y monospermicos) (Lopes et al., 2019).

### Tinción diferencial de los blastocistos

Mediante una tinción que diferenciaba las células del trofotodermo y las células totales de los blastocistos, se pudo determinar también el número de células de la masa celular interna (MCI).

Los blastocistos fueron fijados en 4% de paraformaldehído (PFA) durante 20 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se mantuvieron en 2% PFA a 4°C hasta el momento de realizar la tinción.

A continuación, los blastocistos fueron lavados 3 veces en PBS con 0.5% de BSA (solución de lavado) y se permeabilizaron en PBS con 0.5% de BSA y 0.5% de Triton-X-100 y 0.05% de Tween a 4°C durante toda la noche.

Tras realizar 3 lavados en solución de lavado, se incubaron 20 minutos a temperatura

ambiente en 2N HCl. Pasado ese tiempo, se incubaron otros 10 minutos a temperatura ambiente en 100 mM de TrisHCl. Este paso se realizó para inducir la exposición de los epítomos.

Los blastocistos fueron posteriormente pasados a solución de lavado y bloqueados en solución de bloqueo (PBS suplementado con 10% suero de cabra + 0.05% de Tween) durante toda la noche a 4°C.

Se dejó un embrión como control negativo en solución de bloqueo. El resto, se lavaron 3 veces en solución de lavado y se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-CDX-2 (Biogenex ready to use, San Ramon, EEUU) en solución de bloqueo durante 24 horas a 4°C.

El control negativo y los embriones de prueba se lavaron 3 veces en solución de lavado. Los embriones se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en una dilución 1:100 del anticuerpo secundario de cabra anti-ratón TRICT (ab6786, Abcam plc, Cambridge, Reino Unido) en solución de bloqueo.

El último paso se corresponde a la tinción con Hoechst y al montaje. Estos procesos se siguieron de la misma manera explicada en el apartado anterior. La evaluación se realizó con un microscopio de epifluorescencia con aumentos de X200 y X400 y diferentes longitudes de onda de excitación de 532 nm para el TRICT y 352 nm para el Hoechst.

### Análisis estadístico

Se ha llevado a cabo el análisis de los datos utilizando el programa Microsoft Excel (v2306, Redmond, EEUU) y SPSS (v.24.0, IBM España SA, Madrid, España). Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media. Para analizar las diferencias entre los grupos experimentales, se utilizó un ANOVA de un factor y posteriormente un Test de Tukey debido a la distribución normal de las muestras. Se consideró que existían diferencias entre grupos para un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

### Diseño experimental

El Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de Valencia, colaboró proporcionando las muestras con las que se ha llevado a cabo este estudio: secreciones obtenidas de organoides de endometrios humanos (ORGs); gota de matrigel con medio de cultivo procesada de la misma forma que los organoides humanos, pero sin células (MGel), y por último, el propio medio de cultivo donde crecieron los organoides (ORGm), llamado medio *Boretto*, ya que está basado en una publicación de este autor (Boretto et al., 2017) (Figura 2).

El experimento se realizó con el método simple ciego.

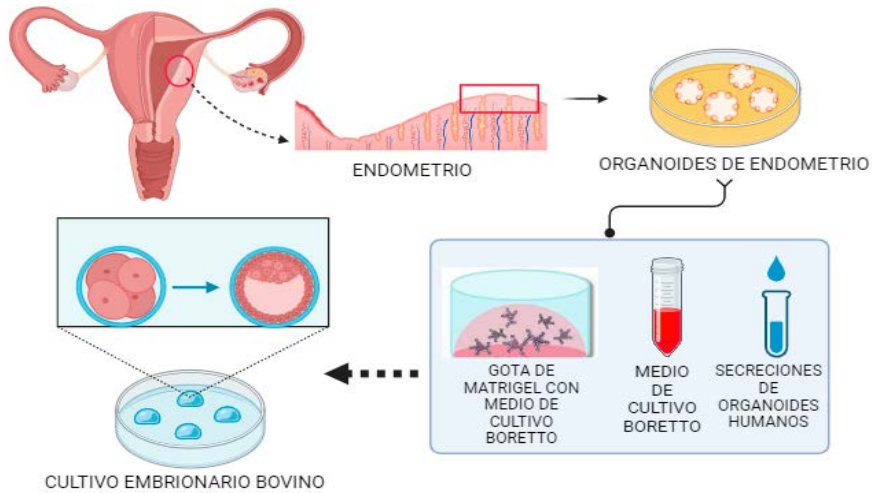
Las muestras de las diferentes soluciones se encontraban en criotubos de 2 ml congelados a -80°C. Se descongelaron en hielo y se hicieron 3 alícuotas de 5  $\mu$ l cada una para su posterior uso en cada replicado.

