



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de los embriones de ratón obtenidos por fecundación  
*in vitro* mediante la adición de 4-hidroxiestradiol y quercetina en  
los medios de cultivo**

Nuria María Hernández Rollán

Programa de Doctorado en Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos  
Universidad de Extremadura

Conformidad del director y codirector:

Fdo. Dr. D. Ignacio S. Álvarez Miguel

Fdo. Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo

Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirector de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura

2022



## Agradecimientos institucionales

Esta tesis doctoral ha sido financiada a través de la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital a través de los proyectos IB18129, GR18199, GR21201 y cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa".

La realización de esta tesis se ha llevado a cabo específicamente en las unidades U23- Assisted Reproduction, U22-Animal Housing, U21-Experimental Operating Rooms y U14-Cell Therapy de la ICTS distribuida en NANBIOSIS, localizadas en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón y en el Servicio de Técnicas Aplicadas en Biomedicina de la Universidad de Extremadura.



Unión Europea

**Fondo Europeo de Desarrollo Regional**

**Una manera de hacer Europa**





# ÍNDICE

<b>ABREVIATURA</b> .....	1
<b>UNIDADES</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1. Infertilidad y Técnicas de Reproducción Asistida.....	13
2. Fecundación, desarrollo embrionario e implantación.....	15
2.1. Fecundación.....	15
2.2. Desarrollo embrionario.....	16
2.3. Implantación.....	19
3. Medios de cultivos y su papel en el desarrollo embrionario.....	22
3.1. Medios de cultivos: composición y utilización.....	23
3.2. Nivel de oxígeno y estrés oxidativo.....	29
3.3. Papel de los antioxidantes: Quercetina.....	36
3.4. Papel del metabolito 4-Hidroxiestradiol.....	41
4. Estructura y función del factor inducible por hipoxia.....	45
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	55
1. Justificación.....	57
2. Objetivo general y específicos.....	58

<b>CAPÍTULOS.....</b>	<b>61</b>
1. <b>CAPÍTULO I:</b> El 4-Hidroxiestradiol mejora la calidad de los embriones de ratón, la capacidad de unión al factor de crecimiento epidérmico <i>in vitro</i> y las tasas de implantación.....	65
1.1. Materiales y métodos.....	67
1.2. Resultados.....	75
1.3. Material complementario.....	88
2. <b>CAPÍTULO II:</b> La suplementación del medio de cultivo con quercetina mejora la calidad embrionaria de los blastocistos de ratón y aumenta la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ .....	91
2.1. Materiales y métodos.....	93
2.2. Resultados.....	99
3. <b>CAPÍTULO III:</b> Efecto de la adición de 4-Hidroxiestradiol y quercetina en medios de cultivo sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno y expresión génica en blastocistos de ratón.....	115
3.1. Materiales y métodos.....	117
3.2. Resultados.....	123
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>131</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO I: Publicaciones derivadas de la tesis doctoral.....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO II: Otras publicaciones científicas.....</b>	<b>279</b>
Otras publicaciones derivadas de esta tesis doctoral.....	281
Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.....	281

# ABREVIATURAS

**4-OHE<sub>2</sub>**: 4-hydroxyestradiol (por sus siglas en ingles)

**aa**: Aminoácidos

**AB**: AlamarBlue

**ADN**: Ácido desoxirribonucleico

**AHR**: Aryl hydrocarbon receptor (por sus siglas en ingles)

**AMPc**: Adenosín monofosfato cíclico

**ARE**: Antioxidant response element (por sus siglas en ingles)

**ARN**: Ácido ribonucleico

**Arnt**: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (por sus siglas en ingles)

**ATP**: Adenosí trifosfato (por sus siglas en ingles)

**bHLH**: Basic helix-loop-helix domains N-terminal (por sus siglas en inglés)

**BMOC2**: Medio Brinster para cultivo de óvulos

**BSA**: Bovine serum albumin (por sus siglas en inglés)

**CAT**: Catalasa

**CCEA**: Cocultivo endometrial autologo

**CG**: Células de la granulosa

**CIV**: Cultivo *in vitro*

**CO**: Cúmulus oophorus

**CO<sub>2</sub>**: Dióxido de carbono

**Col**: Colaboradores

**EOC**: Estimulación Ovárica Controlada

**COV**: Compuestos orgánicos volátiles

**COX-2**: Ciclooxygenasa-2

**Ctrl**: Contol

**D+**: Día del desarrollo

**Dcp**. Después del coito

**DE**: Desviación estándar

**DGP**: Diagnóstico genético preimplantacional

**DMEN**: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (por sus siglas en ingles)

**DMSO**: Dimetilsulfóxido

**E<sub>2</sub>**: Estradiol

**EA**: Eclosión Asistida

**eCG:** Gonadotropina Coriónica equina

**EDTA:** Ethylene diamine tetraacetic acid (por sus siglas en inglés)

**AGE:** Activación genómica embrionaria

**EGF:** Epidermal growth factor (por sus siglas en inglés)

**EGF-HB:** Epidermal growth factor with heparin-binding domain (por sus siglas en inglés)

**EO:** Estrés oxidativo

**EPO:** Eritropoyetina

**ErbB:** Protein family ErbB o Epidermal growth factor receptor (EGFR) (por sus siglas en inglés)

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**ESHRE:** European Society for Human Reproduction and Embryology (por sus siglas en inglés)

**FGF:** Fibroblast growth factor (por sus siglas en inglés)

**Fih:** HIF inhibitory factor (por sus siglas en inglés)

**FITC:** Fluorescein IsoTioCyanate (por sus siglas en inglés)

**FIV:** Fecundación *in vitro*

**GF:** Growth factor (por sus siglas en inglés)

**GLUT-1:** Transportador de glucosa- 1

**GLUT-3:** Transportador de glucosa- 3

**GM-CSF:** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (por sus siglas en inglés)

**GPx:** Glutación peroxidasa

**GSH:** Glutación

**GST:** Glutación s-transferasa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**HamF10:** Medio nutritivo F-10

**hCG:** Gonadotropina Coriónica humana

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad

**HIF:** Hypoxia-Inducible Factor (por sus siglas en inglés)

**HRE:** Hypoxia response element (por sus siglas en inglés)

**HTF:** Fluido tubárico humano

**ICSI:** Intracytoplasmic Sperm Injection (por sus siglas en inglés)

**IGF:** Insulin-like growth factor (por sus siglas en inglés)

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IU:** *In utero*

**KSOM:** Medio optimizado de potasio simple

**LIF:** leukemia inhibitory factor (por sus siglas en inglés)

**MaB:** De mórula a blastocisto

**MCI:** Masa celular interna

**MIV:** Maduración *in vitro*

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno

**NAC:** N-Acetil-L-cisteamina

**NADPH:** Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (por sus siglas en inglés)

**NOS:** nitric oxide synthases (por sus siglas en inglés)

**NQO1:** Quinona oxidorreductasa 1

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**ODD:** Oxygen dependent degradation domain (por sus siglas en inglés)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**P<sub>4</sub>:** Progesterona

**PAS:** Per-Arnt-Sim domain (por sus siglas en inglés)

**PBS:** Phosphate-Buffered Saline (por sus siglas en inglés)

**PDGF:** Platelet derived growth factor (por sus siglas en inglés)

**PFA:** Paraformaldehído

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**PGS:** Preimplantation genetic screening (por sus siglas en inglés)

**Phd:** Prolyl hydroxylase domain (por sus siglas en inglés)

**PN:** Pronucleos

**PRDX-5:** Peroxirredoxina 5

**PVHL:** Proteína de Von Hippel-Lindau

**PVP:** Polivinil polividona

**Quer:** Quercetina

**RA:** Reacción Acrosómica

**RT-qPCR:** Reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction (por sus siglas en inglés)

**SEF:** Sociedad Española de Fertilidad

**SOD:** Superóxido Dismutasa

**ERN:** Especies reactivas de nitrógeno

**TAD:** Transcriptional activation domains (por sus siglas en inglés)

**TdT:** Terminal deoxynucleotidyl transferase (por sus siglas en inglés)

**TECD:** Transferencia de embriones congelados-descongelados

**TGF-β:** Transforming growth factor β (por sus siglas en inglés)

**TNF:** Tumor necrosis factor (por sus siglas en inglés)

**TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida

**TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (por sus siglas en inglés)

**VEGF:** Vascular endothelial growth factor (por sus siglas en inglés)

**Vhl:** Von Hippel-Lindau

**ZP:** Zona pelúcida

# UNIDADES

**%:** Porcentaje

**µg:** microgramos

**µm:** micrómetro

**µM:** micromolar

**Ct:** Umbral de ciclos

**h:** horas

**kDa:** Kilodalton

**Kg:** Kilogramos

**l:** litro

**mg:** miligramos

**min:** minutos

**ml:** mililitros

**mm:** milímetros

**mM:** milimolar

**nm:** nanómetro

**°C:** grados centígrados

**rpm:** revoluciones por minutos

**U:** Unidades

**UIF:** Unidades de intensidad de fluorescencia



## RESUMEN

El tratamiento médico de la esterilidad incluye diferentes técnicas de reproducción asistida (TRA) en las que los embriones se cultivan *in vitro* y finalmente se transfieren al útero. Durante todo este procedimiento, son muchos los factores que influyen tanto en la calidad del embrión, como en el éxito de la implantación. Entre ellos: los niveles de oxígeno (O<sub>2</sub>) utilizado durante la incubación y la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas durante el cultivo. Ambos factores influyen en la proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto, la cual sigue siendo variable en las tasas de desarrollo, en la calidad del embrión y en las tasa de implantación. Por otro lado, el potencial de desarrollo de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV) también está relacionado con la composición del medio de cultivo, ya que el cultivo aún no reemplaza todos los beneficios del desarrollo embrionario dentro del tracto reproductivo femenino, por lo que se asume que el cultivo embrionario es subóptimo y que las condiciones del cultivo son en gran parte responsables del desarrollo embrionario deficiente *in vitro*.

Los factores inducibles por hipoxia (HIF) son factores de transcripción que median la regulación dependiente de O<sub>2</sub> de numerosos genes que se cree que están implicados en el desarrollo del futuro embrión. Se ha visto que la quercetina (Quer) induce la acumulación del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) en condiciones de normoxia. Este flavonoide podría ayudar a solventar algunos de los problemas que son producidos por concentraciones normales de O<sub>2</sub> mediante la activación de HIF-1 $\alpha$  y los genes que este induce, algunos de los cuales están implicados en el desarrollo e implantación del embrión. Por otro lado, el 4-Hidroxiestradiol (4-OHE<sub>2</sub>), un metabolito del estradiol producido por las células endometriales, juega un papel clave en las interacciones endometrio-embrión que son necesarias para la implantación. No obstante, los efectos del 4-OHE<sub>2</sub> aún no se han descrito en embriones obtenidos *in vitro*.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo principal mejorar los medios de cultivos utilizados en el desarrollo de los embriones obtenidos por FIV, empleando dos moléculas: el 4-OHE<sub>2</sub> y Quer, con el fin de poder conseguir embriones de mejor calidad y con mejor poder de implantación. Para ello, utilizamos el ratón como modelo de desarrollo preimplantacional debido a su pequeño tamaño, prolificidad, facilidad de manejo, facilidad de extracción de gametos y embriones y costo relativamente bajo, pero con el objetivo de trasladar su significado a la FIV humana.

Este proyecto de Tesis Doctoral aporta, en un escenario experimental, resultados positivos respecto a la mejora en el desarrollo y en la implantación embrionaria utilizando de forma independiente tanto Quer durante cortos periodos de tiempo como 4-OHE<sub>2</sub> durante 24 h. Con esta suplementación hemos conseguido una calidad embrionaria similar a cuando los embriones se cultivan en bajas concentraciones de O<sub>2</sub> o se obtienen directamente del útero. Los niveles en la producción de las ERO se vieron reducidos en la etapa de compactación cuando los embriones fueron tratados con Quer. Sin embargo, la suplementación con 4-OHE<sub>2</sub>, a pesar de no tener efectos en la reducción de los niveles de ERO, actúa directamente en la señalización molecular implicada en el proceso de implantación mejorando la capacidad de los embriones para unirse a EGF. Además, ambas moléculas activan varios genes cuando se añaden a los medios de cultivo, entre ellos Hif-1 $\alpha$ . Por otro lado, se ha comprobado que estos compuestos han sido efectivos cuando la adición se realizó en la transición de mórula a blastocisto, y no en otras fases de desarrollo. Como conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían tener implicaciones importantes para las técnicas de reproducción asistida abriendo las puertas a la modificación de las condiciones de cultivo para una mejora de los resultados en las clínicas.

**Palabras claves:** quercetina, 4-OHE<sub>2</sub>, medio de cultivo, implantación, embrión, FIV, desarrollo embrionario, ERO, hipoxia.

## ABSTRACT

The medical treatment of infertility includes different assisted reproductive techniques (ART) in which embryos are grown *in vitro* and finally transferred into the uterus. Throughout this procedure, there are many factors that influence both the quality of the embryo and the success of the implantation. These include: the levels of oxygen (O<sub>2</sub>) used during incubation, and the concentrations of reactive oxygen species (ROS) produced during culture. Both factors influence the proportion of embryos that reach the blastocyst stage, which remains variable in development rates, embryo quality and implantation rates. On the other hand, the development potential of the embryos obtained by *in vitro* fertilization (IVF) is also related to the composition of the culture medium, since the culture does not replace all the benefits of embryonic development within the female reproductive tract, so it is assumed that embryo culture is suboptimal and that culture conditions are largely responsible for poor embryo development *in vitro*.

Hypoxia-inducible factors (HIF) are transcription factors that mediate the O<sub>2</sub>-dependent regulation of numerous genes that are believed to be involved in the development of the future embryo. Quercetin (Quer) has been shown to induce the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) under normoxic conditions. This flavonoid could help to solve some of the problems that are produced by normal concentrations of O<sub>2</sub> through the activation of HIF-1 $\alpha$  and the genes that it induces, some of which are involved in the development and implantation of the embryo. On the other hand, 4-Hydroxyestradiol (4-OHE<sub>2</sub>), a metabolite of estradiol produced by endometrial cells, plays a key role in the endometrial-embryo interactions that are necessary for implantation. However, the effects of 4-OHE<sub>2</sub> have not yet been described in embryos developed *in vitro*.

The main objective of this doctoral thesis is to improve the culture media used in the development of embryos obtained by IVF, using two molecules: 4-OHE<sub>2</sub> and Quer, with the aim to obtain better quality embryos and with higher implantation potential. To do this, we use the mouse as a model of preimplantation development due to its small size, prolificacy, ease of handling, ease of gamete and embryo extraction and relatively low cost, but with the aim of transferring the results to human IVF.

This Doctoral Thesis project provides, in an experimental scene, positive results regarding the improvement in embryonic development and implantation independently using both Quer for short periods of time and 4-OHE<sub>2</sub> for 24 h. With this supplementation we have achieved an embryonic quality similar to when the embryos are cultured in low concentrations of O<sub>2</sub> or obtained directly from the uterus. ROS production levels were reduced at the compaction stage when embryos were treated with Quer. However, supplementation with 4-OHE<sub>2</sub>, despite having no effect on reducing ROS levels, acts directly on the molecular signaling involved in the implantation process, improving the ability of embryos to bind EGF. Furthermore, both molecules activate several genes when added to culture media, including Hif-1 $\alpha$ . On the other hand, it has been proven that these compounds have been effective when the addition was made in the transition from morula to blastocyst, and not in other development phases. In conclusion, the results obtained in this study could have important implications for assisted reproduction techniques opening the doors to the modification of the culture conditions for an improvement of the results in the clinics.

**Key Word:** quercetin, 4-OHE<sub>2</sub>, culture medium, implantation, embryo, IVF, embryo development, ROS, hypoxia.

# **INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

## 1. Infertilidad y Técnicas de Reproducción Asistida

La infertilidad es un problema de salud global que afecta entre 48 millones de parejas y 186 millones de personas en edad reproductiva en todo el mundo (OMS; Organización Mundial de la Salud). Se estima que un 15 % de la población sufre este trastorno reproductivo, es decir una de cada seis parejas, y experimenta una evolución creciente.

El concepto de infertilidad para muchos especialistas es la incapacidad para conseguir gestaciones capaces de evolucionar hasta la viabilidad fetal, ya sea debido a una enfermedad del sistema reproductivo masculino o femenino, en algunas ocasiones también es definida por la imposibilidad de lograr un embarazo exitoso después de 12 meses o más de relaciones sexuales regulares sin protección. Sin embargo, este concepto también engloba situaciones como el aborto de repetición, la muerte fetal intrauterina, el parto prematuro, etc. Por lo que, en la actualidad, se tiende a preferir el término “pérdida gestacional recurrente”. Mientras que a la incapacidad para lograr gestación tras un año de relaciones sexuales con frecuencia normal y sin uso de ningún método anticonceptivo se entiende como esterilidad.

Las causas de la infertilidad pueden ser debidas a factores masculinos (10-30 %), factores femeninos (30-40 %), una combinación de ambos factores (15-30 %) o por una causa inexplicable (10 %). Además, tanto para las mujeres como para los hombres, los factores ambientales y de estilo de vida, como el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, la obesidad y la exposición a contaminantes ambientales, se han asociado con tasas de fertilidad más bajas (Silvestri y colaboradores (cols.), 2019; OMS, 2021). Respecto al factor masculino, las causas más comunes de infertilidad están motivadas, tanto por problemas de origen endocrino, como por fallos testiculares (factores genéticos, congénitos o adquiridos) y obstructivos, que modifican la cantidad y la calidad del semen y del esperma. Por otra parte, y en cuanto al factor femenino se refiere, la mayoría de las patologías estudiadas están asociadas con los trastornos ovulatorios que producen la modificación del ambiente endocrino, aunque también a las alteraciones anatómicas y fisiológicas, fundamentalmente defectos de malformación y permeabilidad tubárica o endometriosis.

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) forman parte de los recursos que se utilizan en clínica como parte del tratamiento de estos trastornos de la fertilidad. Estas técnicas, son un

conjunto amplio de procedimientos caracterizados por la actuación directa sobre los gametos (ovocitos y/o espermatozoides) con el fin de favorecer la fecundación y la transferencia o depósito de embriones en la cavidad uterina. Desde los primeros informes de embarazos y nacidos vivos después de la fecundación *in vitro* (FIV) por Steptoe y Edwards en 1976 y 1978, las TRA ha evolucionado notablemente, con varios avances vitales y logros históricos (Zhao y cols., 2011), lo que ha resultado en el nacimiento de más de siete millones de niños en todo el mundo (Sciorio y cols., 2020). En este sentido se han ido optimizando los medios de cultivo para ajustarse a los cambios de pH y temperatura propios de la manipulación de los gametos, o para abordar de forma secuencial cada una de las fases del desarrollo embrionario. Una innovación importante en las TRA es la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que implica la inyección de un solo espermatozoide en el citoplasma de un ovocito maduro. Otras modalidades en las TRA incluyen eclosión asistida de embriones (EA), cocultivo endometrial autólogo (CCEA), diagnóstico genético preimplantacional (DGP) o detección (PGS), criopreservación de gametos, embriones y tejido ovárico, transferencia de embriones congelados-descongelados (TECD) y el uso de gametos de donantes. Tampoco tenemos que olvidar el desarrollo de nuevos fármacos, que posibilitan la aplicación de protocolos personalizados de estimulación ovárica.

Dentro de las TRA, el procedimiento más comúnmente realizado es la FIV, esta técnica es un procedimiento complejo de varios pasos, el primero de los cuales es la estimulación ovárica controlada (EOC)). Este proceso implica el uso de gonadotropinas exógenas para estimular los ovarios de la paciente para que produzcan un mayor número de ovocitos, que luego se recuperan por vía transvaginal mediante aspiración folicular (Humaidan y cols., 2016). Los ovocitos viables se fecundan mediante cocultivo con el esperma de la pareja y los cigotos resultantes se cultivan durante unos días antes de depositar el mejor embrión disponible dentro del útero en un proceso conocido como transferencia de embrión fresco. Durante todo este procedimiento, son muchos los factores que influyen tanto en la calidad del embrión, entre ellos la composición de los medios de cultivo y las condiciones de este cultivo (Temperatura, humedad, concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), concentración de oxígeno (O<sub>2</sub>), etc.) como en el éxito de la implantación, este último es uno de los pasos más importantes y críticos en el proceso para lograr un embarazo exitoso.

## 2. Fecundación, desarrollo embrionario e implantación

### 2.1 Fecundación

La fecundación es uno de los procesos biológicos descritos más fascinantes y a la vez más complejos. Comienza con el transporte de los gametos en el tracto reproductor y concluye con la formación de los pronúcleos (PN) y la singamia de los mismos, para dar paso al desarrollo embrionario, el cual, permite la reproducción y continuación de la especie. En los mamíferos, la fecundación exitosa requiere que los espermatozoides liberados sobrevivan al entorno extremadamente duro del tracto reproductivo femenino y lleguen al lugar donde se encuentra el óvulo(s) recién liberado(s) en el oviducto (o trompa de Falopio en humanos). El oviducto, es una estructura en forma de tubo que conecta el ovario con el útero y que se compone de las siguientes tres regiones principales ordenadas desde el ovario hacia el útero: el **infundíbulo** (fimbria en humanos), en el que la mayoría de las células son células epiteliales ciliadas; la **ampolla**, que contiene un gran número de células epiteliales ciliadas y es el sitio de fecundación; y el **istmo**, que contiene un gran número de células epiteliales secretoras. Con estas tres estructuras distintas, el oviducto sirve como un pasaje que transporta los gametos y el embrión y proporciona un importante soporte estructural, ambiental y nutricional para el desarrollo embrionario temprano (Li y Winuthayanon, 2017).

Para que los espermatozoides de mamíferos puedan fecundar el óvulo deben de sufrir un proceso de capacitación, durante el cual se producen cambios bioquímicos en su membrana plásmatica (Salicioni y cols., 2007). Los espermatozoides capacitados que alcanzan la porción ampular deben contactar con las células de *cúmulus oophorus* (CO) que rodea al ovocito. Estas células deben de ser atravesadas por los espermatozoides. Se piensa que se hace a través de la motilidad espermática y la presencia de una proteína denominada *Hyal5* con actividad hialuronidasa que permitirá la penetración de las CO mediante la digestión de la matriz de ácido hialurónico (Kim y cols., 2005).

Una vez superadas las células del CO, el espermatozoide interacciona con el ovocito. Este proceso de interacción se produce en tres niveles: la zona pelúcida, que induce la excitosis del contenido acrosomal; la membrana plasmática del ovocito, con la que se fusiona y finalmente el citoplasma, donde se produce la descondensación del núcleo espermático.

Por tanto, cuando el espermatozoide se encuentra con el ovocito se tiene que producir el reconocimiento entre ambos, este reconocimiento se produce a través de una proteína situada en la capa exterior de la cabeza del espermatozoide que se denomina Izumo y un receptor específico para esta proteína que existe en la membrana del óvulo que se denomina Juno, cuando ambas estructuras se reconocen, se unen y los gametos se fusionan produciendo la fecundación y como consecuencia se forma el cigoto. Para conseguir esto, en los mamíferos, el óvulo está protegido por la zona pelúcida que es una capa de matriz extracelular que consiste principalmente en glicoproteínas. Cuando un espermatozoide se une a la zona pelúcida, tiene lugar las reacciones acrosomales (Li y Winuthayanon, 2017). Este proceso de reacción acrosómica (RA) está mediado por una compleja interacción de señales celulares que incluyen la activación de proteínas cinasas y su posterior fosforilación, activación de canales iónicos y otros procesos aún por definir (Herrick y cols., 2005). Además, este proceso de RA libera proteínas en otros lugares para evitar que otros espermatozoides se fusionen con el óvulo. Si este mecanismo falla, múltiples espermatozoides pueden fusionarse con el óvulo, lo que resulta en polispermia y el embrión resultante no es genéticamente viable muriendo a los pocos días.

Una vez, producida la degradación de la matriz de glicoproteínas (zona pelúcida) que protege al óvulo, se produce la fusión de la membrana plásmática del espermatozoide con la membrana plasmática del óvulo. La fusión de estas dos membranas crea una abertura a través de la cual el núcleo del espermatozoide se transfiere al óvulo. El núcleo del membrana nucleare del espermatozoide se descondensa para formar el pronúcleo masculino y el material genético del óvulo forma el pronúcleo femenino para que mediante el proceso de singamia los dos genomas haploides se condensan para formar un genoma diploide. Este evento conduce a la embriogénesis y comienza el desarrollo embrionario (Li y Winuthayanon, 2017).

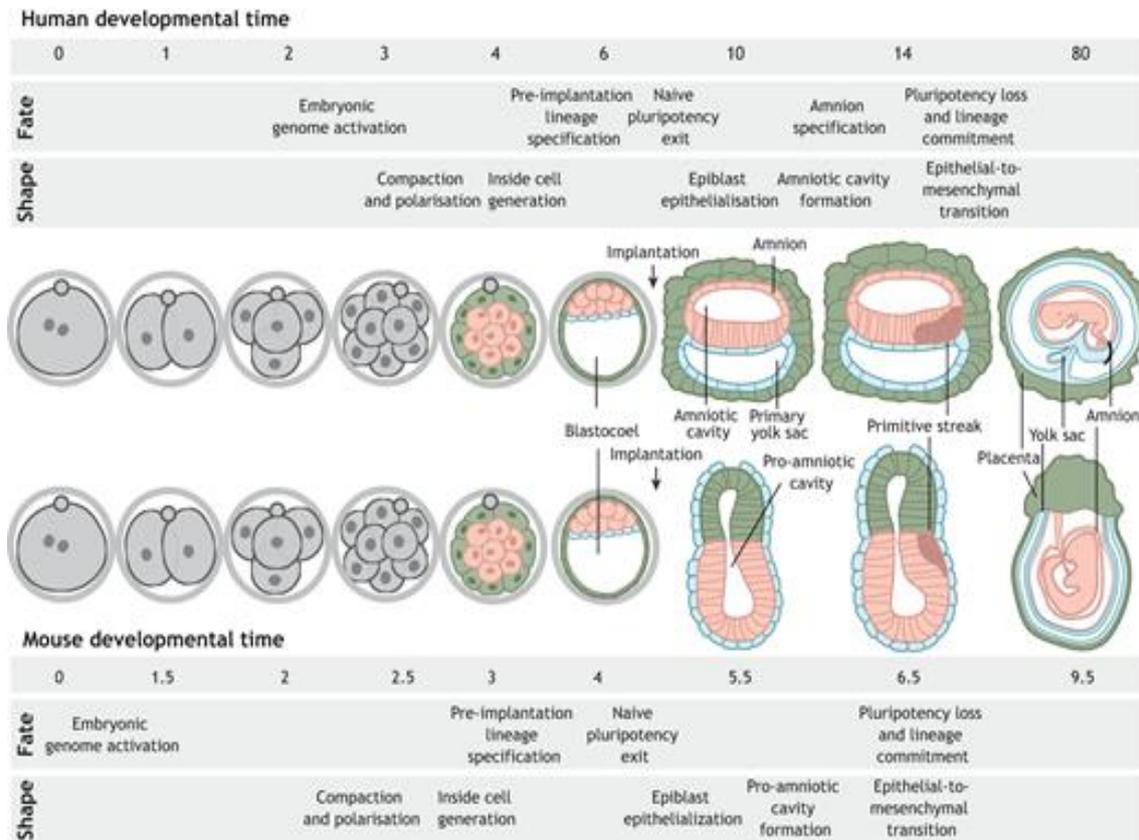
## **2.2. Desarrollo embrionario.**

La etapa embrionaria de preimplantación es el desarrollo progresivo del cigoto fecundado desde la etapa de dos PN hasta la etapa de blastocisto, que está marcada por varios cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos clave, todos ellos son críticos para el desarrollo del embrión temprano (Gardener, 2018). En términos generales, la etapa embrionaria de preimplantación se divide en dos etapas de desarrollo distintas: etapa de pre-compactación y post-compactación (Zander-Fox y Lane, 2012). La etapa de pre-compactación del embrión es un período muy dinámico y crucial que comienza después de la fecundación. Tras la unión de

ambos gametos, en la etapa pronuclear el embrión está bajo control genético de las transcripciones derivadas de la madre. Posteriormente, los embriones de mamíferos se someten a una serie de divisiones. La activación del genoma embrionario se produce por ejemplo; en la etapa de dos células en los embriones de ratón y en la transición de la etapa de cuatro a ocho células en los embriones humanos (Saugandhika y cols., 2022). Las rápidas y múltiples fases de división celular o mitótica se denominan escisión y ocurren en el oviducto (Pelton y cols., 1998), donde el embrión es transportado desde el sitio de fecundación hacia el final del oviducto durante las etapas tempranas de escisión. En estas etapas las células se dividen sin un aumento de masa, es decir, el cigoto se divide en múltiples células más pequeñas dando como resultado una mórula compacta (Saugandhika y cols., 2022).

La compactación y la polarización ocurren en la etapa de 8 a 16 células en embriones humanos. Posteriormente, Los blastómeros, que son cada célula que forma el embrión, se adhieren fuertemente entre sí, maximizando su área de contacto célula-célula, lo que lleva al embrión a adquirir una morfología comprimida. Este proceso se conserva en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta ahora, pero el momento varía (Shahbazi y cols., 2020). El momento preciso del inicio y finalización de la compactación es importante para el desarrollo exitoso de embriones (Kim y cols., 2017). Los embriones humanos en los que la compactación se inicia prematuramente o se retrasa tienen un menor potencial para formar blastocistos. La compactación prematura se asocia con fallos citocinéticos y blastómeros multinucleares (Iwata y cols., 2014), mientras que la compactación tardía se asocia con una cantidad reducida de células de masa celular interna (MCI) (Ivec y cols., 2011). Los mecanismos que impulsan la compactación en embriones humanos siguen siendo desconocidos, en cambio, estos mecanismos se han explorado principalmente utilizando embriones de ratón permitiéndonos una mejor comprensión de este proceso.

Después de que las divisiones celulares hayan producido más de 100 células, el embrión se llama blastocisto, el cual está formado por una cavidad hueca, el blastocele, el cual se compone de dos capas: la MCI y una capa externa llamada trofoblasto. La MCI también se conoce como embrioblasto, esta masa de células es la que luego pasará a formar el embrión. El trofoblasto contribuirá a la placenta y nutrirá al embrión. En esta última etapa los embriones sufren una transformación morfológica global (Shahbazi y cols., 2020) (**Figura 1**).



**Figura 1. Descripción general del desarrollo embrionario humano y de ratón.** Tomada de Shahbazi y cols., 2020.

Por otro lado, se sabe que el embrión de preimplantación de mamífero se desarrolla en un entorno transoviductal/uterino de movimiento libre y autosuficiente, aunque influenciado por biomoléculas de los fluidos del tracto reproductivo, el cual es fundamental para su desarrollo (Li y Winuthayanon., 2017). Durante este desarrollo *in vivo*, el embrión se transporta por un movimiento activo generado por las células ciliadas del oviducto (Gaddum-Rosse y Blandau, 1973) y las contracciones del músculo liso del oviducto y el útero (Lyons y cols., 2006). Durante el movimiento a través del aparato reproductor femenino, y especialmente en el oviducto, los embriones de preimplantación residen espacialmente entre las células epiteliales ciliadas y no ciliadas y están sujetos a un microambiente húmedo resultante de las secreciones de las células epiteliales uterinas y del oviducto que favorece su desarrollo (Leese y cols., 2001). Estas secreciones del tracto reproductivo aportan diferentes biomoléculas al embrión en desarrollo durante el tránsito del oviducto al útero que favorecen su movimiento (Gardner y Lane., 2012).

Se ha observado que después de que las células del cúmulo se caen en la post-fecundación, los embriones de preimplantación utilizan el metabolismo oxidativo para adquirir energía,

principalmente a partir de piruvato y lactato como principales fuentes de energía (Absalon-Medina y cols., 2014). Por otro lado, los embriones tempranos generalmente permanecen en el oviducto durante 3 a 4 días (Croxatto, 2002). Durante este tiempo, los embriones fecundados pasan del metabolismo oxidativo al metabolismo glicólico (Folmes y Terzic, 2014). Esta transición va acompañada de diferentes cambios en la composición de los nutrientes a medida que el embrión viaja a través del oviducto, además de la maduración de las mitocondrias para permitir que el embrión establezca su propio metabolismo y un cambio en la tensión de O<sub>2</sub> paralelo a este cambio en el metabolismo (Absalon-Medina y cols., 2014). Por otro lado, dentro del oviducto existe un microambiente que proporciona una actividad antioxidante interna para obtener una protección frente al estrés oxidativo (EO) generado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Guerin y cols., 2001), además de una temperatura estable y de un pH óptimo para el desarrollo del embrión (Li y Winuthayanon, 2017). La presencia/ausencia de sustratos, sus diferentes concentraciones y la variedad de sustratos metabólicos disponibles para el cambio del desarrollo embrionario previo a la implantación se producen de manera gradual durante el tránsito a través del tracto reproductivo femenino (Swain y cols., 2016).

Por todo lo anterior, el desarrollo embrionario es un proceso complejo, regulado por la interacción entre el ambiente oviductal, el fluido uterino y la interacción del embrión con el ambiente del tracto reproductor femenino, al cual deben de enfrentarse y adaptarse especialmente en las etapas previas a la implantación. Además, el embrión debe poder adaptarse aún más a las señales ambientales en el útero para dar como resultado el nacimiento de una descendencia viva y saludable. Estas condiciones son difíciles de replicar *in vitro*, por lo que identificar cuáles son los requerimientos nutricionales y condiciones ambientales en cada etapa del desarrollo embrionario, constituye en la actualidad uno de los objetivos en el ámbito de la embriología clínica.

### **2.3 Implantación.**

Una vez que el embrión en estadio de blastocisto llega al útero, se produce la implantación del mismo. Esta fase es una de las etapas más significativas en la consecución de un embarazo exitoso. Para que el proceso se lleve a cabo correctamente, es necesario que exista una correcta interacción entre útero y embrión. El establecimiento de una relación tan estrecha como la que se constituye entre ambos, implica la participación de múltiples factores que dirigen el proceso. En algunos casos estos factores actúan sobre el embrión, modificando su

grado de actividad o el potencial implantatorio, y en otros casos actúan sobre el útero, induciendo la expresión de moléculas de adhesión, alterando la actividad del sistema inmune y su vascularización (Simon y Dominguez, 2004). El patrón cronológico al que se ajustan dichos factores, está marcado por el ambiente endocrino, del que cabe destacar la función de los esteroides ováricos, principalmente el Estradiol (E<sub>2</sub>) y la Progesterona (P<sub>4</sub>) (Franco y cols., 2008). El proceso de implantación puede dividirse en tres etapas que detallaremos a continuación, cada una de ellas con unos protagonistas moleculares determinados (Schlafke y Enders, 1975).

La primera etapa se denomina **Fase de Aposición**, es donde se produce el primer contacto celular entre los tejidos uterinos y embrionarios. Durante este periodo las citoquinas son las principales moléculas implicadas, se produce el reconocimiento del blastocisto por parte de los pinápodos endometriales, el blastocisto pierde la zona pelúcida y el trofoblasto situado en el polo embrionario hace contacto con la capa compacta del endometrio. Durante la siguiente etapa o **Fase de Adhesión**, cabe destacar el papel de las integrinas  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 4$ , que son las principales moléculas de adhesión implicadas en este proceso, facilitando la fijación del trofoblasto con las células epiteliales del endometrio (Lessey y cols., 1994). Su actividad se encuentra regulada no solo por el ambiente endocrino circundante, sino por el propio embrión, que tiene la capacidad de inducir un aumento en la expresión de algunas de ellas en las células del epitelio endometrial (Simon y cols., 1997), Finalmente la **fase de Invasión** está protagonizada por factores proteolíticos como las serínproteasas, metaloproteasas y colagenasas, e inmunológicos (Salamonsen, 1999). La actividad invasiva del trofoblasto en la cavidad uterina y más concretamente en el endometrio, es estimulada por los esteroides ováricos y controlada por inhibidores específicos, secretados tanto por el embrión como por el endometrio (Behrendtsen y cols., 1992). Durante esta fase ocurre la activación del blastocisto, que se inicia con la diferenciación del trofoblasto en citotrofoblasto, formado por células que se multiplican activamente y el sincitiotrofoblasto, formado por una capa multinucleada. Al diferenciarse el sincitiotrofoblasto adquiere su capacidad invasiva, sintetiza enzimas proteolíticas, entre ellas las metaloproteasas que rompen los desmosomas de la membrana basal del epitelio endometrial y mediante protrusiones alcanza la capa esponjosa invadiéndola y fijándose ahí, proceso que se denomina anidación, el epitelio degenerado se regenera y el embrión queda inmerso dentro. A lo largo de todos estos procesos es preciso que tanto el blastocisto como el útero atraviesen una fase competente y establezcan una correcta comunicación entre ellos. La adquisición de competencia por parte del endometrio, se refiere

al conjunto de cambios morfológicos y funcionales que posibilitan la anidación del blastocisto. Dichos cambios están controlados fundamentalmente por el ambiente endocrino.

Por otra parte, la adquisición de competencia por parte del embrión también está relacionada con el ambiente endocrino. Los cambios que se producen en el ambiente endocrino del tracto reproductor femenino, durante el periodo que define la ventana de implantación, desencadenan la producción, por parte del endometrio, de una gran cantidad de factores de crecimiento, mientras que una gran parte de sus receptores pueden ser detectados en la superficie del embrión; esto incluye miembros de la familia de factores de crecimiento insulínico (IGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento fibroblástico (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y factores de necrosis tumoral (TNF) (Hardy y Spanos, 2002). La realización de estudios con ratones knockout, evidencian que los embriones que carecen de uno de estos factores de crecimiento en particular pueden completar el desarrollo preimplantacional e implantarse. No ocurre lo mismo con aquellos embriones deficientes en la expresión del factor inhibidor de la leucemia (LIF), que es a su vez el principal regulador de la expresión de factores de crecimiento epidérmico con dominio de unión a heparina (EGF-HB) (Song y cols., 2000). Aunque la expresión de EGF-HB es dependiente de LIF, parece que es EGF-HB quien dirige el proceso de la implantación (Lim y Dey, 2009). Por otra parte, y confirmando la importancia de dicho factor, cualquier deficiencia en la expresión de su receptor ErbB provoca fallos de implantación (Threadgill y cols., 1995). Se podría decir que es EGF-HB, a través de sus receptores, la principal herramienta utilizada por el útero para sincronizar el momento y el lugar adecuados de la implantación (**Figura 2**).

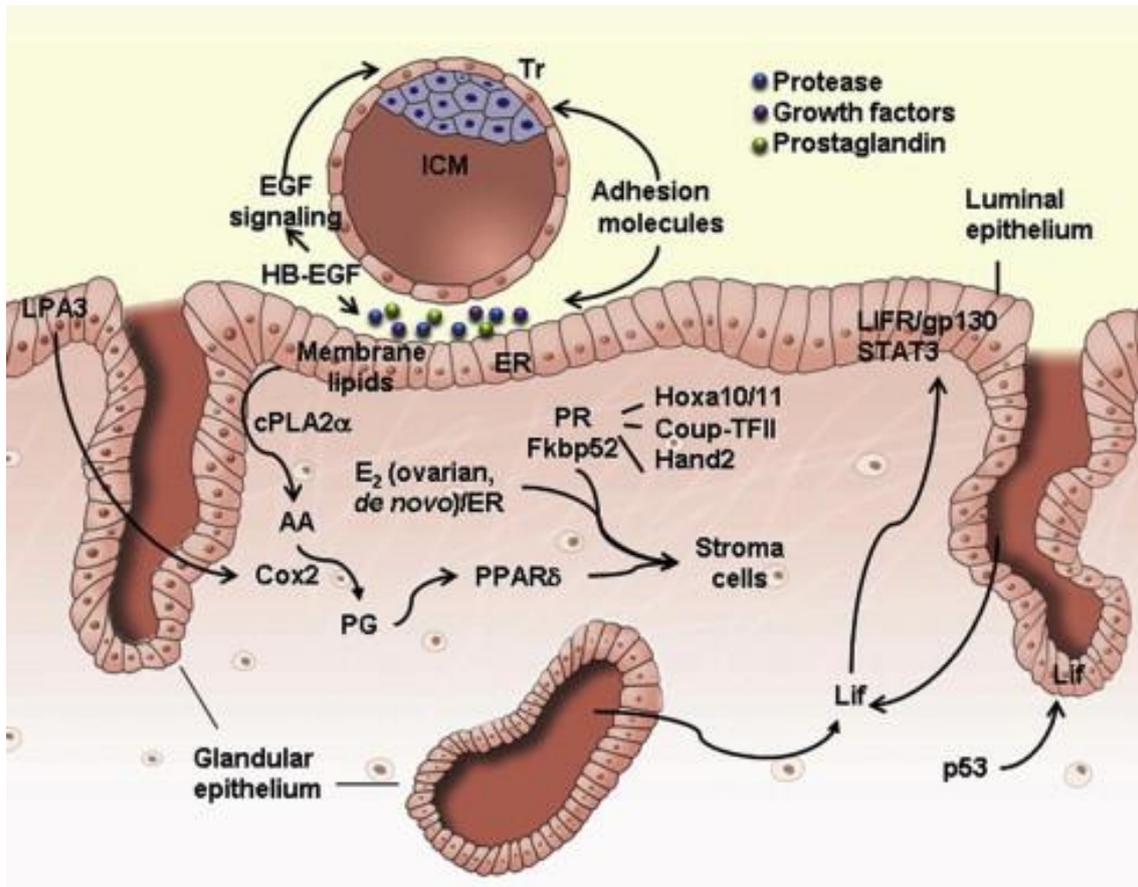


Figura 2. Redes de señalización que regulan la implantación. Tomada de Zhang y cols., 2013.

Por lo tanto, podemos decir que la implantación embrionaria es un proceso complejo, regulado por múltiples factores y moléculas cuyo origen se sitúa tanto en el útero como en el propio embrión. Identificar cuáles son estos factores, constituye en la actualidad, uno de los principales objetivos en el ámbito de la medicina reproductiva.

### 3. Medios de cultivos y su papel en el desarrollo embrionario

El objetivo final de las TRA es el nacimiento de una descendencia saludable. Desde el nacimiento de Louise Brown, la primera niña nacida gracias a la FIV (Steptoe y Edwards, 1978), los avances en el mundo de la reproducción asistida han sido rápidos e impresionantes y el futuro depara aún muchos más progresos. La gran mejora en las condiciones de cultivo y especialmente en los medios utilizados para este cultivo durante la FIV son una parte importante de este éxito (Chronopoulou y Harper, 2015).

Hay evidencias acumuladas que muestran que las condiciones de cultivo son importantes para el resultado de la FIV y tienen un impacto en el desarrollo previo y posterior a la implantación y posiblemente en la salud futura de la descendencia (Mantikou y cols., 2013a). Sin embargo, la evidencia de un papel de la composición de los medios de cultivo de FIV en estos resultados a menudo es insuficiente y controvertida.

Los embriones *in vivo* e *in vitro* se enfrentan y deben adaptarse a múltiples microambientes, especialmente en las etapas previas a la implantación y también deben poder adaptarse aún más a las señales ambientales en el útero para dar como resultado el nacimiento exitoso, por ello, la proporción de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto sigue siendo variable (Yu y cols., 2014). Se sabe que los medios actuales se diseñan principalmente en base a datos de estudios en animales que no siempre son transferibles a la embriología humana (Harper y cols., 2012). Sin embargo, gracias a las investigaciones realizadas en estos animales, los estudios realizados hasta ahora han logrado enormes avances en la comprensión y el cumplimiento de los requisitos específicos de las etapas de los embriones previos a la implantación, pero la interpretación de los datos se dificulta debido a la complejidad de la amplia gama de sistemas de cultivo y la notable plasticidad de los embriones en desarrollo que parecen ser capaces de desarrollarse bajo un variedad de condiciones. Por lo que sigue siendo un objetivo principal cumplir, en la medida de lo posible, los requisitos embrionarios previos a la implantación tal como se proporcionan *in vivo*, ya que los sistemas de cultivo más óptimos darían como resultado menos problemas de "bloqueo del desarrollo" y facilitarían la producción de un mayor número embriones de alta calidad para transferencias frescas o criopreservación exitosas.

### **3.1. Medios de cultivos: composición y utilización**

Los primeros esfuerzos en el diseño de medios de cultivo de embriones previos a la implantación de mamíferos, incluidos humanos, se centraron en el análisis del tiempo de tránsito del tracto reproductivo del embrión, las secreciones del oviducto, (Leese, 1988), las secreciones uterinas (Aguilar y Reyley, 2005) y los sustratos específicos de exposición del desarrollo del embrión (Swain y cols., 2016).