El diseño experimental de este trabajo se hizo sobre el cultivo embrionario, el cual se dividió en 4 grupos:

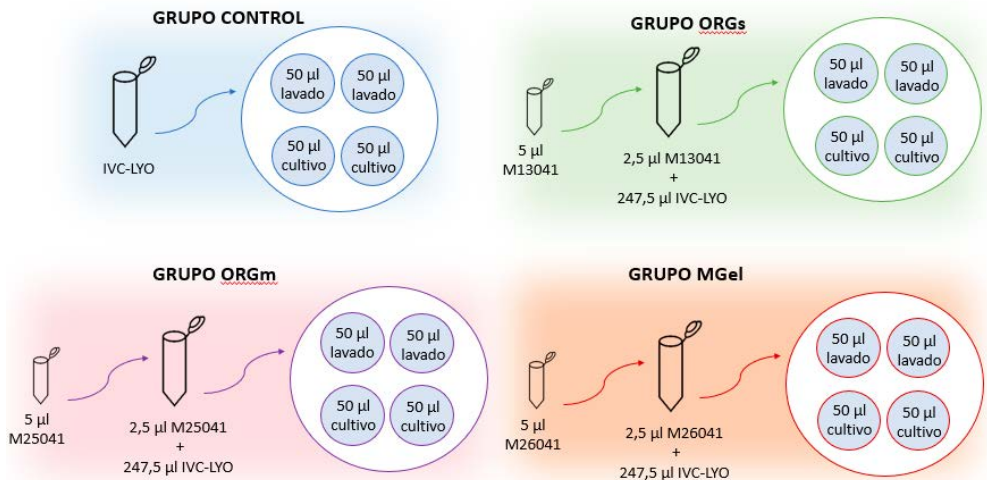
- Grupo control. Los embriones se llevaron a cultivo embrionario en el medio COW-IVC-LYO.
- Grupo ORGs. El medio de cultivo embrionario COW-IVC-LYO se suplementó con un 1% (v/v) de secreciones de organoides de endometrio humano.
- Grupo ORGm. El medio de cultivo embrionario COW-IVC-LYO se suplementó con un 1% (v/v) de medio de cultivo *Boretto*.
- Grupo MGel. El medio de cultivo embrionario COW-IVC-LYO se suplementó con un 1% (v/v) de fluido procedente de la gota de matrigel con medio de cultivo *Boretto*.

Para obtener un porcentaje del 1% (v/v) de cada aditivo, se añadieron 247.5  $\mu$ l de COW-IVC-LYO y 2.5  $\mu$ l de cada una de las muestras a un tubo eppendorf. Una vez realizadas todas las combinaciones, se prepararon las placas de cultivo (Figura 3).





**Figura 2.** A partir de muestras de endometrio humano se obtuvieron organoides. Los organoides se desarrollaron en el medio de cultivo *Boretto* y se sembraron en gotas de matrigel. Al cultivo embrionario bovino se añadieron secreciones de organoides de endometrio humano, una muestra de matrigel con medio de cultivo procesado de la misma forma que los organoides humanos, pero sin células, y por último el propio medio de cultivo *Boretto*.



**Figura 3.** Esquema del diseño experimental donde se muestran los distintos grupos experimentales y el grupo control. Obsérvese que para cada tratamiento se preparó una placa de cultivo embrionario con 4 gotas de 50 µl de medio de cultivo. Las dos primeras gotas se usaron para lavado y las dos últimas gotas para llevar a cultivo 25 embriones en cada una de ellas. Cada placa se rotuló con su tratamiento correspondiente y la fecha.

Se trabajó con una concentración del 1% (v/v) porque en el estudio de Lopera-Vasquez (Lopera-Vasquez et al., 2017) se observó que el cultivo de embriones con concentraciones de 5%, 10% y 25% de fluido oviductal era perjudicial para el desarrollo del embrión, con rendimientos de blastocistos del 11%, 10% y 1% en el día 9, respectivamente, mientras que las concentraciones de 1.25% y 0.625% resultaron beneficiosas.

## RESULTADOS

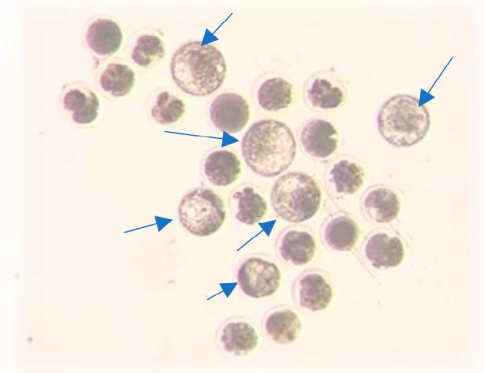
Se realizaron 3 replicados con un número total de 600 ovocitos. Los ovocitos fueron sometidos a MIV, FIV y CIV.