Whitten en 1956 usó una solución de bicarbonato de Krebs-Ringer con glucosa, albúmina de suero bovino (BSA) y antibióticos y cultivó con éxito embriones de ratón de 8 células recolectados desde la trompa de Falopio hasta la etapa de blastocisto. En ese momento, era

más difícil cultivar embriones recuperados antes de la etapa de 8 células, pero posteriormente demostró que agregar lactato al medio permitía el progreso de los embriones desde la etapa de 2 células hasta la etapa de blastocisto (Whitten, 1957). Luego, Brinster en 1965 descubrió que los embriones de ratón en etapa de 2 células no utilizan glucosa como fuente de energía, sino que requerían piruvato o lactato, por lo que desarrolló el medio Brinster para cultivo de óvulos (BMOC2) en ratones y demostró que mejoraba el rendimiento de blastocistos de embriones de 2 células cuando se añadían piruvato y lactato a los medios en comparación con su uso único (Yao y Asayama, 2016). Sin embargo, estudios posteriores encontraron que sin glucosa los embriones post-compactados no podrían desarrollarse hasta la etapa de blastocisto (Brinster, 1965; Brown y Whittingham, 1991). Finalmente, en 1968, Whitten y Biggers lograron cultivar embriones de 1 célula hasta la etapa de blastocisto utilizando un medio que contenía BSA, piruvato, lactato y glucosa (Yao y Asayama, 2016). Pero al usar este medio, solo pudieron cultivar óvulos fertilizados de ratones híbridos F1, mientras que la mayoría de los embriones de otras cepas mostraron una detención del desarrollo en la etapa de 2 células, que más tarde se conoció como "el bloqueo de desarrollo embrionario temprano" y se observó lo mismo en la mayoría de otros animales de laboratorio (Bavister, 1995). Para superar el bloqueo del desarrollo, algunos estudios utilizaron un sistema de cocultivo y encontraron que la adición de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) evitó la utilización prematura de glucosa y alivió el bloqueo (Baltz, 2013). Además, se observó que el bloqueo del desarrollo coincidió con la activación genómica embrionaria (AGE) en diferentes etapas en diferentes especies. Se concluyó que la presencia de glucosa y fosfato en los medios de cultivo no era la causa del bloqueo del desarrollo en embriones en etapa temprana (Chronopoulou y Harper, 2015). En resumen, los estudios anteriores sobre el modelo animal proporcionaron una visión general para desarrollar medios de cultivo de FIV para embriones humanos.

En la primera década de la FIV humana, los medios de cultivo iban desde soluciones salinas bastante simples, como las soluciones de Earle o Tyrode, hasta medios complejos destinados al cultivo de tejidos, como medio nutritivo F-10 (HamF10). Todos ellos solían complementarse con diferentes fuentes de proteínas, en su mayoría con suero fetal o materno. Incluso hoy en día, los medios de cultivo disponibles comercialmente van desde medios bastante simples, con 8 a 10 sales y azúcares diferentes, hasta medios que contienen casi 80 componentes diferentes, incluidos aminoácidos, lípidos, vitaminas, iones traza y moléculas bioactivas como hormonas y moduladores de expresión (Morbeck y cols., 2014; Chronopoulou y Harper, 2015,

Sunde y cols., 2016). Todo esto ha demostrado que la suplementación de medios con varios aditivos es una fuente importante de mejora del cultivo de FIV.

Actualmente los medios de cultivos contienen los siguientes componentes:

**Carbohidratos:** ya que el embrión previo a la implantación depende de diferentes fuentes de energía para generar trifosfato de adenosina (ATP). El piruvato y el lactato son las principales fuentes de energía del embrión temprano, ya que no pueden metabolizar la glucosa (Morbeck y cols., 2014). Pero no es solo su concentración absoluta, sino también la proporción de estos dos carbohidratos en el medio de cultivo lo que influye en la viabilidad del embrión (Morbeck y cols., 2014).

**Aminoácidos (aa):** Los aminoácidos son reguladores importantes del desarrollo previo a la implantación y son utilizados por los embriones a diferentes velocidades en diferentes etapas de desarrollo. Antes de la activación del genoma embrionario, los aa contribuyen como fuente de energía y también realizan otras funciones importantes como amortiguadores del pH interno, osmolitos, antioxidantes, quelantes de metales pesados y moléculas precursoras biosintéticas (Gruber y Klein, 2011; Zander-Fox y Lane, 2014).

**Agente quelante-EDTA:** El EDTA en los medios de cultivo funciona como ligando y agente quelante para secuestrar iones metálicos que, de lo contrario, causarían peroxidación y provocarían EO. Además, la adición de EDTA también alivia el bloqueo de dos células en los embriones (Gruber y Klein, 2011). Inhibe la glucólisis prematura disminuyendo el metabolismo aeróbico y la producción de ERO y también bloquea la conversión de hipoxantina a xantina que produce superóxidos (Guerin y cols., 2001). Sin embargo, se ha demostrado que el EDTA a una concentración de 0,1 mM/L reduce el desarrollo de la MCI después de la compactación (Gardner y cols., 2000). La razón de tal efecto bifásico es que el efecto inhibitorio de la glucólisis del EDTA es necesario solo hasta la compactación, ya que después de eso el embrión requiere la glucólisis para la producción de energía, y la presencia de EDTA luego inhibe el desarrollo del blastocisto (Hewitson y Leese, 1993).

**Macromoléculas:** Como la albúmina, que es un transportador de lípidos, hormonas, vitaminas y minerales, que también tiene múltiples funciones, como mantener la estabilidad de la membrana celular, quelar componentes tóxicos y regular la permeabilidad de la

membrana capilar (Tarahomi y cols., 2018). Debido a sus funciones anteriores y su efecto regulador sobre los embriones *in vitro*, la albúmina es un componente de los medios de cultivo del embrión en lugar del suero (Lane y Gardner, 2003). Otra molécula fisiológica alternativa a la albúmina es el ácido hialurónico. Se ha demostrado que la inclusión de ácido hialurónico en el medio de cultivo aumenta la tasa de implantación embrionaria y desarrollo fetal en ratones y embriones humanos (Bontekoe y cols., 2009). Además, en bovinos, el ácido hialurónico y la albúmina en medio de cultivo mejoraron el desarrollo de blastocistos y la tasa de criosupervivencia de los embriones (Lane y cols., 2003,).

**Factores de crecimiento:** los embriones de preimplantación están naturalmente expuestos a un número variable de factores de crecimiento (GF), algunos de los cuales son secretados por el propio embrión y otros por el endometrio materno. Los GF median una comunicación cruzada entre el tejido materno y el embrión que promueve el desarrollo y la implantación del embrión en crecimiento (O'Neill, 2008). La adición de varios GF a los medios de cultivo de embriones humanos ha demostrado resultados optimistas que muestran un desarrollo acelerado, una mayor tasa de embriones que llegan a blastocistos y un mayor número de células (Richter, 2008; Kawamura, 2012). En este sentido, ciertos GF han recibido una atención considerable en investigación, como la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Yao y Asayama, 2016).

**Vitaminas:** Las vitaminas añadidas a los medios de cultivo actúan como antioxidantes que alivian el efecto perjudicial causado por la secreción deliberada de ERO en el medio. El ácido fólico promueve la producción intrínseca de antioxidantes y también contribuye a la síntesis de ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico) y proteínas y regula la actividad epigenética adecuada después de la fecundación (Laanpere y cols., 2010). Recientemente se ha demostrado que agregar ácido fólico al medio de cultivo aumenta la tasa de fecundación y mejora la competencia de desarrollo de los embriones bovinos (Saini y cols., 2022). En embriones de FIV de ratón y bovino, se ha observado que la adición de vitamina C y cobalamina en los medios de cultivo rescata el desarrollo embrionario *in vitro* al corregir la desmetilación activa del ADN alterada (Chu y cols., 2021). Además, se ha demostrado que dosis moderadas de vitaminas C y E añadidas a los medios de cultivo reducen el daño oxidativo y mejoran la tasa de desarrollo de blastocistos en embriones de ratón (Wang y cols., 2003). Por

lo tanto, actualmente, las vitaminas como ácido ascórbico, ácido fólico, cianocobalamina y tocoferol se utilizan en TRA en concentraciones óptimas vitaminas.

**Antibióticos:** para proteger a los embriones de la contaminación microbiana, los antibióticos se agregan rutinariamente a los medios de cultivo (Lemeire y cols., 2007). Los antibióticos de uso común son la gentamicina (50 µg/ml), la estreptomycinina (100 µg/ml) y la penicilina (100 U/ml). La penicilina no tiene efectos tóxicos directos en los embriones de preimplantación, sin embargo, se ha observado que los aminoglucósidos muestran algunos efectos tóxicos (Lemeire y cols., 2007).

**pH y tampones:** el pH es una función celular importante necesaria para regular la homeostasis intracelular de un embrión. El pH de los medios de cultivo está regulado por la concentración de CO<sub>2</sub> y la concentración de bicarbonato presentes en los medios. Pero además, los iones intracelulares, las interacciones entre los aminoácidos y otros iones dipolares y las proteínas también regulan el pH de los medios (Swain, 2012). La mayoría de las investigaciones llevadas a cabo sobre este parámetro han propuesto un rango de pH de 7,2 y 7,4 aceptable para los medios de cultivo de embriones (Swain, 2012), Para garantizar que el medio de cultivo mantenga un pH constante, los dos tampones comúnmente utilizados en los medios de cultivo de FIV disponibles comercialmente son el tampón HEPES y el tampón MOPS. (Saugandhika y cols., 2022).

**Osmolaridad media:** Los embriones *in vivo* se exponen a una osmolaridad fisiológica de >360 mOsmol (en líquido oviductal) (Borland y cols., 1980). Para lograr esta osmolaridad se agrega a los medios aa extracelulares, como glicina, alanina, betaína, prolina e hipotaurina que actúan como osmolitos orgánicos, lo que no solo protege al embrión preimplantacional contra la hipertonicidad sino que también promueve el desarrollo embrionario (Baltz, 2013, Saugandhika y cols., 2022).

Por otro lado, hoy en día hay muchos medios de cultivo comerciales para cultivar y seleccionar embriones de buena calidad y cada uno tiene una composición diferente, pero todos se basan en dos conceptos de diseño: cultivo secuencial o "de regreso a la naturaleza" y el método de un solo paso o "dejar al embrión la elección" (Sepúlveda y cols., 2008; Yao y Asayama, 2016). El método de cultivo secuencial imita el tracto reproductivo femenino y utiliza dos medios en secuencia (Sepúlveda y cols., 2008) y por lo tanto las formulaciones de este sistema se basan

en el concepto de diferentes necesidades de nutrientes y energía de los embriones en la etapa de escisión y en la etapa de blastocisto (Huang y cols., 2014). Uno de los dos medios es donde los embriones en etapa de escisión se cultivan con una composición de medio para los primeros días (1 a 3 días) y luego se colocan un medio con una segunda composición durante el siguiente periodo de tiempo (de 2–3 días) para apoyar la compactación de la mórula y el desarrollo del blastocisto. Por otro lado, el medio de monocultivo no imita el ambiente *in vivo*, más bien constituye un medio que tiene una concentración adecuada de cada componente que permanece igual durante todo el período de cultivo (Saugandhika y cols., 2022) y que el embrión irá utilizando en función de sus necesidades y etapa del desarrollo. Los medios de monocultivo se desarrollaron para apoyar el desarrollo de cigotos hasta la etapa de blastocisto sin necesidad de cambiar los medios de cultivo. Estos medios tradicionales se formularon para imitar el líquido tubárico humano (HTF) (Huang y cols., 2014).

No está claro qué tipo de medio de cultivo, si secuencial o único, está asociado con la mejor calidad de embriones en el día 2, el día 3 o el día 5, o lo que es más importante, con la mayor tasa de implantación por embrión transferido. En los estudios hechos hasta el momento no se han encontrado diferencias en la calidad del embrión en el día 3 y el día 5 entre un solo medio y un medio secuencial (Biggers y Racowsky, 2002; Yao y Asayama, 2016) y si se ha observado una calidad óptima del embrión después del cultivo en un medio secuencial (Xella y cols., 2010) o único (Paternot y cols., 2010).

Se ha demostrado que las tasas de fecundación y formación de blastocistos son similares en ambos medios de cultivo (Hardarson y cols., 2015), pero otros investigadores han sugerido que los medios de un solo paso han aumentado la tasa formación de blastocistos y la alta calidad de estos en comparación con los medios secuenciales, mientras que no hay diferencia en las tasas de embarazo clínico, aborto espontáneo temprano e implantación sostenida (Tao y cols., 2022). Esto es debido a que los embriones son cultivados en las condiciones de cultivo subóptimas lo que obliga al embrión a sufrir adaptaciones y, por lo tanto, conducen a menores tasas de embarazo y mayores tasas de aborto. Actualmente, existe una discusión entre los diferentes científicos por saber cuál es el mejor medio, ya que, los medios de cultivo que se utilizan actualmente en TRA no son óptimos para el crecimiento del embrión humano previo a la implantación. Sin embargo, los estudios que utilizan el desarrollo *in vitro* de embriones de preimplantación de mamíferos han jugado un papel importante en la comprensión de la

fisiología preembrionaria (Biggers, 2008; Gruber y Klein, 2011). Aunque también suponen una limitación en el desarrollo de medios de cultivo para el embrión humano.

Sin embargo, el cultivo de embriones en etapa de preimplantación siempre ha sido un elemento clave de la embriología de laboratorio y ha contribuido sustancialmente al éxito de muchos procedimientos de reproducción asistida. Durante la última década, su importancia ha aumentado a medida que el cultivo embrionario *in vitro* se ha extendido y la transferencia de un solo blastocisto se ha convertido en parte indispensable del enfoque para disminuir la probabilidad de embarazo múltiple y preservar la eficacia general del tratamiento. Sin embargo, a pesar del desafío científico y comercial que estimula la investigación en todo el mundo para optimizar las condiciones de cultivo de embriones, falta un consenso incluso en los principios básicos, incluida la composición y el intercambio de medios, el entorno físico y biológico requerido e incluso la temperatura de incubación.

### **3.2. Nivel de oxígeno y estrés oxidativo**

Si bien la composición del medio utilizado para cultivar embriones de preimplantación *in vitro* es ciertamente importante para preservar la viabilidad, el laboratorio también juega un importante papel, ya que en él se controlan directamente otras variables dentro del sistema de cultivo. Estas variables ambientales controladas en el laboratorio pueden impactar dramáticamente en la eficacia de los medios y en el desarrollo del embrión preimplantacional cuando se cultivan *in vitro*.

Uno de los factores clave es el nivel de O<sub>2</sub> empleado para cultivo de embriones. En los mamíferos, la tensión de O<sub>2</sub> dentro de los ambientes intratubárico e intrauterino es baja (entre 2 y 8 %) (Fischer y Bavister, 1993, Herbemont y cols., 2021), mientras que la concentración de O<sub>2</sub> en el oviducto está alrededor del 7 % o menos, y parece que el entorno uterino tiene una concentración de O<sub>2</sub> aún más baja que la del oviducto (Fischer y Bavister, 1993, Harvey, 2007). Por lo tanto, se supone que el desarrollo de los embriones *in vitro* debe ser óptimo en condiciones similares.

En investigaciones anteriores, se ha demostrado que el cultivo en una concentración de O<sub>2</sub> reducida, del 5 al 7 %, mejora el desarrollo embrionario previo a la implantación en una multitud de especies de mamíferos, incluidas las ovejas, la vaca (Thompson y cols., 1990), la cabra (Batt y cols., 1991), el cerdo (Berthelot y Terqui, 1996) y los ratones exogámicos (Wale y

Gardner, 2016), produciendo divisiones de escisión más rápidas (Kirkegaard y cols., 2013), mayor formación de blastocistos y número de células (Dumoulin y cols., 1999), menos células apoptóticas (Yuan y cols., 2003), aneuploidía menos frecuente (Bean y cols., 2002) y menos daño en el ADN (Kitagawa y cols., 2004 ).

Aún se desconoce el mecanismo exacto del beneficio del bajo uso de O<sub>2</sub> para el cultivo de embriones, las posibilidades incluyen una generación reducida de ERO, una calidad del aire mejorada/ compuestos orgánicos volátiles (COV) reducidos debido al gas nitrógeno (N<sub>2</sub>) filtrado, y quizás otros mecanismos potenciales que pueden afectar la expresión génica (Swain y cols., 2016) así como cambios en el proteoma, secretoma y metabolismo (Katz-Jaffe y cols., 2005; Wale y Gardner, 2012) u otros procesos celulares. Por todas estas razones, el cultivo de embriones *in vitro* se lleva a cabo, cuando es posible, con un 5 % de O<sub>2</sub> para parecerse más a las condiciones fisiológicas (Wale y Gardner, 2016), además, Nanassy y cols. en su estudio en 2010 concluyeron que el cultivo prolongado del embrión previo a la implantación aumenta el estrés en el embrión y, como tal, se debe emplear O<sub>2</sub> reducido (5 %) para el cultivo del embrión posterior a la compactación, pero no antes. También es importante tener en cuenta que los datos transcriptómicos, proteómicos y metabólicos indican que los embriones que se desarrollaron con un 5 % de O<sub>2</sub> son similares a los desarrollados *in vivo* (Wale y Gardner, 2016).

Sin embargo cuando los embriones son cultivados con un 20 % de O<sub>2</sub> se ha observado que es perjudicial para el desarrollo del embrión, alterando la expresión génica (Rinaudo y cols., 2006), el proteoma (Katz-Jaffe y cols., 2005) y el metaboloma (Wale y Gardner, 2012) y actúa en sinergia con otros factores para comprometer aún más la función embrionaria (Wale y Gardner, 2013). Pero también ha observado que los embriones pueden formar blastocistos cuando se cultivan en O<sub>2</sub> atmosférico, estos datos resaltan la importancia de medir la competencia de desarrollo y la viabilidad de los embriones resultantes para evaluar más a fondo la respuesta patológica completa del embrión a las condiciones de cultivo (Balaban y cols., 2014). Sin embargo, aún no se sabe cuál deber ser la concentración óptima de O<sub>2</sub> para el desarrollo del embrión y, además, tampoco sabemos si existen diferencias específicas de las diferentes etapas de desarrollo.

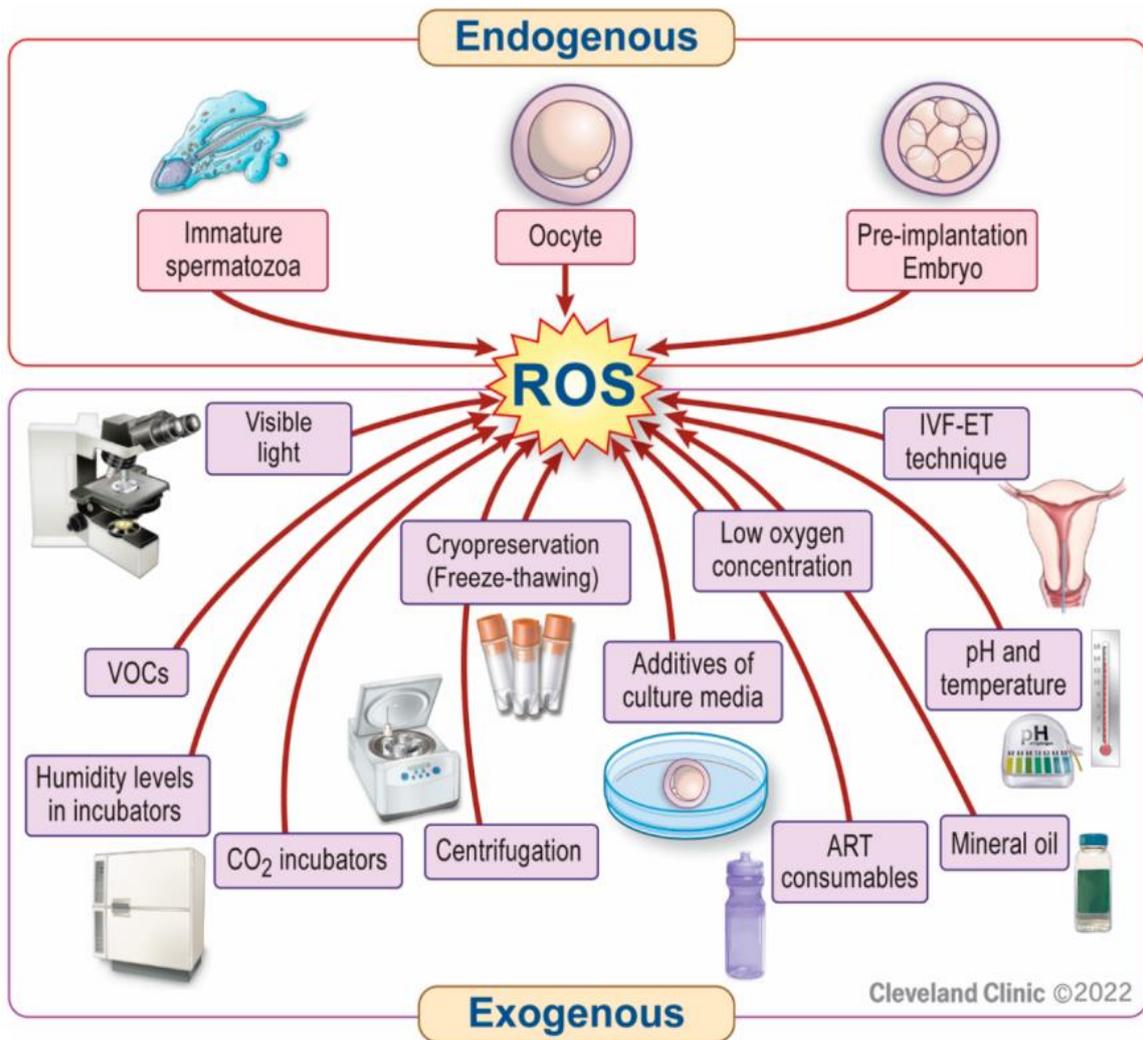
Las concentraciones de O<sub>2</sub> en el útero dependen del ciclo y su disminución es particularmente evidente en el momento de la implantación (Fischer y Bavister, 1993). Por lo tanto, los

embriones parecen encontrar un gradiente de concentración de O<sub>2</sub> decreciente a medida que avanzan desde el oviducto hasta el útero. Además, durante el tiempo de la implantación temprana, las condiciones hipóxicas e incluso anóxicas forman al trofoectodermo invasor (Wale y Gardner, 2016). Este gradiente de O<sub>2</sub> puede tener una función reguladora importante en la programación del desarrollo embrionario normal *in vivo*. A pesar de todas estas observaciones, los embriones de la mayoría de las especies se cultivan en concentraciones de O<sub>2</sub> cercanas a la atmosférica (20 %) o bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (5 %), ninguna de las cuales representa los cambios dinámicos en la concentración de O<sub>2</sub> que es probable que experimenten los embriones que se desarrollan *in vivo*.

La Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) publicó en 2015 las guías en la que recomienda una tensión baja de O<sub>2</sub> para el cultivo de embriones. Sin embargo, los sistemas de cultivo trigas requieren un consumo importante de N<sub>2</sub> (alrededor de 7 l/hora en incubadoras de sobremesa) y una logística más complicada (por ejemplo: monitorización de los niveles de N<sub>2</sub>), lo que lo hace más caro que las condiciones de incubación estándar. Aun así, podemos decir que la hipoxia durante el cultivo de embriones mejora la calidad del embrión y la capacidad de desarrollo (Herbement y cols., 2021).

Todos estos datos condujeron a equipar los laboratorios de FIV con incubadoras de CO<sub>2</sub> que proporcionaban una atmósfera de O<sub>2</sub> reducido. Sin embargo, la tasa de embarazo relativamente alta lograda después de la transferencia de embriones que se desarrollaron con éxito en las concentraciones atmosféricas de O<sub>2</sub> (20 %), hizo que algunos abandonaran los equipos de bajo O<sub>2</sub> y también evitó el costo adicional del suministro de N<sub>2</sub>. Posteriormente, las incubadoras con 5–6 % de CO<sub>2</sub> en la atmósfera del aire se han convertido en estándar en los laboratorios de FIV en los últimos 30 años. El nacimiento de casi cinco millones de niños concebidos en condiciones de cultivo con alto contenido de O<sub>2</sub> demuestra con creces que los embriones humanos pueden adaptarse bien a la concentración de O<sub>2</sub> atmosférico. Por lo tanto, a pesar de la evidencia de que el O<sub>2</sub> atmosférico es perjudicial para el desarrollo embrionario y que una concentración del 2 al 8 % es más fisiológica (Fischer y Bavister, 1993), no existe un consenso mundial sobre el uso de O<sub>2</sub> reducido para el cultivo de embriones (Gardner, 2016), y sigue siendo una práctica común en las clínicas donde se hace FIV usar O<sub>2</sub> atmosférico (alrededor del 20 %) en incubadoras, y es además, utilizado por grupos de investigación de alto perfil (Kleijkers y cols., 2016).

Otro factor que influyen en el desarrollo embrionario preimplantacional de gran relevancia, es la producción ERO. El EO se ha establecido como un factor importante que puede afectar negativamente los resultados de las TRA (Agarwal y Allamaneni, 2004). El EO se define como un desequilibrio entre las ERO y la cantidad total de antioxidantes a favor de los oxidantes (Sies, 1985). A bajas concentraciones, las ERO actúan fisiológicamente como moléculas de señalización en varios procesos (Sies, 2017). En la reproducción masculina, estos mecanismos redox juegan un papel importante en la regulación de numerosas funciones, incluyendo la espermatogénesis (Silva y cols., 2020). En la reproducción femenina, se ha observado que la homeostasis redox es fundamental para la foliculogénesis, la implantación y la placentación (Silva y cols., 2020). Por otro lado, los niveles anormalmente altos de ERO pueden dañar los lípidos celulares, los orgánulos y el ADN, alterar la función enzimática y desencadenar la apoptosis (Sies, 2017). En el entorno de las TRA, varios factores pueden ser responsables de una mayor generación de ERO, lo que conduce a resultados de TRA subóptimos (Agarwal y cols., 2006) (**Figura 3**).



**Figura 3. Factores responsables del aumento de la generación de ERO en un entorno de TRA.**  
Tomada de Agarwal y cols., 2022

Las ERO pueden generarse de formas endógenas y/o exógenas como producto secundario de cualquier metabolismo aeróbico. En los medios de cultivo las ERO pueden originarse a partir del metabolismo del embrión y/o su entorno. La generación de EO no solo puede alterar muchos tipos de moléculas celulares, sino que también pueden bloquear o retrasar el desarrollo embrionario temprano (Guerin y cols., 2001; Lan y cols., 2019).

Las ERO endógenas se producen principalmente durante la reducción de O<sub>2</sub> en las mitocondrias, mientras que la fuente exógena de ERO nos la encontramos en condiciones fisiológicas son el líquido folicular o el medio tubárico y uterino.

En el laboratorio las ERO pueden ser inducidas por varios factores, incluida la exposición a la luz visible, la composición de los medios de cultivo, la temperatura y el pH, la concentración de

O<sub>2</sub>, la centrifugación durante la preparación de los espermatozoides, las TRA que involucran el manejo de gametos/embriones y los métodos de criopreservación (Agarwal y cols., 2006). Estos factores aumentan el EO y dan como resultado resultados TRA subóptimos. Aunque las concentraciones fisiológicas de ERO son necesarias para la función reproductiva normal *in vivo*, la manipulación *in vitro* de gametos y embriones puede exponer estas células a un exceso de ERO, generado por factores ambientales endógenos o exógenos.

En el laboratorio los ovocitos y los embriones se cultivan en un medio que, en sí mismo, puede ser la fuente de ERO. Las ERO generalmente ocurren durante la recolección, manipulación y cultivo de embriones, ya que estos procesos realizados en un laboratorio no pueden recrear por completo las condiciones en las que tiene lugar la fecundación natural (Truong y Gardner, 2017). Se ha observado que las concentraciones de ERO en los medios de cultivo usados se correlacionan con un grado avanzado de fragmentación embrionaria o formación de blastocistos (Martin-Romero y cols., 2008; Lee y cols., 2012). En la actualidad, el uso de medios comerciales en los sistemas de cultivo ha mejorado la consistencia del cultivo de embriones. Estos medios de cultivo se complementan con frecuencia con antioxidantes, lo que mantiene un equilibrio pro-oxidante-antioxidante en los embriones (Agarwal y cols., 2006). Pero además, se ha encontrado que los embriones en medios de cultivo comerciales generan ERO a diferentes velocidades, dependiendo de la composición de los medios (Martin-Romero y cols., 2008; Shih y cols., 2014). Pero sin embargo, a día de hoy el papel exacto de ERO en el desarrollo embrionario temprano se ha determinado por completo. Las ERO se pueden producir intracelularmente a partir de espermatozoides inmaduros, ovocitos y embriones. Además, varios factores externos pueden inducir ERO en las TRA, incluido el O<sub>2</sub> atmosférico (20 %) (Agarwal y cols., 2022). Varios estudios informan que el efecto perjudicial del EO en embriones cultivados en concentraciones atmosféricas de O<sub>2</sub> se correlaciona con una mayor producción de ERO (Takahashi y cols., 2012). Por lo tanto, la calidad del embrión se ve afectada durante el cultivo *in vitro*, lo que lleva a un aumento de la apoptosis, cambios en la expresión génica y un desarrollo deficiente, lo que provoca que menos embriones lleguen a la etapa de blastocisto (Ullah y cols., 2019). Por otro lado, un entorno con alto contenido de O<sub>2</sub> aumenta las ERO (Kitagawa y col., 2004), lo que desregula importantes vías de señalización y factores de transcripción, que pueden alterar el metabolismo y otras funciones celulares (Zhang y cols., 2016). El exceso de ERO también puede dañar el ADN y oxidar lípidos y proteínas, lo que estimula los mecanismos de reparación, ralentiza la división celular y, en

última instancia, cambia los requisitos metabólicos (Guerin y cols., 2001; Wale y Gardner, 2012).

Debemos mencionar también, que una tensión realmente baja de O<sub>2</sub> (<2 %) es perjudicial para el desarrollo embrionario debido a la inhibición de los pasos esenciales del desarrollo (Ufer y cols., 2021) y la liberación del exceso de ERO mitocondrial (Guzy y Schumacker, 2006). El aire del laboratorio, los gases utilizados, los consumibles de TRA y la calidad de los medios de cultivo también pueden contribuir al aumento de ERO en un entorno de TRA (Guérin y cols., 2001)

En condiciones fisiológicas, ERO y los antioxidantes mantienen una proporción estable. El embrión tiene varios mecanismos para defenderse contra ERO (Guyader-Joly y cols., 1998). En el entorno natural, existe un sistema antioxidante que protege a los embriones del daño oxidativo (Agarwal y cols., 2012), que está regulado por varias enzimas antioxidantes, que incluyen superóxido dismutasa (SOD), peroxirredoxina (PRDX) y glutatión (GSH) (Rizzo y cols., 2012). No obstante, este sistema antioxidante endógeno no está disponible o no está suficientemente cubierto *in vitro* (Abdelrazik y cols., 2009).

La acumulación de ERO intracelular/extracelular durante la maduración del ovocito y el desarrollo del embrión puede ser perjudicial para la fecundación y la tasa de éxito de la implantación. Sin embargo, según la mayoría de los estudios realizados en los últimos años, está claro que el efecto de las ERO sobre el desarrollo embrionario normal varía según la etapa y las condiciones de desarrollo. De hecho, ya sea *in vivo* o *in vitro*, las variaciones en la sensibilidad embrionaria al EO hacen que un nivel preciso de ERO tenga un efecto positivo en una etapa específica y un efecto negativo en otra etapa del desarrollo. Estas observaciones solo pueden resaltar la complejidad del papel regulador de ERO en el proceso de desarrollo embrionario. Por lo tanto, es necesario analizar cada fase del desarrollo, para una mejor comprensión de las fases que dependen de las ERO reguladoras y, posteriormente, una mejor optimización de las condiciones de desarrollo embrionario *in vitro* (Jamil y cols., 2020).

En general, las ERO se forman como subproductos del metabolismo del O<sub>2</sub> durante el transporte electrónico mitocondrial y juegan un papel importante en la señalización celular, la homeostasis, los procesos fisiológicos, la proliferación celular, la adaptación a la hipoxia y en la

determinación del destino celular. Por lo tanto, la concentración de ERO es importante en el desarrollo embrionario.

### **3.3. Papel de los antioxidantes: Quercetina**

Los antioxidantes son moléculas naturales o sintetizadas que juegan un papel importante en la reducción de los procesos oxidativos en el organismo (Bazinet y Doyen, 2017), inhibiendo o retardando la oxidación de otras moléculas (Rozoy y cols., 2012). Los antioxidantes naturales están presentes en frutas, verduras y pescados, mientras que los antioxidantes sintéticos se elaboran a partir de compuestos naturales o son compuestos completamente sintéticos (Augustyniak y cols., 2010). Los antioxidantes actúan como captadores de radicales libres y protegen las células o reparan el daño causado por los estos radicales (Tebboub y Kechrid, 2019). Los radicales libres se pueden producir a partir de dos fuentes de oxidantes: oxidantes endógenos y oxidantes exógenos. La producción de oxidantes endógenos ocurre cuando las células usan  $O_2$  y generan naturalmente radicales libres que podrían dañar las células. Los oxidantes exógenos se conocen comúnmente como radicales libres que se producen a partir de factores ambientales como la luz solar y la contaminación (Haida y Hakiman, 2019). Los antioxidantes disminuyen el efecto de los oxidantes al unirse con estas moléculas dañinas. Sin embargo, los antioxidantes son efectivos a bajas concentraciones y pueden actuar como oxidantes y volverse adversos al aumentar la concentración (Iwayama y cols., 2017).

Los antioxidantes se dividen en enzimáticos y no enzimáticos en función de su actividad catalítica (Haida y Hakiman, 2019). Los antioxidantes enzimáticos se producen en las células y protegen el cuerpo contra los radicales libres a través de algunas enzimas que forman un grupo distintivo, con desintoxicación. La glutatión peroxidasa (GPx), la SOD y la catalasa (CAT) son enzimas antioxidantes clave de este sistema de defensa por el cual los radicales libres que se generan durante las reacciones metabólicas se eliminan (Jeeva y cols., 2015). Los antioxidantes no enzimáticos incluyen principalmente polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas), carotenoides (carotenos, xantofilas) y vitaminas (vitaminas A y C) (Xu y cols., 2017). Este tipo de antioxidantes se encuentran de forma natural en frutas, verduras y alimentos como el tomate, la naranja, la zanahoria y el pescado (Zarbaksh, 2021).

Dado el impacto negativo documentado que tiene el  $O_2$  en la fisiología celular y de otros factores exógenos vistos anteriormente, parecería prudente considerar la inclusión de antioxidantes para contrarrestar el aumento de ERO en los medios de cultivo de FIV para

garantizar niveles de protección durante los primeros días de vida y mejorar así la producción de embriones (Wale y Gardner, 2016). Por lo tanto, el medio de cultivo a menudo contiene una amplia variedad de antioxidantes para reducir las ERO generadas durante el cultivo de embriones *in vitro* (Martín-Romero y cols., 2008; Mishra y cols., 2016). Algunos estudios, han evidenciado que agregar la dosis correcta de antioxidantes al medio de cultivo puede proteger a los embriones del EO (Yu y cols., 2014; Truong y Gardner, 2017), pero no todos los resultados han confirmado este hallazgo, ya que se ha observado que la adición de coenzima Q 10 o la lipoproteína de alta densidad (HDL) a diferentes dosis no tuvo efecto en la mejora del desarrollo embrionario porcino y bovino *in vitro* respectivamente (Maside y cols., 2019; Rincón y cols., 2019). Estos estudios mostraron que el uso de antioxidantes para el desarrollo de embriones *in vitro* es prometedor, pero se necesita más investigación.

A su vez, se ha demostrado que varios antioxidantes entre ellos ácido ascórbico o vitamina C, glutatión, carnitina, cisteamina, glutatión, naringenina, licopeno, N-Acetil-L-cisteamina (NAC), resveratrol, quercetina (Quer) y melatonina, tienen efectos protectores y/o estimuladores durante el cultivo o la crioconservación de embriones, produciendo una mejora en la calidad de los embriones, con un aumento del número de células, mejora de la función mitocondrial y de los sistemas antioxidantes endógenos, eliminación de los niveles de ERO, mejora de la zona pelúcida, de la masa celular interna, reducción en la degeneración de los blastocistos, un aumento en las tasas de desarrollo de los blastocistos, un aumento en la eclosión de los blastocistos y una reducción en la apoptosis del embrión, y otra influencia pro-oxidante degenerativa, que conllevan a una mejor tasa de embarazo (Zarbakhsh, 2021). Aunque la función de los antioxidantes en las TRA humanas deben esperar ser aclaradas más extensamente.

Por otro lado, se han investigado una amplia gama de funciones fisiológicas de los flavonoides desde que se determinó por primera vez su bioactividad hace unos 80 años (Kawabata y cols., 2015). En concreto los flavonoides son compuestos fitofenólicos con un fuerte efecto antioxidante que funcionan como captadores de radicales libres. Dentro de la familia de los flavonoides, la Quer es el eliminador más potente de ERO (Boots y cols., 2008) y especies de nitrógeno (Heijnen y cols., 2002). Estas propiedades antioxidantes podrían atribuirse a su capacidad para quelar metales (Aherne y cols., 2000), captación de radicales (Aherne y cols., 2000), inhibición enzimática (Nagao y cols., 1999) y/o inducción de mecanismos de reparación (Myhrstad y cols., 2002). En muchos tipos de células, la Quer muestra efectos protectores

integrales contra el EO causado por la oxidación de lípidos, fragmentos de lipoproteínas y otros factores (Sakanashi y cols., 2008).

La Quer (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona) es una forma de aglicona derivada de plantas de glucósidos flavonoides que tiene una gran cantidad de flavonoides (Rafiq y cols., 2015) y se ha utilizado ampliamente desde 1857 como antioxidante (Fischer y cols., 1997). La Quer es un cristal amarillo e insoluble en agua fría, moderadamente soluble en agua caliente, pero soluble en alcohol. Este componente se encuentra en una variedad de alimentos, incluyendo bayas, manzanas, vegetales, uvas, cebollas, té, tomates, chalotes, nueces, cortezas, semillas, hojas y flores (Li y cols., 2016). Esta Quer se ha utilizado tradicionalmente como antioxidante natural para prevenir o tratar una variedad de enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, los trastornos nerviosos y neurodegenerativos, la obesidad, la inflamación crónica, la gastritis, las alergias, el asma y diferentes tipos de enfermedades bacterianas y virales (David y cols., 2016). Varios estudios demostraron que la Quer actúa como agente antiinflamatorio, antiapoptótico, antioxidante y anticancerígeno (Amidi y cols., 2019). Además, ejerce varios efectos biológicos, incluida la inhibición de la proteína quinasa C, la modulación del ciclo celular, la inhibición de la angiogénesis, la agregación plaquetaria, la promoción de la permeabilidad capilar y la estimulación de la biogénesis mitocondrial (Li y cols., 2016; Hashemzaei y cols., 2017).

El efecto de este compuesto ha sido ampliamente estudiado por investigadores durante los últimos 35 años en células embrionarias de hámster (Machiko y cols., 1977), células de hámster chino V79 (Nakayama y cols., 1998), espermatozoides humanos (Khanduja y cols., 2001), hepatocitos humanos HepG2 (Dong y cols., 2006) y ovocitos porcinos (Kang y cols., 2016).

Estudios previos han evaluado la aplicación terapéutica de la Quer *in vitro* e *in vivo*, como medicina alternativa para el tratamiento de la infertilidad masculina (Khanduja y cols., 2001; Taepongsorat y cols., 2008). Sorprendentemente, la Quer juega un papel importante en el sistema reproductivo femenino, particularmente en los ovarios como agente anticancerígeno y antioxidante. Esta Quer puede usarse para la regulación de las funciones del sistema reproductivo, incluida la foliculogénesis, la maduración del ovocito y la ovulación, por lo que puede ser beneficioso para el tratamiento de trastornos reproductivos (Stochmalová y cols., 2013).

En un estudio realizado por Machha y cols., en 2007, se observó que la Quer usada en ratas diabéticas durante 6 semanas aumentaba la actividad de la SOD y la capacidad antioxidante total (Machha y cols., 2007). Además también se ha observado que puede permitir la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD, catalasa, glutatión s-transferasa (GST), nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato (NADPH), quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), GPx y tioredoxina (Wang y cols., 2013) a través de la activación de la vía de señalización Nrf2-ARE (ARE: elementos de respuesta antioxidante) (Dong y cols., 2017).

Kang y cols. demostraron en 2013 que la suplementación del medio de maduración *in vitro* (MIV) con diferentes concentraciones de Quer no mejoraba la maduración y el desarrollo de blastocistos de ovocitos porcinos, pero una baja concentración de Quer resultó en niveles más bajos de producción de ERO y tasas más altas de desarrollo de ovocitos en blastocistos tras su fecundación. Además, también demostraron que en altas concentraciones tuvo efectos perjudiciales sobre la maduración nuclear del desarrollo de ovocitos y blastocistos (Kang y cols., 2013; Kang y cols., 2016). Los hallazgos de otros estudios también mostraron que la Quer tenía efectos similares en la MIV de ovocitos bovinos (Sovernigo y cols., 2017). Aunque un estudio indicó que diferentes dosis de Quer pueden mejorar la expansión de las células del cúmulo y el desarrollo de los embriones, por lo que no está claro qué dosis de Quer es óptima para la MIV de ovocitos porcinos (Orlovski y cols., 2014). Además, Karimian y cols. en 2018 informaron que la Quer tuvo efectos positivos en la tasa de producción de blastocistos de MIV de ovocitos en ovejas. Otro estudio reciente (Naseer y cols., 2017), indicó que la suplementación con Quer mejoró la calidad del ovocito y el desarrollo de los folículos. También, redujo la apoptosis de las células de la granulosa (GC) durante el estrés por calor. Por otro lado, Wang y cols, en 2017 observaron que el tratamiento con Quer disminuyó las alteraciones morfológicas inducidas por el envejecimiento y también redujo los defectos en la organización del huso mitótico y la distribución mitocondrial. Un estudio realizado por Chen y cols., en 2010 mostró que aunque la Quer no tuvo un efecto significativo en la reserva folicular ovárica, se observó la mayor cantidad de folículos sanos en ratas tratadas con Quer. El tratamiento de ovocitos porcinos con el flavonoide Quer tuvo un efecto positivo significativo en el desarrollo embrionario y redujo la generación de ERO al aumentar los niveles de GSH intracelular a bajas concentraciones, pero fue perjudicial a altas concentraciones. No está claro si esta concentración de Quer es óptima en cerdos. Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar la concentración óptima que se debe añadir al medio de cultivo para producir efectos beneficiosos sobre el desarrollo embrionario (Kang y cols., 2016).

Por otro lado, varios estudios demostraron que los espermatozoides tratados con Quer mejoran las características del esperma, incluidas la motilidad, las tasas de supervivencia, la integridad de la membrana y la actividad de las mitocondrias durante el almacenamiento *in vitro* y posterior desarrollo embrionario (Mao y cols., 2018) y lo protegen frente al EO (Abdallah y cols., 2010) Además, las bajas concentraciones de Quer parecen tener un efecto beneficioso sobre el desarrollo del embrión de FIV porcino (Kim y cols., 2014).

En relación con el efecto de la Quer en el cultivo de embriones *in vitro*, existen estudios que demuestran que la suplementación de este flavonoide como antioxidante exógeno en un sistema de cultivo de embriones *in vitro* bajo condiciones de EO, mejora la viabilidad del embrión de preimplantación bovina, protege a los embriones contra el EO y mejora la viabilidad del embrión mediante la modulación de la vía de señalización Nrf2 (Khadrawy y cols., 2020). Yu y cols., en un estudio realizado en 2014 informaron que la Quer tiene un efecto protector en los embriones de ratón contra el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En otro estudio llevado a cabo en 2010, Pérez-Pasten y cols., informaron que el uso de más de 100 µM de Quer causa algunos defectos y anomalías, y la concentración de 3 µM de Quer tiene un efecto protector en embriones de ratón contra la hidroximetilglutimidilglutaminato. Además, Shahzad y cols., en 2017, informaron que la administración de 50 mg/kg/día de Quer a ratas preñadas disminuyó la tasa de implantación. Parece que altas dosis de antioxidantes pueden actuar como inhibidores enzimáticos y mutágenos debido a la inhibición de las topoisomerasas, la síntesis de proteosomas o la síntesis de ácidos grasos (Crespo y cols., 2008). Sameni y cols., en 2018, demostraron que embriones de 2 células extraídos de útero y cultivados con 5µM de Quer puede proteger a los embriones contra la actinomicina D, por lo que aumenta el número de células viables y disminuye el número de células apoptóticas, lo que puede ayudar a la expansión de los blastocistos, adelgazando el grosor de la zona pelúcida y aumentando la tasa de eclosión en embriones de ratón. Por otro lado, Sovernigo y cols., en 2017, mostraron que una concentración de 2µM de Quer redujo significativamente los niveles de ERO en el cultivo *in vitro* de embriones bovinos. Por último, se ha informado de su actividad antioxidante, antimutagénica y antiinflamatoria, lo que reduce las anomalías en los embriones de rata, disminuye los defectos del tubo neural en los embriones de ratones diabéticos y reduce el daño de las células ciliadas en los embriones de pez cebra (Kang y cols., 2016).

Por lo tanto, podemos decir que se debería de establecer la dosis adecuada de Quer a utilizar, ya que es uno de los aspectos más importantes de su eficacia, debido a que este flavonoide a

dosis adecuadas tiene efectos favorables *in vitro* sobre el desarrollo de diferentes especies de embriones. Por el contrario, existen varios informes que indican un posible efecto tóxico de la Quer en embriones de ratón obtenidos *in vitro* por mecanismos desconocidos, por lo que aún existe controversia sobre su posible utilización en FIV (Pérez-Pastén y cols., 2010; Hashemzaei y cols., 2017).

En resumen, la Quer tiene un efecto dosis-dependiente, el cual se ve influenciado por el tipo de gametos y embriones de diferentes especies de animales en donde se administra. Además, existe controversia a la hora de usar una dosis específica de Quer. Por lo tanto, la utilización de este flavonoide en medios de cultivo de embriones *in vitro* requiere nuevas investigaciones ya que se sabe que tiene numerosos efectos biológicos, pero su función en procesos y mecanismos reproductivos siguen sin estar claros. Además, la optimización de los medios de cultivo de embriones es fundamental para obtener embriones de alta calidad, y por lo tanto, la Quer podría ser una molécula candidata para suplementar los medios de cultivo al mejorar el estado oxidativo de los embriones tempranos.

### **3.4. Papel del metabolito 4-Hidroxiestradiol**

La implantación de un blastocisto en el útero materno es un paso crucial en la reproducción de los mamíferos. En el útero, eventos celulares y moleculares altamente coordinados, dirigidos por el E<sub>2</sub> ovárico y la P<sub>4</sub>, producen un ambiente receptivo para apoyar la implantación (Cha y cols., 2012; ), por su parte, el blastocisto, con su propio programa molecular para el crecimiento y diferenciación celular, funciona como una unidad activa en este proceso (Takeuchi y cols., 2017). Comprender los mecanismos y las señales moleculares que controlan esta interacción materno-embriónica sincronizada, es un objetivo común en los estudios de investigación sobre reproducción, ya que se podrían desarrollar estrategias con el objetivo final de mejorar no solo el desarrollo embrionario previo a la implantación, sino también las tasas de implantación, tanto en la producción animal como reproducción asistida en humanos.

En el momento de la implantación, el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> secretados por las células de la granulosa y el cuerpo lúteo respectivamente, elevan la actividad específica de la enzima 4-hidroxilasa (Paria y cols., 1990a), lo que resulta en un aumento de 4-hidroxiestradiol (4-OHE<sub>2</sub>), un metabolito de catecol producido a partir del E<sub>2</sub>. Se ha propuesto que el estradiol a través de su metabolito el 4-OHE<sub>2</sub>, es el responsable del cambio de estado del embrión de inactivo a activo (Paria y cols., 1998a). Por lo tanto, es el 4-OHE<sub>2</sub> secretado, el que actúa en el embrión como la señal principal

para dejarlo listo para la implantación, al desencadenar su cambio a un estado competente (Paria y cols., 1998a). El fundamento de este mecanismo propuesto es que el embrión debe reconocer las células endometriales que funcionan bien y, en consecuencia, la ventana de implantación, para comenzar el proceso de implantación.

Una posible vía de señalización molecular para hacerlo sería la capacidad del embrión para detectar y reaccionar con este catecolestrógeno, lo que significa que las células uterinas están metabolizando correctamente  $E_2$ , y produciendo así uno de sus principales metabolitos, el 4-OHE<sub>2</sub>, en el momento oportuno, es decir, cuando el blastocisto alcanza la cavidad uterina. Además, se ha demostrado que el 4-OHE<sub>2</sub>, al unirse a sus receptores en las células del trofoectodermo, afecta a la calidad final del blastocisto, aunque el mecanismo involucrado necesita ser aclarado (Takeuchi y cols., 2017).

Se han identificado muchos factores que aceleran el desarrollo del blastocisto, entre ellos LIF y EGF, además se ha descrito su impacto en las señales intracelulares que regulan la diferenciación del trofoblasto (Fritz y cols., 2014), para producir una correcta interacción del embrión con el útero y conseguir el establecimiento de un embarazo. Se sabe que la familia de EGF a través de sus receptores ErbB1 y ErbB4, son factores clave en la adquisición del potencial de implantación (Chobotova y cols., 2005) modulando el desarrollo del blastocisto para lograr la sincronización temporal de la competencia del blastocisto con la receptividad uterina en el momento de la implantación, el cual ocurre dentro de una ventana de tiempo limitada.

A su vez, la adquisición de competencia implantatoria, que es como se define la activación de los embriones en el momento de la implantación, conlleva, además de la sobreexpresión de factor de crecimiento similar al EGF que se une a la heparina (EGF-HB) y ErbB4, la adquisición por parte de éstos últimos de la capacidad para unir EGF. Estos receptores se unen a la proteína del EGF-HB, que aparece en la superficie del epitelio luminal uterino cuando comienza la reacción de unión, lo que sugiere que los blastocistos perimplantacionales son el objetivo del EGF-HB durante la implantación (Paria y cols., 1999 ). Estos eventos posicionan al EGF-HB y sus receptores para mediar en la adhesión del blastocisto y la diferenciación del trofoblasto (Fritz y cols., 2014 ). Ésta es una condición para que se produzca correctamente la sincronización útero-embrión. Poco se sabe de la forma de actuar del 4-OHE<sub>2</sub>, salvo que su efecto se lleva a cabo de forma independiente a los receptores estrogénicos Er $\alpha$  o Er $\beta$  (Markides y Liehr, 2005). Existen ciertas evidencias, de que el 4-OHE<sub>2</sub> actúa a nivel del cambio

de afinidad de los receptores de EGF, de este modo, los embriones durmientes obtenidos a partir de ratonas ovariectomizadas (embriones aislados de estradiol durante el proceso de implantación), no son sensibles al EGF. Sin embargo, la exposición de dichos embriones a un cultivo con 4-OHE<sub>2</sub> revierte dicha situación (Paria y cols., 1993b; Paria y cols., 1998). Una vez el blastocisto ha sido expuesto a la acción del 4-OHE<sub>2</sub>, el embrión gana sensibilidad hacia el EGF-HB expresado en la superficie del endometrio y con ello la capacidad para establecer un “diálogo” adecuado que sincronice el momento y lugar de la implantación.

Se sabe que alrededor de la ventana de implantación, tanto el endometrio como el blastocisto secretan EGF y, dado que su receptor está presente en las células trofoctodérmicas, el embrión puede unirse potencialmente a EGF a través de vías autocrinas del blastocisto y paracrinas del epitelio (Hamatani y cols., 2004). Sin embargo, los estudios sobre los beneficios potenciales de complementar los medios de cultivo con EGF durante las etapas iniciales del desarrollo del embrión aún arrojan resultados contradictorios, mientras algunos investigadores no encontraron ningún efecto de la adición de este EGF en el medio de cultivo (Sirisathien y cols., 2003), otros estudios demuestran cambios en la síntesis de proteínas, el número de células, la diferenciación y los procesos de eclosión (Richter, 2008; Ahumada y cols., 2013). Se ha demostrado *in vivo* que, independientemente de la activación inducida por catecolestrógenos, la activación de solo el 5-10 % del total de moléculas receptoras de EGF presentes en la superficie del embrión es suficiente para desencadenar todas las respuestas embrionarias tempranas requeridas para el inicio de la diafonía molecular embrión-endometrial necesaria para la implantación (Paria y Dey, 1990b). Finalmente, es bien sabido que los catecolestrógenos pueden inducir una multitud de factores de crecimiento, incluida la familia EGF en células cultivadas y embriones (Paria y cols., 1998a).

En particular, en el proceso de FIV, el desarrollo temprano de los embriones ocurre en ausencia de contacto celular directo con el tracto reproductivo y, por lo tanto, fuera del entorno endocrino del tracto reproductivo femenino, donde se produce una expresión temporal y espacial específica de numerosos factores de crecimiento y se producen hormonas para regular el desarrollo del embrión de mamífero antes de la implantación, desde un óvulo fertilizado hasta un blastocisto (Diaz-Cueto y Gerton, 2001). Por lo tanto, se ha sugerido que la ausencia y/o la dilución de tales hormonas y factores de crecimiento en los medios de cultivo (Paria y Dey, 1990b; Rizos y cols., 2002; Lonergan, 2007) podría explicarse, al menos parcialmente, por el deterioro del desarrollo de embriones de preimplantación *in vitro* (Collins

y cols., 1994). No obstante, algunos de estos embriones pueden llegar a la etapa de blastocisto *in vitro* y finalmente implantarse cuando se transfieren a un útero debidamente preparado, lo que indica un mecanismo más complejo en la regulación del proceso de implantación en el sistema de FIV.

Por otro lado, existen resultados que muestran que el 4-OHE<sub>2</sub> potencia el daño oxidativo del ADN en los espermatozoides (Salama y cols., 2008; Rempel y cols., 2009), al producir un aumento de la producción de ERO lo que puede reducir la fecundación y perjudicar el desarrollo embrionario, pero otros mecanismos de acción también pueden contribuir a estos efectos. En la actualidad, no existen estudios que demuestren que el cultivo de embriones con 4-OHE<sub>2</sub> produzca un aumento de ERO y por tanto una menor calidad embrionaria. A pesar de todos estos estudios, se dispone de información limitada sobre el efecto de la adición del 4-OHE<sub>2</sub> sobre la producción de ERO para mejorar el poder de implantación en el desarrollo de embriones.

Como ya se ha expuesto, la capacidad de implantación de blastocistos es un requisito previo para un embarazo exitoso; por lo tanto, la mala calidad de los embriones de FIV es una de las principales causas del fracaso de la implantación (Cha y cols., 2012), además también se desconoce si existe una posible relación con el EO, ya que este factor influye negativamente en el desarrollo de los embriones de preimplantación.

Aunque ha habido varias mejoras en las técnicas de FIV humana en las últimas 2 décadas, los nacimientos vivos de TRA siguen siendo bajos: en promedio, alrededor del 20 % por ciclo (Calhaz-Jorge y cols., 2016). La mala calidad de los embriones derivados de FIV es una de las principales causas del fracaso de la implantación (Cha y cols., 2012). Por lo tanto, la mejora de la eficiencia de implantación de los blastocistos cultivados debe ser un punto central para mejorar la eficacia de la FIV, y debe investigarse tanto el desarrollo *in vitro* de embriones hasta blastocistos como la capacidad de implantación de los blastocistos. Nuevos estudios deben determinar si los medios de cultivo suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> podrían ser ventajosos para los embriones obtenidos *in vitro* con el objetivo de trasladar su significado a la FIV.

#### 4. Estructura y función del factor inducibles por hipoxia

La existencia de un factor transcripcional inducible por hipoxia (HIF) se predijo por primera vez en 1991 a través de una investigación sobre los elementos reguladores que actúan sobre el gen de la eritropoyetina humana (Epo), cuya expresión se induce en condiciones hipóxicas (Semenza y Wang, 1992). Se sabe, que la baja concentración de O<sub>2</sub> desencadena una amplia gama de eventos celulares en el desarrollo embrionario centrados en la regulación de la familia de HIF (Mantikou y cols., 2013b; Ma y cols., 2017) que aseguran que la homeostasis del O<sub>2</sub> sea mantenida por procesos críticos dependientes del O<sub>2</sub> (Houghton, 2021).

HIF es un factor de transcripción heterodimérico que consta de dos subunidades, la subunidad Hif- $\alpha$  que es dependiente de O<sub>2</sub> y la subunidad Hif- $\beta$  también conocida como translocador nuclear del receptor de hidrocarburo de arilo (Arnt) (**Figura 4**); estos factores interactúan a través de dos dominios Per-Arnt-Sim (PAS), se unen al ADN a través de dominios de hélice-bucle-hélice básico N-terminal (bHLH) y activan la transcripción con dominios de transactivación transcripcional (TAD) C-terminal. En ausencia de estrés hipóxico, es decir, a concentraciones de O<sub>2</sub> superiores al 5 %, las proteínas del dominio prolil hidroxilasa (Phd1–3) hidroxilan dos residuos de prolina de Hif- $\alpha$ , lo que permite la unión de la proteína supresora de tumores de von Hippel-Lindau (Vhl). Vhl es el componente de reconocimiento de una ubiquitina-proteína ligasa E<sub>3</sub> que se dirige a Hif- $\alpha$  para la ubiquitilación y la degradación proteasómica (Schofield y Ratcliffe, 2005). Además, el factor inhibidor de HIF (Fih) hidroxila un residuo de asparagina en el TAD, bloqueando la unión del coactivador transcripcional CBP/p300 (Lisy y Peet, 2008). En condiciones de bajo nivel de O<sub>2</sub> (menos del 5 %), la tasa de hidroxilación de prolina y asparagina se reduce y, como resultado, Hif- $\alpha$  se acumula, se dimeriza con Arnt y se traslada al núcleo, donde se une al ADN y se asocia con coactivadores transcripcionales (Dunwoodie, 2009). El sistema HIF es un regulador clave de una amplia gama de respuestas celulares y sistémicas a la hipoxia y actúa en todas las células de los mamíferos. Los cambios en la expresión génica regulados directa o indirectamente por HIF se extienden a más de 100 genes (Weidemann y Johnson, 2008).

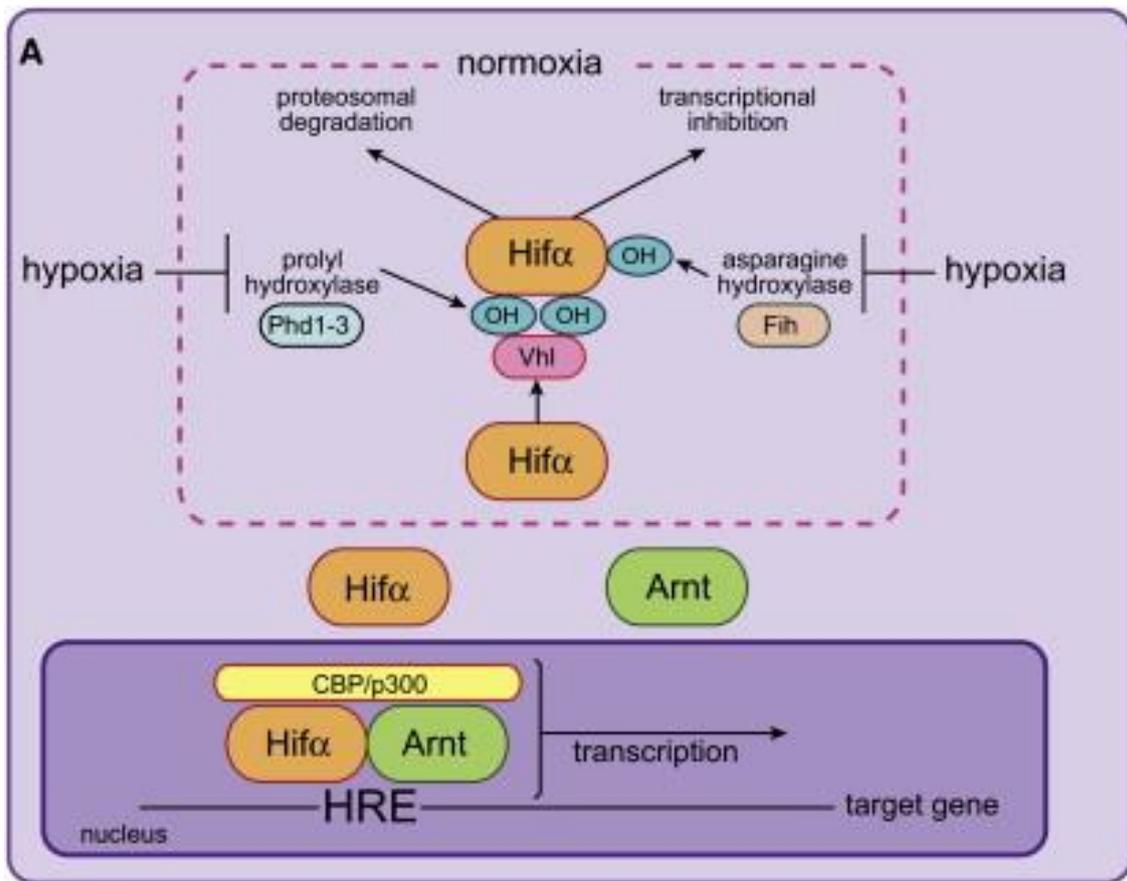
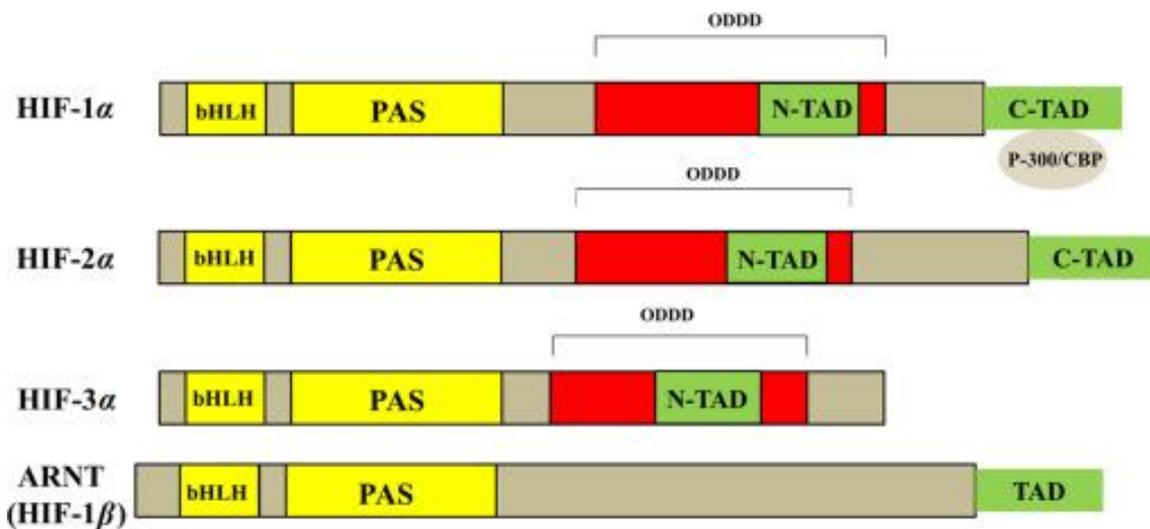


Figura 4. Regulación HIF en condiciones aeróbicas e hipóxicas. Tomada de Dunwoodie, 2009.

Debido a la complejidad de la respuesta hipóxica, existen tres isoformas principales de HIF- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ) (Figura 5). Todas están codificadas por distintos loci de genes y se genera una mayor diversidad mediante el uso de promotores alternativos y patrones de corte y empalme. HIF-1 $\alpha$  fue el descubierto primero, se expresa ubicuamente y, por lo tanto, fue considerado como el regulador maestro de la respuesta hipóxica (Wang y cols., 1995). HIF-2 $\alpha$  (también conocido como EPAS1) se caracterizó por primera vez por tres grupos independientes (Ema y col., 1997; Tian y cols., 1997; Houghton, 2021). HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  comparten una arquitectura de dominio similar (48 % de identidad de aminoácidos) (Ema y cols., 1997; Fedele y cols., 2002) y se someten a una regulación proteolítica similar; sin embargo, la expresión tisular de HIF-2 $\alpha$  parece ser más limitada, incluye células endoteliales vasculares, células del parénquima hepático y células intersticiales renales (Tian y cols. 1997). Aunque HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  se unen al mismo elemento de respuesta a la hipoxia (HRE), se cree que HIF-1 $\alpha$  es responsable de la respuesta inicial a la hipoxia, es decir, a una respuesta transcripcional aguda a la hipoxia, mientras que HIF-2 $\alpha$  regula la respuesta hipóxica crónica

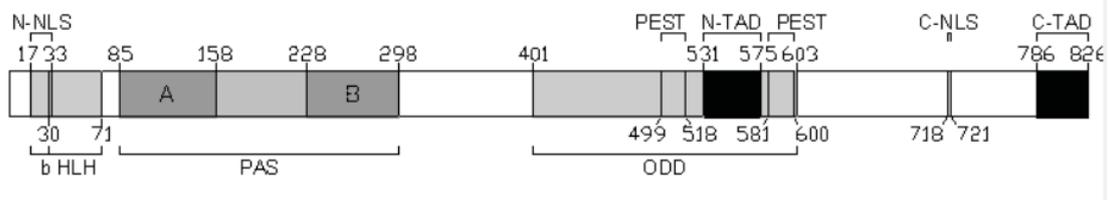
(Houghton, 2021). Además, hay pruebas sólidas que sugieren que cada proteína posee cualidades únicas y funciones biológicas distintas, y aunque se han estudiado ampliamente muchos genes diana directos de HIF-1 $\alpha$ , ninguno se ha identificado positivamente para HIF-2 $\alpha$  (Tian y cols., 1998, Fedele y cols., 2002). HIF-3 $\alpha$  está menos relacionada con la respuesta a hipoxia y su papel aún no se comprende completamente. Curiosamente, el corte y empalme alternativo de HIF-3 $\alpha$  genera una proteína de dominio PAS inhibitoria que inhibe la respuesta de HIF al formar heterodímeros transcripcionalmente inactivos con HIF-1 $\alpha$  (Weidemann y Johnson, 2008; Masoud y Li, 2015).



**Figura 5. Estructura de las diferentes isoformas de HIF. Dominios funcionales (bHLH, PAS, TAD) para proteínas relacionadas con la familia bHLH-PAS.** Tomada de Masoud y Li en 2015.

El factor 1 $\alpha$  inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) es un factor de transcripción clave en las respuestas a la hipoxia, formado por 826 aminoácidos (120 kDa) y está formado por dos subunidades (1 $\alpha$  y 1 $\beta$ ). La subunidad 1 $\alpha$  en la parte N-terminal contiene el dominio básico (aa 17–30), el dominio helix-loop-helix (aa 31–71) y el dominio PAS (aa 85–298) con PAS-A (aa 85–158) y PAS-B (aa 228–298) (Wang y cols., 1995). Dos dominios de transactivación, TAD N-terminal y C-terminal (también denominados NAD y CAD), que están localizados en la mitad C-terminal de HIF-1 (aa 531–575 y 786–826, respectivamente) (**Figura 6**) (Pugh y cols., 1997). Además, la parte C-terminal contiene un dominio responsable de la degradación de HIF-1 en condiciones normóxicas (Huang y cols., 1997). Este dominio de degradación dependiente de O<sub>2</sub> (ODD en aa 401–603) contiene dos motivos similares a PEST: secuencias ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) (aa 499–518 y 581–600) común para muchas proteínas

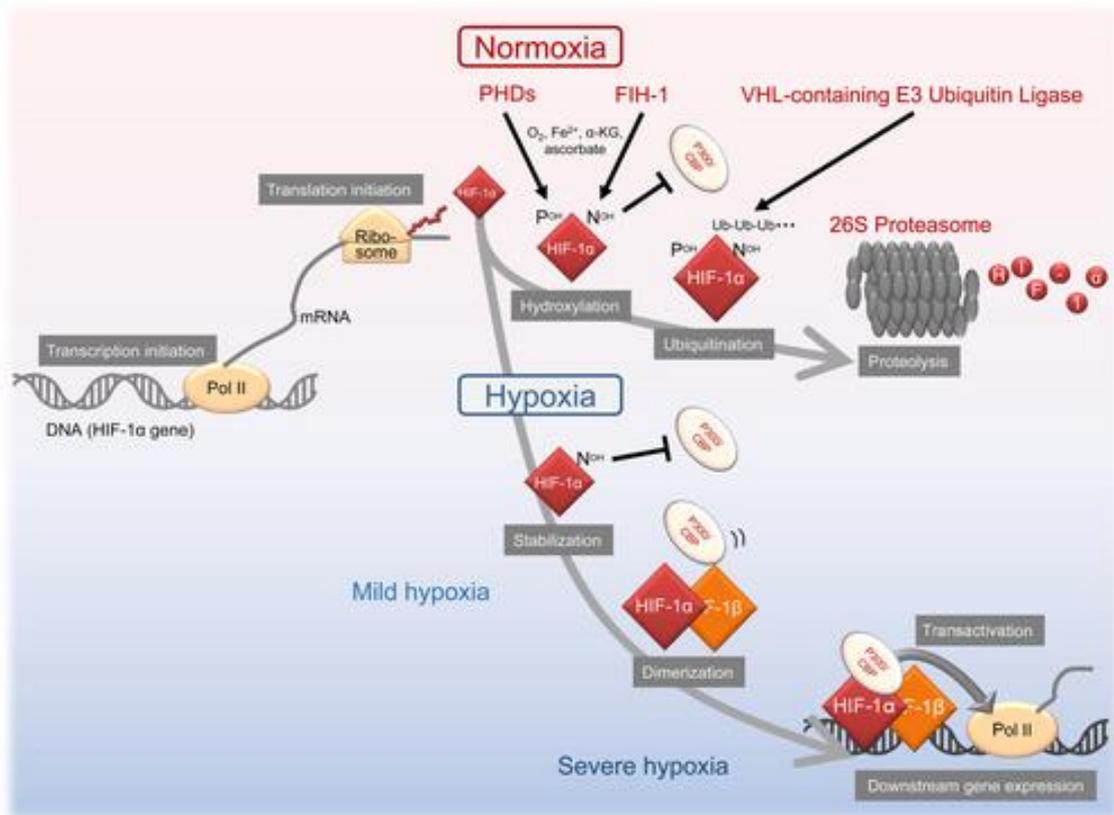
con una vida media corta (menos de 2h) (Rechsteiner y Rogers, 1996). La vida media de HIF-1 en condiciones normóxicas es inferior a 10 min y la proteína es apenas detectable (Chun y cols., 2002). La subunidad 1 $\beta$ , se identificó previamente como translocador de Arnt, que se heterodimeriza con el receptor de arilo hidrocarburo (AHR) para formar el receptor de dioxina funcional (Zagórska y Dulak, 2004). La proteína Arnt se expresa de manera ubicua en las células de los mamíferos y se mantiene en cantidades constantes independientemente de las presiones parciales de O<sub>2</sub> (Kallio y cols., 1997). Por el contrario, HIF-1 $\alpha$  se inducen rápidamente en condiciones hipóxicas (Fedele y cols., 2002).



**Figura 6. Estructura de HIF-1 $\alpha$ .** Tomada de en Zagórska y Dulak, 2004.

En condiciones normóxicas (>5 % O<sub>2</sub>) (**Figura 7**), HIF- $\alpha$  se dirige a la hidroxilación por la enzima dioxigenasa dependiente de O<sub>2</sub>, hierro y 2-oxoglutarato (2OG) en dos residuos de prolina específicos (P402 y P564) y un residuo de asparagina específico (N803) por la proteína que contiene el dominio PHD que conduce a la proteólisis y a una disminución de la actividad de transactivación de HIF-1 $\alpha$  (Koyasu y cols 2018; Kobayashi y cols., 2021). Además, se ha demostrado que la hipoxia prolongada induce la regulación negativa de HIF-1 $\alpha$  (Marxsen y cols., 2004) y la regulación positiva de PHD (Marxsen y cols., 2004). Por lo tanto, en estas condiciones de hipoxia prolongada, HIF-1 $\alpha$  induce el ARNm y las proteínas de PHD, lo que conduce a la regulación negativa de su expresión (Marxsen y cols., 2004). Una vez que HIF-1 $\alpha$  es hidroxilada, interactúa con la proteína von Hippel-Lindau (pVHL), lo que lleva a la degradación por la vía ubiquitina-proteosoma (Semenza, 2003; Kobayashi y cols., 2021). pVHL funciona como el componente de reconocimiento de un complejo E<sub>3</sub> ubiquitina proteína ligasa que conduce a la poliubiquitinación y degradación proteasomal de HIF-1 $\alpha$  (Highe y cols., 2015) Además, el factor inhibidor de HIF (Fih) hidroxila un residuo de asparagina en el TAD, bloqueando la unión del coactivador transcripcional CBP/p300 (Lisy y Peet, 2008; Dunwoodie, 2009).

En condiciones hipóxicas (<5 % O<sub>2</sub>) (**Figura 7**), HIF-1α se estabiliza principalmente por la inactivación de PHD concomitante con disminuciones en los niveles de O<sub>2</sub> (Koyasu y cols 2018). Estudios previos informaron que HIF-1α se acumula en condiciones hipóxicas y se une al Arnt y la proteína de unión a CREB (CBP)/p300 (Semenza, 2003). Se ha demostrado que el complejo HIF-1α induce la expresión de genes relacionados con la hipoxia y aumentan su transcripción, al unirse a una secuencia de consenso (A / G) CGTG conservada denominada HRE (Semenza, 2003; Kobayashi y cols., 2021).



**Figura 7. Regulación de HIF-1 en condiciones de normoxia e hipoxia.** Tomada de Koyasu y cols 2018.

HIF-1α una vez activado regula una amplia variedad de genes que son factores críticos en el desarrollo y fisiología celular (**Tabla 1**). Entre ellos se incluyen los implicados en el metabolismo energético, apoptosis, proliferación, autorrenovación y vasculogénesis.

**Tabla 1. Genes regulados por HIF-1.** Tomada de Ke y cols., 2006.

<b>Función</b>	<b>Genes</b>
<b>Angiogénesis/tono vascular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Receptor adrenérgico <math>\alpha</math>1B</li> <li>-Adrenomodulina</li> <li>-Endotelina-1</li> <li>-Hemooxigenasa 1</li> <li>-Óxido nítrico sintasa inducible 1 (iNOS)</li> <li>-Inhibidor del activador de plasminógeno 1</li> <li>-Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vegf)</li> <li>-Receptor VEGF flt-1</li> <li>-Derivados de glándula endocrina VEGF (EG- Vegf)</li> <li>-Trasporte del factor de crecimiento-<math>\beta</math>3 (Tgf-<math>\beta</math>3)</li> <li>-Leptina (Lep)</li> </ul>
<b>Captación de glucosa y glucolisis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adenilato kinasa 3</li> <li>- Aldolasa A, C (Alda,C)</li> <li>- Anídrido carbónico 9</li> <li>- Enolasa 1 (Eno1)</li> <li>- Transportador de glucosa 1 (Glut-1), 3 (Glut-3)</li> <li>- Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh)</li> <li>- Hexokinasa 1,2 (HK 1,2)</li> <li>- Lactato deshidrogenasa A (LDHA)</li> <li>-6-fosfofructosa-2-kinasa/fosfofructosa-2,6-bifosfatasa-3 (Pfkfb3)</li> <li>- Fosfofructokinasa L (Pfk1)</li> <li>- Fosfoglicerato kinasa 1 (Pfk1)</li> <li>- Piruvato Kinasa M (Pkm)</li> </ul>
<b>Proliferación y supervivencia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ciclina G2</li> <li>-DEC-1,2</li> <li>-Factor de crecimiento insulínico 2 (Igf2)</li> <li>-Proteína de unión 1 (Igfbp1)</li> <li>-Igfbp 2, 3</li> <li>-Nip3</li> <li>-Nix</li> <li>-p21</li> <li>-Transporte del factor de crecimiento <math>\alpha</math> (Tgf-<math>\alpha</math>)</li> <li>-Adrenomodulina</li> </ul>
<b>Matriz extracelular</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Colagenasa tipo V, <math>\alpha</math>1</li> <li>-Receptor activador de plasminógeno e inhibidores (PAIs)</li> <li>-Prolil hidroxilasa de colágeno</li> <li>-Metaloproteinas de la matriz (Mmp)</li> </ul>
<b>Eritropoyesis/metabolismo de ión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Eritropoyetina (Epo)</li> <li>-Transferrina (Tf)</li> <li>-Transportador de transferrina (Tfr)</li> <li>-Ceruloplasmina</li> </ul>
<b>Apostosis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Bcl-2/adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3 (BNip3)</li> <li>-Nip3-like protein X (Nix)</li> </ul>

En mamíferos HIF-1 $\alpha$  ha sido estudiado en la maduración del complejo cumulo ovocito en el cual se ha observado que es un factor multidireccional que controla las comunicaciones de los cúmulos, la actividad esteroidogénica y las tasas de desarrollo del ovocito, todo ello ejerce efectos sobre las tasas de blastocistos viables (Turhan y cols., 2021). Por otro lado, también se ha observado que HIF-1 $\alpha$  es importante en la espermatogénesis, apareciendo dicha proteína en los espermatozoides maduros (Marti y cols., 2002). En el embrión preimplantacional, existen estudios que demuestran que la expresión de varios genes, incluidos los transportadores de glucosa (por ejemplo: Glut-1, Glut3), enzimas glucolíticas (Semenza y cols., 1994), factor de crecimiento endotelial vascular (Vegf), factor de crecimiento similar a la insulina-II (Igf-II) y óxido nítrico sintasas (NOS) (Bracken y cols., 2003) está alterada en embriones producidos *in vitro* (Yaseen y cols., 2001). De particular importancia para el desarrollo del embrión es la regulación de los genes implicados en el metabolismo glucolítico, vías que tienen una importancia creciente durante las etapas posteriores a la compactación (Harvey y cols., 2004).

En 2004, Harvey y cols. observaron el efecto de las condiciones de O<sub>2</sub> alteradas después de la compactación en la expresión génica del embrión bovino. Si bien solo la expresión de Glut-1 se vió significativamente alterada por el cultivo posterior a la compactación con O<sub>2</sub> reducido (2 %). Estos cambios en la expresión génica están asociados con la falta de proteína HIF-1 $\alpha$  (Harvey y cols., 2004). Las razones de la ausencia del principal factor de transcripción regulador de O<sub>2</sub> (HIF-1) siguen sin estar claras. Si la ausencia de la proteína HIF-1 $\alpha$  es una consecuencia de las condiciones de cultivo (que refleja una deficiencia en la suplementación del cultivo con factores de crecimiento, que se sabe que regulan al alza los HIF), o un evento que ocurre normalmente *in vivo*, requiere más investigación. En último caso, la falta de expresión génica puede ser específica del embrión previo a la implantación, en el que una respuesta pronunciada a condiciones de bajo O<sub>2</sub> sería perjudicial, como se observó en caso del ratón por Feil y cols., en 2006, y/o específica de la especie en función de su modo de implantación, por ejemplo, los embriones bovinos pasan por un período de elongación antes de la implantación (Harvey, 2007).

Se han identificado sitios críticos de unión a HIF-1 $\alpha$  en genes que intervienen en vías metabólicas clave para optimizar la utilización de glucosa y O<sub>2</sub> en hipoxia, para generar cantidades suficientes de ATP sin producir cantidades excesivas de ERO mediante la inhibición del ciclo ácido tricarbóxico y la respiración mitocondrial. Además de controlar enzimas

glucolíticas clave, HIF-1 $\alpha$  también está implicada en la regulación del pH intracelular. Además, los estudios de modelos de ratones knockout para HIF-1 $\alpha$  han demostrado letalidad embrionaria en el día 10,5 que involucra una vascularización fetal y del saco vitelino deficiente (Iyer y cols., 1998; Ryan y cols., 1998). Lo que sugiere que HIF es un regulador de los procesos de desarrollo críticos asociados con el desarrollo normal del embrión posterior a la implantación. Además, se ha demostrado que la expresión de HIF dentro de los tejidos placentarios está involucrada en la diferenciación, particularmente durante el primer trimestre (Caniggia y cols., 2000). Por lo tanto, la activación de HIF puede funcionar como un mecanismo importante antes y después de la implantación, para la inducción de la cascada correcta de genes necesarios para respaldar un mayor desarrollo (Harvey y cols., 2004). Por lo tanto, el papel de HIF-1 $\alpha$  es necesario para la vascularización adecuada del embrión de ratón (Ryan y cols., 1998) y para coordinar la cooperación compleja de factores de crecimiento angiogénicos. Esto se demostró en animales transgénicos donde la sobreexpresión de VEGF solo condujo a hipervascularización con hiperpermeabilidad en la piel, (Thurston y cols., 1999) mientras que, por el contrario, los vasos inducidos por un transgén HIF-1 $\alpha$  estable impulsado por el mismo promotor específico de la piel no presentaban fugas (Weidemann y Johnson, 2008). Además, Baek y cols., en 2010 encontraron que un aumento en VEGF puede causar que HIF-1 $\alpha$  inhiba la apoptosis. Por lo que HIF-1 $\alpha$  juega un papel importante en el manejo de la apoptosis y la antiapoptosis al regular la transcripción de genes relacionados con la apoptosis. Por todo lo mencionado anteriormente HIF-1 es un factor clave en la supervivencia embrionaria, en el desarrollo de sistemas fisiológicos en la vida fetal y posnatal.

En la mayoría de las clínicas de FIV, los embriones se cultivan de forma rutinaria con una concentración de O<sub>2</sub> del 5 % durante 3 a 6 días, lo que representa el estado de hipoxia crónica. Varios estudios informaron de que las expresiones de genes regulados por O<sub>2</sub> tenían un papel importante en la regulación del metabolismo embrionario previo a la implantación, y que la baja tensión de O<sub>2</sub> aumentaba el desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocisto (Harvey y cols., 2004; Kind y cols., 2005; Harvey y cols., 2007). Sin embargo, aunque estos resultados sugieren la posibilidad de que HIF-1 $\alpha$  sea un regulador de los procesos de desarrollo embrionario, la expresión y función de HIF-1 $\alpha$  en la embriogénesis aún no está clara (Yoon y cols., 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  puede ser inducida por una variedad de estímulos distintos a la hipoxia, como metales de transición, el óxido nítrico,

las ERO, (Harvey, 2007), hormonas, citoquinas, factores de crecimiento (Pringle y cols., 2010; Yoon y cols., 2013; Jeong y cols., 2016), flavonoides (Bogacz y cols., 2021) y 4-OHE<sub>2</sub> (Gao y cols., 2004) los cuales pueden regular la activación de HIF, incluso en condiciones normóxicas. Además, también están regulados por los ritmos circadianos, la neurogénesis y el metabolismo de toxinas (Ramírez-Bergeron y cols., 2006). Esto sugiere que HIF es capaz de responder dinámicamente a una variedad de condiciones y que durante la evolución, HIF-1 $\alpha$  ha sido utilizado para dirigir muchos otros procesos celulares que, en última instancia, permiten que el embrión sobreviva después del nacimiento. Esto puede implicar a HIF como un importante regulador del desarrollo embrionario, donde el tracto reproductivo proporcionaría un entorno rico en factores de crecimiento, citocinas y moléculas redox, además de una atmósfera reducida en O<sub>2</sub>. Por lo tanto, la activación de los HIF-1 $\alpha$  en el cultivo *in vitro* de embriones, donde se ha observado que su expresión es deficiente, puede ser importante para que estos embriones se adapten a un entorno donde las condiciones de cultivo son hostiles para su desarrollo, el cual normalmente no se encuentra *in vivo* y así poder obtener blastocitos de buena calidad y con capacidad de implantación.



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## Justificación

Aunque ahora es posible la producción *in vitro* de embriones hasta el estadio de blastocisto en numerosas especies, la calidad y la cantidad de embriones aún no son satisfactorios. Claramente, las condiciones de cultivo aún no reemplazan todos los beneficios del desarrollo dentro del tracto reproductivo femenino, por lo que se asume que el cultivo embrionario es subóptimo y que las condiciones de cultivo son en gran parte responsables del desarrollo embrionario deficiente *in vitro*.

Sabemos que los requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales del tracto reproductivo femenino son diferentes según en la etapa del desarrollo embrionario en la que nos encontremos antes de la implantación, debido a que el embrión se vuelve más complejo conforme avanza en su desarrollo. Por ello, en el cultivo *in vitro* se le debería de ofrecer a los embriones diferentes medios adecuados a su etapa de desarrollo, ya que dependiendo del estadio donde se encuentren necesitarán unos nutrientes y condiciones diferentes.

Por otro lado, el hecho de que los embriones obtenidos por fecundación *in vitro* carezcan del ambiente endocrino adecuado, es un factor determinante en la reducción del potencial implantatorio y esto se refleja en los resultados obtenidos a partir de los ciclos de reproducción asistida, donde el origen de los embriones depende de un proceso de fecundación artificial.

Por todo esto, una mayor optimización de las condiciones de cultivo proporcionaría un entorno mejor para el desarrollo embrionario que es fundamental para la obtención de embriones de buena calidad, para que sean competentes y con capacidad adecuada de implantación disponibles para la transferencia, por lo que a día de hoy la mejora de los medios de cultivo en donde se desarrollan los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, se ha convertido a día de hoy, en un objetivo común para muchos de los grupos de investigación que desempeñan su labor en el ámbito de la reproducción asistida humana o la producción animal.

## Objetivo general

El objetivo general planteado en este trabajo de tesis es examinar si la adición al medio de cultivo de 4-OHE<sub>2</sub> o Quer mejora la calidad embrionaria y la capacidad de implantación de los embriones obtenidos por FIV, lo que los convertiría a estas moléculas en candidatos potenciales para conseguir imitar las condiciones fisiológicas en los medios de cultivo utilizados en los laboratorios de las clínicas de reproducción, y potenciar así las tasas de éxito de los tratamientos empleados.

## Objetivos específicos

Para profundizar en el conocimiento del papel que realizan el 4-OHE<sub>2</sub> y la Quer en los medios de cultivo, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Determinar si los medios de cultivo suplementado con 4-OHE<sub>2</sub> o quercetina podría ser ventajoso para los embriones obtenidos *in vitro*.
2. Determinar el efecto del 4-OHE<sub>2</sub> sobre el desarrollo preimplantacional y la capacidad de implantación.
3. Determinar el efecto de la Quer sobre el desarrollo preimplantacional y la capacidad de implantación.
4. Determinar la dosis, el tiempo y etapa del desarrollo preimplantacional más adecuado para la suplementación de los medios de cultivo con 4-OHE<sub>2</sub>.
5. Determinar la dosis, el tiempo y la etapa del desarrollo preimplantacional más adecuada para la suplementación de los medios de cultivo con Quer.
6. Evaluar los efectos de la adición de 4-OHE<sub>2</sub> en los niveles de ERO.
7. Evaluar los efectos de la adición de Quer en los niveles de ERO.
8. Analizar el patrón de expresión de las proteínas para HIF-1 $\alpha$  en blastocistos obtenidos tanto por FIV como en los obtenidos del útero.

9. Analizar la expresión de Egf, Prdx-5 y de varios genes relacionados con la hipoxia en embriones preimplantacionales obtenidos tanto por FIV como en los obtenidos del útero cuando el medio se suplementa con 4-OHE<sub>2</sub>.
10. Analizar la expresión de Egf, Prdx-5 y varios genes relacionados con la hipoxia en embriones preimplantacionales obtenidos tanto por FIV como en los obtenidos del útero cuando el medio se suplementa se con Quer.



# **CAPÍTULOS**



# CAPÍTULOS

Los resultados científicos de esta tesis doctoral están estructurados en tres partes o capítulos estructurados independientemente de la introducción y discusión general de esta tesis y por lo tanto cada uno contiene sus propias figuras y tablas. A continuación se enumeran los distintos capítulos:

- 1. CAPÍTULO I:** El 4-Hidroxiestradiol mejora la calidad de los embriones de ratón, la capacidad de unión al factor de crecimiento epidérmico *in vitro* y las tasas de implantación
- 2. CAPÍTULO II:** La suplementación del medio de cultivo con quercetina mejora la calidad embrionaria de los blastocistos de ratón y aumenta la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ .
- 3. CAPÍTULO III:** Efecto de la adición de 4-Hidroxiestradiol y quercetina en medios de cultivo sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno y expresión génica en blastocistos de ratón.



# **CAPÍTULO I**



# 1. CAPÍTULO I: El 4-Hidroxiestradiol mejora la calidad de los embriones de ratón, la capacidad de unión al factor de crecimiento epidérmico *in vitro* y las tasas de implantación

## 1.1. Materiales y métodos

### Animales

Se utilizaron ratones hembras híbridas B6D2F1/J (C57BL/6J01aHsd DBA/201aHsd, Envigo RMS, Holanda) como donantes de ovocitos y embriones, y ratones machos híbridos B6D2F1/J como donantes de semen. Se usaron ratones hembra Hsd:ICR (CD-1) (Servicio de Animales de la Universidad de Extremadura, España) como madres receptoras, y ratones machos vasectomizados de la cepa ICR se aparearon con las madres receptoras hembras ICR. Todos los ratones tenían entre 8 y 12 semanas de edad. Los animales se alojaron en el animalario del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (certificado por ES100370001499) en condiciones controladas, con un ciclo de 12 horas (h) de luz: 12 h de oscuridad, temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa del 40 al 70 %, comida y agua ad libitum. Los machos se alojaron individualmente en jaulas, mientras que las hembras se alojaron en grupos de dos o cuatro por jaula. Para estudiar diferentes calidades de los embriones (recuento celular, apoptosis, diámetros), se utilizaron 12 animales B6D2. Para el ensayo de unión del factor de crecimiento epidérmico (EGF), se utilizaron 24 animales B6D2 (n= 12, para obtener embriones por fecundación *in vitro* (FIV); n= 12, para obtener embriones en el útero). Para los modelos de implantación se utilizaron 10 animales B6D2 para estudiar el potencial de implantación en un modelo *in vitro* (cocultivo con células endometriales) y 94 hembras ICR para realizar transferencias embrionarias *in vivo*, en las que se utilizaron como madres receptoras de los embriones obtenidos de los 10 animales B6D2. Los experimentos *in vitro* fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Extremadura el 21 de diciembre de 2007 según el RD 53/2013 de 1 de febrero, y los experimentos *in vivo* fueron aprobados por el Comité de Ética de la Junta de Extremadura el 10 de mayo 2016, y todos los procedimientos siguieron los principios rectores para la investigación con animales de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Investigación con Animales de Laboratorio (ILAR) y el Reglamento español (RD1201/2005). En la **figura 1** se muestra un diagrama de flujo para aclarar los experimentos realizados.