Se realizó un control de FIV con 81 ovocitos, fijándolos a las 24 hpi. Se obtuvo una tasa de penetración de 99%, una tasa de monospermia de 87.7% y una tasa de eficiencia de 86.8%. Los resultados de desarrollo embrionario a día 2, 7 y 8 post inseminación, se muestran en la Tabla 1.

La tasa de división a 2-4 células a las 48 hpi, fue igual en todos los grupos. Sin embargo, el porcentaje de blastocistos a día 7 y a día 8 post inseminación, tanto si se calcula con respecto al porcentaje de ovocitos totales como respecto al porcentaje de ovocitos divididos, fue significativamente superior en el grupo ORGm respecto

del grupo control (con los valores más bajos), obteniéndose valores intermedios en los grupos ORGs y MGel (Tabla 1).

En cuanto a la cinética del desarrollo hasta el día 7 (Figura 4), los resultados se expresan en la Tabla 2. Como puede observarse, el grupo ORGm tuvo una progresión más avanzada a día 7 post inseminación que el resto de grupos y que el control,



**Figura 4.** Ejemplo de cómo se visualizan los blastocistos cultivados a día 7 del grupo ORGm. Se observan los embriones en diferentes etapas de desarrollo. Las flechas azules señalan blastocistos bovinos.

**Tabla 1.** Porcentaje de blastocistos a día 7 (D7) y día 8 (D8) respecto al total de cigotos en cultivo (% Total) y respecto a los cigotos divididos (% D2).

Grupo	N	2-4 células (%) D2		Blastocistos (%) D7			Blastocistos (%) D8		
		n	% Total	n	% /Total	% /Divididos	n	% /Total	% /Divididos
Control	150	122	81.31 ± 3.14	11	7.30 ± 2.12 <sup>a</sup>	9.00 ± 2.60 <sup>a</sup>	16	10.70 ± 2.54 <sup>a</sup>	13.15 ± 3.00 <sup>a</sup>
ORGs	150	130	86.74 ± 2.81	19	12.72 ± 2.74 <sup>ab</sup>	14.61 ± 3.19 <sup>ab</sup>	22	14.71 ± 2.91 <sup>ab</sup>	16.91 ± 3.32 <sup>a</sup>
ORGm	150	117	78.01 ± 3.47	28	18.71 ± 3.28 <sup>b</sup>	23.94 ± 3.91 <sup>b</sup>	37	24.74 ± 3.50 <sup>b</sup>	31.66 ± 4.35 <sup>b</sup>
MGel	150	129	86.00 ± 2.81	22	14.74 ± 2.91 <sup>ab</sup>	17.00 ± 3.31 <sup>ab</sup>	24	16.00 ± 3.00 <sup>ab</sup>	18.62 ± 3.40 <sup>a</sup>

\*Valores expresados como la media ± error estándar. Número de replicados = 3. <sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (P < 0.05).

**Tabla 2.** Cinética del desarrollo a blastocisto (D7). Evaluación morfológica. Los datos proporcionados muestran los resultados de la etapa de desarrollo de los embriones bovinos en los diferentes grupos de tratamiento en el día 7 de cultivo.

Grupo	N	Blastocisto temprano	Blastocisto	Blastocisto expandido	Blastocisto eclosionando
		% Total	% Total	% Total	% Total
Control	150	2.67 ± 1.32	2.67 ± 1.32 <sup>a</sup>	2.00 ± 1.15 <sup>a</sup>	0
ORGs	150	4.00 ± 1.61	4.00 ± 1.61 <sup>a</sup>	3.33 ± 1.47 <sup>ab</sup>	1.33 ± 0.94
ORGm	150	3.33 ± 1.47	6.67 ± 2.04 <sup>ab</sup>	8.00 ± 2.22 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.67
MGel	150	2.67 ± 1.32	11.33 ± 2.60 <sup>b</sup>	0.67 ± 0.67 <sup>a</sup>	0

\*Valores expresados como la media ± error estándar. Número de replicados = 3. <sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (P < 0.05).

ya que el porcentaje de blastocistos expandidos alcanzó el 8%. Por su parte, el porcentaje de blastocistos sin expandir fue significativamente mayor en el grupo MGel que en los otros tres.