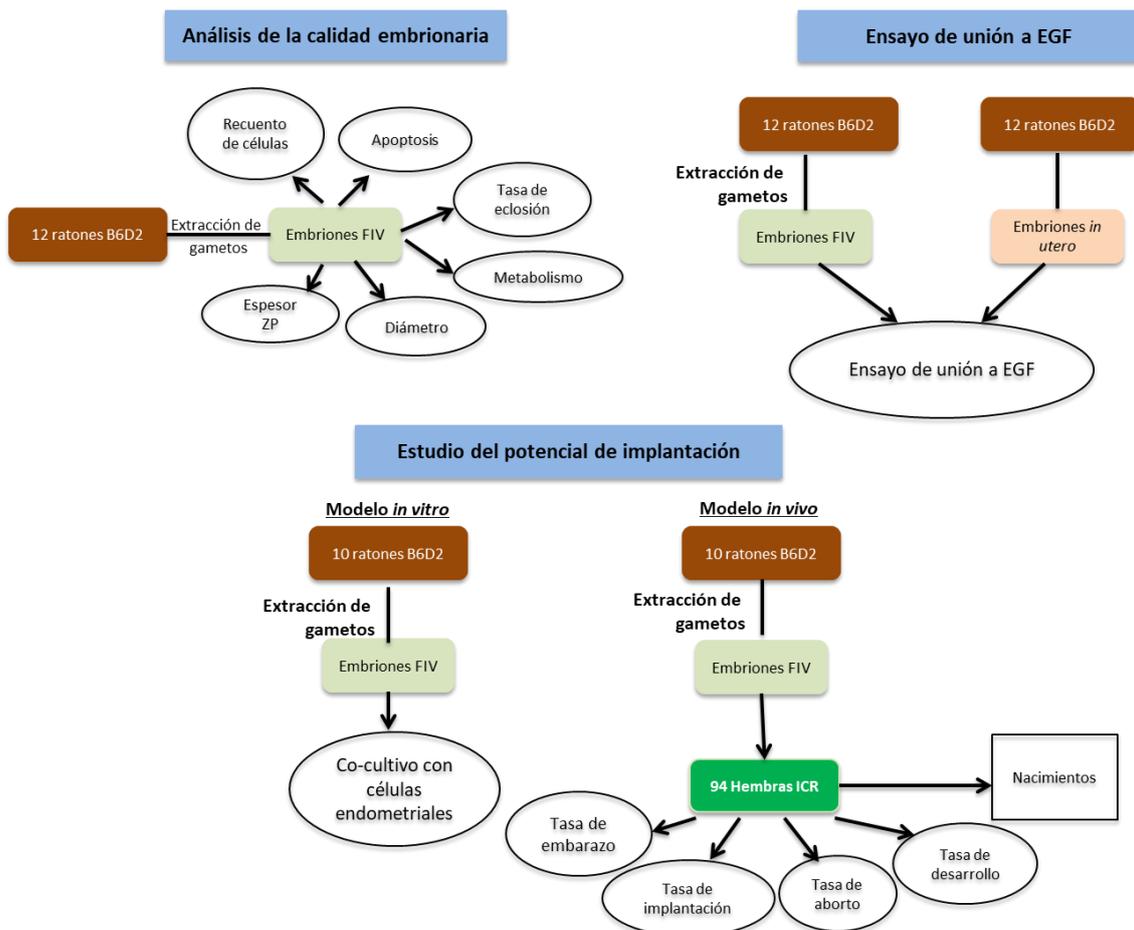


Figura 1. Esquemas de los experimentos realizados con los diferentes grupos de ratones. EGF, factor de crecimiento epidérmico.

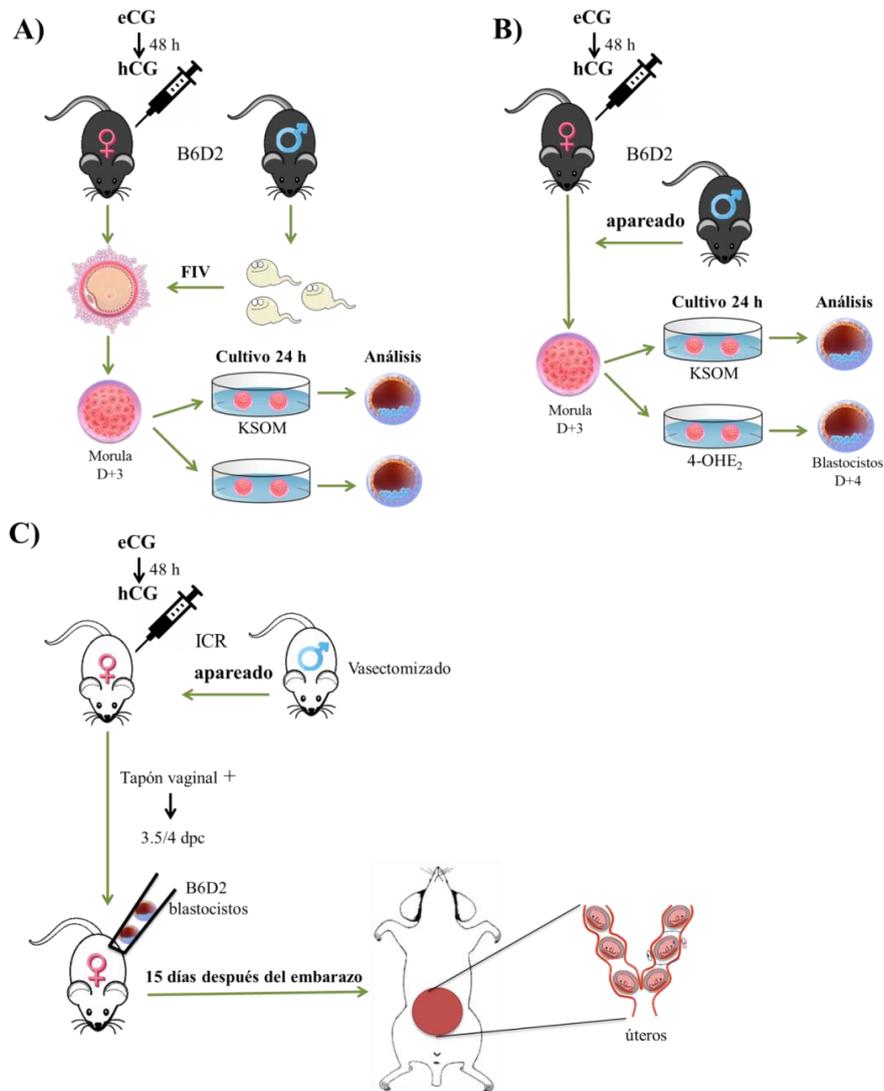
## Recolección de embriones y fecundación *in vitro*

Embriones desarrollados *in utero* (Figura 2B): ratones hembra adultas B6D2 fueron previamente estimulados con 8 unidades internacionales (UI) de gonadotropina coriónica equina (eCG; Syncrostim, CEVA Salud Animal, S.A. Barcelona, España), y 8 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Veterin Corion, Divisa Farmavic, S.A. Barcelona, España) 48 h después. Para inducir el embarazo, durante la noche las hembras se aparearon con machos adultos B6D2 fértiles de la misma edad (1♂:1♀). El embarazo se confirmó mediante la visualización del tapón vaginal, denominado Día 1 del desarrollo del embrión. Para recolectar los embriones, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical. Los embriones en desarrollo se recuperaron en medio optimizado de potasio simplex (KSOM; Merck-Millipore, Madrid,

España) después de lavar el útero con medio M2 (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) 72 h y 96 h después de la inyección de hCG (para la etapa de mórula y blastocisto, respectivamente).

Embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV) (Figura 2A): ratones hembras adultas B6D2 fueron estimulados previamente con 8 UI de eCG, seguido de 8 UI de hCG 48 h después. Para realizar el procedimiento de FIV, se equilibró medio de fluido tubárico humano (HTF) (Merck-Millipore, Madrid, España) en una incubadora (37 °C, atmósfera controlada con 5 % de CO<sub>2</sub>) 1 día antes del experimento. Para extraer el semen, se sacrificaron ratones machos adultos B6D2 mediante dislocación cervical y se recogió el epidídimo caudal. El epidídimo se prensó para la extracción de los espermatozoides y se incubó en medio HTF durante 45 min (minutos) a 37 °C en atmósfera controlada para mejorar el potencial de fecundación (capacitación). Para recolectar ovocitos maduros, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical 12 h después de la inyección de hCG y los complejos cúmulo-ovocitos se recuperaron de la ampolla del oviducto y se cultivaron en medio KSOM.

Se añadieron espermatozoides capacitados a 600 µl de medio HTF que contenía los ovocitos recién ovulados para lograr una concentración espermática final de 3x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml. Seis horas después, los ovocitos fertilizados se lavaron y cultivaron en medio HTF fresco hasta que alcanzaron el estado de mórula (72 h). Luego, las mórulas se colocaron en KSOM, diseñado para el cultivo de embriones en etapa de preimplantación, en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> y mantenidas a 37 °C hasta la etapa de blastocisto.



**Figura 2. Representación esquemática de diferentes procedimientos realizados con los embriones de ratón. (A)** Embriones obtenidos por FIV. Se obtuvieron ovocitos de ratones hembras B6D2 previamente estimulados con hormonas, y espermatozoides de ratones machos B6D2, para realizar FIV. Los embriones resultantes se cultivaron en la etapa de mórula durante 24 h en KSOM convencional o en medios suplementados con 4-hidroxiestradiol (4-OHE<sub>2</sub>) y se estudiaron los blastocistos obtenidos. **(B)** Embriones obtenidos en el útero: ratones hembras B6D2 fueron estimulados con hormonas y apareados con ratones machos B6D2 para obtener embriones en el útero, en la etapa de mórula. Estos embriones se cultivaron durante 24 h en KSOM convencional o en medios suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> y se estudiaron los blastocistos obtenidos. **(C)** Transferencias de embriones a madres receptoras de ICR: ratones hembras ICR estimuladas con hormonas se aparearon con ratones machos ICR vasectomizados. Se utilizaron hembras con tapón vaginal como madres receptoras para transferir embriones de ratones B6D2 a los 3,5/4 días después del coito (dpc). El día 15 de embarazo, las madres receptoras de ICR fueron sacrificadas y se examinó el útero para determinar las tasas de implantación, aborto y desarrollo. D+3, día 3 de desarrollo embrionario; D+4, día 4 de desarrollo embrionario.

## Tratamiento 4-Hidroxiestradiol

Para investigar el efecto de 4-Hidroxiestradiol (4-OHE<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich, Barcelona, España) en los diferentes experimentos realizados, se utilizaron dos concentraciones diferentes de 4-OHE<sub>2</sub>: 0,1 mg/ml para experimentos *in vivo*; 1 mg/ml para experimentos *in vitro*. Se agregó 4-OHE<sub>2</sub> a los medios de cultivo de embriones en dos etapas diferentes y se dejó durante 24 h: desde la fecundación hasta la etapa pronuclear (PN), y luego los embriones se cultivaron en medios KSOM hasta la etapa de blastocisto; y desde la mórula hasta el estadio de blastocisto. Los embriones cultivados desde la etapa de fecundación fueron los obtenidos solo por FIV, mientras que los embriones cultivados desde la mórula hasta la etapa de blastocisto con 4-OHE<sub>2</sub> fueron los obtenidos por FIV y del útero. Todos los embriones se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta la etapa de blastocisto y se usaron para los experimentos que se describen a continuación. Experimentos adicionales se realizaron para comprobar la especificidad de 4-OHE<sub>2</sub> mediante el tratamiento de algunos embriones con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).

## Ensayo de unión de EGF488

Después del tratamiento adecuado con 4-OHE<sub>2</sub>, los embriones obtenidos *in utero* e *in vitro* (de 24 hembras B6D2; n= 12 para *in utero* y n= 12 para *in vitro*) se incubaron con factor de crecimiento epidérmico (EGF) conjugado con Alexa Fluor 488 (5 µg/ml; E-3476, Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) en KSOM durante 2 h. Posteriormente, se lavaron minuciosamente en KSOM para descartar el EGF no unido específicamente y se transfirieron a una nueva placa con microgotas de 90 µl de KSOM para su visualización mediante un microscopio invertido, Nikon Eclipse TE2000-U, equipado con una plataforma de microincubación DH-40i. (Warner Instruments, Inc., Hamden, CT, EE. UU.) a 37 °C. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con filtros de excitación a 340 y 380 nm, un espejo dicróico de 510 nm y un filtro de emisión de 520 nm (Semrock, Rochester, NY, EE. UU.). Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara CCD multiplicadora de electrones Hamamatsu C9100-02, bajo el control del software de imágenes de fluorescencia Metafluor (Molecular Devices, Downingtown, PA, EE. UU.), utilizando condiciones de exposición idénticas (6 segundos) y ganancia (2,40). Para cuantificar la intensidad de la fluorescencia, se utilizó el paquete de software Sigma Scan Professional, SpSSInc. La cantidad de EGF unido a la superficie del embrión se extrapola individualmente a partir de la intensidad de la fluorescencia en una

escala estándar de 0 a 255 unidades, donde 0 representa ausencia de fluorescencia y 255 equivale a la máxima intensidad de fluorescencia.

Se usaron embriones *in utero* e *in vitro* cultivados en ausencia de EGF conjugado con Alexa Fluor 488 como controles negativos para la señal de fluorescencia.

## **Tinción nuclear**

Para contar el número de células, los blastocistos se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) durante 15 min, luego se incubaron en tampón de permeabilización Tritón X-100 (0,1 %; Sigma Aldrich, Barcelona, España) en PBS (Solución salina tamponada con fosfato; Sigma-Aldrich, Barcelona, España) durante 30 min, y finalmente se lavó tres veces en PBS-Tween al 0,05 % (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron incubando los embriones con 1 ml de PBS que contenía 2 µg/ml de Hoechst 33342 (Eugene, OR, EE. UU.) durante 10 min a 37 °C. Luego, los embriones se montaron en un portaobjetos con glicerol, se sellaron con una cubierta y se examinaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U), equipado con una lámpara ultravioleta (línea láser de 405 nm). El número de células se analizó utilizando el software Fiji Image-J (1.45q, Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, MD, EE. UU.).

## **Ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling)**

Las células apoptóticas en embriones se detectaron utilizando el kit de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL; Roche, Mannheim, Alemania). Todos los reactivos se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los embriones obtenidos del útero y FIV se fijaron en PFA al 4 % durante 15 min, se incubaron en el tampón de permeabilización de Triton X-100 al 0,1 % en PBS durante 30 min y se lavaron tres veces en PBS-Tween al 0,05 % a temperatura ambiente. Luego, los blastocistos se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL que contenía desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y nucleótidos marcados (fluoresceína-dUTP) a una concentración de 1:10 durante 1 h a 37 °C, en la oscuridad. Como control positivo para la señal de fluorescencia, los embriones de FIV se cultivaron en KSOM y se incubaron con ADNasa RQ1 (50 Unidades/ml; Promega, Madison, WI, EE. UU.), que rompe todo el ADN, durante 20 min a 37 °C antes de realizar el ensayo TUNEL. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 como se describió anteriormente. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron utilizando un

microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U), equipado con un láser de 488 nm (canal verde).

### **Ensayo de unión *in vitro***

Para el ensayo de unión *in vitro*, se recogieron células endometriales del útero de ratones hembras B6D2 adultas previamente estimuladas para realizar FIV (n= 10). Los cuernos uterinos se extirparon y se abrieron longitudinalmente para exponer la superficie luminal. Las células epiteliales de la luz uterina se extrajeron con un raspador estéril y se colocaron en colagenasa al 1 % en DMEM/Ham's Nutrient Mixture F12 (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) durante 1 h a 37 °C y se filtraron para eliminar el tejido residual. Las células epiteliales se sedimentaron mediante centrifugación a 300 g durante 5 min y se resuspendieron en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (Lonza, Basilea, Suiza), L-glutamina al 1 % (Lonza, Basilea, Suiza) y solución de antibiótico-antimicótico al 1 %. (Sigma-Aldrich, Barcelona, España). Las células se cultivaron hasta un 80 % de confluencia, se separaron, se contaron y se sembraron en placas de cultivo a la concentración adecuada.

Se cocultivaron embriones para evaluar la capacidad de implantación con células endometriales. El cocultivo se mantuvo durante 48 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Para evaluar la capacidad de fijación de los embriones, se agitaron las placas durante unos segundos y se contaron todos los embriones adheridos y sueltos para establecer las proporciones (competentes/no competentes para la implantación) correspondientes a cada grupo experimental. Aquí, los embriones implantados fueron aquellos en los que las células endometriales fueron desplazadas por células trofoectodérmicas a las 72 h de cocultivo.

### **Análisis de la actividad metabólica**

Para determinar los cambios en la actividad metabólica del embrión, se utilizó el colorante vital AlamarBlueVR (AB; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los embriones fueron analizados en base a las diferentes condiciones de desarrollo mediante cultivo en microgotas de KSOM suplementado con 10 % AB bajo aceite mineral en atmósfera humidificada de 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C por 2 h. En los medios de cultivo, se determinó AB reducido, un indicador de actividad metabólica, midiendo las intensidades de fluorescencia utilizando un lector de microplacas multimodo (SynergyTM Mx, BioTek Instruments Inc., Winooski, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Medición del diámetro del blastocisto y espesor de la zona pelúcida

Se obtuvieron imágenes digitales de todos los embriones utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-U); el plano focal seleccionado fue el ecuador embrionario. El diámetro del blastocisto se midió a lo largo del eje más largo, utilizando una distancia conocida de 100 mm, con el paquete de software de análisis de imágenes Sigma Scan Professional SpSSInc. De manera similar se midió el grosor de la zona pelúcida.

## Transferencia quirúrgica de embriones a madres receptoras

En el caso de las madres receptoras, las ratonas hembras ICR se aparearon con ratones machos ICR vasectomizados. En hembras que presentaban tapón vaginal, se estableció el día siguiente como Día 1 de pseudopreñez. Usando la técnica intraendometrial, las transferencias de embriones se realizaron en los días 3,5 a 4 de pseudopreñez (**Figura 2C**). A las madres receptoras se les administraron los siguientes analgésicos intrapereitonealmente: meloxicam (Chanelle Pharmaceutical, VIRBAC, Barcelona, España) y buprenorfina (Laboratorios Karizoo, Barcelona, España). Los ratones se anestesiaron usando isoflurano por inhalación (Steve Laboratories, Reino Unido).

El cuerno uterino se expuso con una incisión dorsal utilizando pinzas. Se insertó un Abboath 24 G (Laboratorios Hospira, Madrid, España) cerca de la unión útero-tubal en la cavidad endometrial. Utilizando una micropipeta de vidrio, se transfirieron 10 embriones por cuerno en un pequeño volumen de medio de cultivo (KSOM) a la cavidad endometrial. La dirección de la inserción fue casi paralela al útero. El mismo procedimiento se repitió en el otro cuerno. En total, se utilizaron 94 hembras ICR para realizar transferencias, divididas en tres grupos experimentales de la siguiente manera: 25 hembras recibieron embriones extraídos en el útero en la etapa de blastocisto; 34 hembras recibieron embriones obtenidos *in vitro*, cultivados en medios convencionales hasta el estadio de blastocisto; 35 hembras recibieron embriones obtenidos *in vitro*, cultivados en medios suplementados con 0,1 mg/ml de 4-OHE<sub>2</sub> desde la mórula hasta el estadio de blastocisto.

## Atención posquirúrgica

Después de la cirugía, a las madres receptoras ICR se les administró Apiretal (acetaminofeno, Laboratorios ERN, Barcelona, España) mezclado en el agua para aliviar el dolor y se les permitió recuperarse en jaulas individuales bajo una luz roja para proporcionar calor. Estos ratones fueron observados hasta la recuperación de las respuestas y la conciencia. La viabilidad de los embriones transferidos se evaluó 15 días después de la transferencia sacrificando a las madres receptoras y examinando el útero para determinar las tasas de embarazo, implantación, fetos viables y abortos. La presencia de un saco vitelino hemorrágico, embriones de un tamaño menor al esperado en el día 15 de desarrollo y que mostraban un desarrollo lento se consideraron para determinar la tasa de aborto.

Para evaluar si el 4-OHE<sub>2</sub> produce efectos negativos en la descendencia, algunas madres receptoras llevaron el embarazo a término y dieron a luz.

## Análisis estadístico

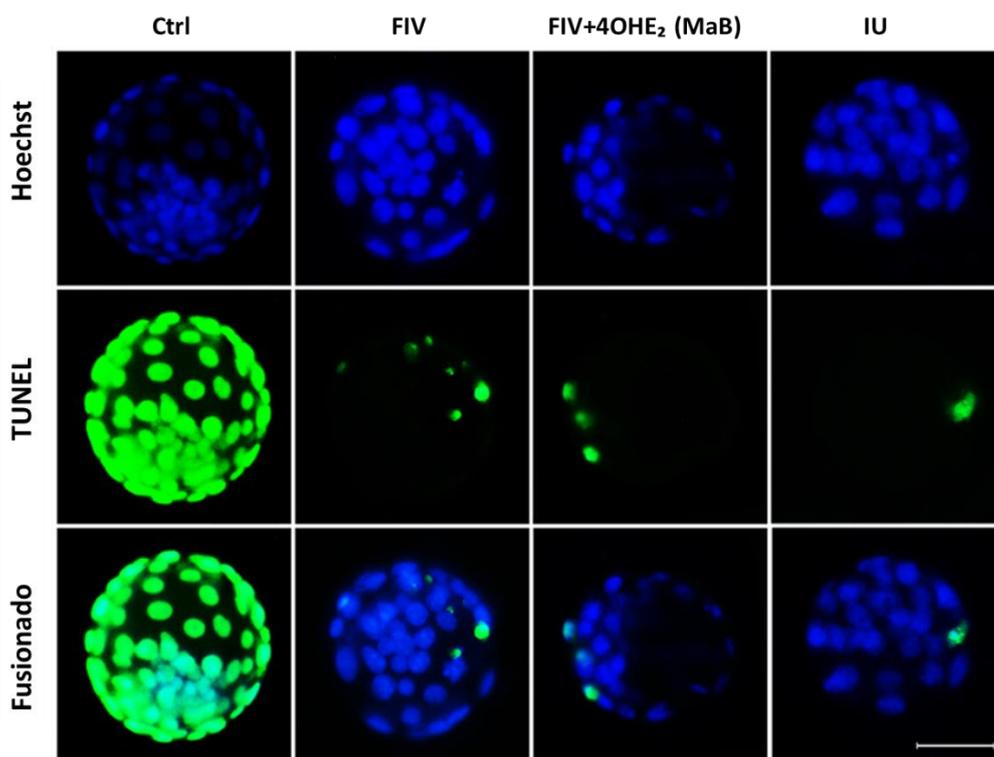
Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.), y un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Se utilizó ANOVA para comparar la proliferación embrionaria y los parámetros de calidad, se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon para comparar la competencia de unión a EGF y se utilizó la prueba de Tukey para analizar los datos de las transferencias de embriones.

### 1.2. Resultados

#### **Efectos de 4-OHE<sub>2</sub> en el recuento total de células de blastocisto, la incidencia de apoptosis y algunas características embrionarias**

Para determinar si el tratamiento con 4-OHE<sub>2</sub> podría mejorar la calidad de los embriones obtenidos *in vitro*, se examinaron la proliferación celular, la muerte celular y otras características relacionadas con la calidad. Los embriones desarrollados *in vitro* hasta el estadio de mórula y luego cultivados en presencia o ausencia de 4-OHE<sub>2</sub> exógeno hasta el estadio de blastocisto se analizaron y compararon con embriones que se desarrollaron completamente en el útero y se extrajeron del conducto femenino en el estadio de blastocisto.

Los resultados demostraron que los embriones obtenidos *in vitro* tratados con 1 mg/ml de 4-OHE<sub>2</sub> durante las últimas etapas de desarrollo (de mórula a blastocisto (MaB): grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB)), presentaron un aumento, aunque no significativo, en el recuento total de células en comparación con embriones cultivados en medios convencionales (grupo FIV); además, la incidencia de muerte celular se redujo poco. En comparación con los embriones desarrollados en el útero y luego extraídos (grupo IU), las diferencias estadísticas fueron significativas tanto en el grupo FIV como en el grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB), mostrando el primero resultados más similares a los observados en el Grupo IU (Figura. 3, Tabla I).



**Figura 3.** Imágenes representativas que ilustran el recuento total de células y la incidencia de muerte celular en embriones de ratón. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. El ADN fragmentado se marcó usando TUNEL (verde). Las imágenes combinadas representan la proporción de células TUNEL positivas (apoptóticas, fila central) con respecto al recuento total de células del embrión (fila inferior). Grupo FIV: embriones obtenidos *in vitro* cultivados en medios convencionales. n = 30; Grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB): embriones obtenidos *in vitro* cultivados en medios suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> desde la mórula hasta el estadio de blastocisto. n = 31; Grupo IU: embriones desarrollados en el útero. n = 30. El control positivo consistió en embriones obtenidos *in vitro* tratados con ADNasa para inducir la apoptosis antes de la incubación con reactivos TUNEL. Barra de escala: 50 mm (milímetros).

**Tabla I** Efectos del 4-OHE<sub>2</sub> sobre el recuento total de células y la muerte celular en embriones de ratones.

	FIV (N = 30)	FIV+4-OHE <sub>2</sub> (MaB) (N = 31)	IU (N = 36)
	Céls (Media±DE)	Céls (Media±DE)	Céls (Media±DE)
Recuento total de células	91 ± 14.5***	97.8 ± 17.8*	109.4 ± 21.3
Incidencia de Apoptosis (%)	4.3 ± 5.1**	3.9 ± 3.3**	1.2 ± 1.9

4-OHE<sub>2</sub>: 4-hidroxiestradiol.

Céls: Células

DE: Desviación estándar

FIV: embriones obtenidos *in vitro* y completamente desarrollados; FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB): embriones obtenidos *in vitro* cultivados en medios suplementados desde la mórula hasta el estadio de blastocisto; IU: embriones completamente desarrollados en el útero.

\*\* P < 0,01

\*P < 0,05 frente a IU

ANOVA y prueba de Tukey para el recuento total de células y prueba de Kruskal-Wallis para la apoptosis. Prueba U de Mann-Whitney para comparar ambos grupos.

Por el contrario, 4-OHE<sub>2</sub> mejoró otros parámetros relacionados. En comparación con los embriones de FIV cultivados solo en KSOM, la tasa de eclosión aumentó poco en los embriones de FIV cultivados con 4-OHE<sub>2</sub>, y el diámetro y el grosor de la zona pelúcida (P < 0,001) también mejoraron significativamente. Además, los embriones tratados con 4-OHE<sub>2</sub> demostraron un ligero aumento en el metabolismo del embrión como lo indica la reducción de AB, aunque no significativo en comparación con los embriones de FIV cultivados en KSOM (**Tabla II**). Aunque estos resultados difirieron significativamente en comparación con los embriones en el útero, la adición de 4-OHE<sub>2</sub> a los embriones de FIV en la etapa de mórula mejoró su calidad en comparación con los embriones de FIV cultivados en medios KSOM convencionales (**Tabla II**).

**Tabla II** Efectos del 4-OHE<sub>2</sub> sobre algunas características de la calidad del embrión de ratón.

	FIV		FIV+4-OHE <sub>2</sub> (MaB)		IU	
	N	Céls (Media±DE)	N	Céls (Media±DE)	N	Céls (Media±DE)
Tasa de eclosión (%)	97	23.71	114	37.72	109	65.8
Reducción AB (%)	37	1.4 ± 1.1***	19	1.8 ± 1,8***	17	9.5 ± 8.9
Diámetro (µm)	107	82.7 ± 7.7***	154	86 ± 9.3***, a	90	95.9 ± 10.5
Espesor ZP (µm)	107	7.6 ± 1.4***	154	6.9 ± 1.8***, b	90	5.7 ± 1.5

AB, alamarBlue;

ZP, zona pelúcida.

DE, Desviación estándar

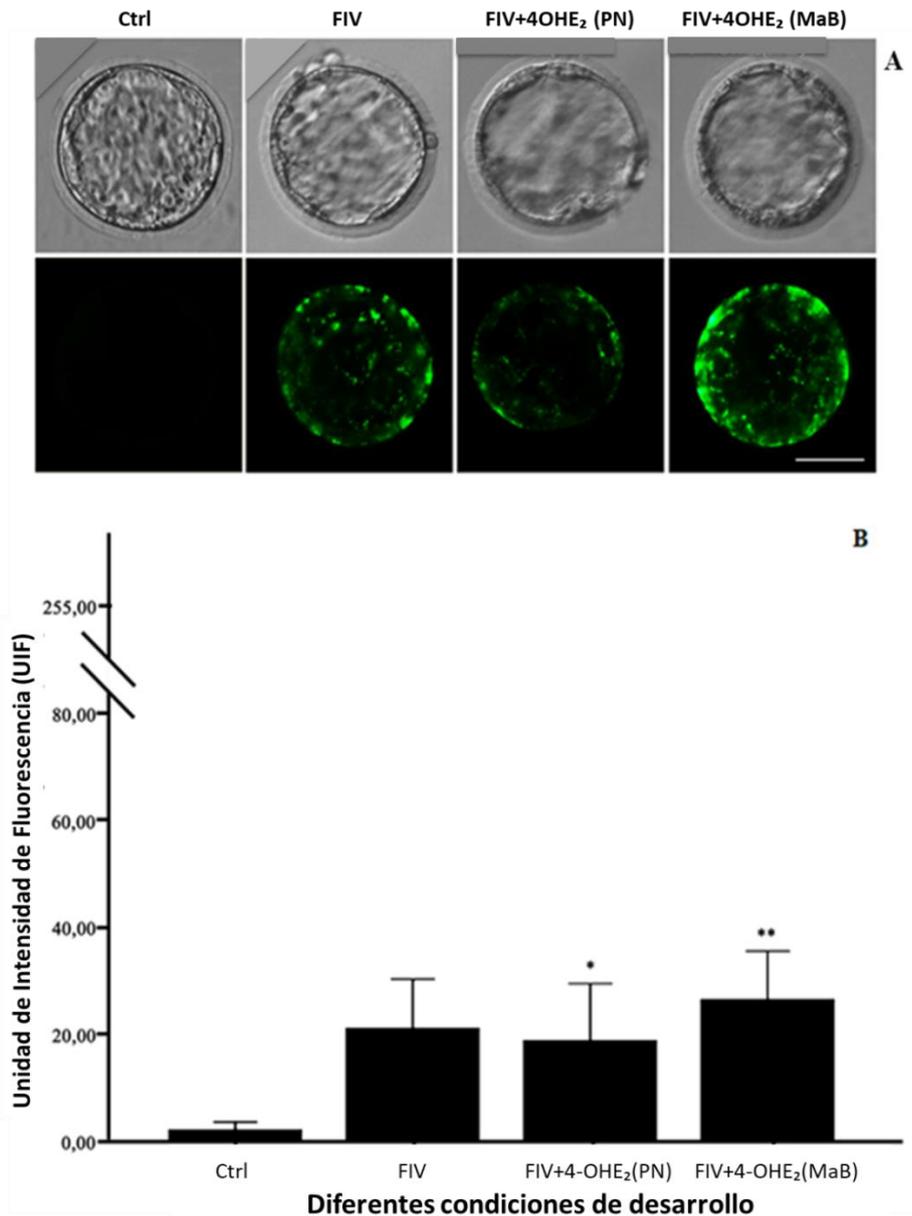
\*\*\*P < 0,001 frente a IU

<sup>a</sup> P < 0,05

<sup>b</sup> P < 0,01 frente a FIV, ANOVA y prueba de Tukey.

### Efectos del 4-OHE<sub>2</sub> exógeno sobre la capacidad de unión al EGF del embrión de embriones obtenidos *in vitro*

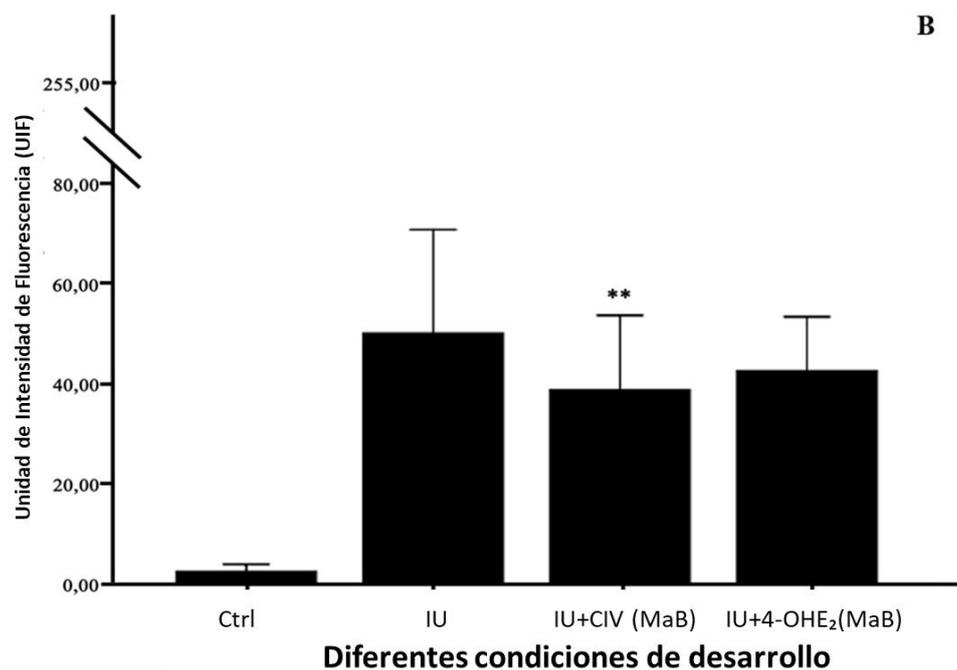
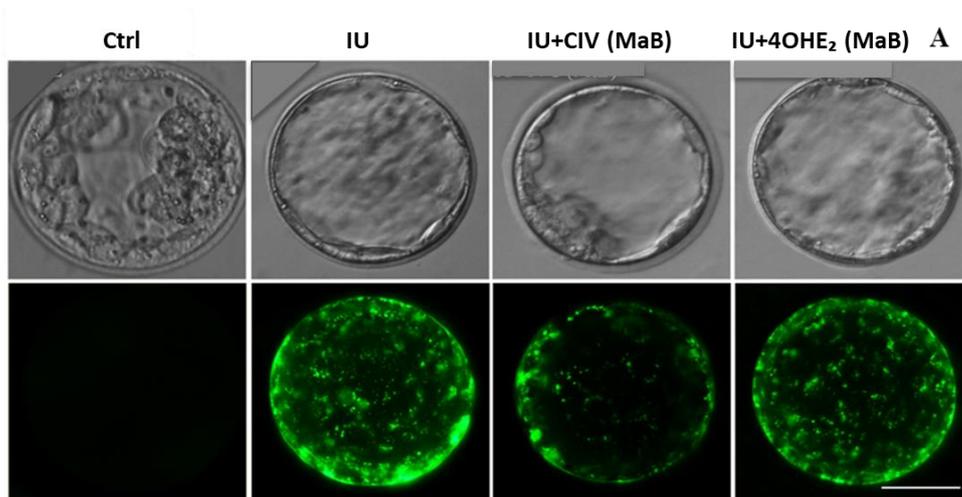
Para determinar si los catecolestrógenos exógenos podrían mejorar la capacidad de unión a EGF de los embriones obtenidos *in vitro*, se añadió 4-OHE<sub>2</sub> [1 mg/ml] al medio de cultivo, seguido de incubación con EGF conjugado con Alexa Fluor 488. En presencia de 4-OHE<sub>2</sub> durante las primeras etapas de desarrollo (desde la fecundación hasta pronúcleo (PN); (grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (PN)), el cultivo de embriones obtenido *in vitro* demostró una disminución significativa en la capacidad de unión de EGF (p < 0,05); sin embargo, la presencia de 4-OHE<sub>2</sub> durante las últimas etapas del desarrollo previo a la implantación (desde la mórula hasta la etapa de blastocisto; grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB)) demostró un aumento estadísticamente significativo en la unión de EGF (p < 0.001) en comparación con embriones obtenidos del útero desarrollados en un medio de cultivo convencional (KSOM) (**Figura 4, Figura complementaria 1**). Además, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> no pudieron emular los resultados producidos con 4-OHE<sub>2</sub> en embriones de FIV, lo que indica que este aumento en la unión de EGF es específico para el catecolestrógeno (**Figura complementaria 2**).



**Figura 4. Capacidad de unión a EGF de embriones de ratón FIV desarrollados en diferentes condiciones de cultivo.** Grupo FIV: embriones obtenidos *in vitro* y completamente desarrollados en medios de cultivo convencionales. n = 30; Grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (PN): embriones obtenidos *in vitro* cultivados con 4-OHE<sub>2</sub> desde la fecundación hasta la etapa pronuclear. n = 32; Grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB): embriones obtenidos *in vitro* cultivados con 4-OHE<sub>2</sub> desde la mórula hasta el estadio de blastocisto n = 31. Estos grupos se cultivaron con EGF conjugado con Alexa Fluor 488 durante 2 h. El grupo control (Ctrl) incluyó embriones de FIV cultivados en ausencia de EGF conjugado con Alexa Fluor 488. Barra de escala: 50 mm. **(A)** Imágenes representativas, tomadas con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U, de embriones de cada grupo. **(B)** Análisis de intensidad de fluorescencia. Los datos representan valores medios dentro de una escala de 0 a 255 unidades de intensidad de fluorescencia (UIF). \*P < 0,05 y \*\*P < 0,001 frente al grupo de FIV; Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Las barras de error representan DE (desviación estándar).

## **Efectos del 4-OHE<sub>2</sub> exógeno sobre la capacidad de unión de EGF de embriones extraídos del útero durante las últimas etapas del desarrollo previo a la implantación**

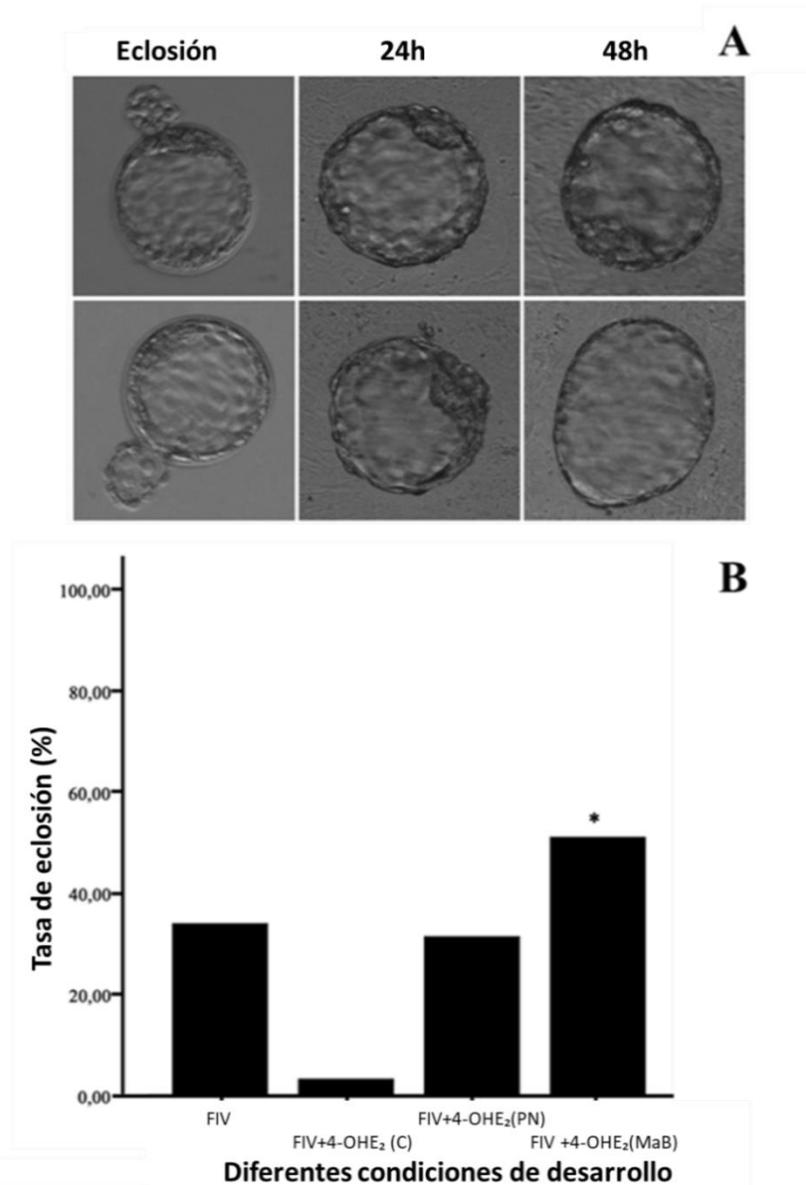
Para analizar la importancia de las condiciones del cultivo en las últimas etapas del desarrollo del embrión preimplantacional, se comparó la capacidad de unión de EGF entre embriones completamente desarrollados en el útero hasta el estadio de blastocisto (grupo IU) y embriones desarrollados en el útero hasta el estadio de mórula y luego cultivado *in vitro* (grupo CIV) hasta el estadio de blastocisto en ausencia (grupo IU + CIV (MaB)) o presencia (grupo IU + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB)) de 4-OHE<sub>2</sub> exógeno. Los resultados mostraron que los embriones desarrollados en el útero, extraídos en la etapa de mórula y luego cultivados *in vitro* desde la mórula hasta la etapa de blastocisto en KSOM, presentaron una disminución estadísticamente significativa en su capacidad para unir EGF en comparación con los embriones completamente desarrollados en el útero ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, cuando las mórulas desarrolladas en el útero se extrajeron del conducto femenino y luego se cultivaron hasta la etapa de blastocisto en presencia de 4-OHE<sub>2</sub> exógeno, la capacidad final para unirse a EGF se restauró parcialmente (**Figura 5**).



**Figura 5. Capacidad de unión a EGF de embriones de ratón obtenidos del útero y desarrollados en diferentes condiciones de cultivo en las últimas etapas del desarrollo previo a la implantación.** Grupo IU: embriones extraídos del útero en estadio de blastocisto. n = 30; Grupo IU + CIV (MaB): embriones extraídos del útero en estadio de mórula y cultivados *in vitro* en KSOM hasta el estadio de blastocisto. n = 32; Grupo IU + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB): embriones extraídos del útero en estadio de mórula y cultivados con 4-OHE<sub>2</sub> hasta el estadio de blastocisto. n = 30. Estos grupos se cultivaron con EGF conjugado con Alexa Fluor 488. El grupo de control (Ctrl) consistió en embriones extraídos del útero y cultivados en ausencia de EGF conjugado con Alexa Fluor 488. Barra de escala: 50 mm. **(A)** Imágenes representativas, tomadas con un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U, de embriones de cada grupo. **(B)** Análisis de intensidad de fluorescencia. Los datos representan la media dentro de una escala de 0 a 255 UIF. \*\*P<0,001 frente al grupo de IU; Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon. Las barras de error representan DE.

## Efectos del 4-OHE<sub>2</sub> exógeno en las tasas de implantación de embriones en un modelo *in vitro*

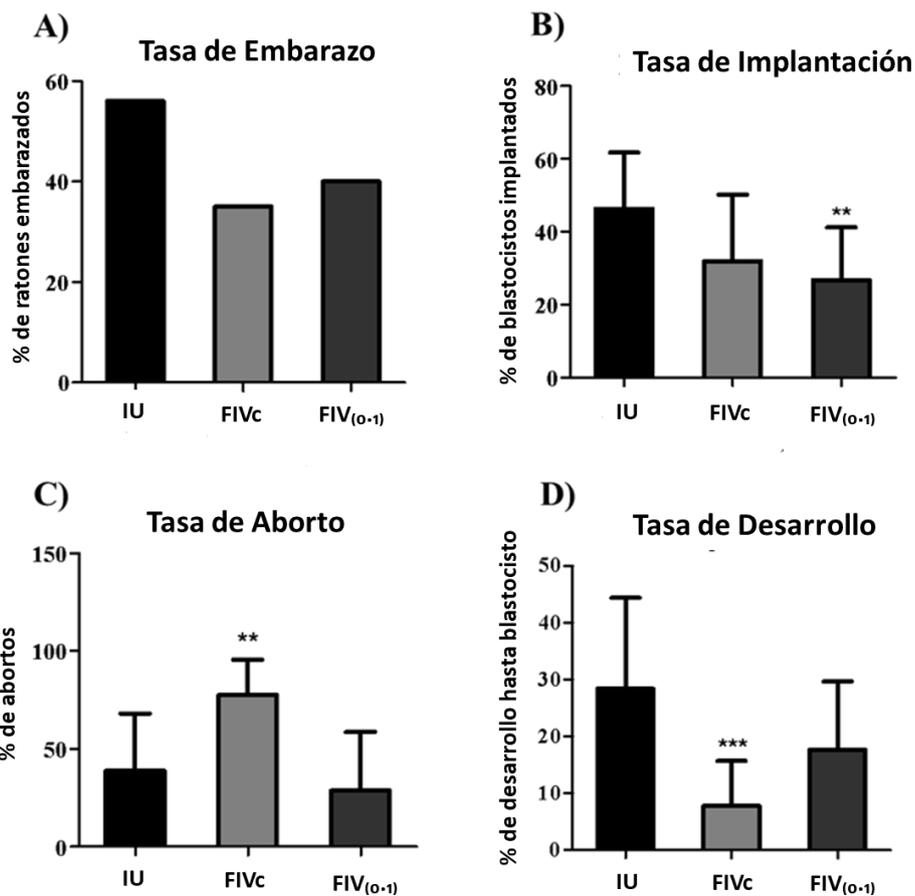
Durante diferentes fases del desarrollo del embrión, se añadió 4-OHE<sub>2</sub> exógena a los medios de cultivo; a continuación, los blastocistos se colocaron sobre una monocapa de células endometriales para probar la capacidad de unión. Los efectos del 4-OHE<sub>2</sub> sobre la capacidad de unión del embrión diferían según la etapa de desarrollo embrionario. El cultivo de embriones obtenidos *in vitro* suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> solo durante las primeras etapas de desarrollo (durante la fecundación y la fase PN) no demostró un efecto significativo en la tasa de fijación *in vitro*; sin embargo, la suplementación con 4-OHE<sub>2</sub> durante las últimas etapas del desarrollo previo a la implantación (desde la mórula hasta el blastocisto) demostró un aumento estadísticamente significativo en la tasa de unión *in vitro* ( $P < 0,05$ ). Curiosamente, el cultivo de embriones suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> durante todo el proceso de cultivo bloqueó la mayoría de los embriones en la etapa de 2 células (grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub>(C)) (**Figura 6**). También hemos comprobado en este caso que la mejora en la implantación *in vitro* es específica para 4-OHE<sub>2</sub>, ya que los embriones tratados con E<sub>2</sub> o P<sub>4</sub> no muestran una mayor adhesión a las células endometriales (**Figura complementaria 3**).



**Figura 6. Ensayo de unión de embriones *in vitro*.** (A) Imágenes de microscopía de blastocistos de ratón. De izquierda a derecha: ejemplos de blastocistos en eclosión; blastocistos unidos a células endometriales después de 24 h de cocultivo y después de 48 h. En cada columna se muestran dos embriones representativos. (B) Porcentaje (%) de tasas de fijación de embriones de ratón desarrollados en diferentes condiciones de cultivo. Grupo FIV: embriones obtenidos *in vitro* y completamente desarrollados en medios de cultivo convencionales n = 30. n = 34; Grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (C): embriones obtenidos *in vitro* cultivados con medios suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> desde el estadio pronuclear hasta el de blastocisto. n = 31; Grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (PN): embriones obtenidos *in vitro* cultivados con medios suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> desde el estadio pronuclear hasta el de 2 células. n = 31; Grupo FIV + 4-OHE<sub>2</sub> (MaB): embriones obtenidos *in vitro* cultivados con medios suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> desde la mórula hasta el estadio de blastocisto. n = 32. \*P < 0,05 versus grupo de FIV; Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.

## Efectos del 4-OHE<sub>2</sub> exógeno en las tasas de implantación de embriones en un modelo *in vivo*

Para investigar el efecto de la suplementación con 4-OHE<sub>2</sub> en embriones durante las últimas etapas del desarrollo embrionario en un modelo *in vivo*, y determinar si los resultados obtenidos se correlacionan con los observados en nuestro modelo de implantación *in vitro*, blastocistos de FIV cultivados en KSOM convencional (grupo FIVc) o 0,1 mg/ml de 4-OHE<sub>2</sub> (grupo FIV<sub>(0.1)</sub>), así como blastocistos extraídos directamente del útero del grupo de ratones hembras B6D2 (IU), se transfirieron a ratones hembras ICR en días 3.5–4 de pseudopreñez. En cada grupo, se determinó el número de ratones preñados y se calculó la tasa de preñez (**Figura 7, Tabla III**). Para determinar más datos del modelo *in vivo*, los resultados se calcularon considerando solo ratones hembras que lograron el embarazo y la cantidad de blastocistos transferidos inicialmente a esas hembras.



**Figura 7. Resultados de la transferencia de embriones de ratón a madres receptoras ICR. (A)** Se muestran las tasas de embarazo, **(B)** implantación, **(C)** aborto y **(D)** desarrollo. Grupo IU: embriones desarrollados en el útero hasta el estadio de blastocisto. n = 237; Grupo FIVc: embriones obtenidos *in vitro* cultivados en medios convencionales. n = 245; Grupo FIV<sub>(0.1)</sub>: embriones obtenidos *in vitro* cultivados con medios suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> desde la mórula hasta el estadio de blastocisto. n = 247. \*\*P < 0,001 y \*\*\*P < 0,0001 frente al grupo de IU; Prueba de Tukey. Las barras de error representan DE.

**Tabla III** Resultados de la tasa de embarazo, implantación, aborto y desarrollo.

	IU	FIV <sub>c</sub>	FIV <sub>(0.1)</sub>
<b>Tasa de embarazo</b>	56%	35%	40%
<b>Tasa de implantación</b>	46.34%	32.04%	26.77%**
<b>Tasa de aborto</b>	39.83%	77.46%**	28.71%
<b>Tasa de desarrollo</b>	28.41%	7.77%***	17.69%

Resultados calculados como porcentaje de los embriones obtenidos en el útero (IU), FIV cultivados en medios KSOM normales (FIV<sub>c</sub>) y FIV cultivados con 4-OHE<sub>2</sub> (FIV<sub>(0.1)</sub>), transferidos a madres receptoras que dieron como resultado un embarazo y se implantó en el útero y comenzó el desarrollo, y los que resultaron en un aborto.

\*\* P < 0,001

\*\*\*P < 0,0001 frente a IU. Prueba de tukey

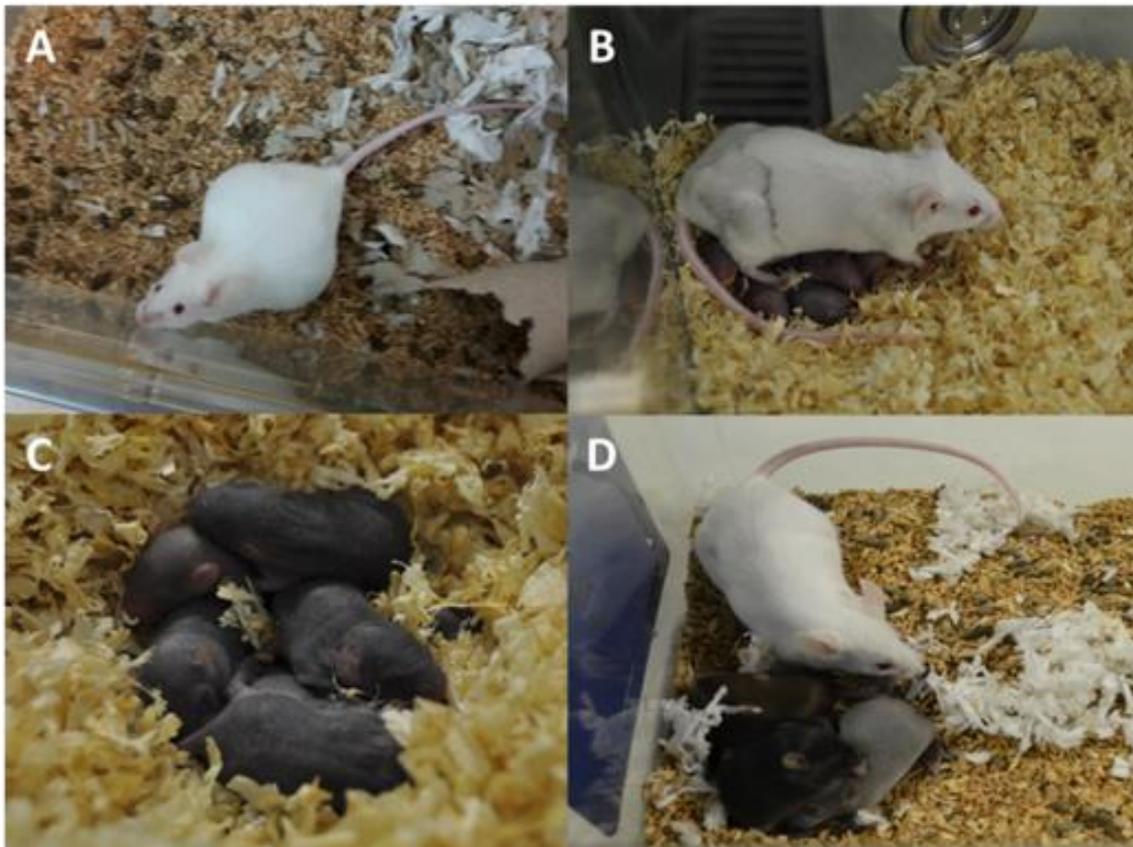
Como el embarazo en ratones dura 21 días, los ratones preñados se sacrificaron el día 15 después de la transferencia. Después de disecar el útero, se determinó el número de blastocistos implantados en el útero en los tres grupos; Grupo IU, grupo FIV<sub>c</sub> y grupo FIV<sub>(0.1)</sub> (**Figura 7A, Tabla III**).

La **Tabla III** presenta la diferencia estadística determinada al comparar el grupo IU con el grupo FIV<sub>c</sub> o el grupo FIV<sub>(0.1)</sub> y no hubo diferencias significativas entre los grupos FIV<sub>c</sub> y FIV<sub>(0.1)</sub>. La tasa de implantación fue mayor en el grupo IU que en los grupos FIV<sub>c</sub> o FIV<sub>(0.1)</sub>; sin embargo, la diferencia fue estadísticamente significativa solo cuando se comparó el grupo IU con el grupo FIV<sub>(0.1)</sub>, presentando el primero una tasa de implantación reducida en el modelo *in vivo* (**Figura 7B, Tabla III**).

Sobre la base de los blastocistos que se implantaron en el útero de las madres receptoras, se determinaron las tasas de aborto y desarrollo embrionario mediante la observación de las placentas embrionarias. Las placentas hemorrágicas se determinaron como fetos no viables y su número se utilizó para calcular la tasa de aborto (**Figura 7C, Tabla III**). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos IU y FIV<sub>c</sub> (\*\*P< 0,01). Sin embargo, los resultados obtenidos del grupo FIV<sub>(0.1)</sub> fueron similares a los obtenidos en el grupo IU. Por el contrario, se utilizó el número de embriones implantados en el útero de los ratones y que presentaban una placenta sin sangre con líquido amniótico claro para calcular la tasa de desarrollo del embrión implantado (**Figura 7D, Tabla III**). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos IU y FIV<sub>c</sub> (\*\*\*P< 0,001), pero no entre los grupos IU y FIV<sub>(0.1)</sub>. De hecho, el número de fetos viables fue mucho mayor en el grupo FIV<sub>(0.1)</sub>

que en los embriones FIV no tratados con 4-OHE<sub>2</sub> (FIVc), demostrando una similitud considerable con el grupo IU, aunque no se observaron diferencias significativas.

Como experimento adicional, seis ratones hembras ICR transferidas con blastocistos tratados con 4-OHE<sub>2</sub> llevaron el embarazo a término y dieron a luz. En total, esto resultó en 13 nacidos vivos. La **Figura 8A** muestra una de las madres receptoras durante el embarazo y la descendencia obtenida de los blastocistos transferidos en diferentes días posteriores al parto (**Figura 8B-D**). La descendencia vivió durante 2 años, lo que corresponde a la esperanza de vida normal de los ratones, sin que se observaran malformaciones ni defectos. Además, se evaluó su fertilidad apareándolos, y todos, tanto hembras como machos, pudieron producir descendencia (datos no mostrados).

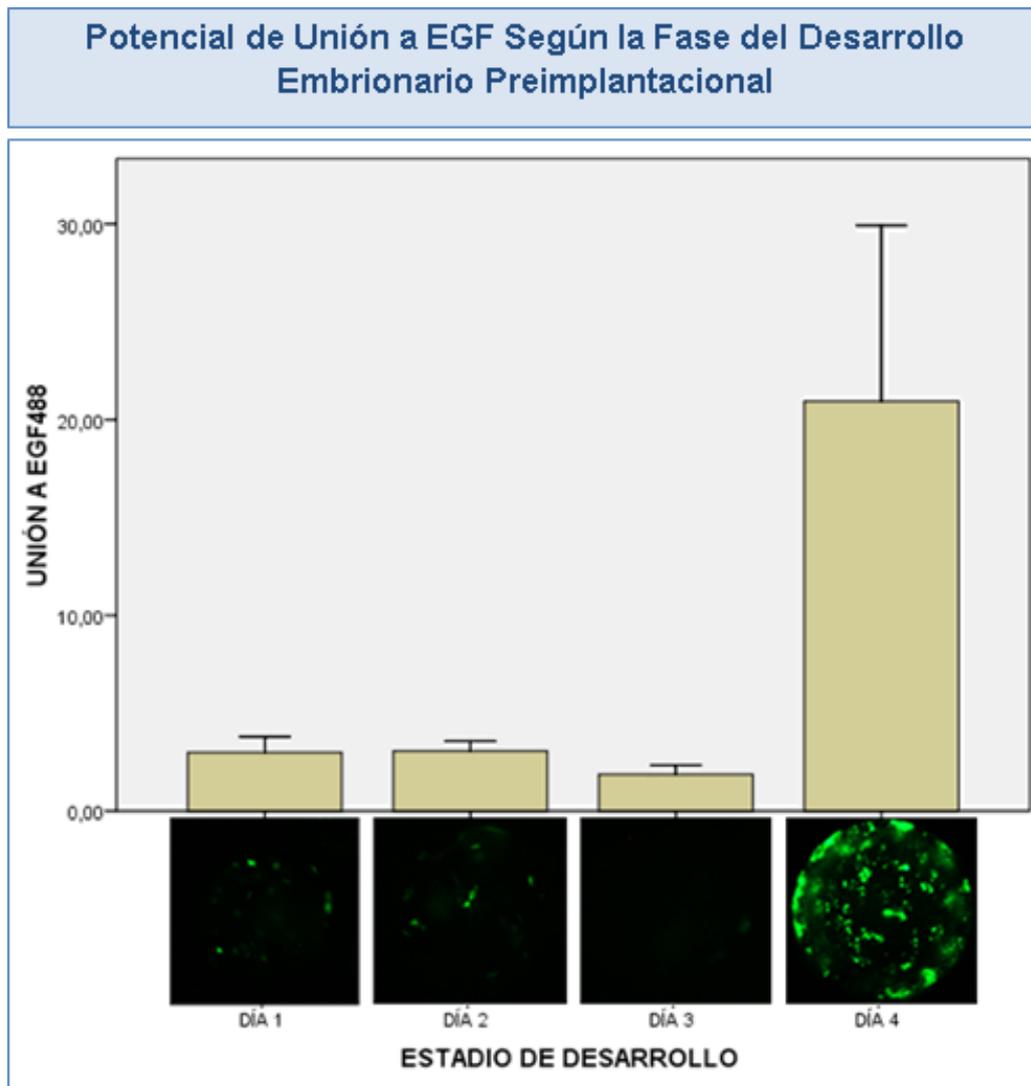


**Figura 8.** Imágenes de una madre receptora ICR y crías nacidas tras la transferencia de embriones obtenidos *in vitro* cultivados en presencia de 4-OHE<sub>2</sub> desde la mórula hasta el estadio de blastocisto. **(A)** Madre receptora embarazada en el día 19 de embarazo. **(B)** descendencia B6D2 recién nacida. **(C)** Descendencia B6D2 5 días después del nacimiento. **(D)** Descendencia B6D2 16 días después del nacimiento.

Además, no se observaron eventos adversos durante este estudio. Todos los ratones respondieron bien a la estimulación hormonal y las transferencias de embriones, así como después del parto.

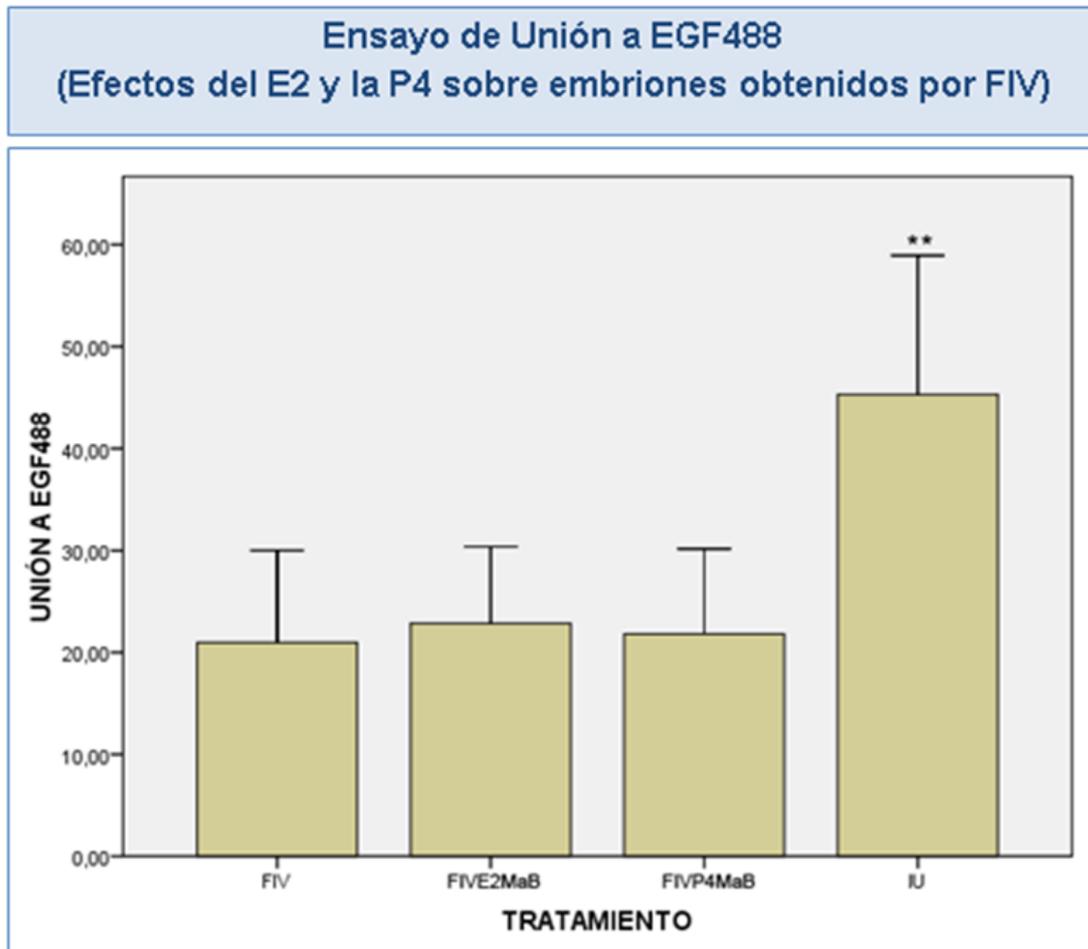
### 1.3. Material suplementario

**Figura complementaria 1**



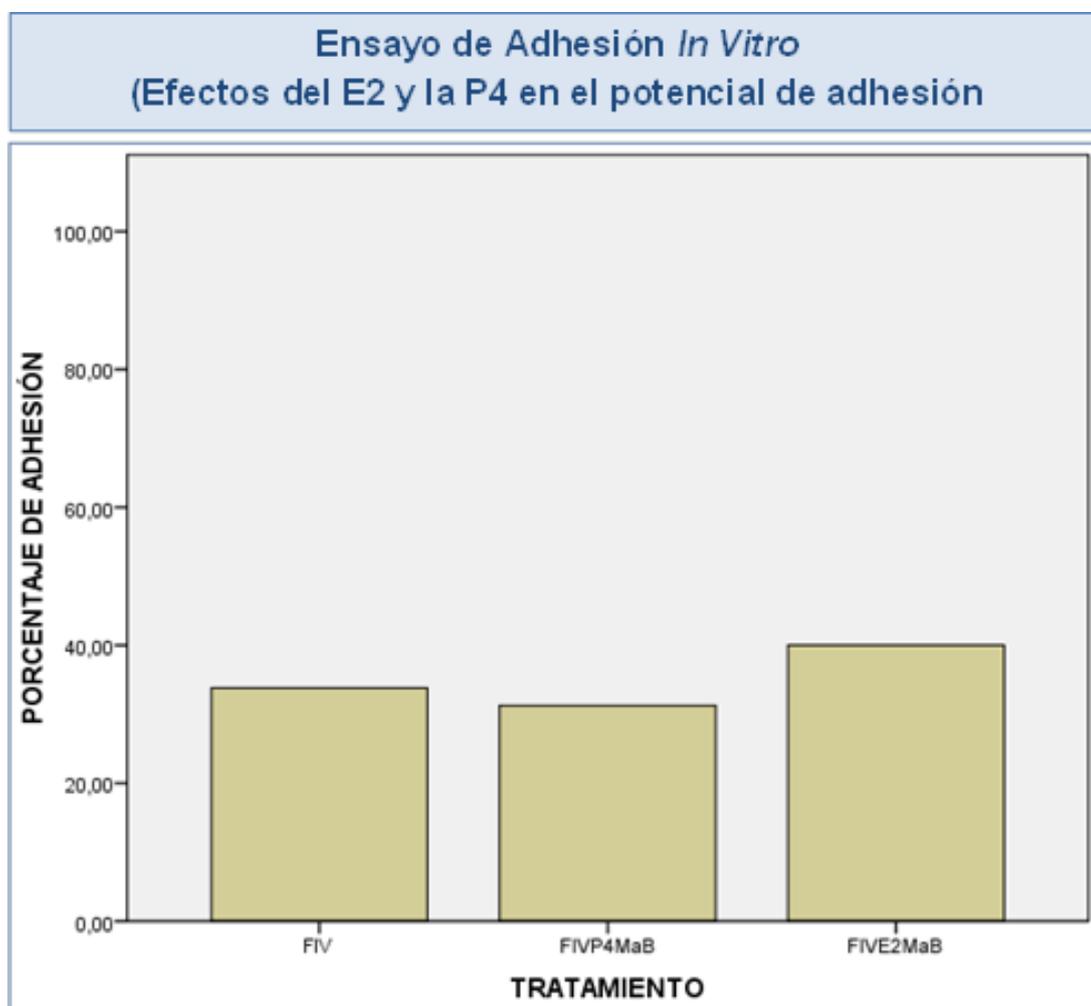
**Figura complementaria 1.** Ensayo de sensibilidad frente al EGF durante el desarrollo embrionario preimplantacional. (Día 1) Embriones de 2-4 células, (Día 2) Embriones de 8-16 células, (Día 3) Mórula-Mórula compactada y (Día 4) Estadio de blastocisto.

Figura complementaria 2



**Figura complementaria 2.** Ensayo de sensibilidad frente al EGF. (FIV) Conjunto de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (promedio de unión a EGF488= 21,2/255); (E<sub>2</sub>) embriones obtenidos por FIV y cultivados 24 h desde mórula a blastocisto en un medio enriquecido con E<sub>2</sub> [5µg/ml] (promedio de unión a EGF= 22,8/255); (P<sub>4</sub>) embriones obtenidos por FIV y cultivados 24 h desde mórula a blastocisto en un medio enriquecido con P<sub>4</sub> [5µg/ml] (promedio de unión a EGF= 21,8/255); (IU) grupo de embriones obtenidos en estadio de blastocisto directamente del útero materno (promedio de unión al EGF= 50,2/255). Los datos han sido analizados estadísticamente utilizando la prueba Mann-Whitney-Wilcoxon para comprobar la efectividad del tratamiento.

Figura complementaria 3



**Figura complementaria 3.** Ensayo de adhesión embrionaria *in vitro*. (FIV) embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, (FIVP<sub>4</sub>MaB) embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados de mórula a blastocisto en un medio enriquecido con P<sub>4</sub> [5µg/ml], (FIVE<sub>2</sub>MaB) embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados de mórula a blastocisto en un medio enriquecido con E<sub>2</sub> [5µg/ml]. Para determinar las diferencias entre las medias se ha aplicado la prueba estadística “ANOVA”.

## **CAPÍTULO II**



## **2. CAPÍTULO II: La suplementación del medio de cultivo con quercetina mejora la calidad embrionaria de los blastocisto de ratón y aumenta la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ .**

### **2.1. Materiales y métodos**

#### **Animales**

Se utilizaron ratones hembras híbridas B6D2F1/J (C57BL/6J01aHsd x DBA/201aHsd, Envigo RMS, Holanda) como donantes de ovocitos y embriones, y ratones machos híbridos B6D2F1/J como donantes de semen. Todos los ratones tenían entre 8 y 12 semanas de edad. Los animales se alojaron en el animalario del Centro de Cirugía de Mínima Invasiva Jesús Usón (certificado por ES100370001499) en condiciones controladas, 12 h luz: 12 h oscuridad, 20-25 °C de temperatura y 40-70 % de humedad relativa, con comida y agua ad libitum. Los machos se alojaron individualmente en jaulas, mientras que las hembras se alojaron en grupos de 2 o 4 por jaula, y fueron controladas por el veterinario durante toda la realización de este trabajo. No se controlaron los factores de confusión. El número de animales utilizados para los experimentos se dividió de la siguiente manera: se utilizaron 60 hembras para obtener embriones por FIV y tratarlos con quercetina durante largos períodos de tiempo para estudiar el potencial de desarrollo; Se utilizaron 11 hembras para obtener embriones por FIV y tratarlos con quercetina por períodos cortos de tiempo y para analizar el potencial de desarrollo, el número de células, la tasa de apoptosis y la expresión de HIF-1 $\alpha$ ; Se utilizaron 11 hembras para obtener embriones en el útero y tratarlos con quercetina por períodos cortos de tiempo y analizar los mismos parámetros que antes. Esto significa un total de 82 hembras utilizadas en este trabajo, junto con un total de 40 machos. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura según el RD 53/2013, de 1 de febrero, y todos los procedimientos siguieron los principios rectores de la investigación con animales de acuerdo con la Guía de cuidados del Instituto de Investigación con Animales de Laboratorio (ILAR) y Uso de Animales de Laboratorio, y el Reglamento Español (RD1201/2005).

## **Recolección de embriones *in útero* y embriones obtenidos por fecundación *in vitro***

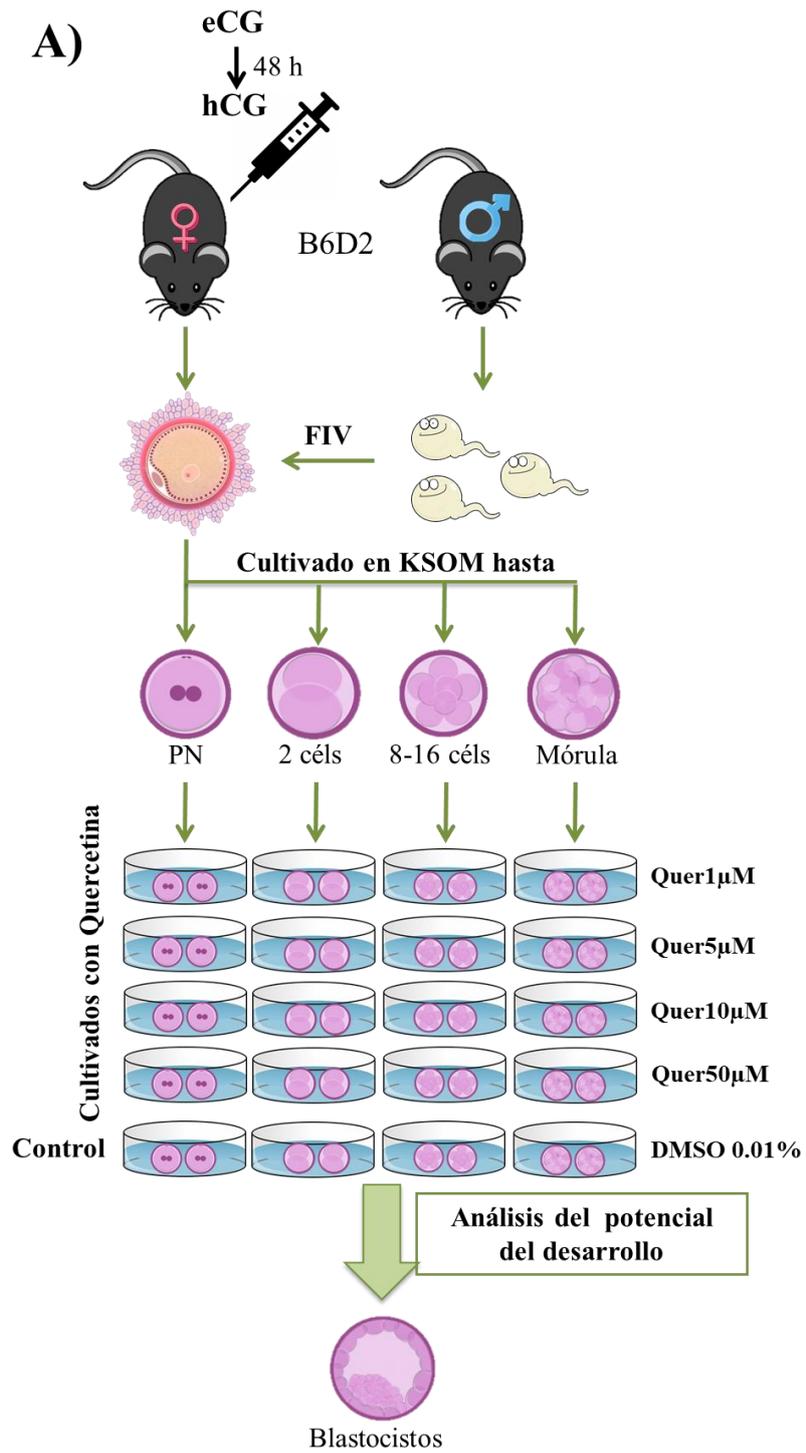
Embriones desarrollados en condiciones fisiológicas: Se estimularon ratones hembras adultas con 8 UI de eCG (gonadotropina coriónica equina; Syncrostim, CEVA Salud Animal, S.A. Barcelona, España) y 48 horas después, con 8 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana; Veterin Corion, Divisa Farmavic, S.A. Barcelona, España). Las hembras se aparearon con machos fértiles de la misma edad y raza para inducir el embarazo (1♂:1♀) durante la noche. El embarazo se confirmó mediante la visualización del tapón vaginal en el día 1 del desarrollo del embrión. Las hembras se sacrificaron 72 h y 96 h después de la inyección de hCG por dislocación cervical y los embriones en desarrollo se recuperaron en medio optimizado simplex de potasio (KSOM; Merck Millipore, Madrid, España) después de lavar el útero con medio M2 (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).

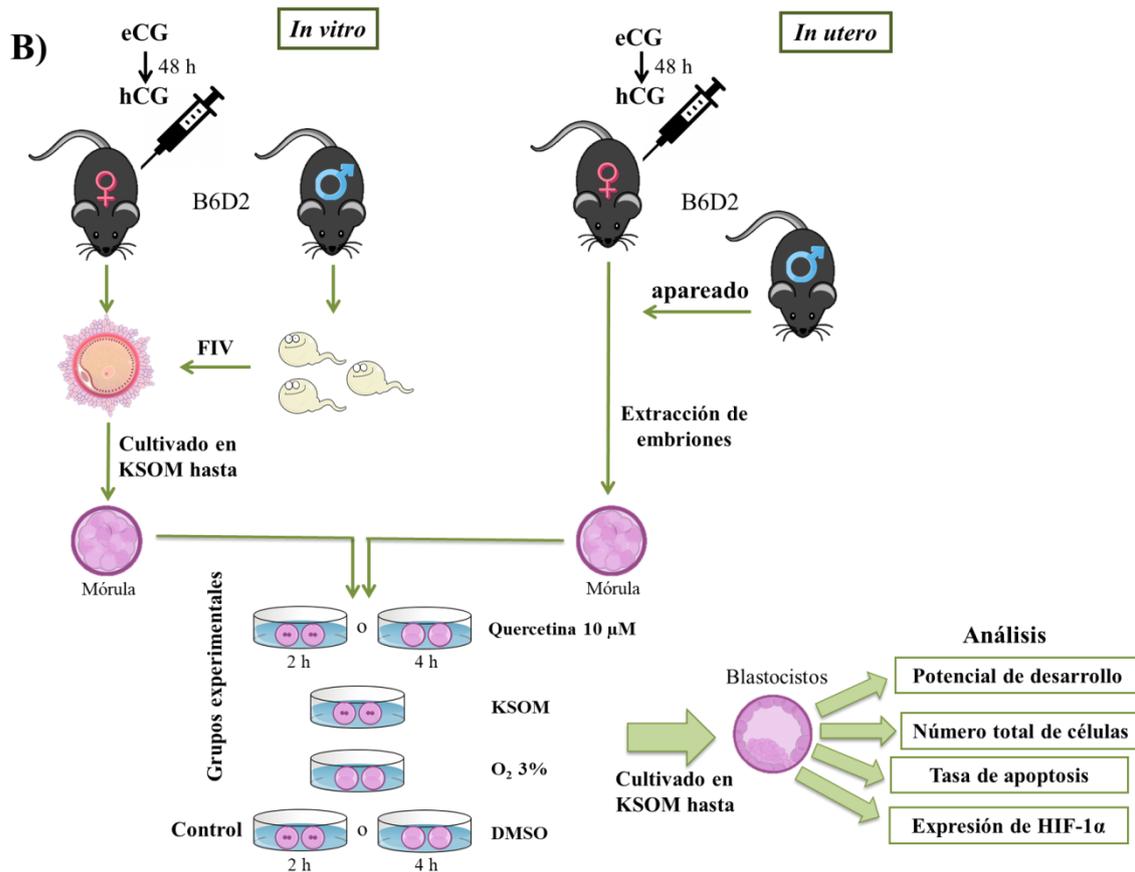
Embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV): Se estimularon ratones hembras adultas con 8 UI de eCG y 48 horas después, con 8 UI de hCG. Para realizar la FIV, los ratones machos fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron espermatozoides de los epidídimos caudales y luego se incubaron en medio HTF (fluido tubárico humano) para permitir la capacitación. Se recuperaron ovocitos maduros de la ampolla del oviducto de hembras sacrificadas por dislocación cervical 12 h después de la inyección de hCG y se colocaron en medio HTF. La inseminación se realizó con espermatozoides capacitados ( $3 \times 10^6$ ) en 600  $\mu$ l de medio HTF que contenía los ovocitos. Los ovocitos fecundados se lavaron y cultivaron en medio KSOM a 37 °C y concentración de O<sub>2</sub> atmosférico (20 %) hasta el momento requerido para los experimentos.

## **Tratamiento de quercetina y cultivo de baja concentración de oxígeno**

La quercetina (Quer; Sigma-Aldrich, Barcelona, España) diluida en DMSO (0,01 %) (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) a diferente concentración (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M), se añadió al medio de cultivo en diferentes etapas de desarrollo (etapa de pronúcleo (PN), 2 células, 8-16 células y mórulas), y luego se cultivaron los embriones hasta la etapa de blastocisto, a 37 °C. Para estudiar el efecto del vehículo DMSO se cultivó un conjunto de embriones únicamente con DMSO (0,01 %), y todos los resultados se compararon con embriones cultivados en medio KSOM durante todo el desarrollo (**Figura 1A**).

En base a los resultados obtenidos, realizamos nuevos experimentos exponiendo embriones a quercetina a 10 $\mu$ M por cortos periodos de tiempo. Añadimos este flavonoide al medio de cultivo de embriones en estado de mórula, durante 2 h o 4 h. Estos embriones fueron obtenidos por FIV o desarrollados en el útero (IU) (**Figura 1B**). Luego, los embriones se cultivaron nuevamente en medio convencionales hasta el estadio de blastocisto. A modo de comparación, se cultivaron otros dos grupos de embriones, ambos obtenidos mediante FIV e IU, en medio KSOM o con O<sub>2</sub> al 3 %. Finalmente, una vez que los embriones alcanzaron el día 4.5 de desarrollo, se evaluó el porcentaje de desarrollo embrionario, el número total de células, el número de células apoptóticas y la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  y se compararon con los grupos de control formados por embriones cultivados con DMSO pero sin quercetina durante 2 h o 4 h y luego se cultivaron en medios KSOM hasta el estadio de blastocisto (**Figura 1B**).





**Figura 1: Diagrama del flujo de trabajo del tratamiento de los embriones con quercetina. A.** Tratamiento de los embriones durante largos periodos de tiempo. La parte superior de la imagen muestra cómo se obtuvieron los embriones por fecundación *in vitro* y luego se cultivaron hasta diferentes etapas de desarrollo. Los embriones en diferentes días de desarrollo fueron tratados hasta el estadio de blastocisto con diferentes concentraciones de quercetina, y luego se estudió el potencial de desarrollo (parte inferior). **B.** Tratamiento de los embriones por períodos cortos de tiempo. La parte superior de la imagen muestra la obtención de los embriones para los experimentos, por fecundación *in vitro* (lado izquierdo) o por extracción del útero en estado de mórula (lado derecho). La parte inferior de la imagen explica cómo se trataron los embriones con quercetina, o DMSO para el control, y qué parámetros se analizaron luego.

## Tinción nuclear

Para contar el número total de células, se tiñeron blastocistos fijados al 4 % con praformaldehído (PFA) con 2 µg/ml de Hoechst 33342 (Eugene, OR, EE. UU.) y se examinaron los núcleos usando un microscopio confocal (Nikon Eclipse TE2000-U). El número se analizó utilizando el software Fiji Image-J (1.45q, Wayne Rasband, NIH, EE. UU.).

## **Ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling)**

Las células apoptóticas en los embriones se detectaron usando el kit de detección de muerte celular *in situ* (TUNEL) de Roche (Mannheim, Alemania) usando el protocolo del fabricante y los núcleos se contrastaron con Hoechst 33342 como se describió anteriormente. Las imágenes de fluorescencia se tomaron utilizando el mismo microscopio confocal.

## **Inmunofluorescencia de proteína HIF-1 $\alpha$**

La inmunodetección de HIF-1 $\alpha$  se realizó incubando embriones fijados con una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal HIF-1 $\alpha$  (Novus Biologicals; NB100-105) y utilizando IgG (Inmunoglobulina G) de cabra anti-ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Novus Biologicals; NB720-F) a una dilución de 1:400 como anticuerpo secundario. Los núcleos se contrastaron de nuevo con Hoechst 33342 y los embriones se observaron en un microscopio de barrido láser confocal (Nikon Eclipse TE2000-U). Los embriones de control se procesaron como se describe anteriormente, pero se omitió el anticuerpo primario. La expresión de HIF1- $\alpha$  se analizó de forma cualitativa, para detectar posibles cambios en su expresión.

## **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS (SPSS Onc., Chicago, IL, EE. UU.), y un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Se utilizó ANOVA para comparar la proliferación de embriones, mientras que se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon para comparar la tasa de desarrollo y los resultados del ensayo de túnel. Los datos expresados como porcentajes se analizaron utilizando la prueba  $\chi^2$ .

## 2.2. Resultados

### **Efecto de la quercetina en el potencial de desarrollo de embriones de ratón**

Para investigar el efecto de la quercetina (Quer) en el desarrollo embrionario, primero cultivamos con diferentes concentraciones de quercetina (50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M) cigotos y embriones obtenidos *in vitro* en diferentes etapas de desarrollo hasta que alcanzaron la etapa de blastocisto. Como grupo de control se utilizaron cigotos y embriones cultivados en medio KSOM durante todo el desarrollo. Nuestros resultados muestran que, independientemente de la concentración de Quer, el porcentaje de embriones que llegaron a la etapa de blastocisto fue significativamente menor en comparación con el control (**Tabla I**). Embriones cultivados únicamente con el disolvente de la Quer, DMSO a una concentración de 0,01 %, también se incluyeron en este experimento para analizar el efecto potencial del disolvente en los embriones y el potencial de desarrollo. En comparación con los embriones control, alrededor del 50 % de los embriones alcanzaron el estadio de blastocisto, un número muy superior al de los grupos de embriones tratados con Quer. Esta primera observación indica un efecto negativo o tóxico de la Quer sobre el desarrollo embrionario que no puede atribuirse al disolvente. A pesar de estos resultados, el grupo Quer 10 $\mu$ M presentó el mayor número de embriones que se desarrollaron a blastocisto (**Tabla I**), por lo que decidimos utilizar esta concentración para los estudios posteriores que se muestran a continuación y tratar de contrarrestar este efecto tóxico de la quercetina.

**Tabla I** Desarrollo por fecundación *in vitro* de cigotos o embriones en diferentes estadios en presencia de quercetina, hasta el estadio de blastocisto.

Grupos	% de cigotos/embriones que alcanzan la etapa de blastocisto							
	Etapa Zigoto	Blastocisto	Etapa 2céls	Blastocisto	Etapa 6-8céls	Blastocisto	Etapa Mórula	Blastocisto
Control	102	42(41,18%)	97	40(41,23%)	156	85(54,49%)	131	82(62,59%)
Quer1µM	100	2(2%)***	98	12(12,24%)***	135	12(8,88%)***	127	25(19,68%)***
Quer5µM	96	2(2,08%)***	97	2(2,06%)***	118	8(6,78%)***	125	20(16%)***
Quer10µM	101	2(1,98%)***	97	2(2,06%)***	123	11(8,94%)***	117	28(23,93%)***
Quer50µM	103	9(8,74%)***	97	1(1,03%)***	120	7(5,83%)***	116	24(20,69%)***

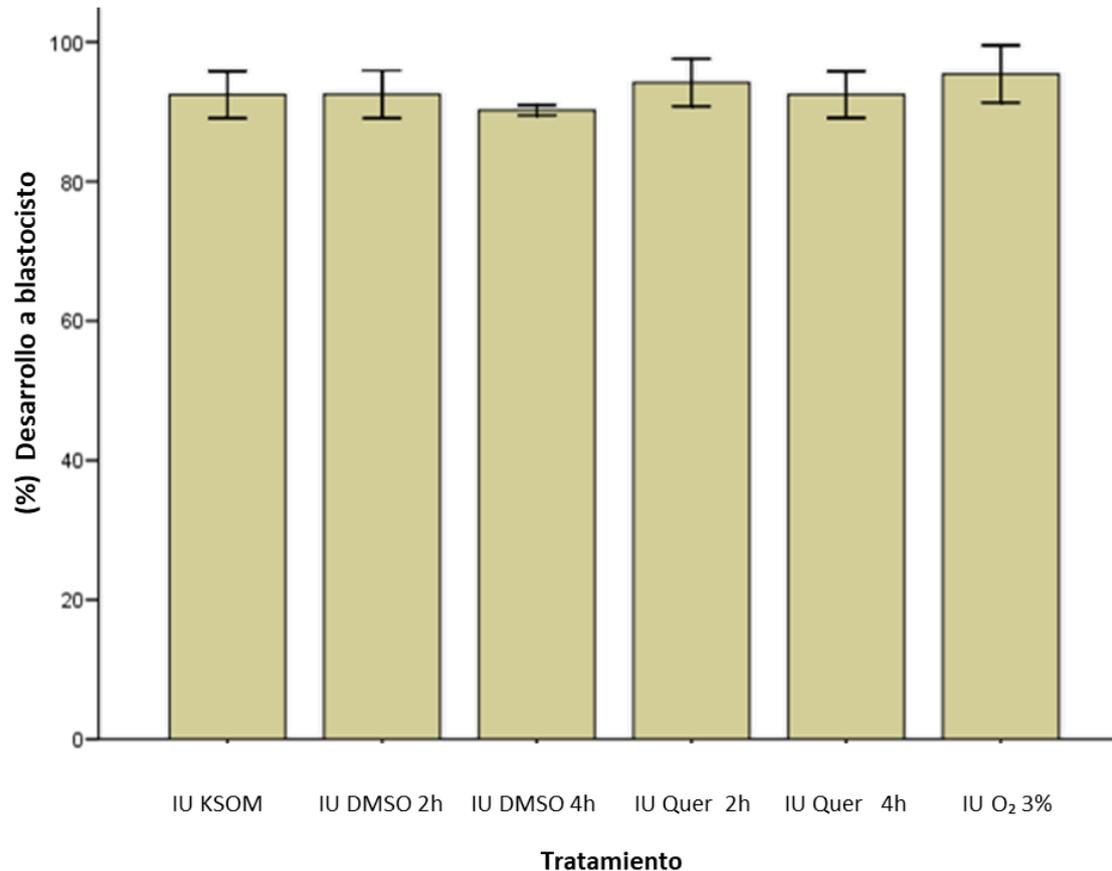
Las diferencias entre los grupos se calcularon utilizando la prueba  $\chi^2$ .

Quer: quercetina.

Céls: células

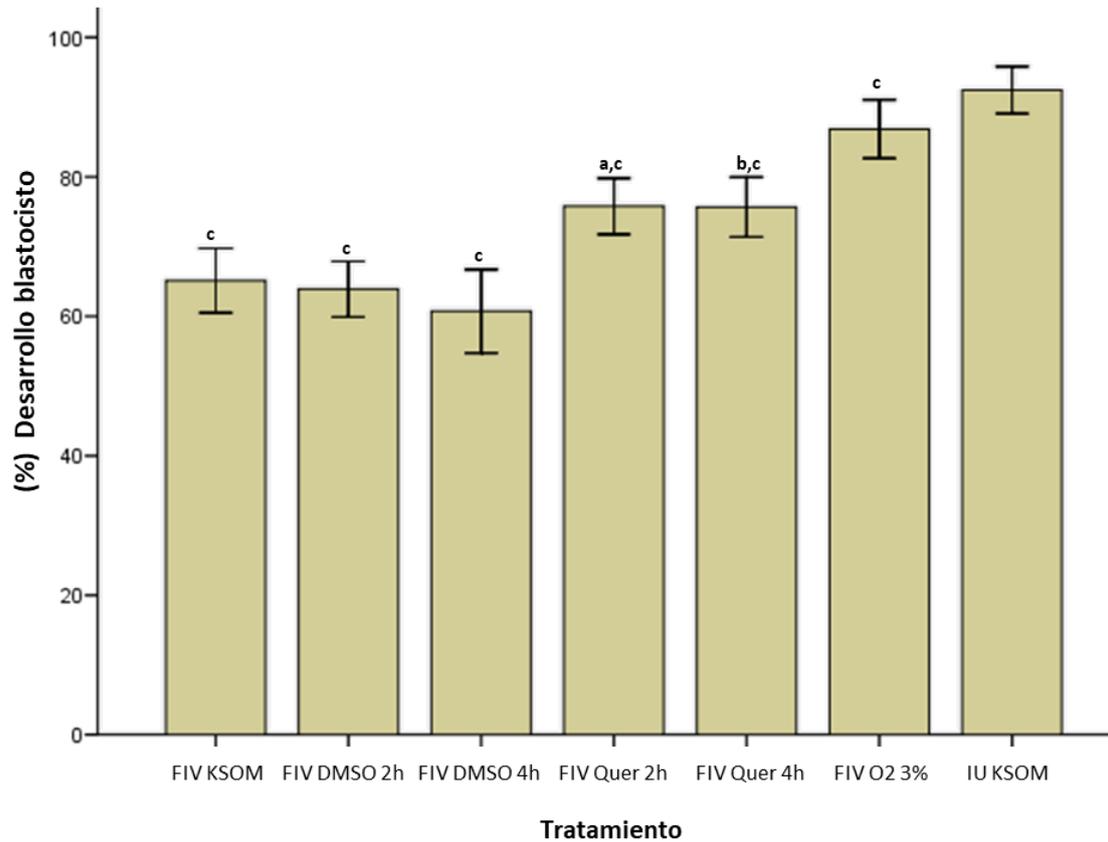
\*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo control.