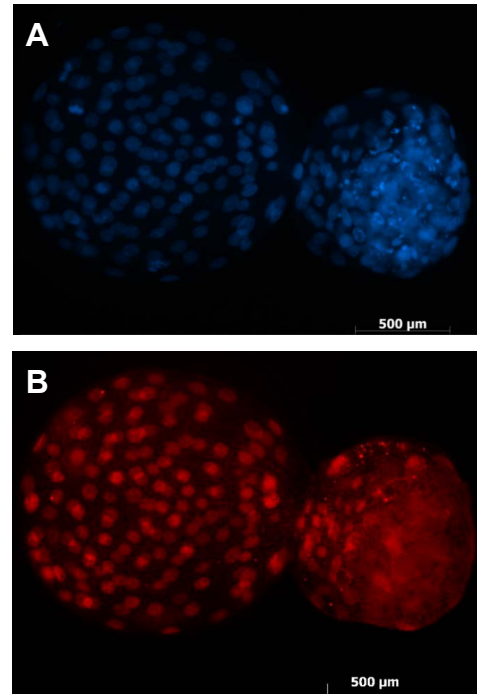
En el día 8 post inseminación, las diferencias observadas en la cinética del desarrollo desaparecieron, siendo iguales todos los grupos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cinética del desarrollo a blastocisto (D8). Evaluación morfológica. Los datos proporcionados muestran los resultados de la etapa de desarrollo de los embriones bovinos en los diferentes grupos de tratamiento en el día 8 de cultivo.

Grupo	N	Blastocisto	Blastocisto expandido	Blastocisto eclosionando
		% Total	% Total	% Total
Control	150	6.67 ± 2.04	1.33 ± 0.94	2.67 ± 1.32
ORGs	150	5.33 ± 1.84	6.00 ± 1.95	3.33 ± 1.47
ORGm	150	12.00 ± 2.66	7.33 ± 2.14	5.33 ± 1.84
MGel	150	10.67 ± 2.53	4.00 ± 1.61	1.33 ± 0.94

\*Valores expresados como la media ± error estándar. Número de replicados = 3. <sup>a, b</sup> en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (P < 0.05).

En cuanto a los resultados de la tinción diferencial (Figura 5), se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número



**Figura 5.** Ejemplo de la tinción diferencial. “A” y “B” muestran un blastocisto de día 8 eclosionando del grupo ORGm. En “A” se ven las células totales del blastocisto en azul; nótese que a la derecha de la imagen se ven las células de la MCI. En “B” se observan las células de trofotodermo de un color rojo.

de células totales entre el grupo ORGm y los grupos control y MGel, presentando el grupo ORGs valores intermedios (Tabla 4). Del mismo modo, pudo observarse que el grupo ORGm tenía un número de células del trofotodermo significativamente mayor que los grupos control y MGel, y que el grupo ORGs presentaban valores intermedios entre el control y el ORGm.

## DISCUSIÓN

Este estudio evalúa la eficacia de las secreciones derivadas de organoides de endometrio humano en un sistema de producción *in vitro* de embriones bovinos. Se decidió utilizar tejido humano en lugar de bovino debido a que las condiciones de cultivo y estudio para los organoides humanos están más avanzadas y estandarizadas (Rossi et al., 2018) en comparación con las condiciones para los organoides bovinos. Este estudio se llevó a cabo como una investigación preliminar que sienta las bases para el futuro desarrollo de modelos de organoides bovinos.

Los organoides son estructuras 3D complejas que muestran arquitecturas y funcionalidades similares a las de los órganos *in vivo*. Se

desarrollan a partir de células madre o progenitoras específicas de órganos a través de un proceso de autoorganización (Rossi et al., 2018). Hay numerosos estudios que han desarrollado organoides de endometrio para entender mejor su biología, ya que juega un papel crucial en la implantación del embrión y el establecimiento de la gestación (Fitzgerald et al., 2021). En el endometrio se liberan una gran cantidad de factores en un momento específico para sincronizar el programa de diferenciación tanto del embrión como del endometrio (Massimiani et al., 2019). Por ello, en este estudio se planteó la hipótesis de añadir secreciones derivadas de organoides de endometrio humano al cultivo *in vitro* bovino, para aumentar la tasa de eficiencia de la obtención de blastocistos.

En el fluido uterino se han detectado factores de crecimiento, incluyendo el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF o factor estimulante de colonias (CSF) 2), el factor activador de plaquetas (PAF) y el factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF). Todos estos elementos mejoran el desarrollo de blastocistos *in vitro* y aumentan el número de células (Gómez et al., 2014; Gopichandran & Leese, 2006). Teóricamente,

**Tabla 4.** Número medio de células de blastocistos a D8. Los parámetros evaluados incluyen el número total de células, el número de células del trofotodermo y el número de células de la masa celular interna (MCI) y la ratio de número de células de la masa celular interna/ número de células del trofotodermo.