Con base en los resultados anteriores que muestran un efecto perjudicial de la Quer cuando se usa por largos periodos de tiempo en los medios de cultivo, se cambió el enfoque de este trabajo. En lugar de estudiar el efecto que produce la Quer sobre el potencial de desarrollo cuando se usa a lo largo de todo el cultivo embrionario, decidimos estudiar sus efectos durante intervalos de tiempo cortos (2 h o 4 h) en embriones obtenidos directamente del útero en la etapa de mórula, un etapa crucial en la que los embriones parecen ser menos susceptibles al efecto negativo del tratamiento con Quer/DMSO (**ver datos en la Tabla 1**). Curiosamente, como se puede ver en la **figura 2**, en este caso, la Quer no mostró un efecto perjudicial sobre el potencial de desarrollo del embrión sino más bien beneficioso, con un número similar de embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto que en los embriones de control o tratados con bajo O<sub>2</sub>.



**Figura 2: Resultados del efecto del cultivo de quercetina durante 2 horas o 4 horas en el desarrollo preimplantacional de embriones obtenidos *in utero* en estado de mórula.** Grupo IU KSOM: embriones obtenidos del útero en estado de mórula y desarrollados a blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 26. Grupo IU DMSO 2h: embriones obtenidos del útero en estado de mórula y cultivados con DMSO durante 2 horas, n = 24. Grupo IU DMSO 4h: embriones obtenidos del útero en estado de mórula y cultivados con DMSO durante 4 horas, n = 24. Grupo IU Quer 2 h: embriones obtenidos del útero en estado de mórula y cultivados con quercetina durante 2 horas, n = 18. Grupo UI Quer 4h: embriones obtenidos del útero en estado de mórula y cultivados con quercetina durante 4 horas, n = 24. Grupo IU O<sub>2</sub> 3 %: embriones obtenidos del útero en estado de mórula y cultivados en bajo O<sub>2</sub> concentraciones hasta el estado de blastocisto, n = 15. Los datos se representan como la media ± la DE (desviación estándar).  $p > 0.05$  para todos los análisis estadísticos. Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.

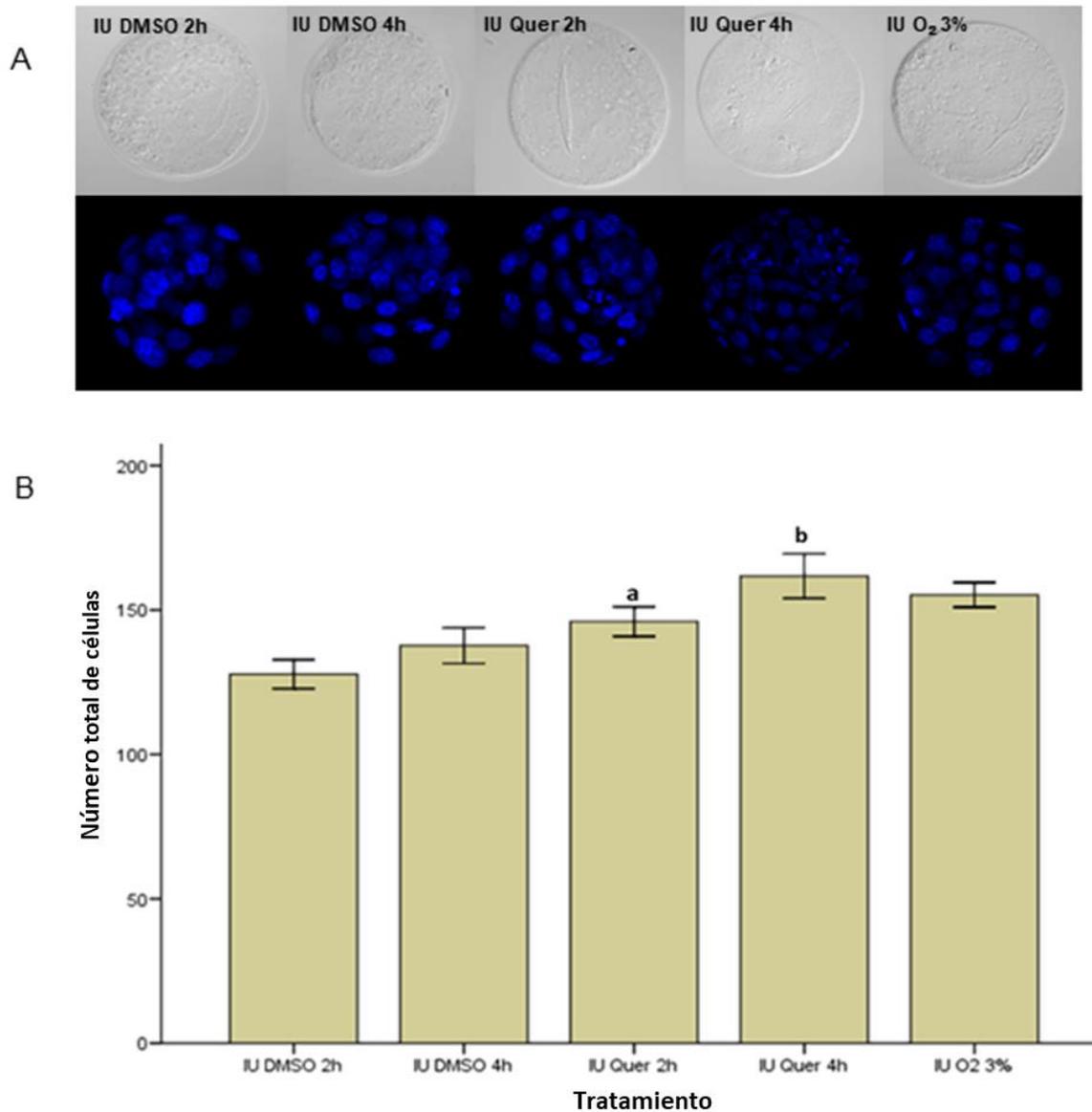
Por lo tanto, estudiamos más a fondo el efecto de la Quer en embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, cultivados hasta la etapa de mórula en medio KSOM y luego tratados con Quer durante 2 o 4 h. Nuestros resultados indican que existen diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos experimentales (**Figura 3**) a favor de los embriones cultivados con Quer, tanto de 2 como de 4 h. También se incluyeron para comparación embriones cultivados en baja concentración de oxígeno (grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %), observándose que se comportan de manera similar a los desarrollados hasta mórula en el útero (grupo IU KSOM), y en todos los casos experimentales los embriones tenían una mayor potencial de desarrollo que los cultivados en medio KSOM convencional (grupo FIV KSOM).



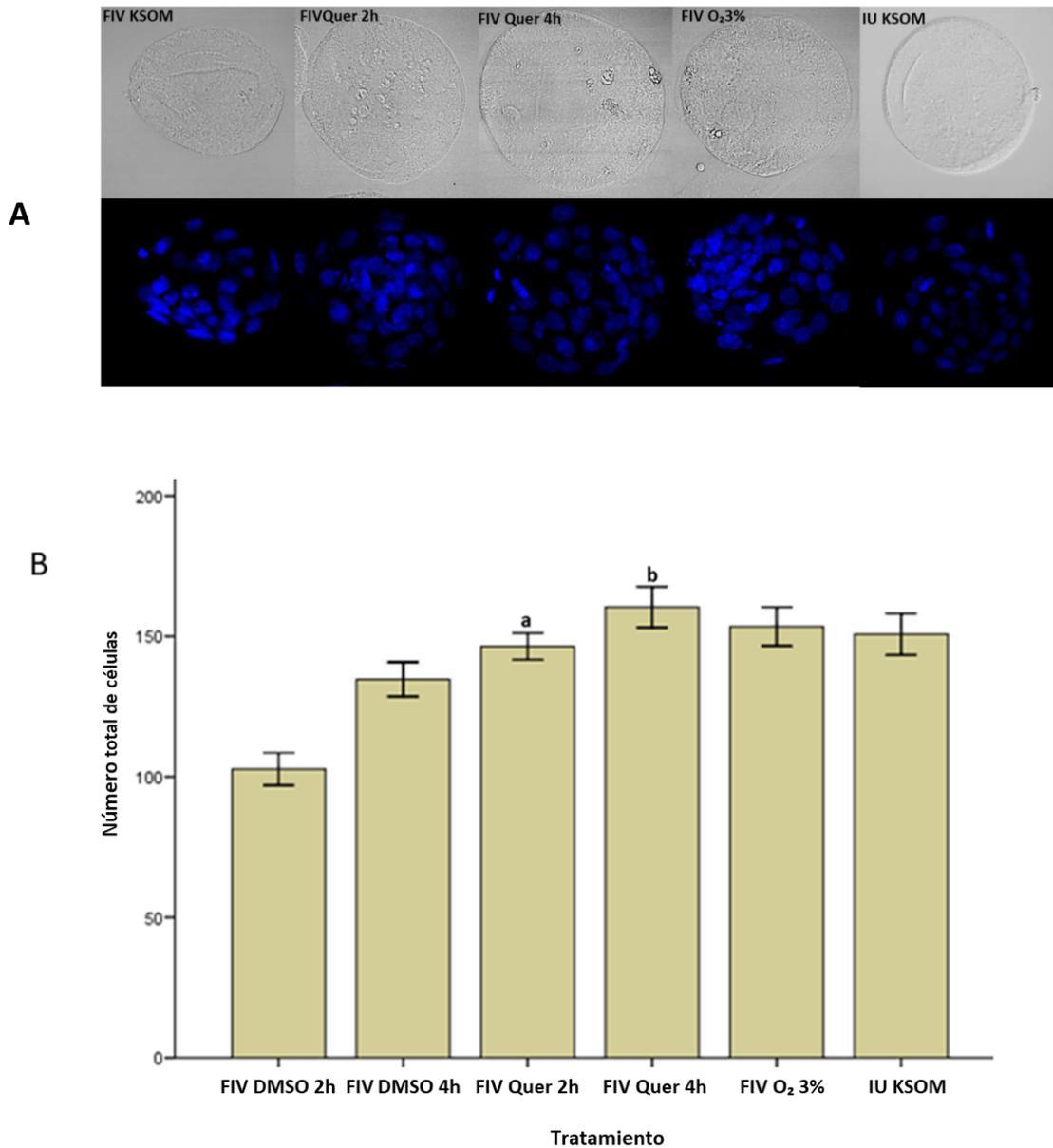
**Figura 3: Resultados del efecto del cultivo de quercetina durante 2 horas o 4 horas en el desarrollo preimplantacional de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y comparado con embriones obtenidos *in utero*.** Grupo FIV KSOM: embriones obtenidos por FIV y desarrollados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 18. Grupo FIV DMSO 2h: embriones obtenidos por FIV y cultivados con DMSO durante 2 horas en estadio de mórula, n = 20. FIV DMSO Grupo 4h: embriones obtenidos por FIV y cultivados con DMSO durante 4 horas en estadio de mórula, n = 16. FIV Quer Grupo 2h: embriones obtenidos por FIV y cultivados con quercetina durante 2 horas en estadio de mórula, n = 16. FIV Quer Grupo 4h: embriones obtenidos por FIV y cultivados con quercetina durante 4 horas en estadio de mórula, n = 20. Grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %: embriones obtenidos por FIV y cultivados con bajas concentraciones de O<sub>2</sub> desde mórula hasta estadio de blastocisto, n = 16. Grupo IU KSOM: embriones obtenidos del útero en estadio de mórula y desarrollados a blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 26. Los datos se representan como la media ± la DE. a, p <0,01 frente al grupo FIV DMSO 2h; b, p <0,005 frente al grupo FIV DMSO 4h; y c, p <0,001 frente al grupo IU KSOM. Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.

## Efecto de la quercetina en el número total de células en estadio de blastocisto

Una vez que confirmamos el efecto beneficioso de la Quer en el potencial de desarrollo de los embriones, examinamos si la Quer producía un aumento en la proliferación celular analizando el número total de células de los embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto en nuestro conjunto de experimentos. Como se puede observar en la **figura 4**, los embriones desarrollados *in utero* hasta el estadio de mórula y tratados, ya sea por 2 o 4 h con Quer, presentaron un promedio mayor estadísticamente significativo de células en el estadio de blastocisto, y en el caso de los embriones tratados por 4h (grupo IU Quer 4h), su número total de células fue incluso mayor que el de los embriones cultivados en bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (grupo IU O<sub>2</sub> 3 %) (**Figura 4B**). También se realizó recuento celular en embriones obtenidos por FIV y expuestos a Quer en estadio de mórula (**Figura 5**). Los resultados muestran nuevamente que los embriones presentaron un mayor número de células totales en los grupos de Quer y bajo O<sub>2</sub>, mostrando diferencias estadísticamente significativas (**Figura 5B**), siendo el número de células totales similar al encontrado en embriones desarrollados en el útero hasta la etapa de mórula.



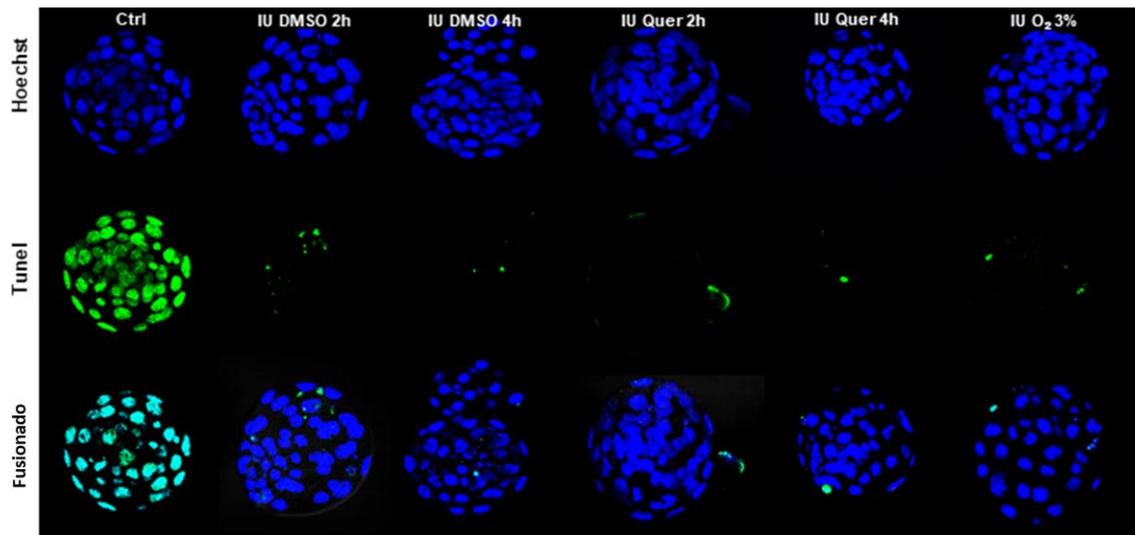
**Figura 4: Resultados del número total de células en blastocistos obtenidos en el útero en la etapa de mórula.** Grupo IU DMSO 2h: embriones obtenidos directamente del útero y cultivados con DMSO durante 2 horas en el estadio de mórula, n = 30. Grupo IU DMSO 4h: embriones obtenidos directamente del útero y cultivados con DMSO durante 4 horas en el estadio de mórula, n = 27. Grupo IU Quer 2h: embriones obtenidos directamente del útero y cultivados con quercetina durante 2 horas en estadio de mórula, n = 24. Grupo IU Quer 4h: embriones obtenidos directamente del útero y cultivados con quercetina durante 4 horas en la etapa de mórula, n = 30. Grupo IU O<sub>2</sub> 3 %: embriones obtenidos directamente del útero y cultivados con bajas concentraciones de oxígeno desde la mórula hasta la etapa de blastocisto, n = 24. **(A)** Imágenes representativas del número total de células, tomadas con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE2000-U, de embriones de cada grupo. **(B)** Análisis del número total de células. Los datos se representan como la media ± la DE. a, p <0,001 IU DMSO 2 h frente a IU Quer 2 h; b, p<0,001 IU DMSO 4h frente a IU Quer 4h. Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.



**Figura 5: Resultados del número de células totales en blastocistos obtenidos por fecundación *in vitro*.** Grupo FIV DMSO 2h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con DMSO durante 2 horas en estadio de mórula, n = 33. Grupo FIV DMSO 4h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con DMSO durante 4 horas en estadio de mórula, n = 27. Grupo FIV Quer 2h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con quercetina durante 2 horas en estadio de mórula, n = 35. Grupo FIV Quer 4h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con quercetina durante 4 horas en estadio de mórula, n = 29. Grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados en bajas concentraciones de oxígeno desde la mórula hasta el estadio de blastocisto, n = 29. **(A)** Imágenes representativas del número total de células, tomadas con un microscopio confocal Nikon Eclipse TE2000-U, de embriones de cada grupo. **(B)** Análisis del número total de células. Los datos se representan como la media ± la DE. a, p <0,001 FIV DMSO 2h frente a FIV Quer 2h; b, p <0,001 grupo FIV DMSO 4h vs FIV Quer 4h, Anova, post-hoc Tukey.

## **Efecto de la quercetina en el número de células apoptóticas en los blastocistos**

Probamos por Tunel el número de células apoptóticas en embriones desarrollados en el útero hasta la etapa de mórula y luego tratados con Quer por períodos cortos de tiempo. Los resultados muestran que un tratamiento de Quer durante 4 h reduce el número de células apoptóticas que se encuentran en los embriones, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Además, las mórulas cultivadas en baja concentración de O<sub>2</sub> también presentaron un número inferior no estadísticamente significativo de células apoptóticas (**Figura 6, Tabla II**).



**Figura 6: Imágenes representativas que ilustran la incidencia de muerte celular en embriones de ratón obtenidos en el útero.** Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (azul). El ADN fragmentado se marcó utilizando el ensayo TUNEL (verde). Las imágenes combinadas representan la proporción de células TUNEL positivas (apoptóticas, fila central) con respecto al recuento total de células embrionarias (fila inferior). Grupo IU DMSO 2h: embriones obtenidos en el útero en el estadio de mórula y cultivados con DMSO durante 2 horas y desarrollados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU DMSO 4h: embriones obtenidos en el útero en el estadio de mórula y cultivados con DMSO durante 4 horas y desarrollados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU Quer 2h: embriones obtenidos en el útero en el estadio de mórula y cultivados con quercetina durante 2 horas y desarrollados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU Quer 4h: embriones obtenidos in utero en estadio de mórula y cultivados con quercetina durante 4 horas y desarrollados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU O<sub>2</sub> 3 %: embriones obtenidos *in utero* y cultivados en bajo concentración de oxígeno desde la mórula hasta el estadio de blastocisto, n = 25. Ctrl: control positivo, que consistió en embriones obtenidos en el útero tratados con DNasa para inducir la apoptosis antes de la incubación con reactivos TUNEL. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

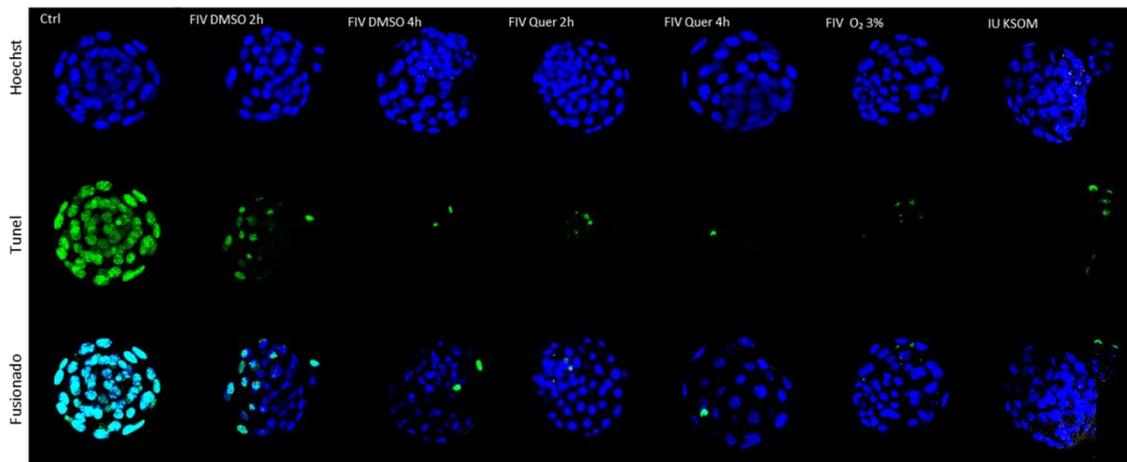
**Tabla II** Número de células apoptóticas en embriones obtenidos en el útero de ratones hembra y tratados con quercetina o DMSO.

Grupos	Nº embriones	TUNEL-núcleos positivos (%)			
		0 célula apoptótica	1 célula apoptótica	2 células apoptóticas	> 3 células apoptóticas
IU DMSO 2h	25	20(80%)	3(12%)	2(8%)	0(0%)
IU DMSO 4h	25	22(88%)	1(4%)	2(8%)	0(0%)
IU Quer 2h	25	22(88%)	3(12%)	0(0%)	0(0%)
IU Quer 4h	25	24(96%)	1(4%)	0(0%)	0(0%)
IU O <sub>2</sub> 3%	25	23(92%)	2(8%)	0(0%)	0(0%)

Las diferencias entre los grupos se calcularon utilizando la prueba  $\chi^2$ .

Quer: quercetina.

Por otra parte, también se evaluó la muerte celular programada en embriones obtenidos por fecundación *in vitro*, que suelen presentar más apoptosis. Los resultados muestran que los embriones tratados con Quer durante 4 h (grupo FIV Quer 4h) presentaron menores tasas de apoptosis y mayor número de embriones sin células apoptóticas (**Figura 7, Tabla III**), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.



**Figura 7:** Imágenes representativas que ilustran la incidencia de muerte celular en embriones de ratón obtenidos mediante fecundación *in vitro*. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. El ADN fragmentado se marcó utilizando el ensayo TUNEL (verde). Las imágenes combinadas representan la proporción de células TUNEL positivas (apoptóticas, fila central) con respecto al recuento total de células embrionarias (fila inferior). Grupo FIV DMSO 2h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con DMSO durante 2 horas en estadio de mórula, n = 25. Grupo FIV DMSO 4h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con DMSO durante 4 horas en estadio de mórula, n = 21. Grupo FIV Quer 2h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con quercetina durante 2 horas en estadio de mórula, n = 25. Grupo FIV Quer 4h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con quercetina durante 4 horas en estadio de mórula, n = 23. Grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados en baja concentración de oxígeno desde el estadio de mórula hasta el estadio de blastocisto, n = 25. Grupo IU KSOM: embriones obtenidos en el útero en estadio de mórula y desarrollados al estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Ctrl: control positivo, que consistió en embriones obtenidos *in vitro* tratados con DNasa para inducir la apoptosis antes de la incubación con reactivos TUNEL. Barra de escala: 50 μm.

**Tabla III** Número de células apoptóticas en embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y tratados con quercetina o DMSO.

Grupos	Nº embriones	TUNEL-núcleos positivos (%)			
		0 célula apoptótica	1 célula apoptótica	2 células apoptóticas	> 3 células apoptóticas
FIV DMSO 2h	25	15(60%)	6(24%)	2(8%)	2(8%)
FIV DMSO 4h	21	19(90,47%)	1(4,76%)	1(4,76%)	0(0%)
FIV Quer 2h	25	20(80%)	4(16%)	0 (0%)	1(4%)
FIV Quer 4h	23	22(95,26%)	1(4,35%)	0(0%)	0(0%)
FIV O <sub>2</sub> 3%	25	19(76%) <sup>a</sup>	4(16%)	1(4%)	1(4%)
IU KSOM	25	21(84%)	3(12%)	0(0%)	1(4%)

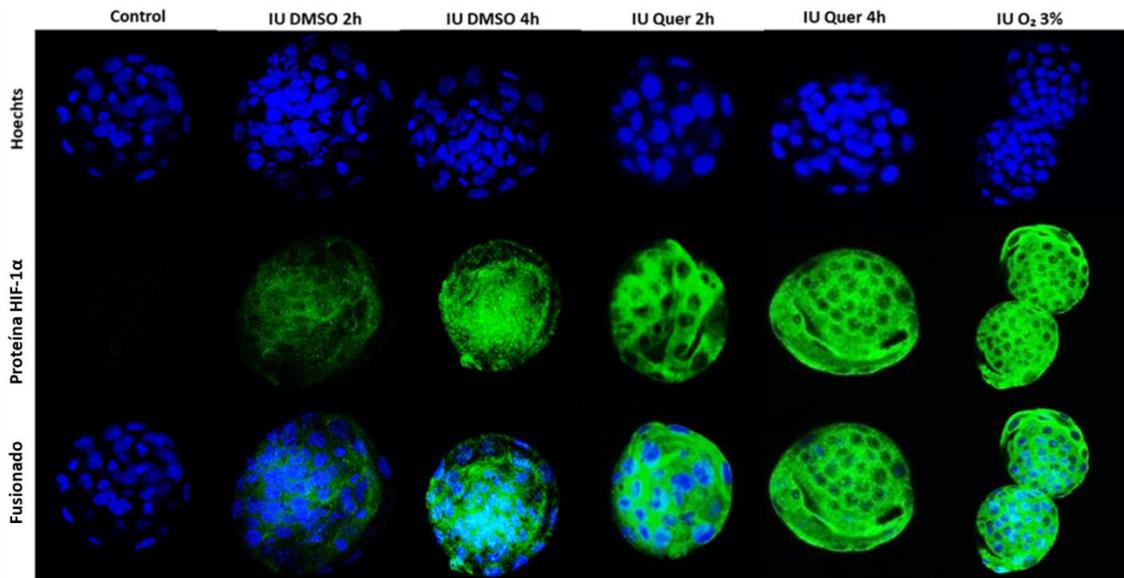
Las diferencias entre los grupos se calcularon utilizando la prueba  $\chi^2$ .

Quer: quercetina.

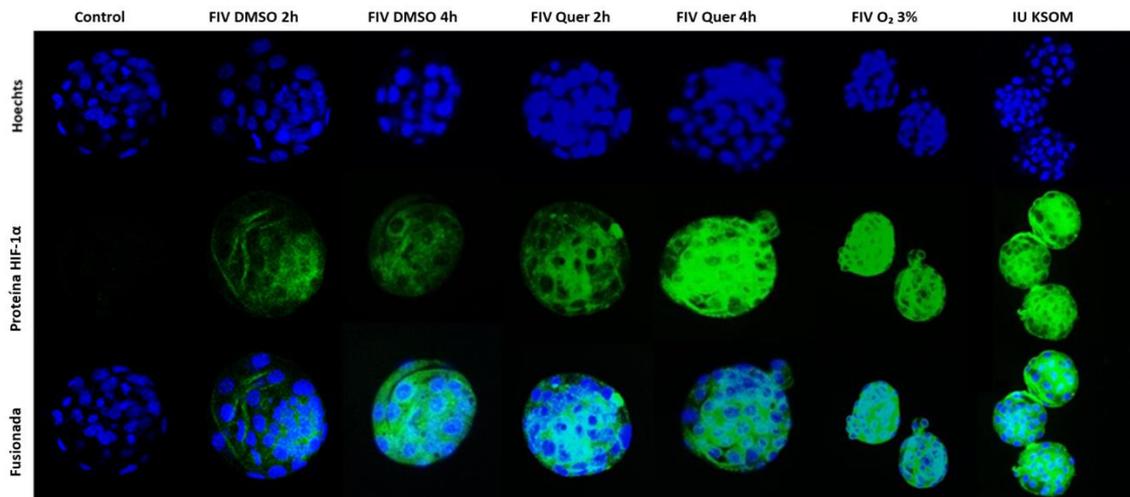
<sup>a</sup>p<0,05, FIV Quer 4h vs FIV O<sub>2</sub>.

### Expresión de HIF-1 $\alpha$

Se realizó inmunofluorescencia para estudiar la expresión de HIF-1 $\alpha$  en embriones cultivados en diferentes condiciones, como se explicó anteriormente. Los resultados muestran que en embriones obtenidos *in utero*, la expresión de HIF-1 $\alpha$  es similar en todos los grupos a pesar del tratamiento utilizado (**Figura 8**). Por otro lado, cuando estudiamos la expresión de proteínas en embriones obtenidos *in vitro* tratados con Quer, especialmente durante 4h, o en embriones cultivados en condiciones de bajo oxígeno (grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %), se produce un aumento significativo en la expresión de HIF-1 $\alpha$  (**Figura 9**) en comparación con embriones cultivados en condiciones convencionales, que muestran claramente una reducción en la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Notablemente, la señal de fluorescencia observada en embriones tratados con Quer es similar a la observada en embriones desarrollados en el útero. Finalmente, debemos mencionar que también se puede observar una clara disminución en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en embriones cultivados solo con DMSO.



**Figura 8: Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en embriones de ratón obtenidos en el útero.** Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (azul). La expresión de HIF-1 $\alpha$  se marcó usando FITC (verde). Grupo IU DMSO 2h: embriones desarrollados *in utero* hasta el estadio de mórula y cultivados con DMSO durante 2 horas y cultivados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU DMSO 4h: embriones desarrollados *in utero* hasta el estadio de mórula y cultivados con DMSO durante 4 horas, luego cultivados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU Quer 2h: embriones desarrollados en el útero hasta el estadio de mórula y cultivados con quercetina durante 2 horas, luego se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU Quer 4h: embriones desarrollados *in utero* hasta el estadio de mórula y cultivados con quercetina durante 4 horas, luego desarrollados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Grupo IU O<sub>2</sub> 3%: embriones desarrollados *in utero* hasta el estadio de mórula y cultivados en baja concentración de oxígeno hasta blastocisto, n = 25. Ctrl: control negativo, que consistió en embriones desarrollados *in utero* de los que se omitió el anticuerpo primario. Barra de escala: 50  $\mu$ m (micrómetro).



**Figura 9: Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en embriones de ratón obtenidos *in vitro*.** Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (azul). La expresión de HIF-1 $\alpha$  se marcó usando FITC (verde). Grupo FIV DMSO 2h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con DMSO durante 2 horas en estadio de mórula, n = 25. Grupo FIV DMSO 4h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con DMSO durante 4 horas en estadio de mórula, n = 21. Grupo FIV Quer 2h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con quercetina durante 2 horas en estadio de mórula, n = 25. Grupo FIV Quer 4h: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con quercetina durante 4 horas en estadio de mórula, n = 23. Grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %: embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados en baja concentración de oxígeno desde la mórula hasta el estadio de blastocisto, n = 25. Grupo IU KSOM: embriones obtenidos *in utero* en el estadio de mórula y desarrollados hasta el estadio de blastocisto en medio de cultivo convencional, n = 25. Ctrl: control negativo, que consistió en embriones obtenidos por FIV de los que se omitió el anticuerpo primario. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

## **CAPÍTULO III**



### **3. CAPÍTULO III: Efecto de la adición de 4-Hidroxiestradiol y quercetina en medios de cultivo sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno y expresión génica en blastocistos de ratón.**

#### **3.1. Materiales y métodos**

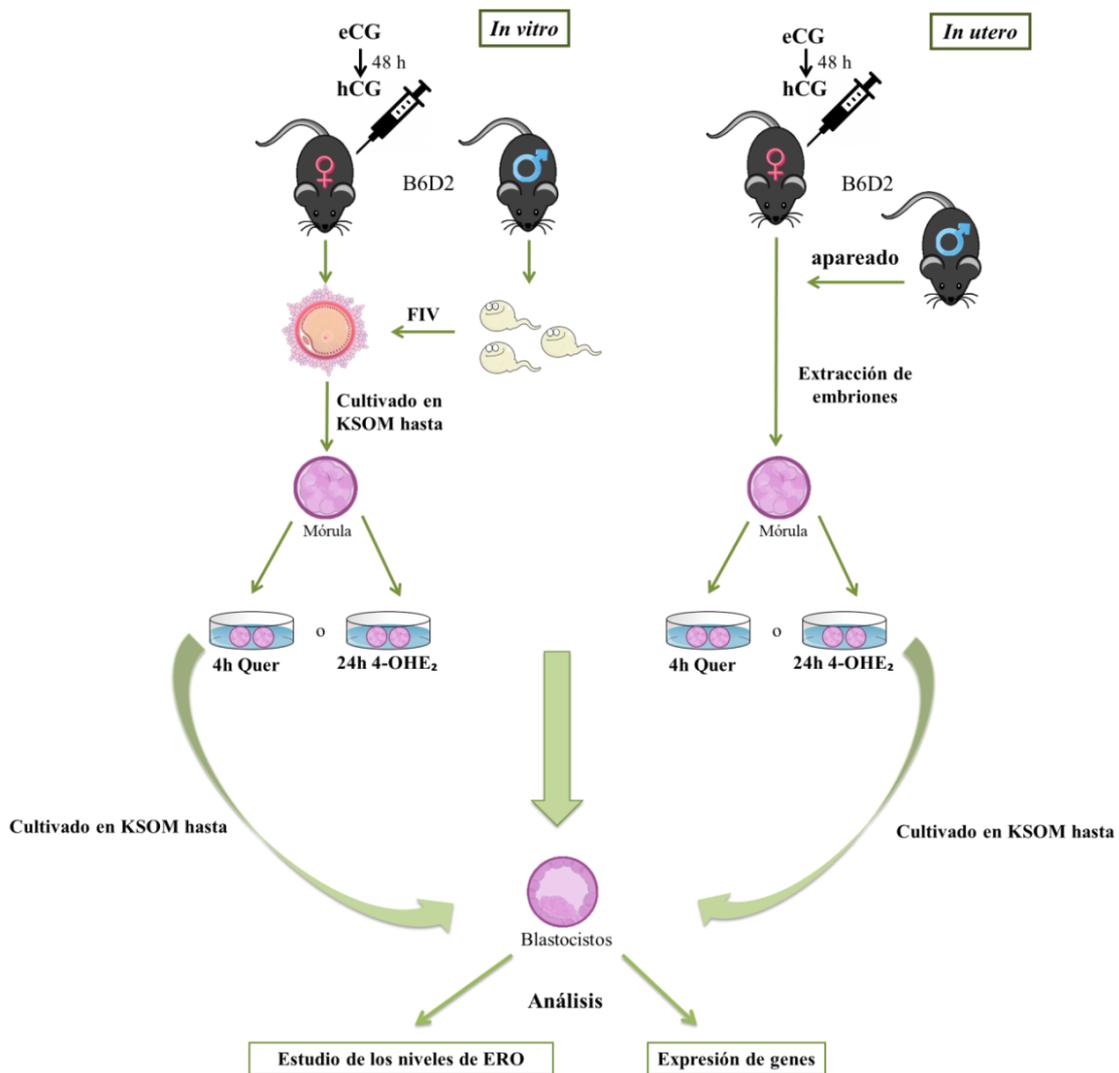
##### **Animales**

Se utilizaron ratones hembras híbridas B6D2F1/J (C57BL/6J01aHsd x DBA/201aHsd, Envigo RMS, Holanda) como donantes de ovocitos y embriones, y ratones machos híbridos B6D2F1/J como donantes de semen. Todos los ratones tenían entre 8 y 12 semanas de edad. Los animales se alojaron en el animalario del Centro de Cirugía de Mínima Invasiva Jesús Usón (certificado por ES100370001499) en condiciones controladas, 12 h luz: 12 h oscuridad, 20-25 °C de temperatura y 40-70 % de humedad relativa, con comida y agua ad libitum. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura según el RD 53/2013, de 1 de febrero, y todos los procedimientos siguieron los principios rectores de la investigación con animales de acuerdo con la Guía de cuidados del Instituto de Investigación con Animales de Laboratorio (ILAR) y Uso de Animales de Laboratorio, y el Reglamento Español (RD1201/2005).

##### **Recolección de embriones *in utero* y embriones obtenidos por fecundación *in vitro***

Embriones desarrollados en condiciones fisiológicas: ratones hembras adultas fueron estimuladas con 8 UI de eCG (gonadotropina coriónica equina; Syncrostim, CEVA Salud Animal, S.A. Barcelona, España) y 48 horas después, con 8 UI de hCG (gonadotropina coriónica humana; Veterin Corion, Divasa Farmavic, S.A. Barcelona, España). Las hembras se aparearon con machos fértiles de la misma edad y raza para inducir el embarazo (1♂:1♀) durante la noche. El embarazo se confirmó mediante la visualización del tapón vaginal en el día 1 del desarrollo del embrión. Las hembras se sacrificaron 72 h y 96 h después de la inyección de hCG por dislocación cervical y los embriones en desarrollo se recuperaron en medio optimizado de potasio simplex (KSOM; Merck-Millipore, Madrid, España) después de lavar el útero con medio M2 (Sigma-Aldrich, Barcelona, España).

Embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV): Se estimularon ratones hembras adultas con 8 UI de eCG y 48 horas después, con 8 UI de hCG. Para realizar la FIV, los ratones machos fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvo esperma del epidídimo caudal y luego se incubó en medio HTF (fluido tubárico humano) para permitir la capacitación. Los ovocitos maduros se recuperaron de la ampolla del oviducto y se colocaron en medio HTF de hembras sacrificadas por dislocación cervical 12 h después de la inyección de hCG. La inseminación se realizó con espermatozoides capacitados ( $3 \times 10^6$ ) en 600  $\mu$ l de medio HTF que contenía los ovocitos. Los ovocitos fertilizados se lavaron y cultivaron en medio KSOM hasta que se necesitaron para los experimentos (**Resumen gráfico de los experimentos**).



**Resumen gráfico: Diagrama del flujo de trabajo del tratamiento de los embriones con quercetina y 4-OHE<sub>2</sub>.** Tratamiento de los embriones durante 4 h con quercetina y 24 h con 4-OHE<sub>2</sub>. La parte superior de la imagen muestra la obtención de los embriones para los experimentos, por fecundación *in vitro* (lado izquierdo) o por extracción del útero en estado de mórula (lado derecho). La parte inferior de la imagen explica cómo se trataron los embriones con quercetina, o 4-OHE<sub>2</sub> y qué parámetros se analizaron luego.

## Tratamiento de peróxido de hidrógeno

Se seleccionaron embriones en etapa de mórula para los experimentos. Este experimento se realizó tanto en embriones obtenidos por FIV (grupos FIV) como en embriones desarrollados *in utero* (IU) hasta el estadio de mórula (grupos IU). Para determinar el daño oxidativo, las mórulas se expusieron durante 15 min a una concentración de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 5 % (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) diluido en KSOM, con el fin de inducir el daño

oxidativo. Luego, las mórulas se dividieron en diferentes grupos de tratamiento. Por un lado, estos embriones tratados con  $H_2O_2$  fueron luego cultivados en medio KSOM hasta el estadio de blastocisto (grupo FIV/IU KSOM +  $H_2O_2$ ). Otro grupo de embriones se cultivó con quercetina (Quer) durante 4 h y luego en medio KSOM hasta el estadio de blastocisto (grupo FIV/IU Quer +  $H_2O_2$ ). Para el 4-OHE<sub>2</sub>, las mórulas se cultivaron durante 24 h hasta el estadio de blastocisto (grupo FIV/UI 4-OHE<sub>2</sub> +  $H_2O_2$ ). Como grupos control, se utilizaron e incluyeron en los resultados embriones cultivados en medios KSOM, tanto a concentración atmosférica (grupo FVI/IU KSOM) como a baja concentración de  $O_2$  (FIV/IU  $O_2$  3 %). Finalmente, estos embriones se utilizaron para estudiar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO).

### **Estudio de niveles de especies reactivas de oxígeno**

Para analizar el estrés oxidativo (EO) se utilizó el reactivo CellRox Green (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) en células vivas. Después de tratar los embriones con  $H_2O_2$ , cada grupo de embriones descrito anteriormente se tiñó con CellRox durante 30 min a 37 °C. A continuación, los embriones se lavaron con PBS 1x + PVP (Solución salina tamponada con fosfato; Sigma-Aldrich, Barcelona, España; Polivinil polividona; Sigma-Aldrich, Barcelona, España). Se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente y se lavaron nuevamente con PBS 1x + PVP. Los embriones se tiñeron con Hoechst 3334 durante 10-15 min a 37 °C y se lavaron en PBS 1x + PVP. Finalmente, los embriones se montaron en un portaobjetos. Las imágenes de fluorescencia se tomaron utilizando un microscopio confocal (Nikon Eclipse TE2000-U), equipado con un láser de 488 nm (canal verde) y se analizaron los niveles de ERO.

### **Tratamiento Quercetina y 4-Hidroxiestradiol, y cultivo de baja concentración de oxígeno**

Para estudiar la expresión de diferentes genes se utilizaron diferentes grupos de embriones obtenidos por FIV, los cuales fueron tratados con diferentes moléculas o compuestos que se añadieron al medio de cultivo en el estadio de mórula. El primer grupo de embriones se trató con Quer (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) diluido en DMSO (0,01 %) (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) a una concentración de 10  $\mu$ M (FIV Quer). Se añadió Quer al medio de cultivo durante 4 h y luego los embriones se transfirieron a medio KSOM y se cultivaron hasta el estadio de blastocisto. El segundo grupo de embriones se trató con 4-OHE<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) a una concentración de 0,1 mg/ml durante 24 h, hasta el estadio de blastocisto (FIV 4-OHE<sub>2</sub>). Otro grupo de embriones se cultivó al 3 %  $O_2$  desde la mórula hasta

el estadio de blastocisto (FIV O<sub>2</sub> 3 %). El control de este experimento fue otro grupo de embriones cultivados en medio KSOM durante todo el desarrollo (FIV KSOM). Adicionalmente, se incluyeron en este experimento embriones desarrollados IU hasta la etapa de mórula y luego cultivados en medio KSOM (IU KSOM), para tener una idea de los efectos del cultivo *in vitro* en los embriones. Una vez en la etapa de blastocisto, los embriones se utilizaron para la extracción de ARN y el análisis de la expresión génica de varios genes.

## **Extracción de ARN**

El ARN total se extrajo de grupos de 40 a 50 blastocistos expandidos por tratamiento, usando Tri Reagent (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los blastocistos congelados se descongelaron, se agitaron en vórtex durante 20 segundos y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió cloroformo (Sigma-Aldrich) a los embriones, las muestras se agitaron vigorosamente y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C y se eliminó la fase acuosa superior. Se añadió isopropanol (Sigma-Aldrich) y el ARN se precipitó mediante incubación durante la noche a -80 °C, seguido de centrifugación a 13 000 rpm (revoluciones por minuto) durante 30 min a 4 °C. Los sedimentos de ARN se lavaron con etanol al 70 %, se secaron al aire y se volvieron a disolver en 10 ml de agua estéril. La solución de ARN se mantuvo congelada a -80 °C hasta que todas las muestras estuvieron listas para la transcripción inversa.

## **Análisis de transcripción inversa y expresión génica por qPCR**

El ensayo de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando un kit de transcriptoma completo QuantiTect (207.043; Qiagen, Hilden, Alemania). Los niveles de expresión génica de (i) Hif-1 $\alpha$ , (ii) Egf, (iii) genes diana de HIF: Glut-1 Glut-3, Cox-2 y Vegf, y (iii) el gen Prdx-5 (enzima antioxidante), se analizaron cuantitativamente en tiempo real por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR) realizado en un Applied Biosystems 7300 (Applied Biosystems) con el kit Sensi-Mix SYBR<sup>®</sup> Hi-ROX (Bioline, Reagents Ltd., EE. UU.). El programa de amplificación fue el siguiente: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos y 60 °C por 30 segundos; curva de fusión de 65 a 95 °C. Se calculó un umbral de ciclo (Ct) para cada muestra utilizando el software GeneAmp 7300. Las secuencias de los cebadores se enumeran en la **Tabla I**. Se usó el método Ct comparativo para la cuantificación de los niveles de expresión de ARNm usando la eficiencia de amplificación de cada gen. Todos los resultados se normalizaron a un gen de referencia ( $\beta$ -actina).

**Tabla I Lista de secuencias de cebadores utilizadas para el experimento de RT-qPCR.** *Hif-1 $\alpha$* : factor 1 $\alpha$  inducible por hipoxia; *Egf*: factor de crecimiento epidérmico; *Glut-1*: transportador de glucosa 1; *Glut-3*: transportador de glucosa 3; *Vegf*: factor de crecimiento del endotelio vascular; *Cox-2*: ciclooxigenasa 2; *Prdx-5*: peroxirredoxina 5; Se usó  *$\beta$ -actina* como control.

Primer Genes	Secuencias (5' -> 3')
<b><i>Hif-1<math>\alpha</math></i></b>	Forward: ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG Reverse: ACTGTTAGGCTCAGGTGAACT
<b><i>Egf</i></b>	Forward: CCAGTTGCTACCCTGACTGG Reverse: GAAGGGCTCACTCGATCCTG
<b><i>Vegf</i></b>	Forward: CTGCCGTCCGATTGAGACC Reverse: CCCCTCCTGTACCACTGTC
<b><i>Glut-1</i></b>	Forward: CCAGCTGGGAATCGTGTT Reverse: CAAGTCTGCATTGCCCATGAT
<b><i>Glut-3</i></b>	Forward: ATGGGGACAACGAAGGTGAC Reverse: GTCTCAGGTGCATTGATGACTC
<b><i>Cox-2</i></b>	Forward: CCAACCTCTCCTACTACACCAGGG Reverse: ACACCTCTCCACCAATGACCTGAT
<b><i>Prdx-5</i></b>	Forward: CGGAAAGAAGCAGGTTGGGA Reverse: CATCTGGCTCCACGTTCACT
<b><i><math>\beta</math>-Actin</i></b>	Forward: ACGGCCAGGTCATCACTATTG Reverse: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA

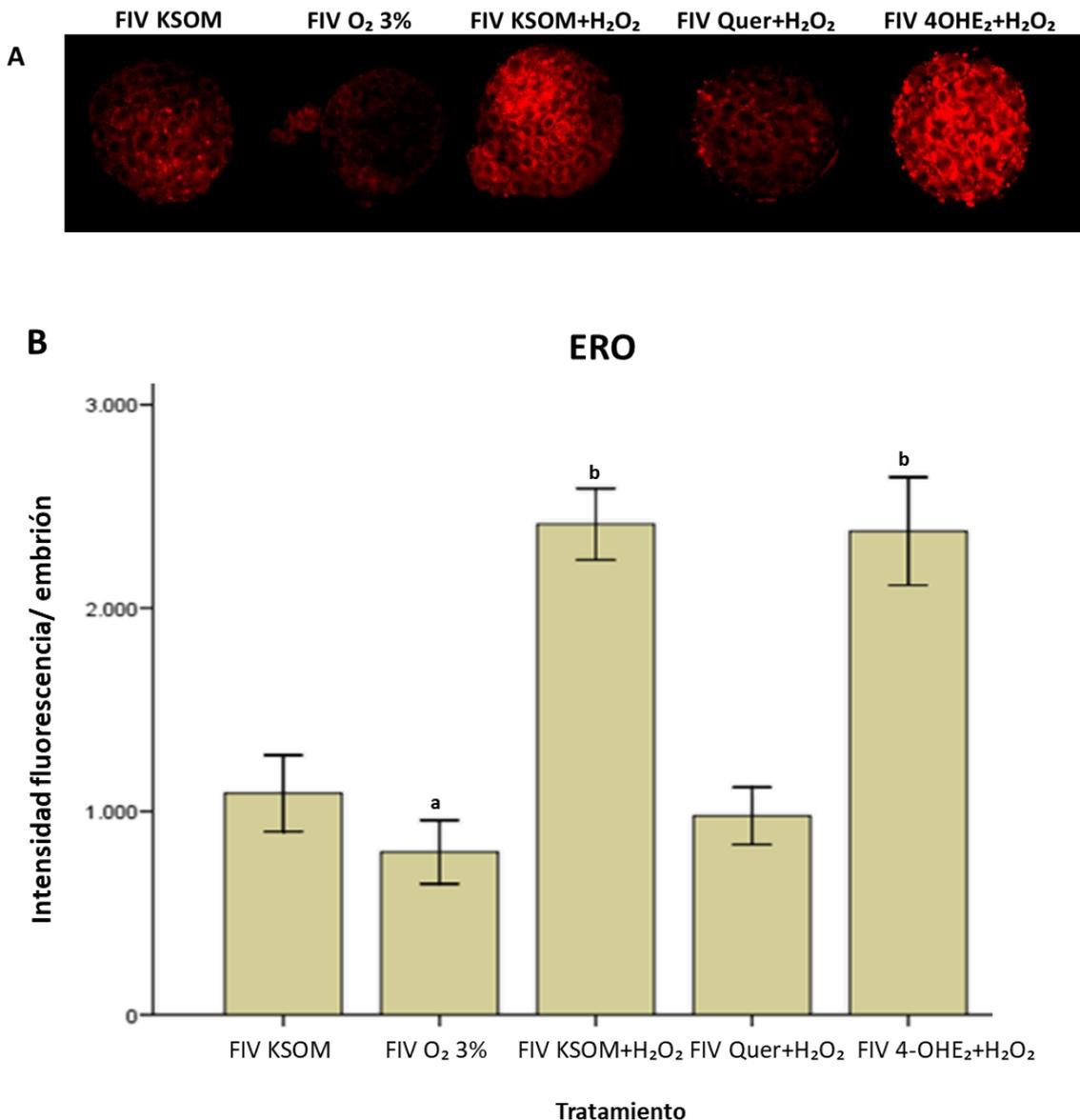
## Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS (SPSS Onc., Chicago, IL, EE. UU.), y un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Después de la transformación logarítmica, se utilizó la prueba de Kolgomorov-Smirnov para la prueba de normalidad. La comparación de ERO se estudió mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon. Las diferencias en la expresión génica se analizaron mediante la prueba t de Student después de la transformación logarítmica.

## 3.2. Resultados

### **Efecto de diferentes tratamientos en los niveles de especies reactivas de oxígeno**

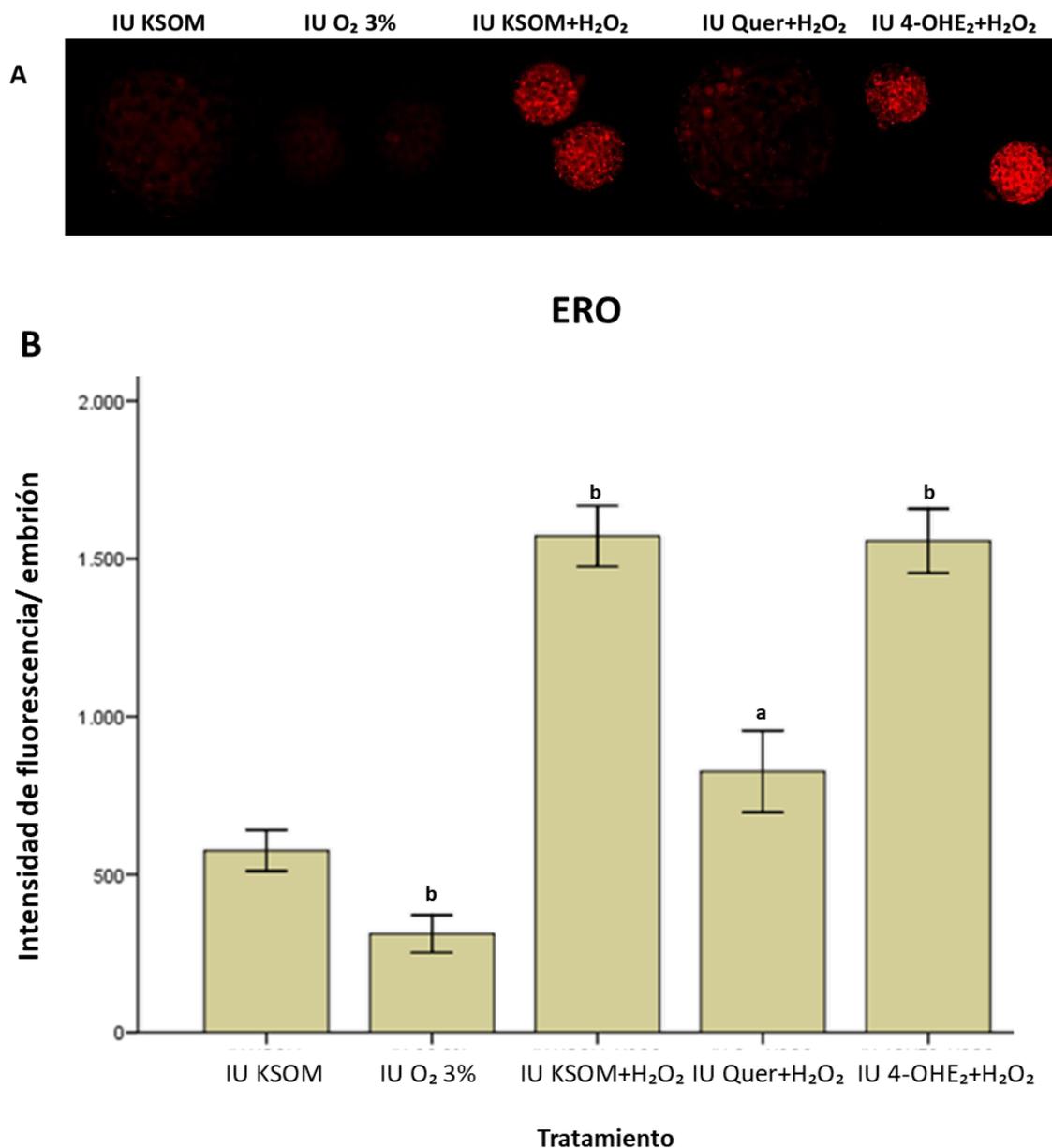
Efecto de quercetina (Quer) y 4-hidroxiestradiol (4-OHE<sub>2</sub>) en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV). Cuando estudiamos el efecto de los diferentes tratamientos en los niveles de ERO, los resultados muestran que, en comparación con los embriones control cultivados en medios KSOM (grupo FIV KSOM), la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los embriones provocó un aumento significativo en los niveles de ERO (grupos FIV KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FIV DMSO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FIV Quer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FIV 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Figura 1B**), y por lo tanto en la fluorescencia detectada (**Figura 1A**). Como era de esperar, los embriones cultivados en baja concentración de O<sub>2</sub> (grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %) presentaron niveles más bajos de ERO ( $p < 0,05$ ). En cuanto a los tratamientos empleados, cuando ERO es inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la Quer parece tener un efecto más protector para los embriones (grupo FIV Quer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), reduciendo los niveles de ERO a los observados en embriones cultivados en medio KSOM. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos FIV KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FIV 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 1A, B**), lo que sugiere un menor efecto de 4-OHE<sub>2</sub> para proteger a los embriones contra ERO.



**Figura 1: Cuantificación de los niveles de ERO en blastocistos obtenidos por FIV expuestos a diferentes tratamientos: (A)** Representación de los niveles de ERO en blastocistos tratados con Quer y 4-OHE<sub>2</sub>. La ERO intracelular se midió con la sonda CellRox (verde). Barra, 50  $\mu$ m (micrómetro). **(B)** Cuantificación relativa de la intensidad de fluorescencia de ERO en blastocistos. Grupo KSOM de FIV: n = 28; grupo FIV O<sub>2</sub> 3 %: n = 28; FIV KSOM + grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 30; FIV Quer + grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 28; Grupo FIV 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 30. Los datos se representan como la media  $\pm$  la DE (desviación estándar). a), p <0,05 para el grupo FIV O<sub>2</sub> 3 % frente al grupo FIV KSOM; b) p <0,001 para los grupos FIV KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, FIV 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente al grupo FIV KSOM. Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.

#### Efecto de Quer y 4-OHE<sub>2</sub> en los niveles de ERO en embriones desarrollados IU

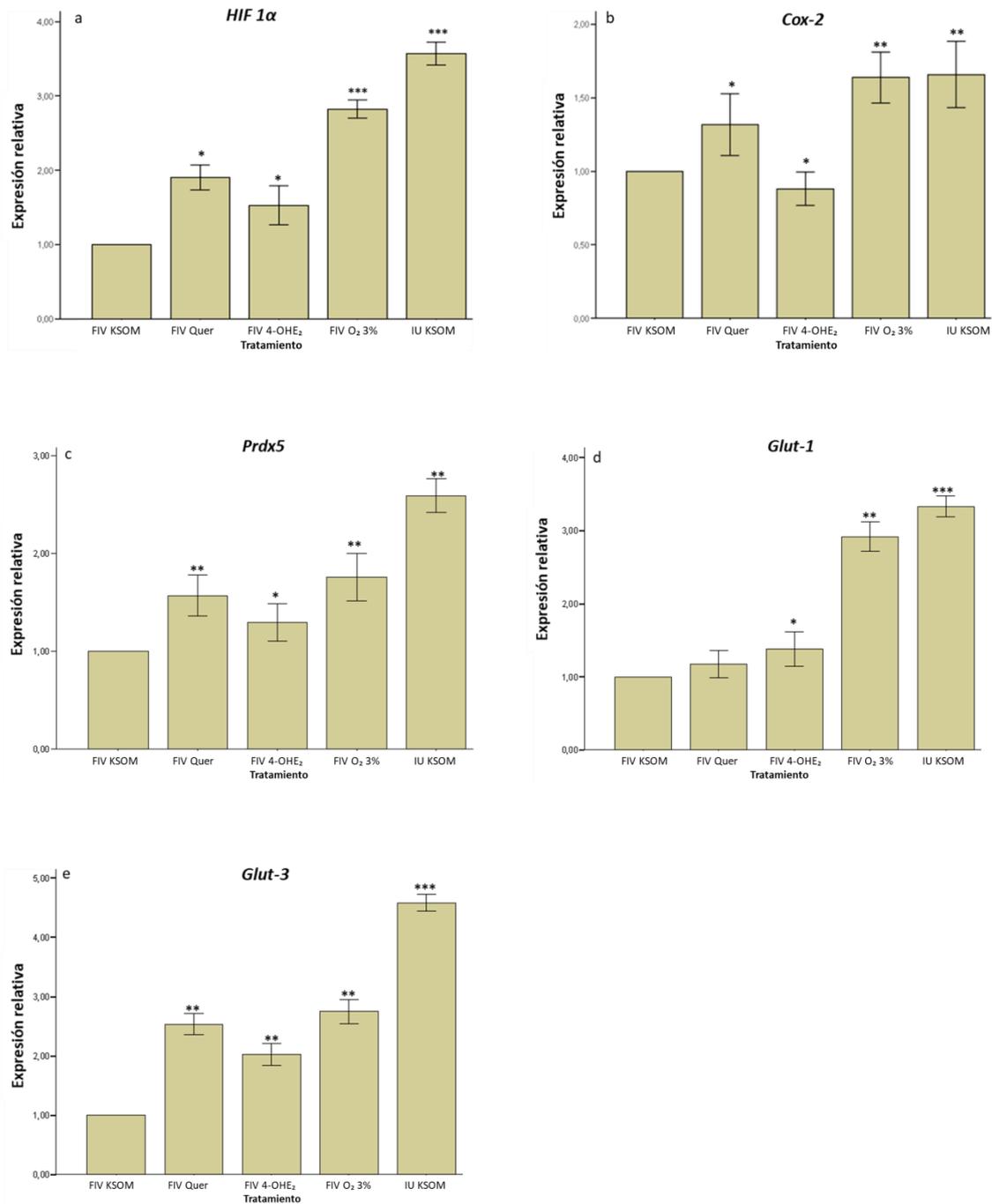
El efecto de Quer y 4-OHE<sub>2</sub> en los niveles de ERO se llevó a cabo en embriones desarrollados por IU de la misma forma que para los embriones obtenidos por FIV, y se estudió analizando la intensidad de la fluorescencia emitida por los blastocistos tratados (**Figura 2A**). Los resultados demuestran que, en comparación con el grupo de control de IU KSOM, en los embriones tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los niveles de ERO fueron estadísticamente más altos (grupo IU O<sub>2</sub> al 3 %, grupo IU KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, grupo IU Quer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y grupo IU 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (p<0,001). ) (**Figura. 2, B**). Como se vio anteriormente en embriones obtenidos por FIV, los embriones cultivados en baja concentración de O<sub>2</sub> presentaron niveles más bajos de ERO (p<0,001) y, por lo tanto, una intensidad de fluorescencia más baja en comparación con todos los grupos experimentales. En los grupos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, solo aquellos embriones tratados con Quer durante 4 h presentaron niveles reducidos de ERO, de forma significativa (grupo IU Quer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (p<0,001), el resto de embriones presentaron niveles de ERO mucho más elevados. Como se vio anteriormente para el 4-OHE<sub>2</sub>, esta molécula no tuvo un efecto protector contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esta vez (grupo IU 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (**Figura 2A, B**).



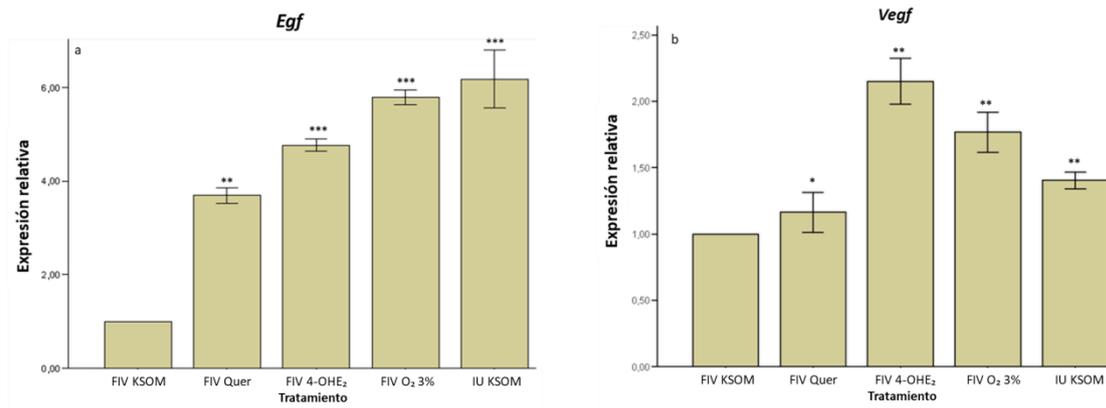
**Figura 2: Cuantificación de los niveles de ERO en blastocistos desarrollados IU y expuestos a diferentes tratamientos: (A)** Representación de los niveles de ERO en mórulas tratadas con Quer y 4-OHE<sub>2</sub>. La ERO intracelular se midió con la sonda CellRox (verde). Barra, 50  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación relativa de la intensidad de fluorescencia de ERO en blastocistos. Grupo IU KSOM: n = 30; grupo IU O<sub>2</sub> 3 %: n = 30; grupo IU KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 30; grupo IU Quer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 30; grupo IU 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: n = 30. Los datos se representan como la media  $\pm$  la DE. a) p < 0.01 para el grupo IU Quer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente al grupo IU KSOM; b) p < 0.001 para los grupos IU KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IU Quer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IU 4-OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frente al grupo IU KSOM. Prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon.

## Expresión génica en blastocistos obtenidos por FIV

En comparación con los embriones desarrollados por IU, el análisis de los niveles de expresión génica en blastocistos obtenidos por FIV mostró que el cultivo *in vitro* provoca una disminución en la expresión de todos los genes analizados. No obstante, cuando los embriones son tratados con Quer, la expresión de Hif-1 $\alpha$ , Cox-2, Vegf, Prdx-5, Glut-3 y Egf aumentó significativamente, y en el caso de Glut-1 también aumentó la expresión pero no de forma estadísticamente significativa (**Figura 3, Figura 4**). En el caso de los embriones cultivados con 4-OHE<sub>2</sub>, la expresión de genes relacionados con la hipoxia (**Figura 3**), a excepción de Cox-2 que estaba disminuida, también aumentó significativamente en comparación con los embriones control cultivados en medio KSOM, aunque no tanto como en el caso de Quer. Curiosamente, en el caso de los genes Egf y Vegf, el 4-OHE<sub>2</sub> produjo un aumento muy significativo en la expresión de estos genes (**Figura 4**). En embriones cultivados a baja concentración de O<sub>2</sub>, la expresión génica aumentó significativamente a niveles muy similares a los observados en embriones desarrollados IU (grupo IU KSOM), observándose resultados mucho mejores que cuando se cultivaron *in vitro* en condiciones atmosféricas (**Figura 3, Figura 4**).



**Figura 3. Niveles de transcripción de genes relacionados con la hipoxia (Hif-1 $\alpha$ , Cox-2, Prdx-5, Glut-1, Glut-3) en embriones obtenidos por FIV y en embriones desarrollados por IU. Los resultados analizados por RT-qPCR se representan como la media  $\pm$  DE, calculada por el método  $\Delta\Delta Ct$ , normalizada a  $\beta$ -actina. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  frente al grupo FIV KSOM.**



**Figura 4. Niveles de transcripción de los genes Egf y Vegf en embriones obtenidos por FIV y en embriones desarrollados por IU.** Los resultados analizados por RT-qPCR se representan como la media  $\pm$  DE, calculada por el método  $\Delta\Delta C_t$ , normalizada a  $\beta$ -actina. \*p <0,05, \*\*p <0,01, \*\*\*p <0,0001 frente al grupo FIV KSOM.



## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

El potencial de desarrollo de los embriones obtenidos por FIV, así como su calidad y viabilidad, depende entre otras cosas de la composición del medio de cultivo en el que se desarrollan (Paternot y cols., 2010). Un cultivo no óptimo puede suponer un fallo en la fecundación de los gametos y un desarrollo inadecuado de los embriones, que no llegan al estadio de blastocisto o no logran implantarse en el útero por su mala calidad. Por lo tanto, las condiciones de cultivo del embrión son cruciales para el resultado de las TRA y tienen un impacto en el desarrollo embrionario antes y después de la implantación, y probablemente en la salud del futuro recién nacido en todas las especies animales (Mantikou y cols., 2013a; Chronopoulou y Harper, 2014). De ahí, que aumentar el potencial de desarrollo *in vitro* de embriones precoces mediante la suplementación del medio de cultivo haya sido de gran interés para muchos investigadores y en consecuencia, se hayan llevado a cabo varios trabajos en los que se ha enriquecido el medio de cultivo con multitud de compuestos que mejoran la calidad de los embriones obtenidos por FIV (Zander-Fox y Lane, 2014; Yao y Asayama, 2016; Sunde y cols., 2016; Tao y cols., 2022; Saugandhika y cols., 2022).

Por ello, el principal reto del cultivo de embriones *in vitro* es recrear en la medida de lo posible las condiciones dadas *in vivo*, tanto en el proceso de fecundación como durante el desarrollo embrionario. Hay muchos factores que necesitan ser controlados durante el desarrollo *in vitro* de los embriones. Entre estos, se encuentra la exposición a la luz visible, la composición de los medios de cultivo, la temperatura, el pH, la concentración de O<sub>2</sub>, la centrifugación durante la preparación de los espermatozoides, las técnicas de TRA que involucran el manejo de gametos/embriones y los métodos de criopreservación (Agarwal y cols., 2006). Estos factores aumentan el EO y como consecuencia dan tratamientos reproductivos subóptimos. Los resultados obtenidos en los procesos de fecundación *in vitro* pueden diferir mucho entre laboratorios y parte de esta variación puede estar relacionada con diferencias en la composición de los medios de cultivo utilizados (Ma y cols., 2017). Por todo esto, el estudio y desarrollo de medios más apropiados para el cultivo de embriones desarrollados *in vitro* ha sido de gran interés últimamente.

En el presente trabajo hemos analizado los efectos que tiene la suplementación de los medios de cultivo con 4-OHE<sub>2</sub> y Quer por separado en la calidad del embrión, implantación, efectos

sobre ERO y en la expresión de EGF, la enzima antioxidante Prdx-5, la proteína HIF-1 $\alpha$  y otros genes inducidos por hipoxia e implicados en estos procesos.

Actualmente, es bien sabido que la capacidad de implantación de los embriones está relacionada con la calidad del embrión durante la etapa de blastocisto (Huisman y cols., 2000). La morfología y algunas otras características del embrión en desarrollo, desde el cigoto hasta el momento de la implantación, se correlacionan con el éxito del embarazo en modelos de FIV, tanto en animales como en humanos (Niakan y cols., 2012). Características adicionales, como la producción de metabolitos, el consumo de O<sub>2</sub>, la morfocinética o la información genética del embrión, se utilizan para determinar información sobre la capacidad del embrión transferible para implantarse con éxito en la pared uterina. Sin embargo, incluso los blastocistos completamente desarrollados con las mejores características pueden no implantarse debido a factores desconocidos incluso cuando las condiciones del endometrio parecen ser correctas en términos clínicos y condiciones moleculares. Por lo que, entre otros factores, este fallo en la implantación podría ser asociado a condiciones de cultivo inadecuadas y desarrollo embrionario subóptimo (Das y Holzer, 2012; Timeva y cols., 2014).

Por el contrario, está demostrado que los llamados embriones inactivos o detenidos de ciertas especies, que poseen buena morfología en la etapa de blastocisto, no se implantan a menos que hayan sido previamente activados. Esta situación se da naturalmente después de que se cumplan algunas condiciones ambientales y fisiológicas en una amplia variedad de especies, pero también se puede producir en roedores durante la lactancia, o puede ser inducida experimentalmente al privar a la madre de la fuente natural de estrógeno (Zhang y cols., 2013). Estos embriones con implantación retrasada pueden reactivarse y reanudar la implantación cuando las condiciones sean favorables o se restablece la fuente de estrógenos (Ptak y cols., 2012). Usando el modelo de ratón de implantación retardada, se ha informado que los catecolestrógenos son esenciales para reactivar el blastocistos para la implantación de embriones, haciéndolos competentes para interactuar con el epitelio uterino para la implantación (Wang y Dey, 2006).

Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos por los cuales los estrógenos y sus metabolitos inician el proceso de implantación. Se sugirió que si bien el E<sub>2</sub> es necesario para preparar el útero para que se encuentre en un estado receptivo junto con la P<sub>4</sub>, el 4-OHE<sub>2</sub>, uno de sus metabolitos producido en el útero, media la activación del embrión a través de las

prostaglandinas. La Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) estimula la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que a su vez, induce la activación de proteína quinasa A (Hughes y cols., 1997), y permite que los embriones inactivos interactúen con los factores de crecimiento maternos (Paria y cols., 1998b).

Por otro lado, algunos investigadores han sugerido que ciertas limitaciones demostradas por los embriones desarrollados *in vitro*, incluida la imposibilidad de implantar correctamente, podría atribuirse a la ausencia de factores de crecimiento que normalmente se secretan en condiciones fisiológicas en el tracto reproductivo (Rizos y cols., 2002; Lonergan, 2007), y/o la dilución de los factores de crecimiento liberados por los embriones en el medio de cultivo (Paria y Dey, 1990b). Desde esta perspectiva, se ha informado que la calidad de los embriones obtenidos *in vitro* está disminuida en comparación con los embriones desarrollados en el útero (Mahdavinezhad y cols., 2019). Además, el metabolismo del embrión es supuestamente deprimido durante el cultivo *in vitro* (Wrenzycki y cols., 1999), y se ha observado frecuentemente que las condiciones de cultivo subóptimas disminuyen el número final de células embrionarias.

Algunos estudios han demostrado los efectos beneficiosos de agregar EGF al medio de cultivo sobre la síntesis de proteínas, el número de células y procesos de eclosión (Richter, 2008; Ahumada y cols., 2013). Estudios recientes han documentado que el EGF añadido al medio de cultivo del embrión disminuye la tasa de apoptosis de los blastocistos cultivados *in vitro* (Wolff y cols., 2007; Ahumada y cols., 2013). En nuestro trabajo, nosotros observamos resultados similares para embriones desarrollados en cultivo enriquecido con 4-OHE<sub>2</sub>. Además, nuestros resultados revelaron que embriones obtenidos mediante cultivo *in vitro* suplementados con 4-OHE<sub>2</sub> mostraron un aumento tanto en el metabolismo como en el recuento total de células, con una incidencia más baja de muerte celular en comparación con los embriones de FIV cultivados en ausencia de 4-OHE<sub>2</sub>. La ruptura de la zona pelúcida y la posterior eclosión del embrión son fundamentales para que se produzca la implantación con éxito (Teklenburg y Macklon, 2009).

Recientemente, ha sido propuesto que los efectos del EGF en la aceleración de la progresión de la mórula a blastocisto completamente expandido aumenta los efectos de expansión natural del blastocisto sobre la zona pelúcida, lo que podría potenciar su capacidad de implantación (Fang y cols., 2010). En nuestro trabajo, observamos que en presencia de 4-OHE<sub>2</sub>,

el cultivo de embriones obtenidos *in vitro* indujo un aumento estadísticamente significativo en el diámetro del blastocisto y una disminución en el espesor de la zona pelúcida (aunque se siguen observando diferencias en comparación con los embriones en el útero), lo que aumentaría el potencial de implantación de los embriones. Por lo tanto, podemos concluir que suplementación con 4-OHE<sub>2</sub> de medios de cultivo de los embriones obtenidos *in vitro*, desde la mórula hasta la etapa de blastocisto, mejora la calidad del embrión y su desarrollo.

También se ha establecido que los embriones obtenidos *in vitro* demuestran una calidad y un potencial de implantación inferiores a los desarrollados en condiciones fisiológicas, situación que podría atribuirse, al menos en parte, a una capacidad reducida de los embriones para interactuar con el EGF (Scheil y cols., 2010; Das y Holzer, 2012). Para ver si los efectos beneficiosos de la administración exógena 4-OHE<sub>2</sub> en los embriones están relacionados con una mayor capacidad para interactuar con EGF, estudiamos la capacidad de unión de EGF *in útero* (IU) e *in vitro* en los embriones obtenidos en ambos procesos. Sorprendentemente, en nuestra investigación observamos una disminución significativa en la capacidad de los blastocistos para interactuar con EGF cuando enriquecemos los medios de cultivo desde el comienzo del desarrollo *in vitro* (desde la fecundación hasta la etapa de PN). No obstante, nuestros resultados muestran que cuando la suplementación se lleva a cabo desde el estado de mórula hasta el de blastocisto, los embriones demostraron un aumento estadísticamente significativo en su capacidad final para unir EGF en comparación con los embriones completamente desarrollados *in vitro* y cultivados en un medio convencional, destacando la importancia de las condiciones ambientales en la transición de mórula a blastocisto para el potencial del embrión para interactuar con el EGF. Los resultados confirmaron que el entorno endocrino en el que el desarrollo del embrión se lleva a cabo en cultivo *in vitro* podría afectar decisivamente el destino del embrión, en el cual, los niveles de catecolestrógenos son perjudiciales en las primeras etapas de la escisión, pero beneficiosos en la transición de la mórula a blastocisto (Lattanzi y cols., 2003). Esta situación podría explicarse a nivel fisiológico si los niveles elevados de metabolitos E<sub>2</sub>, incluido el 4-OHE<sub>2</sub>, al ser detectados por el embrión en etapas tempranas, se interpretaron como una señal que indica un endometrio post-receptivo, lo que impide un mayor desarrollo.

Finalmente, quisimos verificar si estos efectos ventajosos de 4-OHE<sub>2</sub> podrían traducirse en una mejora en la implantación. En consecuencia, probamos si los efectos de 4-OHE<sub>2</sub> en embriones obtenidos *in vitro* se reflejaron en la capacidad del embrión para adherirse a células

endometriales, utilizando un modelo de implantación *in vitro*, consistente en un cocultivo de embriones con células endometriales, nuestros resultados demostraron que los embriones cultivados en presencia de 4-OHE<sub>2</sub> durante las últimas etapas del desarrollo previo a la implantación mostraron un aumento significativo en su adherencia a las células endometriales en comparación con embriones cultivados durante el mismo período en ausencia de 4-OHE<sub>2</sub>. Sin embargo, la capacidad adhesiva de los embriones tratados no alcanzó el potencial demostrado por los embriones obtenidos en el útero. Además, los efectos beneficiosos del cultivo enriquecido se restringen a las últimas etapas del desarrollo preimplantacional, precisamente durante el aumento fisiológico de catecolestrógenos y cuando se abre la ventana de implantación (Paria y cols., 1993, 1998a). Además, algunos embriones expuestos a 4-OHE<sub>2</sub>, antes de la primera división, demostraron una disminución significativa en su potencial para unirse a células endometriales en estadio de blastocisto.

En nuestro estudio, también intentamos evaluar el potencial de 4-OHE<sub>2</sub> para mejorar las tasas de implantación de embriones obtenidos *in vitro* utilizando un modelo de trasplante *in vivo*. Aquí, los embriones fueron cultivados en diferentes condiciones experimentales y luego transferidos a ratonas ICR receptoras, pasados 15 días de la transferencia embrionaria y tras la comprobación del embarazo, se sacrificó a los ratones y se observó su útero y placenta para determinar la tasa de implantación, el aborto espontáneo y el desarrollo del embrión. Cabe destacar que la calidad de la técnica de transferencia afecta a la tasa de embarazo y puede ser responsable de hasta el 30 % de los fallos de implantación (Cohen, 1998). Nuestros resultados confirmaron que los embriones obtenidos *in vitro* mostraron un menor potencial de implantación y mayor tasa de aborto espontáneo en comparación con los embriones desarrollados *in vivo*. Sin embargo, los blastocistos que fueron cultivados en presencia de 4-OHE<sub>2</sub> desde mórula hasta blastocisto, aunque mantuvieron tasas de implantación similares, produjeron menos tasas de abortos espontáneos y tasas de desarrollo fetal similares a las de los embriones desarrollados *in utero*. Como información adicional para confirmar la seguridad experimental, a algunas madres receptoras, transferidas con embriones cultivados en 4-OHE<sub>2</sub>, se les permitió llevar el embarazo a término y dar a luz. Notablemente, no se observaron defectos, malformaciones o problemas de fertilidad en la descendencia durante los 2 años de observación.

Aunque el objetivo principal de este trabajo fue comprobar si el 4-OHE<sub>2</sub> puede ser una posible alternativa en los medios de cultivos para mejorar las características del embrión e

implantación, aquí también llevamos a cabo experimentos similares con otras hormonas candidatas para este papel, como, el E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, y no se observaron efectos beneficiosos similares. Estos resultados sugieren fuertemente que la suplementación con 4-OHE<sub>2</sub> en los medios de cultivos *in vitro*, en las últimas etapas del desarrollo preimplantacional, mejora la calidad de los embriones, así como el potencial de los embriones implantados para desarrollarse y convertirse en fetos viables. Estos efectos pueden ser relacionados con la eficacia de 4-OHE<sub>2</sub> para activar embriones para adquirir potencial de implantación, haciendo que los embriones activados sean más propensos a desarrollarse una vez implantados (Paria y cols., 1998a).

La situación de un entorno endocrino y proteómico alterado durante el cultivo *in vitro*, utilizado como base para este estudio, se puede traducir a las TRA, especialmente en FIV humana por varias razones, primero, los fluidos tubáricos y uterinos contienen varios componentes más, incluidos las hormonas y los factores de crecimiento (Aguilar y Reyley, 2005; Avile's y cols., 2010), que los medios de cultivo suministrados comercialmente. En segundo lugar, durante las TAR se produce una clara desregulación del entorno hormonal de la mujer, producida por la protocolos de estimulación y transferencia (Timeva y cols., 2014). La alteración del perfil hormonal podría explicar niveles incorrectos de catecolestrógenos en el momento de la transferencia embrionaria a la cavidad uterina, impidiendo la activación necesaria del embrión y afectando la implantación. Esta discrepancia debe ser considerada por las clínicas para determinar los niveles hormonales y tenerlos en cuenta a la hora de decidir cuándo transferir los embriones, considerando la posibilidad de vitrificar los embriones y transferirlos en un ciclo diferido o evitar la transferencia de embriones en el día 3 cuando los niveles de estrógenos son altos. Estos resultados son consistentes con informes previos (Lattanzi y cols., 2003), destacando la importancia de la sincronización entre el ambiente endocrino y el estado de actividad del embrión durante el desarrollo preimplantacional. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, también sugieren que el enriquecimiento de los medios de cultivo con 4-OHE<sub>2</sub> en las últimas etapas del cultivo *in vitro* podría ser ventajoso para los embriones, favoreciendo al menos las primeras fases del proceso de implantación. Además, la consideración de diferentes medios de composición para diferentes etapas de desarrollo según la suplementación de estrógenos o sus derivados debe ser más investigada.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo demuestran el importante papel del 4-OHE<sub>2</sub> en el desarrollo del embrión, mejorando su calidad y el éxito de la implantación, probablemente al aumentar la capacidad del blastocisto para interactuar con el EGF. Sin

embargo, los efectos de los medios de cultivo enriquecidos con 4-OHE<sub>2</sub> son insuficientes para alcanzar los valores fisiológicos mostrados por embriones completamente desarrollados en el útero, abriendo la puerta a la investigación de factores adicionales involucrados en este proceso.

Por otro lado, hemos analizado los efectos de la suplementación del medio de cultivo con Quer, un flavonoide con propiedades antioxidantes. Se ha informado que la Quer tiene un efecto protector en embriones de ratón contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se observó una mejora en la tasa de formación de blastocistos cuando los embriones se cultivaron durante 3 horas con Quer (Yu y cols., 2014). También se ha observado que cuando se añade una concentración de más de 100 µM de Quer en el medio de cultivo se producen algunos defectos y anomalías en el embrión, mientras que una concentración de 3 µM de esta molécula tuvo un efecto protector en embriones de ratón contra la hidroxiurea (Hu y cols., 2012). Además, se demostró un efecto protector de la Quer en embriones cultivados con una concentración de 0,005 µg/ml de actinomicina D (Sameni y cols., 2018). En nuestro caso, los resultados obtenidos en los experimentos realizados sugieren que la Quer produce un efecto perjudicial sobre el desarrollo embrionario cuando se cultiva durante largos períodos de tiempo, independientemente de la etapa de desarrollo. Esto podría deberse a que después de 24 horas en medio de cultivo, la Quer deja de ser estable (Kang y cols., 2017) y pierde su eficacia como antioxidante, produciendo productos tóxicos para los embriones. Además, se ha observado que la Quer puede actuar como un compuesto antiproliferativo y proapoptótico en varias líneas de células cancerosas, esta propiedad podría explicar sus efectos negativos sobre los embriones en cultivo y porque no pueden crecer adecuadamente (Pérez-Pastén y cols., 2010). Además, hemos demostrado que el dimetilsulfoxido (DMSO), que es el vehículo habitual para disolver la Quer, tiene efectos citotóxicos en embriones preimplantacionales de ratón, lo que explica algunos de los resultados observados aquí, pero no los efectos drásticos observados con la Quer. Otra posibilidad es que este efecto citotóxico y la inestabilidad de la Quer después de 24 horas puedan estar produciendo un efecto sinérgico con el DMSO y sean responsables de las bajas tasas de desarrollo de blastocistos aquí observadas.

Al igual que pasó con la suplementación del 4-OHE<sub>2</sub> en el medio de cultivo, se produce una mejora en la calidad del embrión cuando se añade Quer en el momento de la compactación (día 3 de desarrollo preimplantacional, estadio de mórula), lo que indica que los embriones son más sensibles a ciertos cambios ambientales cuando se encuentran en el estadio de mórula

(Tao y cols., 2022). Sin embargo, en embriones obtenidos *in vitro*, nuestro estudio corrobora que la adición de Quer en el momento de la compactación del embrión por un período de 2 h o 4 h, da como resultado un mayor número de embriones que se desarrollan a la etapa de blastocisto, en comparación con los embriones cultivados en medio convencional, con resultados casi similares a los observados en embriones cultivados en baja concentración de O<sub>2</sub>. Estos resultados indican que la Quer no afecta negativamente a los embriones y, además, parece contrarrestar los efectos perjudiciales producidos por las condiciones de cultivo *in vitro*.

Poniendo esta información en el contexto del desarrollo embrionario, parece claro que la exposición de embriones de escisión temprana a ciertos compuestos y durante largos períodos de tiempo, perjudica el desarrollo normal y no logran alcanzar la etapa de blastocisto. Esto podría aplicarse a las hormonas y sus metabolitos, o antioxidantes como la Quer, que reduce la viabilidad de los embriones de diferentes maneras, como se indicó anteriormente. Sin embargo, la introducción de los mismos compuestos en la transición de mórula a blastocisto por períodos cortos de tiempo puede tener un efecto beneficioso cuando los embriones se cultivan *in vitro*. Evidentemente, deben exponerse las posibles implicaciones de esta situación sobre la embriología humana y el cultivo de embriones humanos.

Existen dos posibilidades convencionales para el cultivo de embriones humanos *in vitro* para técnicas de FIV, una es el cultivo secuencial, que implica cambiar el medio de cultivo en el día 3 de desarrollo a un medio más apropiado para cultivo extendido; y la otra es el cultivo único o de un solo paso, en el que se utiliza el mismo medio de cultivo a lo largo de todo el desarrollo del embrión (Wigger y cols., 2017). Nuestros resultados estarían a favor del primer tipo de cultivo, ya que las necesidades y la susceptibilidad de los embriones son muy diferentes en los primeros pasos del cigoto a la mórula, en comparación a cuando se forma el blastocisto. Nuestros datos podrían ayudar a comprender la posible modificación del medio de cultivo en la etapa de mórula para lograr mejores resultados en la FIV. Esta información también podría ayudar a algunos laboratorios que no tienen acceso a incubadoras de bajo O<sub>2</sub> porque la adición de Quer en condiciones del 20 % de O<sub>2</sub> en la etapa de mórula se asemeja al éxito que brindan estos sistemas en las clínicas de FIV.

Además de mejorar el potencial de desarrollo, nuestros resultados muestran que hay un aumento en el número total de células cuando usamos Quer, datos en concordancia con otros trabajos que muestran también este aumento después de usar Quer (Yu y cols., 2014; Sameni

y cols., 2018). Es importante mencionar que el aumento no fue descontrolado y el número máximo de células totales observado se mantuvo alrededor de 160. Esta observación es interesante porque un mayor número de células no se relaciona con un mayor potencial de implantación, y puede ser indicativo de mala calidad (Cao y cols., 2020).

Con respecto a las tasas de apoptosis, varios estudios demostraron que hubo una reducción en el número de células apoptóticas en blastocistos cuando los embriones fueron tratados con Quer después del tratamiento con sustancias estresantes o en ratones envejecidos (Yu y cols., 2014; Sameni y cols., 2018). Nuestros resultados están en concordancia con esto y muestran que, efectivamente, el cultivo de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* con Quer produjo una reducción del número de células apoptóticas por embrión, encontrando menos embriones con células apoptóticas cuando se cultivaron con Quer durante 4 h. Sin embargo, cuando los embriones se obtienen del útero en estado de mórula y se cultivan con Quer, no se observa una reducción en el número de embriones que tenían células apoptóticas, y muchos de los embriones presentan una sola célula apoptótica, lo que coincide con los resultados observados en el control. Nuevamente, estos resultados que muestran los efectos de la Quer en embriones obtenidos *in vitro* pero no en embriones desarrollados en el útero hasta la etapa de mórula, sugieren que la Quer no afecta a los embriones por sí mismos, pero parece contrarrestar los efectos negativos que los componentes y condiciones del medio de cultivo *in vitro* producen en los embriones fecundados *in vitro*. Por lo tanto, los efectos producidos por la Quer podrían atribuirse más a sus propiedades antioxidantes que a un efecto beneficioso sobre el desarrollo de los embriones (Rocha-Frigoni y cols., 2016).

Se sabe que la tensión de O<sub>2</sub> influye en el desarrollo embrionario y el número de células en varias especies. Varios estudios sugieren que las bajas concentraciones de O<sub>2</sub> benefician el desarrollo del embrión desde la etapa de 8 células hasta la de blastocisto (Karagenc y cols., 2004). De hecho, el desarrollo del embrión se retrasa cuando se cultiva bajo condiciones atmosféricas en comparación con una baja concentración de O<sub>2</sub> (Karagenc y cols., 2004). Además, el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto es menor, y esto probablemente se deba a un aumento en la generación de daño en el ADN inducido por las ERO en las células (Karagenc y cols., 2004), ya que una de sus principales consecuencias negativas es la producción de ERO. Por otro lado, los niveles de O<sub>2</sub> tienen una influencia significativa en los patrones de expresión génica que están mediados por el factor de transcripción heterodimérico HIF-1 $\alpha$  (Myhrstad y cols., 2002; Khandujay cols., 2001; Rocha-

Frigoni y cols., 2016). Harvey en 2007, sugirió que HIF puede estar involucrado en los mecanismos moleculares que responden a los cambios en el estado del O<sub>2</sub> durante el desarrollo embrionario en blastocistos bovinos y de ratón. Algunos estudios demostraron que HIF-1 $\alpha$  puede ser activado por el flavonoide Quer para la cicatrización de úlceras (Hyunchu y cols., 2007) y producir un aumento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en procesos relacionados con inflamación y enfermedades vasculares en células placentarias humanas (Bogacz y cols., 2021). Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que la localización de HIF-1 $\alpha$  fue predominantemente en el citoplasma de las células, lo que es consistente con el estudio previo de Thompson y cols. 2004 en el que se detectó HIF-1 $\alpha$  en el citoplasma de blastocistos de ratón cuando se cultivaron en una concentración baja de O<sub>2</sub> (2 %) durante la compactación y la blastulación. Además, los embriones obtenidos por fecundación *in vitro* y cultivados con Quer durante 4 horas presentaron una mayor expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Este aumento fue similar al observado en embriones obtenidos por FIV cultivados con O<sub>2</sub> al 3 % y en embriones obtenidos directamente del útero. Por el contrario, los embriones cultivados en medios convencionales apenas expresan la proteína HIF-1 $\alpha$ . La suma de todos estos resultados, podrían determinar que la Quer, al ser añadida al medio de cultivo de embriones por períodos cortos de tiempo, produce un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$ , lo que podría producir un aumento en la activación de los genes necesarios para la reducción de los niveles de ERO y los mecanismos de reparación.

Por tanto, para obtener un medio de cultivo mejorado, se han estudiado diferentes moléculas como candidatas potenciales para complementar el medio de cultivo de embriones. En nuestro caso hemos empleado las dos moléculas antes mencionadas, la Quer y 4-OHE<sub>2</sub> y los resultados obtenidos muestran que en mórulas obtenidas por FIV o desarrolladas IU, previamente sometidas a EO, la suplementación del medio de cultivo con 10 $\mu$ M de Quer disminuyó los niveles de ERO a valores cercanos a los observados en embriones cultivados en baja concentración de O<sub>2</sub>. Estos resultados sugieren que Quer tiene un efecto protector frente al EO, pudiendo mejorar la calidad de los embriones como indicamos anteriormente, ya que las mórulas tratadas con Quer presentaban menores tasas de apoptosis y mayor número de células totales en estadio de blastocisto. Resultados similares ya fueron reportados por Yu y cols. en 2014, que demostraron que el cultivo de embriones con Quer tenía un efecto beneficioso sobre el desarrollo embrionario. No obstante, nuestro estudio es el primero que evalúa los efectos de Quer específicamente en la etapa de mórula y por un corto período de tiempo.