Grupo	N	Nº Células totales	Nº Células trofotodermo	Nº Células MCI	Ratio MCI/TF
		Media ± error	Media ± error	Media ± error	Media ± error
Control	12	90.33 ± 12.80 <sup>a</sup>	67.60 ± 16.13 <sup>ab</sup>	43.20 ± 4.53 <sup>ab</sup>	0.72 ± 0.13
ORGs	17	135.00 ± 22.19 <sup>ab</sup>	160.71 ± 27.40 <sup>bc</sup>	64.33 ± 9.20 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.51
ORGm	21	167.90 ± 20.89 <sup>b</sup>	175.90 ± 26.79 <sup>c</sup>	62.30 ± 5.22 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.11
MGel	18	80.72 ± 6.26 <sup>a</sup>	58.71 ± 6.90 <sup>a</sup>	37.71 ± 5.09 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.11

\*Valores expresados como la media ± error estándar. Número de replicados = 3. <sup>a, b, c</sup> en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (P < 0.05).

estos organoides serían capaces de producir secreciones semejantes al fluido uterino y así, al añadirse al medio de cultivo embrionario, mejoraría el cultivo *in vitro* de embriones imitando las condiciones fisiológicas que existen *in vivo*.

Sin embargo, los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas entre el tratamiento que contenía las secreciones derivadas de organoides respecto al control (medio de cultivo COW-IVC-LYO). Una explicación que podría justificar la no confirmación de nuestra hipótesis en las condiciones de este trabajo es la baja concentración a la que se añadieron las secreciones al medio de cultivo embrionario. Concretamente se añadieron a una concentración del 1% (v/v). En estudios posteriores se deberían probar estas secreciones a concentraciones crecientes, por ejemplo, del 1.5%, 2% y 2.5%. Concentraciones mayores a las propuestas no estarían indicadas, ya que podrían resultar nocivas para los embriones (Lopera-Vasquez et al., 2017). Además, las secreciones corresponden a organoides de endometrio humano y no bovino. Aunque los humanos y los bovinos son mamíferos y comparten algunas similitudes biológicas básicas, hay diferencias importantes en su fisiología, metabolismo, anatomía y respuesta a los tratamientos. Se requieren investigaciones futuras específicas y estudios en embriones bovinos para comprender cómo se comportan y responden a los tratamientos planteados en este estudio.

No obstante, en los resultados sí se observó una mayor tasa de desarrollo de blastocistos a día 7 y 8 post inseminación en los embriones bovinos que recibieron el tratamiento ORGm, es decir, aquellos embriones en los que al medio de cultivo embrionario COW-IVC-LYO se suplementó con un 1% (v/v) de medio de cultivo *Boretto*, en comparación con el resto de tratamientos. Además, hubo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control. También se observa que el grupo ORGm tuvo un mayor porcentaje de blastocistos expandidos que el resto

de grupos, alcanzando un 8% de blastocistos expandidos respecto al total de embriones que se llevaron a cultivo, por lo que presentaba una cinética del desarrollo más avanzada. Esta misma tendencia la podemos observar en el número de células de los blastocistos, donde el grupo ORGm presenta el mayor número de células. Estos datos nos sugieren que el medio de cultivo *Boretto* debe estar compuesto por elementos que estimulan el desarrollo de embriones preimplantatorios y las divisiones celulares. El medio de cultivo *Boretto* en el que se desarrollaron los organoides de endometrio humano (Boretto et al., 2017), está suplementado con insulina-transferrina-selenio (ITS), con Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y con Factor de Crecimiento Fibroblástico 10 (FGF10). La insulina tiene efecto mitógeno sobre el epitelio endometrial (Shiraga et al., 1997). El EGF participa en las vías de señalización celular que controlan la multiplicación y supervivencia de las células (Wells, 1999). Y los miembros de la familia FGF poseen amplias actividades mitogénicas y de supervivencia celular, y están involucrados en una variedad de procesos biológicos, incluidos el desarrollo embrionario, el crecimiento celular, la morfogénesis, la reparación de tejidos, el crecimiento tumoral y la invasión (Itoh, 2016). La conexión entre la insulina-transferrina-selenio (ITS), el EGF y los FGFs, radica en su capacidad para promover el crecimiento y la supervivencia celular. En los cultivos celulares, se pueden utilizar combinaciones de ITS junto con EGF o FGFs para proporcionar un entorno óptimo para el crecimiento y la proliferación de células específicas. Estos componentes juntos pueden actuar sinérgicamente para mejorar la viabilidad y funcionalidad de las células en cultivo. Esto puede explicar el avanzado desarrollo que tienen los blastocistos que fueron sometidos a este tratamiento (Mesalam et al., 2019; Arias et al., 2022). Diferentes estudios han mostrado que los embriones con un desarrollo rápido tenían mayores tasas

de blastocistos que aquellos con un desarrollo más lento (García et al., 2015). Otros estudios también han demostrado que los embriones de rápido desarrollo presentan mejor calidad que embriones de desarrollo lento (Bastos et al., 2008; van Soom et al., 1997). Sin embargo, un desarrollo demasiado acelerado podría ser perjudicial porque los genes relacionados con el *imprinting* se ven alterados, como pasa con los ratones (Market Velker et al., 2012). Por ello, al añadir concentraciones bajas, por ejemplo, del 1% del medio *Boretto* al medio de cultivo embrionario mejoraría las tasas de blastocistos, ya que tienen un desarrollo más rápido que el resto de tratamientos, pero sin que esta aceleración llegara a ser excesiva y, por tanto, perjudicial.

Se deben mencionar algunas limitaciones que se han tenido a la hora de realizar este trabajo. La eficiencia de obtención de blastocistos en ninguno de los tratamientos ha superado el 25% respecto al total de ovocitos. Sólo el tratamiento ORGm alcanzó una tasa de blastocistos del 24.74% en día 8 de cultivo. Este dato está lejos de la tasa alcanzada en otros estudios, donde la eficiencia ronda el 35-40% (Kepkova et al., 2011; Lonergan & Fair, 2016). Una explicación a estos resultados puede deberse a la baja calidad de los ovocitos con los que se ha trabajado, entre otras cosas debido a la época del año y al calor extremo que han soportado los animales de los que se obtuvieron los ovocitos en el sureste español. Por otra parte, los ovocitos procedían de mataderos locales. Esto tiene ciertas ventajas. Se puede conseguir un gran número de ovocitos, ya que los mataderos suelen ser fuente de grandes cantidades de ovarios de vacas, lo que proporciona una amplia disponibilidad de ovocitos bovinos para su uso en investigación, reproducción asistida o producción de embriones. Además, obtener ovocitos de mataderos puede resultar menos costoso en comparación con otras opciones, como la OPU (*Ovum pick up*). Sin embargo, también tiene ciertas desventajas, como la calidad y el

estado de los ovocitos. Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de la maduración *in vitro* de ovocitos, la calidad sigue siendo más baja en comparación con los ovocitos madurados *in vivo* (Nagai, 2001).

Tras analizar las mejoras obtenidas en este trabajo cabría la posibilidad de añadir el medio de cultivo *Boretto* o algunos de sus componentes principales al medio de cultivo bovino, pero este hecho debería ser evaluado desde las perspectivas científica y económica. El medio de cultivo *Boretto* es prometedor para la investigación, ya que sus componentes son ideales para el cultivo de embriones bovinos. Sin embargo, habría que evaluar su coste/beneficio, ya que, los embriones bovinos se pueden considerar un producto comercial porque el objetivo de la PIV bovina es generar embriones para venderlos y transferirlos y este paso debe de salir rentable a los ganaderos. Por ello, es necesario seguir investigando con secreciones de organoides específicas de bovino producidas a gran escala para poder diseñar un medio que incremente el rendimiento de la PIV y que sea rentable para todas las partes involucradas en la industria bovina.

## CONCLUSIONES

La adición de secreciones de organoides de endometrio humano al 1% (v/v) de concentración al cultivo embrionario *in vitro* bovino no mejora la tasa de obtención de blastocistos a día 7 y 8 post inseminación.

La adición del medio *Boretto* al 1% (v/v) de concentración al cultivo embrionario *in vitro* bovino mejora la tasa de obtención de blastocistos a días 7 y 8 post inseminación respecto al control, e incrementa la cinética de desarrollo de los embriones a día 7 post inseminación, y el número de células respecto al control.

La adición de al 1% (v/v) de concentración de fluidos de gota de matrigel al cultivo embrionario *in vitro* bovino no tiene ningún efecto en el desarrollo de los embriones bovinos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Matadero Orihuela S.A. y MercaMurcia S.A. en la recogida de material biológico. También quieren agradecer a Lucía Sarrias de la Universidad de Murcia y a Gabriel Pastor de Embryo-Cloud S.L por su apoyo técnico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith, L. C. (2020). Oocyte Selection for *In vitro* Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(12), 2196. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>
- Arias, M. E., Vargas, T., Gallardo, V., Aguila, L., & Felmer, R. (2022). Simple and Efficient Chemically Defined In Vitro Maturation and Embryo Culture System for Bovine Embryos. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(21), 3057. <https://doi.org/10.3390/ani12213057>
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Molecular human reproduction*, 16(12), 896–906. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>
- Bastos, G. M., Gonçalves, P. B., & Bordignon, V. (2008). Immunolocalization of the high-mobility group N2 protein and acetylated histone H3K14 in early developing parthenogenetic bovine embryos derived from oocytes of high and low developmental competence. *Molecular reproduction and development*, 75(2), 282–290. <https://doi.org/10.1002/mrd.20798>
- Bazer, F. W., Spencer, T. E., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., & Wu, G. (2009). Comparative aspects of implantation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 138(2), 195–209. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0158>
- Block, J., Hansen, P. J., Loureiro, B., & Bonilla, L. (2011). Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76(9), 1602-1609. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.025>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction (AR)*, 10(3), 344-348.
- Brito, L. F., Bedere, N., Douhard, F., Oliveira, H. R., Arnal, M., Peñagaricano, F., Schinckel, A. P., Baes, C. F., & Miglior, F. (2021). Review: Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 15 Suppl 1, 100292. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100292>
- Britt, J. H., Cushman, R. A., Dechow, C. D., Dobson, H., Humblot, P., Hutjens, M. F., Jones, G. A., Mitloehner, F. M., Ruegg, P. L., Sheldon, I. M., & Stevenson, J. S. (2021). Review: Perspective on high-performing dairy cows and herds. *Animal*, 15, 100298. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100298>
- Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., de la Blanca, M. G. M., Sánchez, J. M., Fernández-Fuertes, B., González, E. M., & Rizos, D. (2021). Role of reproductive fluids and extracellular vesicles in embryo–maternal interaction during early pregnancy in cattle. *Reproduction, fertility, and development*, 34(2), 117–138. <https://doi.org/10.1071/RD21275>
- Chumduri, C., & Turco, M. Y. (2021). Organoids of the female reproductive tract. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 99(4), 531–553. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-02028-0>
- Coy, P., Romar, R., & Romero-Aguirregomez-corta, J. (2022). The embryo culture media in the era of epigenetics: is it time to go back to nature? *Animal reproduction*, 19(1),

- e20210132. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0132>
- Cutullic, E., Delaby, L., Gallard, Y., & Disenhaus, C. (2012). Towards a better understanding of the respective effects of milk yield and body condition dynamics on reproduction in Holstein dairy cows. *Animal*, 6(3), 476-487.
- Dieleman, S. J., Hendriksen, P. J., Viuff, D., Thomsen, P. D., Hyttel, P., Knijn, H. M., Wrenzycki, C., Kruip, T. A., Niemann, H., Gadella, B. M., Bevers, M. M., & Vos, P. L. (2002). Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, 57(1), 5–20. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00655-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00655-0)
- Duranthon, V., Watson, A. J., & Lonergan, P. (2008). Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction* (Cambridge, England), 135(2), 141–150. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0324>
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 14(5), 991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Fitzgerald, H. C., Schust, D. J., & Spencer, T. E. (2021). *In vitro* models of the human endometrium: evolution and application for women's health. *Biology of reproduction*, 104(2), 282–293. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa183>
- García, S. M., Marinho, L. S., Lunardelli, P. A., Seneda, M. M., & Meirelles, F. V. (2015). Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos: effects of protein supplementation source and developmental kinetics. *PloS one*, 10(3), e0119463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119463>
- Gómez, E., Correia-Álvarez, E., Caamaño, J. N., Díez, C., Carrocera, S., Peynot, N., Martín, D., Giraud-Delville, C., Duranthon, V., Sandra, O., & Muñoz, M. (2014). Hepatoma-derived growth factor: from the bovine uterus to the *in vitro* embryo culture. *Reproduction* (Cambridge, England), 148(4), 353–365. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0304>
- Gopichandran, N., & Leese, H. J. (2006). The effect of paracrine/autocrine interactions on the *in vitro* culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* (Cambridge, England), 131(2), 269–277. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00677>
- Hamdi, M., Lopera-Vasquez, R., Maillou, V., Sanchez-Calabuig, M. J., Núñez, C., Gutierrez-Adan, A., & Rizos, D. (2018). Bovine oviductal and uterine fluid support *in vitro* embryo development. *Reproduction, fertility, and development*, 30(7), 935–945. <https://doi.org/10.1071/RD17286>
- Hansen, P. J., & Block, J. (2004). Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reproduction, fertility, and development*, 16(1-2), 1–14. <https://doi.org/10.10371/RD03073>
- Hoshi, H. (2003). *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, 59(2), 675-685. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01247-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01247-5)
- Itoh N. (2016). FGF10: A multifunctional mesenchymal-epithelial signaling growth factor in development, health, and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 28, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.10.001>
- Itze-Mayrhofer, C., & Brem, G. (2020). Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. *Journal of Proteomics*, 225, 103884. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103884>
- Kepkova, K. V., Vodicka, P., Toralova, T., Lopatarova, M., Cech, S., Dolezel, R., Havlicek, V., Besenfelder, U., Kuzmany, A., Sirard,



- M.-A., Laurincik, J., & Kanka, J. (2011). Transcriptomic analysis of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos revealed a developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. *Theriogenology*, 75(9), 1582-1595. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.019>
- Kobayashi, A., & Behringer, R. R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews. Genetics*, 4(12), 969-980. <https://doi.org/10.1038/nrg1225>
- Li, Y., Donnelly, C. G., & Rivera, R. M. (2019). Overgrowth Syndrome. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 35(2), 265-276. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.02.007>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. *Theriogenology*, 69(1), 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes *in vitro*. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 255-268. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>
- Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., & Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86(1), 270-277. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.040>
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Lloreda, V., Coy, P., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., & Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction, fertility, and development*, 29(3), 621-629. <https://doi.org/10.1071/RD15238>
- Lopes, J. S., Canha-Gouveia, A., París-Oller, E., & Coy, P. (2019). Supplementation of bovine follicular fluid during *in vitro* maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number. *Theriogenology*, 126, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.010>
- Massimiani, M., Lacconi, V., La Civita, F., Ticconi, C., Rago, R., & Campagnolo, L. (2019). Molecular Signaling Regulating Endometrium-Blastocyst Crosstalk. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 23. <https://doi.org/10.3390/ijms21010023>
- Mesalam, A., Lee, K. L., Khan, I., Chowdhury, M. M. R., Zhang, S., Song, S. H., Joo, M. D., Lee, J. H., Jin, J. I., & Kong, I. K. (2019). A combination of bovine serum albumin with insulin-transferrin-sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix metalloproteinases. *Reproduction, fertility, and development*, 31(2), 333-346. <https://doi.org/10.1071/RD18162>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2023). Ganado bovino. Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero. Observatorio de Tecnologías Probadas. Recuperado de <https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/plataforma-de-conocimiento-para-el-medio-rural-y-pesquero/observatorio-de-tecnologias-probadas/sistemas-prodnut-animal/ganado-bovino.aspx>
- Nagai T. (2001). The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55(6), 1291-1301. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00483-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00483-6)
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171-1180. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- Pryce, J. E., Royal, M. D., Garnsworthy, P. C., & Mao, I. L. (2004). Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science*, 86(1), 125-135. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00145-3)

- Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nature reviews. Genetics*, 19(11), 671–687. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>
- Shiraga, M., Takahashi, S., Miyake, T., Takeuchi, S., & Fukamachi, H. (1997). Insulin-Like Growth Factor-I Stimulates Proliferation of Mouse Uterine Epithelial Cells in Primary Culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 215(4):412-417. <https://doi.org/10.3181/00379727-215-44152>
- Sirard, M. A. (2018). 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction (Cambridge, England)*, 156(1), R1–R7. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0008>
- Telfer, E. E., Sakaguchi, K., Clarkson, Y. L., McLaughlin, M., Telfer, E. E., Sakaguchi, K., Clarkson, Y. L., & McLaughlin, M. (2020). *In vitro* growth of immature bovine follicles and oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 1-6. <https://doi.org/10.1071/RD19270>
- Van Langendonck, A., Donnay, I., Schuurbiens, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., & Dessy, F. (1997). Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1), 87-93. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090087>
- van Soom, A., Ysebaert, M. T., & de Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Molecular reproduction and development*, 47(1), 47–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199705\)47:1<47:AID-MRD7>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<47:AID-MRD7>3.0.CO;2-Q)
- Vh, D., S, W., & Aw, T.-R. (2016). Improvements to *In vitro* Culture Media for Use in Bovine IVF. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 4(2). <https://doi.org/10.15744/2348-9790.4.205>
- Viana, J. (2022). 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 40(4), 22-40.
- Wang, Z., Song, Y., Sun, S., Zhao, C., Fu, S., Xia, C., & Bai, Y. (2022). Metabolite Comparison between Serum and Follicular Fluid of Dairy Cows with Inactive Ovaries Postpartum. *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(3), 285.
- Wells A. (1999). EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(6), 637–643. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00015-1)
- Wrenzycki, C. (2018). Gene expression analysis and *in vitro* production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present concepts and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 53 Suppl 2, 14-19. <https://doi.org/10.1111/rda.13260>
- Young, L. E., Sinclair, K. D., & Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, 3(3), 155-163. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030155>