En el caso de la 4-OHE<sub>2</sub>, hemos demostrado que se produce una mejora en la calidad embrionaria cuando se añade esta molécula en el momento de la compactación (día 3 de desarrollo preimplantacional). No obstante, también hemos demostrado que en este caso el 4-OHE<sub>2</sub> no tiene un efecto protector frente al EO en mórulas obtenidas y desarrolladas por FIV o IU, observándose niveles de ERO iguales a los producidos por DMSO o KSOM cuando se induce estrés a los embriones. Este resultado es consistente con otros estudios que muestran que el 4-OHE<sub>2</sub> no reduce los niveles de ERO, si no que incluso esta molécula puede aumentarlos (Salama y cols., 2008; Rempel y cols., 2009).

Además, como las condiciones de hipoxia inducen HIF, también estudiamos la expresión de HIF-1 $\alpha$  en diferentes condiciones, ya que es un elemento de respuesta a condiciones de bajo O<sub>2</sub> para que las células puedan adaptarse a la hipoxia (Semenza 2000; Wenger 2002), y otros genes inducidos por esta proteína. Debido al hecho de que antes de la implantación, los embriones están sujetos a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> en el útero, el papel de HIF y de sus genes aún no está claro durante el desarrollo preimplantacional. Se ha observado que los niveles de HIF-1 $\alpha$  aumentan exponencialmente a medida que las células se exponen a niveles bajos de O<sub>2</sub> (Mantikou y cols., 2013b; Ma y cols., 2017) y está estrechamente regulado a nivel de proteínas a través de la degradación mediada por ubiquitina en condiciones normóxicas, lo que significa que el O<sub>2</sub> lo degrada rápidamente y tiene una vida media corta (Ma y cols., 2017). También se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  se puede estabilizar en condiciones normóxicas mediante una variedad de estímulos diferentes, incluidos los flavonoides (Bogacz y cols., 2021) y el 4-OHE<sub>2</sub> (Gao y cols., 2004). De acuerdo con esta información, en este trabajo observamos que la expresión de HIF-1 $\alpha$  aumentó significativamente en las mórulas obtenidas tanto por FIV como desarrolladas IU cultivadas en baja concentración de O<sub>2</sub>. Además, los embriones obtenidos por FIV y cultivados con Quer en condiciones normóxicas mostraron una mayor expresión de HIF-1 $\alpha$ , y se obtuvieron resultados similares cuando los embriones se cultivaron con 4-OHE<sub>2</sub>.

Estos cambios en la expresión de HIF-1 $\alpha$  pueden afectar a sus genes diana y tener un efecto en la implantación embrionaria. Nuestros resultados muestran que en embriones obtenidos por FIV, la Quer produce un aumento en la expresión de todos los genes estudiados en este trabajo. Lo mismo se puede observar en los embriones tratados con 4-OHE<sub>2</sub>, excepto en el caso del gen ciclooxygenasa-2 (Cox-2), que disminuyó ligeramente. En el caso de Cox-2, que se ha observado que se expresa durante la ventana de implantación (Marions y Danielsson,

1999), su aumento causado por Quer en este trabajo puede estar activando una vía importante para la implantación, y por lo tanto dando embriones de mejor calidad. Se ha demostrado que embriones con expresión aumentada de Cox-2 tienen una mayor activación de prostaglandinas, las cuales están relacionadas con mejoras en la implantación y decidualización (Lim y cols., 1997). Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos por Bolouki y cols. en 2020, quienes demostraron que el tratamiento de embriones preimplantatorios con Quer en ratones diabéticos aumentaba la expresión de Cox-2.

En el caso de los genes Glut-1 y Glut-3, observamos un aumento significativo de estos cuando los embriones se cultivaron con Quer o 4-OHE<sub>2</sub>. Un aumento en los niveles de Glut-3 puede sugerir un aumento en la captación de glucosa, ya que se cree que media la captación de glucosa en el blastocisto desde el entorno externo (Havery, 2007). Este aumento podría generar cantidades suficientes de ATP para el embrión. Esta regulación positiva de Glut-3 fue similar a la observada por Kind y cols. en 2005, y está en concordancia con otros estudios de embriones humanos (Gardner y Wale, 2013) y de ratón (Wale y Gardner, 2012) que aumentaron significativamente la captación de glucosa cuando se cultivaron con baja tensión de O<sub>2</sub>. Cabe mencionar, que este es el primer estudio en el que se mide la expresión de transportadores de glucosa cuando se cultivan mórulas con 4-OHE<sub>2</sub> por 24 h y con Quer por 4 h, observándose un aumento de Glut-1 y Glut-3, necesarios para la obtención de energía y en consecuencia, la obtención de blastocistos más competentes.

En cuanto a Vegf, un gen que juega un papel importante en la permeabilidad vascular endometrial al inducir directamente la angiogénesis, reclutar células endoteliales y estimular su proliferación (Rabbani y cols., 2001), en los datos obtenidos en nuestro trabajo, observamos un aumento muy significativo en embriones cultivados con Quer y 4-OHE<sub>2</sub>. Una mayor angiogénesis podría ser beneficiosa para la implantación embrionaria, sin embargo se necesitan más estudios para corroborar esto, ya que un aumento excesivo de la angiogénesis también podría tener efectos muy negativos, llegando a producir tumores, por lo que estos resultados deben ser estudiados con detenimiento. Todos estos resultados sugieren que HIF-1 $\alpha$  puede ser un mecanismo molecular a través del cual el blastocisto puede detectar y responder a los cambios producidos por diferentes moléculas en el medio de cultivo. Se requieren más estudios para determinar si la expresión génica regulada por Quer y/o 4-OHE<sub>2</sub> en el embrión está mediada por HIF y el rango de genes regulados por estas moléculas en el embrión previo a la implantación.

Además, en este trabajo se estudiaron otros dos genes, Egf y Prdx-5, que no demostraron ser dianas de HIF-1 $\alpha$ . Nuestros resultados mostraron que los niveles de Egf aumentaron en todos los grupos, pero el aumento fue menor en el grupo FIV Quer (**figura 3, figura 4 del capítulo 3**). Sin embargo, los niveles entre los grupos FIV 4-OHE<sub>2</sub> e FIV O<sub>2</sub> 3 % son similares pero inferiores a los de los embriones obtenidos *in vivo*. Estos resultados podrían corroborar la hipótesis de que en los embriones tratados con Quer, activaría la vía Cox-2 pero no la vía Egf. Para asegurar esto, se necesitan más estudios. Anteriormente, demostramos que los embriones cultivados durante 24 h con 4-OHE<sub>2</sub> en la etapa de mórula unían más EGF, lo que podría mejorar las tasas de implantación. También se sabe que EGF puede inducir la expresión de HIF-1 $\alpha$  través del 4-OHE<sub>2</sub>. Estos resultados plantean la hipótesis de que el 4-OHE<sub>2</sub>, al unirse a EGF y expresar una mayor cantidad de HIF que los embriones cultivados en medios convencionales, podría ser un buen candidato para agregarlo a los medios de cultivo, pero para esto se necesitan más estudios ya que también produce un aumento de Vegf. Por otro lado, varios estudios demostraron que Quer reduce los niveles de EGF (Huangy cols., 1999; Kaneuchi y cols., 2003). Sin embargo, este es el primer estudio en el que se mide la expresión de Egf cuando se cultivan embriones preimplantacionales con Quer obteniendo resultados positivos, produciéndose un aumento de EGF que podría ayudar al embrión a establecer un diálogo con el útero para implantarse. No obstante, los resultados no son estadísticamente significativos, lo que podría deberse a que Quer tiene un efecto dosis-dependiente y su efecto depende del tejido que se trate.

Finalmente, estudiamos Prdx-5, una proteína que puede mejorar el desarrollo de blastocistos al proteger a las células del EO al regular la homeostasis de ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) (De Simoni y cols., 2013). En este trabajo, observamos que la Quer y la baja concentración de O<sub>2</sub> aumentaban los niveles de Prdx-5 en mórulas obtenidas por FIV. Estos resultados son consistentes con los de un estudio en ganado (Balasubramanian y cols., 2007), que muestra que las condiciones bajas de O<sub>2</sub> pueden mejorar la defensa mediada por antioxidantes contra el EO al eliminar las ERO extracelulares generadas, proporcionando así a los embriones un entorno de menos EO. En el caso de Quer, esta molécula podría estar reduciendo los niveles de ERO en embriones mediante el aumento de Prdx-5. Sin embargo, los niveles de Prdx-5 en embriones cultivados con 4-OHE<sub>2</sub> no aumentaron tanto como en los otros grupos. No obstante, los resultados también sugieren que 4-OHE<sub>2</sub> puede expresar la enzima antioxidante pero a niveles que no eliminan todas las ERO existentes o que la cantidad de expresión de la enzima no es suficiente para realizar su función. Estos datos brindan evidencia

creciente de que la protección interna en los embriones podría activarse, además de la hipoxia por Quer, a través de una mayor producción de Prdx-5 para limitar las ERO durante el desarrollo del blastocisto, pero no por 4-OHE<sub>2</sub>.

Por lo tanto, la suplementación de medios de cultivo para mejorar el desarrollo embrionario es un tema de gran interés. En este trabajo hemos mejorado el desarrollo y la implantación embrionaria utilizando dos clases diferentes de moléculas: Quer y 4-OHE<sub>2</sub>, obteniendo una calidad embrionaria similar a cuando los embriones se cultivan en bajas concentraciones de O<sub>2</sub> o se obtienen directamente del útero. Estos compuestos fueron efectivos cuando la adición se realizó en la transición de mórula a blastocisto, y no en otras fases de desarrollo, lo que indica que los embriones en esta etapa son más susceptibles a factores estresantes y también a tratamientos protectores, y por lo tanto es posible que las vías moleculares involucradas sean similares para las dos moléculas ensayadas.

En resumen, podemos decir que la Quer y el 4-OHE<sub>2</sub>, por separado, mejoran la calidad de los embriones, y que la Quer incluso reduce los niveles de ERO, especialmente en la etapa de compactación, cuando el embrión es más susceptible al medio que lo rodea. Además, ambas moléculas activan varios genes cuando se añaden a los medios de cultivo, entre ellos Hif-1 $\alpha$ , al que se asocian varios genes implicados en la mejora e implantación embrionaria. Con los resultados obtenidos, podemos plantear la hipótesis de que el cultivo de embriones con Quer podría mejorar la implantación a través de la vía Cox-2 y el 4-OHE<sub>2</sub> a través de la vía Egf, produciendo embriones más exitosos cuando se transfieren a los tratamientos de reproducción asistida que ofrecen las clínicas de reproducción, aunque se necesitan más estudios antes de que este procedimiento pueda usarse clínicamente. Además, la adición de ambos compuestos al medio de cultivo podría producir un efecto sumatorio que beneficiaría tanto al desarrollo embrionario como al proceso de implantación, aunque serían necesarios más estudios sobre el efecto conjunto de ambos compuestos para sustentar esta afirmación.

Si bien numerosos estudios han explorado el impacto en la calidad del embrión de alterar la composición del sustrato energético, complementar las macromoléculas, agregar factores de crecimiento y modificar otros constituyentes de los medios y condiciones de cultivo, con mejoras tecnológicas y nuevos enfoques para evaluar el metabolismo embrionario, la morfocinética y otros medios de evaluación de la viabilidad, sigue existiendo la posibilidad de que las formulaciones de los medios puedan refinarse y mejorarse aún más para beneficiar el

desarrollo embrionario y mejorar los resultados clínicos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían tener por tanto implicaciones importantes para las TRA como la modificación de las condiciones de cultivo o niveles hormonales del paciente. En base a los datos obtenidos, podrían proporcionar una estrategia interesante para mejorar el éxito de la FIV. Sin embargo, más investigaciones son cruciales antes de que estos hallazgos se puedan trasladar con eficacia y seguridad a las clínicas de fertilidad.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. La suplementación de los medios de cultivos *in vitro* con 4-OHE<sub>2</sub> en las últimas etapas del desarrollo embrionario preimplantacional, mejora la calidad de los embriones, así como el potencial de los embriones implantados para desarrollarse y convertirse en fetos viables.
2. La suplementación de los medios de cultivo con 4-OHE<sub>2</sub>, aumenta la capacidad final de los embriones *in vitro* para unir EGF.
3. La suplementación de los medios de cultivos con Quer produce un efecto perjudicial sobre el desarrollo embrionario cuando se cultiva durante largos períodos de tiempo, independientemente de la etapa de desarrollo.
4. La adición de Quer a los medios de cultivo en la fase de compactación por periodos cortos de tiempo mejora la calidad embrionaria y produce un aumento de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ .
5. La suplementación de Quer tiene un efecto protector frente al EO mientras que el 4-OHE<sub>2</sub> no presenta este efecto.
6. La suplementación de los medios de cultivo con Quer en condiciones normóxicas mostraron una mayor expresión de HIF-1 $\alpha$  y de los genes Glut-1, Glut-3, Vegf y Cox-2.
7. La suplementación de los medios de cultivo con 4-OHE<sub>2</sub> en condiciones normóxicas mostraron una mayor expresión de HIF-1 $\alpha$  y de los genes Glut-1, Glut-3 y Vegf.
8. La Quer y el 4-OHE<sub>2</sub> producen un aumento de la expresión de los genes Egf y la enzima antioxidante Prdx-5.
9. Estos compuestos fueron efectivos cuando la adición se realizó en la transición de mórula a blastocisto, y no en otras fases de desarrollo, lo que indica que los embriones en esta etapa son más susceptibles a factores estresantes y también a tratamientos protectores, y por lo tanto es posible que las vías moleculares involucradas sean similares para las dos moléculas ensayadas.



## **BIBLIOGRAFÍA**



# BIBLIOGRAFÍA

Abdallah FB, Zribi N, Ammar-Keskes L (2010) Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. *Andrología*, **43**: 261–265261.

Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R and Agarwal A (2009) L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril*, **91**: 589–96.

Absalon-Medina VA, Butler WR and Gilbert RO (2014) Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **31**: 393–409.

Agarwal A, Allamaneni SS (2004) Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online*, **9**: 338–347.

Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A and Gupta S (2012) The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **10**:49.

Agarwal A, Maldonado Rosas I, Anagnostopoulou C, Cannarella R, Boitrelle F, Munoz LV, Finelli, R, Durairajanayagam D, Henkel R, Saleh R (2022) Oxidative Stress and Assisted Reproduction: A Comprehensive Review of Its Pathophysiological Role and Strategies for Optimizing Embryo Culture Environment. *Antioxidants*, **11**: 477.

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG (2006) Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril*, **86**: 503–512.

Aguilar J, Reyley M (2005) The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Anim Reprod*, **2**: 91–105.

Agustín CR (1952) The “Capacitation” of the mammalian sperm. *Nature*, **170**: 326.

Aherne SA, O’Brien NM (2000) Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med*, **29**: 507–514.

Ahumada CJ, Salvador I, Cebrian-Serrano A, Lopera R, Silvestre MA (2013) Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. *Animal*, **7**: 455–462.

Amidi F, Rashidi Z, Khosravizadeh Z, Khodamoradi K, Talebi A, Navid S, and Abbasi M (2019) Antioxidant effects of quercetin infreeze-thawing process of mouse spermatogonial stem cells. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **8(1)**: 7.

Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A, Duburs G, Horakova L, Luczaj W, Majekova M, Odysseos AD, Rackova L, Skrzydlewska E, Stefek M, Strosova M, Tirzitis G, Venskutonis PR, Viskupicova J, Vranka PS and Zarkovic N (2010). Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic Res*, **44**: 1216–62.

Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P (2010) Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod*, **16**: 896–906.

Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW (2000) Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene*, **19**: 4621-4631.

Baghshahi H, Zenioaldini S an Yosefi A (2021) Effect of adding different levels of folic acid to the culture medium on developmen-tal competence of bovine oocytes. *Ira J App Ani Sci*, **11(2)**: 287-295.

Balaban B, Denny Sakkas BS, Gardner DK (2014) Laboratory Procedures for Human In Vitro Fertilization Semin. *Reprod Med*, **32**: 272–282.

Balasubramanian S, Son WJ, Kumar BM, Ock SA, Yoo JG, Im GS, *et al.* (2007) Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. *Theriogenology*, **68(2)**: 265–75.

Baltz JM (2013) Connections between preimplantation embryo physi-ology and culture. *J Assist Reprod Genet*, **30(8)**: 1001-7.

Batt PA, Gardner DK, Cameron AW (1991) Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev*, **3**: 601–607.

Bavister BD (1995) Culture of preimplantation embryos: facts and arti-facts. *Hum Reprod Update*, **1(2)**: 91-148.

- Bazinet L and Doyen A (2017). Antioxidants, mechanisms, and recovery by membrane processes. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **57**: 677–700.
- Bean CJ, Hassold TJ, Judis L (2002) Hunt Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. *Hum Reprod*, **17**: 2362-2367.
- Behrendtsen O, Alexander CM and Werb Z (1992) Metalloproteinases mediate extracellular matrix degradation by cells from mouse blastocyst outgrowths. *Development*, **114**: 447-456.
- Berthelot F, Terqui M (1996) Effects of oxygen, CO<sub>2</sub>/pH and medium on the in vitro development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos. *Reprod Nutr Dev*, **36**: 241–251.
- Biggers J, Racowsky C (2002) The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM<sup>AA</sup> medium: is a two-step protocol necessary?. *RBM Online*, **5**: 133-140.
- Biggers JD, Summers MC (2008) Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril*, **90**: 473–83.
- Bogacz A, Mikołajczak PŁ, Wolek M, Górska A, Szulc M, Ozarowski M, Kujawski R, Czerny B, Wolski H, Karpiński T.M, *et al.* (2021) Combined Effects of Methyldopa and Flavonoids on the Expression of Selected Factors Related to Inflammatory Processes and Vascular Diseases in Human Placenta Cells—An In Vitro Study. *Molecules*, **26**: 1259.
- Bolouki A, Zal F and Alaei S (2020) Ameliorative effects of quercetin on the preimplantation embryos development in diabetic pregnant mice. *Obstet. Gynaecol. Res*, **46(5)**: 736–744.
- Bontekoe S, Blake D, Heineman MJ, Williams EC, Johnson N (2010) Adherence compounds in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev*, **(7)**: CD007421.
- Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, **585**: 325–337.
- Borland RM, Biggers JD, Lechene CP, Taymor ML (1980) Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J Reprod Fertil*, **58(2)**: 479-82.
- Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ (2003) The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci*, **60**: 1376–1393.

- Brinster RL (1965) Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. *J Reprod Fertil*, **10(2)**: 227-40.
- Brown JJ, Whittingham DG (1991) The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro. *Development*, **112(1)**: 99-105.
- Calhaz-Jorge C, de Geyter C, Kupka MS, de Mouzon J, Erb K, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G, Wyns C, Goossens V (2016) Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, **31**: 1638–1652.
- Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M (2000) Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF $\beta$ 3. *J Clin Invest*, **105**: 577–587.
- Cao Y *et al.* (2020) Quercetin promotes in vitro maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell death and disease*, **11(11)**: 1-15.
- Cha J, Sun X, Dey SK (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med*, **18**: 1754–1767.
- Chen ZG, Luo LL, Xu JJ, Zhuang X L, Kong XX and Fu YC (2010) Effects of plant polyphenols on ovarian follicular reserve in aging rats. *Biochemistry and Cell Biology*, **88(4)**: 737–745.
- Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, Mardon HJ (2005) Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**: 913–919.
- Chronopoulou E and Harper JC (2015) IVF culture media: past, present and future. *Human Reproduction Update*, **21(1)**: 39–55.
- Chu M, Yao F, Xi G, Yang J, Zhang Z, Yang Q, Tian J, An L (2021) Vitamin C Rescues in vitro Embryonic Development by Correcting Impaired Active DNA Demethylation. *Front Cell Dev Biol*, **9**: 784244.
- Chun YS, Kim MS, Park JW (2002) Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 $\alpha$ . *J Korean Med Sci*, **17**: 581–8.
- Cohen J (1998) Embryo Replacement Technology. 31 Annual Post Graduate Course. San Francisco: ASRM.

Collins MK, Perkins GR, Rodriguez-Tarduchy G, Nieto MA, Lopez Rivas A (1994) Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *BioEssays*, **16**: 133–138.

Crespo I, García-Mediavilla MV, Almar M, González P, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, *et al.* (2008) Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. *Food Chem Toxicol*, **46**: 1555–1569.

Croxatto HB (2002) Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reproductive BioMedicine Online*, **4**: 160–169.

Das M, Holzer HE (2012) Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. *Fertil Steril*, **97**: 1021–1027.

David AVA, Arulmoli R and Parasuraman S (2016) Overviews of bio-logical importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, **10(20)**: 84.

De Simoni S, Linard D, Hermans E, Knoops B, Goemaere J (2013) Mitochondrial peroxiredoxin-5 as potential modulator of mitochondria-ER crosstalk in MPP+--induced cell death. *J Neurochem*, **125(3)**: 473–85.

Diaz-Cueto L, Gerton GL (2001) The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res*, **32**: 619–626.

Dong F, Wang S, Wang Y, Yang X, Jiang J, Wu D, Qu X, Fan H, and Yao R (2017) Quercetin ameliorates learning and memory via the Nrf2-ARE signaling pathway in d-galactose-induced neurotoxicity in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **491(3)**: 636–41.

Dong GZ, Kim CY, Cho WS, Shin YJ, Lee K (2006) Cryoprotective role of the flavonoid quercetin in mammalian cells. *Korean J. Genetics*, **28**: 269-277.

Dumollard R, Duchen M and Carroll J (2007a) The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, **77**: 21–49.

Dumollard R, Ward Z, Carroll J and Duchen MR (2007b) Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*, 134455–465.

Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL (1999) Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod*, **14**: 465-469.

Dunwoodie SL (2009) The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. *Development cell*, **17(6)**: 755-773.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y and Fujii-Kuriyama Y (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxiainducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *PNAS*, **94**: 4273–4278.

ESHRE Guideline Group on Good Practice in IVF Labs *et al.* (2015) Revised guidelines for good practice in IVF laboratories. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **31**: 685–686.

Esteves SC, Bento FC (2016) Air quality control in the ART laboratory is a major determinant of IVF success. *Asian J. Androl*, **18**: 596–599.

Fang C, Li T, Miao BY, Zhuang GL, Zhou C (2010) Mechanically expanding the zona pellucida of human frozen thawed embryos: a new method of assisted hatching. *Fertil Steril*, **94**: 1302–1307.

Fedele AO, Whitelaw ML and Peet DJ (2002) Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Molecular intervention*, **2(4)**: 229-243.

Feil D, Lane M, Roberts CT, Kelley RL, Edwards LJ, Thompson JG, Kind KL (2006) Effect of culturing mouse embryos under different oxygen concentrations on subsequent fetal and placental development. *J. Physiol.*, **572**: 87-96.

Fischer B and Bavister BD (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil*, **99**: 673–679.

Fischer C, Speth V, Fleig-Eberenz S and Neuhaus G (1997) Induction of zygotic polyembryos in wheat: Influence of auxin polar transport. *The Plant Cell*, **9(10)**: 1767–1780.

Folmes CD and Terzic A (2014) Metabolic determinants of embryonic development and stem cell fate. *Reproduction Fertility and Development*, **27**: 82–88.

Fouladi-Nashta AA, Raheem KA, Marei WF, Ghafari F and Hartshorne GM (2017) Regulation and roles of the hyaluro-nan system in mammalian reproduction. *Reproduction*, **153(2)**: R43-R58.

Franco HL, Jeong JW, Tsai SY, Lydon JP and DeMayo FJ (2008) In vivo analysis of progesterone receptor action in the uterus during embryo implantation. *Semin Cell Dev Biol*, **19**: 178-186.

Fritz R, Jain C, Armant DR (2014) Cell signaling in trophoblast-uterine communication. *Int J Dev Biol*, **58**: 261–271.

Gaddum-Rosse P and Blandau RJ (1973) In vitro studies on ciliary activity within the oviducts of the rabbit and pig. *Am J Anat*, **136**: 91-104.

Gao N, Nester RA and Sarkar MA (2004) 4-Hydroxy estradiol but not 2-hydroxy estradiol induces expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor A through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/FRAP pathway in OVCAR-3 and A2780-CP70 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **196(1)**: 124-135.

Gardner DK (2018) Human embryo development and assessment of viability. *Encyclopedia Reprod. Academic Press*, **2(5)**: 176-185.

Gardner DK, Lane MW and Lane M (2000) EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blasto-cyst development and differentiation. *Mol Reprod Dev*, **57(3)**: 256-61.

Gardner DK (2016) The impact of physiological oxygen during culture, and vitrification for cryopreservation, on the outcome of extended culture in human IVF. *Reprod BioMed Online*, **32**: 137-141.

Gardner DK and Lane M (2012) Extended culture in IVF Z.P. Nagy, A. Varghese, A. Agarwal (Eds.), *Practical manual of in vitro fertilization*, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 141-150.

Gardner DK, Wale PL (2013) Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril*, **99(4)**: 1062–72.

Gruber I and Klein M (2011) Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *J Turk Ger Gynecol Assoc*, **12(2)**: 110-7.

Guerin P, Mouatassim SE and Menezo Y (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, **7**: 175–189.

Guyader-Joly C, Guerin P, Renard JP, Guillaud J, Ponchon S, Menezo Y (1998) Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro. *Amino Acids*, **15(1–2)**: 27–42.

Guzy RD, Schumacker PT (2006) Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol*, **91**: 807–819.

Haida Z and Hakiman M (2019) A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr* **7**: 1555–63.

Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK (2004) Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 10326–10331.

Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis SJ, Molnar L, Gunnarsson K, Wikland M (2015) Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril*, **104(6)**: 1452–1459.

Hardy K and Spanos S (2002) Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol*, **172**: 221-236.

Harper J, Cristina Magli M, Lundin K, Barratt CLR and Brison D (2012) When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory? *Hum Reprod*, **27**: 303-313.

Harvey AJ (2007) The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci*, **98(1–2)**: 113–28.

Harvey AJ, Santos AN, Kirstein M, Kind KL, Fischer B, Thompson JG (2007) Differential expression of oxygen-regulated genes in bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, **74**: 290–9.

Harvey JA, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG (2004) Oxygen-Regulated Gene Expression in Bovine Blastocysts. *Biology of Reproduction*, **71(4)**: 1108–1119.

Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi S M, Tzanakakis G (2017) Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, **38(2)**: 819–828.

Heijnen CG, Haenen GR, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A (2002) Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res*, **36**: 575–581.

Henze AT, Riedel J, Diem T, *et al.* (2010) Prolyl hydroxylases 2 and 3 act in gliomas as protective negative feedback regulators of hypoxia-inducible factors. *Cancer Res*, **70(1)**: 357–366.

Herbemont C, Labrosse J, Bennani-Smires B, Cedrin-Durnerin I, Peigne M, Sermondade N, S. Sarandi, Vivot A, Vicaut E, Talib Z, Grynberg M and Sifer C (2021) Impact of oxygen tension according to embryo stage of development: a prospective randomized study. *Scientific Reports*, **11**: 22313.

Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA (2005) The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *Cell Physiol*, **202**: 663-71.

Hewitson LC and Leese HJ (1993) Energy metabolism of the trophecto-derm and inner cell mass of the mouse blastocyst. *J Exp Zool*, **267(3)**: 337-43.

Highet AM, Khoda SM, Buckberry S, Leemaqz S, Miotto TB, Harrinton E, Ricciardelli C, Roberts CT (2015) Hypoxia induced HIF-1/HIF-2 activity alters trophoblast transcriptional regulation and promotes invasión. *European Journal of Cell Biology*, **94(12)**: 589-602.

Houghton FD (2021) HYPOXIA AND REPRODUCTIVE HEALTH Hypoxic regulation of preimplantation embryos: lessons from human embryonic stem cells. *Reproduction*, **161**: F41–F51.

Hu J, Chen L, Lei F, Tian Y, Xing D-M, Chai Y-S, Zhao S, Ding Y and Du LJ (2012) Investigation of quercetin stability in cell culture medium: Role in in vitro experiment. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **6(14)**: 1069-1076.

Huang JY, and Rosenwaks Z (2014) Assisted Reproductive Techniques. *Human Fertility*, 171-231.

Huang LE, Ho V, Arany Z, Krainc D, Galson D, Tendler D, Livingston DM, Bunn HF (1997) Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. *Kidney Int*, **51**: 548–52.

Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C, Middleton E and Lee M-T (1999) Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol*, **128(5)**: 999–1010.

Hughes SJ, Hollingsworth M, Elliott KR (1997) The role of a cAMPdependent pathway in the uterine relaxant action of relaxin in rats. *Reproduction*, **109**: 289–296.

Hugo H. Marti, Dörthe M. Katschinski, Klaus F. Wagner, Leonhard Schäffer, Bettina Stier, Roland H. Wenger (2002) Isoform-Specific Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  During the Late Stages of Mouse Spermiogenesis. *Molecular Endocrinology*, **16(2)**: 234–243.

Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH (2000) Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril*, **73**: 117–122.

Humaidan P, Alviggi C, Fischer R, Esteves SC (2016) The novel POSeiDON stratification of ‘Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology’ and its proposed marker of successful outcome. *F1000 res*, **5**:2911.

Ivec M, Kovacic B and Vlajsavljevic V (2011) Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertil. Steril.*, **96**: 1473-1478e2.

Iwata K, Yumoto K, Sugishima M, Mizoguchi C, Kai Y, Iba Y and Mio Y (2014) Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *J Assist Reprod Genet*, **31**: 421-426.

Iwayama K, Kusakabe A, Ohtsu K, Nawano T, Tatsunami R, Ohtaki KI, Tampo Y and Hayase N (2017). Long-Term treatment of clarithromycin at a low concentration improves hydrogen peroxide-induced oxidant/antioxidant imbalance in human small airway epithelial cells by increasing Nrf2 mRNA expression. *BMC Pharmacol Toxicol*, **18**: 15.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev*, **12**: 149–162.

Jamil M, Debbarih H, Aboulmaouahib S, Aniq Filali O, Mounaji K, Zarqaoui M, Saadani B, Louanjli N, Cadi R (2020) Reactive oxygen species in reproduction: harmful, essential or both?. *Zygote*, **28(4)**: 255-269.

Jeeva JS, Sunitha J, Ananthalakshmi R, Rajkumari S, Ramesh M and Krishnan R (2015) Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *J Pharm Bioallied Sci*, **7**: S331–3.

Jeong W, Bazer FW, Song G, Kim J (2016) Expression of hypoxia-inducible factor-1 by trophoblast cells in response to hypoxia and epidermal growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **469(2)**: 176-182.

- Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J and Poellinger L (1997) Activation of the hypoxia inducible factor 1: Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**: 5667–5672.
- Kaneuchi, Sasaki, Tanaka, Sakuragi, Fujimoto, Dahiya (2003) Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *International Journal of Oncology*, **22(1)**: 159-164(6).
- Kang JT, Kwon DK, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Koo OJ, Lee BC (2013) Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. *Journal of Veterinary Science*, **14(1)**: 15–20.
- Kang JT, Moon JH, Choi JY, Park SJ, Kim SJ, Saadeldin IM and Lee BC (2016) Effect of Antioxidant Flavonoids (Quercetin and Taxifolin) on In vitro Maturation of Porcine Oocytes. *Asian-Australas J Anim Sci*, **29(3)**: 352–358.
- Kang MH, Das J, Kim JH *et al.* (2017) The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics*, **7(19)**: 4735–4752.
- Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahçeci M (2004) Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod BioMed Online*, **9(4)**: 409–17..
- Karimian M, Zandi M, Sanjabi MR, Masoumian M and Ofoghi H (2018) Effects of grape seed extract, quercetin and vitamin C on ovineocyte maturation and subsequent embryonic development. *Cellular and Molecular Biology*, **64(4)**: 98–102.
- Katz-Jaffe MG, Linck DW, Schoolcraft WB, Gardner DK (2005) A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction*, **130(6)**: 899–905.
- Kawabata, K., R. Mukai, and A. Ishisaka (2015) Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food and Function*, **6 (5)**: 1399–417.
- Kawamura K, Chen Y, Shu Y, Cheng Y, Qiao J, Behr B, Pera RA and Hsueh AJ (2012) Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors. *PLoS One*, **7(11)**: e49328.
- Ke Q and Costa M (2006) Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Minirevie. Mol Pharmacol*, **70**: 1469–1480.

Kelley RL and Gardner DK (2019) Individual culture and atmospheric oxygen during culture affect mouse preimplantation embryo metabolism and post-implantation development. *Reproductive BioMedicine Online*, **39(1)**: 3-18.

Khadrawy O, Gebremedhn S, Wondim DS, Rings F, Neuhoff C, Hoelker M, Schellander K, Dawit Tesfaye D (2020) Quercetin supports bovine preimplantation embryo development under oxidative stress condition via activation of the Nrf2 signalling pathway. *Reprod Domest Anim*, **55(10)**: 1275-1285.

Khanduja K, Verma A and Bhardwaj A (2001) Impairment of humansperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxi-dation. *Andrologia*, **33(5)**: 277–281.

Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T (2005) Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *PNAS*, **102**: 18028-33.

Kim J, Kim SH and Jun JH (2017). Prediction of blastocyst development and implantation potential in utero based on the third cleavage and compaction times in mouse pre-implantation embryos. *J Reprod Dev*, **63**: 117-125.

Kim TH, Yuh IS, Park IC, Cheong HT, Kim JT, Park CK and Yang BK (2014) Effects of Quercetin and Genistein on Boar Sperm Characteristics and Porcine IVF Embyo Developments. *J. Emb. Trans*, **29(2)**: 141-148.

Kind KL, Collett RA, Harvey AJ, Thompson JG (2005) Oxygen regulated expression of GLUT 1, GLUT 3, and VEGF in the mouse blastocyst. *Mol Reprod Dev*, **70**: 37–44.

Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ (2013) Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril*, **99**: 738-744.

Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T (2004) Effects of oxygen concentration and antioxidants on their vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, **62**: 1186-1197.

Kleijkers SH, Mantikou E, Slappendel E, Consten D, van Echten-Arends J, Wetzels AM, van Wely M, Smits LJ, van Montfoort AP, Repping S, Dumoulin JC, Mastenbroek S (2016) Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicentre RCT. *Hum Reprod*, **31(10)**: 2219-30.

Kobayashi Y, Oguro A, Imaoka S (2021) Feedback of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) transcriptional activity via redox factor-1 (Ref-1) induction by reactive oxygen species (ROS). *Free Radic Res*, **55(2)**: 154-164.

Koyasu S, Kobayashi M, goto Y, hiraoka M, Harada H (2018) Mecanismos reguladores de la actividad del factor 1 inducible por hipoxia: Dos décadas de conocimie. *Cancer science*, **109**: 560–571.

Laanpere M, Altmäe S, Stavreus-Evers A, Nilsson TK, Yngve A and Salumets A (2010) Folate-mediated one-carbon metab-olism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutr Rev*, **68(2)**: 99-113.

Lan LC, Lin YC, Chang YC, Lin HJ, Tsai YR and Kang HY (2019) Limited relationships between reactive oxygen species levels in culture media and zygote and embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **36**: 325–334.

Lane M and Gardner DK (2003) Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod*, **69(4)**: 1109-17.

Lattanzi ML, Santos CB, Mudry MD, Baranao JL (2003) Exposure of bovine oocytes to the endogenous metabolite 2-methoxyestradiol during in vitro maturation inhibits early embryonic development. *Biol Reprod*, **69**: 1793–1800.

Lee TH, Lee MS, Liu CH, Tsao HM, Huang CC, Yang YS (2012) The association between microenvironmental reactive oxygen species and embryo development in assisted reproduction technology cycles. *Reprod Sci*, **19(7)**: 725–32.

Leese HJ (1988) The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil*, **82**: 843-856.

Leese HJ, Tay JI, Reischl J and Downing SJ (2001) Formation of fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*, **121**: 339-346.

Lemeire K, Van Merris V, Cortvrindt R (2007) The antibiotic strepto-mycin assessed in a battery of in vitro tests for reproduc-tive toxicology. *Toxicol In Vitro*, **21(7)**: 1348-53.

Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW and Sun J (1994) Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertility and sterility*, **62**: 497-506.

- Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry M, Wang S, Yin Y (2016) Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients*, **8(3)**: 167.
- Li S and Winuthayanon W (2017) Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol*, **232(1)**: R1-R26.
- Lim H, Paria BC, Das SK *et al.*, (1997) "Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice". *Cell*, **91(2)**: 197–208.
- Lim HJ and Dey SK (2009) HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. *Exp Cell Res*, **315**: 619-626.
- Lisy K and Peet DJ (2008) Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell Death Differ*, **15**: 642–649.
- Loneragan P (2007) State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Reprod Dom Rum*, **6**: 315–325.
- Lyons RA, Saridogan and Djahanbakhch EO (2006) The reproductive significance of human fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update*, **12**: 363-372.
- Ma YY, Chen HW and Tzeng CR (2017) Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *Journal of Ovarian Research*, **10**: 47.
- Machha A, Achike FI, Mustafa AM and Mustafa MR (2007) Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide*, **16(4)**: 442–7.
- Machiko T, Yoichi K, Shozo T (1977) In vitro transformation of hamster embryo cells by quercetin. *Toxicology Letters*, **1**: 175-178.
- Mahdavinezhad F, Kazemi P, Fathalizadeh P, Sarmadi F, Sotoodeh L, Hashemi E, Hajarian H, Dashtizad M (2019) In vitro versus in vivo: Development-, apoptosis-, and implantation-related gene expression in mouse blastocyst. *Iran J Biotechnol*, **17**: e2157.
- Makarevich AV and Markkula M (2002) Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol Reprod*, **66(2)**: 386-92.

- Mantikou E, Bontekoe S, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S (2013b) Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod Update*, **19(3)**: 209.
- Mantikou E, Youssef MAFM, van Wely M, van der Veen F (2013a) Al-Inany HG Repping S Mastenbroek S Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update*, **19**: 210-220.
- Mao T, Han C, Wei B, Zhao L, Zhang Q, Deng R, Liu J, Luo Y and Zhang Y (2018) Protective Effects of Quercetin Against Cadmium Chloride-Induced Oxidative Injury in Goat Sperm and Zygotes. *Biological Trace Element Research*, **185**: 344–355.
- Marions L and Danielsson k.G (1999) “Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period.” *Molecular Human Reproduction*, **5(10)**: 961–965.
- Markides CSA and Liehr JG (2005) Specific binding of 4-hydroxyestradiol to mouse uterine protein: evidence of a physiological role for 4-hydroxyestradiol. *Journal of Endocrinology*, **185**: 235–242.
- Martin KL, Barlow DH, Sargent IL (1998) Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod*, **13**: 1645–1652.
- Martin-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Dominguez-Arroyo JA, Gonzalez-Carrera E, Alvarez IS (2008) Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod BioMed Online*, **17(5)**: 652–61.
- Marxsen JH, Stengel P, Doege K, *et al.* (2004) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J*, **381(3)**: 761–767.
- Maside C, Martinez CA, Cambra JM, Lucas X, Martinez EA, Gil MA, Rodriguez-Martinez H, Parrilla I and Cuello C (2019) Supplementation with exogenous coenzyme Q10 to media for in vitro maturation and embryo culture fails to promote the developmental competence of porcine embryos. *Reprod Domest Anim*, **54 (Suppl 4)**: 72–7.
- Masoud GN and Li W (2015) HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **5(5)**: 378-389.

Matsumoto H, Fukui E, Yoshizawa M (2015) Angiogenesis and hormonal regulation on uterine receptivity for blastocyst implantation. *J Mamm Ova Res*, **32**: 79–85.

Mishra A, Reddy I, Gupta P and Mondal S (2016) L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant menzymes in sheep embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, **51(2)**:311–321.

Morbeck DA, Krisher R, Herrick J, Baumann N, Matern D and Moyer T (2014) Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil Steril*, **102**: 759–766.

Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO (2002) Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med*, **32**: 386–393.

Nagao A, Seki M, Kobayashi H (1999) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**: 1787–1790.

Naillat F, Saadeh H, Nowacka-Woszuk J, Gahurova L, Santos F, Tomizawa SI, Kelsey G (2021) Oxygen concentration affects de novo DNA methylation and transcription in in vitro cultured oocytes. *Clin. Epigenetics*, **13**: 132.

Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawakishi S (1998) Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol*, **45**: 265-7.

Nanassy L, Peterson CA, Wilcox AL, Peterson MC, Hammoud A, Carrell TD (2010) Comparison of 5% and ambient oxygen during days 3-5 of in vitro culture of human embryos. *Fertil Steril*, **93(2)**: 579-85.

Naseer Z, Ahmad E, Epikmen ET, Uçan U, Boyacioglu M, Ipek E, Akosy M (2017) Quercetin supplemented diet improves follicular development, oocyte quality, and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. *Theriogenology*, **96**: 136e141.

Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR (2012) Human preimplantation embryo development. *Development*, **139**: 829–841.

Nowak-Imialek M, Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lagutina I, Lemme E, Lazzari G, Galli C, Niemann H (2008) Messenger RNA expression patterns of histone-associated genes in bovine preimplantation embryos derived from different origins. *Mol Reprod Dev*, **75**: 731–743.

O'Neill C (2008) The potential roles for embryotrophic ligands in pre-implantation embryo development. *Hum Reprod Update*, **14(3)**: 275-88.

Organización Mundial de la Salud (OMS) [https://www.who.int/es/health-topics/infertility#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/infertility#tab=tab_1)

Orlovski D, Miclea I, Zahan M, Miclea V and Pernes AJ (2014) Quer-cetin efficacy on in vitro maturation of porcine oocytes. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, **47(1)**: 113–115.

Paria BC, Chakraborty C, Dey SK (1990a) Catechol estrogen formation in the mouse uterus and its role in implantation. *Mol Cell Endocrinol*, **69**: 25–32.

Paria BC, Das SK, Dey SK (1998a) Embryo implantation requires estrogen-directed uterine preparation and catecholesterogen-mediated embryonic activation. *Adv Pharmacol*, **42**: 840–843.

Paria BC, Dey SK (1990b) Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 4756–4760.

Paria BC, Elenius K, Klagsbrun M, Dey SK (1999) Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*, **126**: 1997–2005.

Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK (1993) Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 10159–10162.

Paria BC, Lim H, Wang XN, Liehr J, Das SK, Dey SK (1998b) Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology*, **139**: 5235–5246.

Paternot G, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens CC (2010) Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **8(83)**.

Pelton TA, Bettess MD, Lake J, Rathjen J and Rathjen PD (1998) Developmental complexity of early mammalian pluripotent cell populations in vivo and in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, **10**: 535–549.

Pérez-Pastén R, Martínez-Galero E, Chamorro-Cevallos G (2010) Quercetin and naringenin reduce abnormal development of mouse embryos produced by hydroxyurea. *J Pharm Pharmacol*, **62**: 1003–1009.

Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT (2020) Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Human Reproduction Update*, **16(4)**: 415–431.

Ptak GE, Tacconi E, Czernik M, Toschi P, Modlinski JA, Loi P (2012) Embryonic diapause is conserved across mammals. *PLoS One*, **7**: e33027.

Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, **272**: 11205–14.

Rabbani ML and Rogers PA (2001) Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction*, **122(1)**: 85–90.

Rafiq RA, Quadri A, Nazir LA, Peerzada K, Ganai BA and Tasduq SA (2015) A potent inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen activated protein (MAP) kinase signalling, quercetin (3,30,40,5,7-pentahydroxyflavone) promotes cell death in ultraviolet (UV)-B irradiated B16F10 melanoma cells. *PLoS One*, **10(7)**: e0131253.

Ramírez-Bergeron DL, Runge A, Adelman DM, Gohil M and Simon MC (2006) HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Developmental Cell*, **11**: 81–92.

Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**: 267–71.

Registro Nacional de Actividad 2019- Registro SEF. Elaborado en junio 2021. Informe estadístico en técnicas de reproducción asistida 2019.

Rempel MA, Hester B, DeHaro H, Hong H, Wang Y and Schlenk D (2009) Effects of 17 $\beta$ -estradiol, and its metabolite, 4-hydroxyestradiol on fertilization, embryo development and

oxidative DNA damage in sand dollar (*Dendraster excentricus*) sperm. *Sci Total Environ*, **407(7)**: 2209–2215.

Richter KS (2008) The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Curr Opin Obstet Gynecol*, **20(3)**: 292-304.

Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM (2006) Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril*, **86(4, Suppl)**: 1252–1265, e1–e36.

Rincon JAA, Pradiee J, Remiao MH, Collares TV, Mion B, Gasperin BG, Tomazele Rovani M, Correa MN, Pegoraro LMC and Schneider A (2019) Effect of high-density lipoprotein on oocyte maturation and bovine embryo development in vitro. *Reprod Domest Anim*, **54**: 445–55.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, **61**: 234–248.

Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL (2012) Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod Domest Anim*, **47(2)**: 344–52.

Robertson SA, Sjöblom C, Jasper MJ, Norman RJ and Seamark RF (2001) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol Reprod*, **64(4)**: 1206-15.

Rocha-Frigoni NA, Leão BC, Dall'Acqua PC, and Mingoti GZ (2016) Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology*, **86(8)**: 1897–1905.

Rozoy E, Simard S, Liu Y, Kitts D, Lessard J and Bazinet L (2012). The use of cyclic voltammetry to study the oxidation of l-5-methyltetrahydrofolate and its preservation by ascorbic acid. *Food Chem*, **132**: 1429–35.

Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998) HIF-1 $\alpha$  is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, **17**: 3005–3015.

Saini S, Sharma V, Ansari S, Kumar A, Thakur A, Malik H, Kumar S and Malakar D (2022) Folate supplementation during oocyte maturation positively impacts the folate-methionine metabolism in pre-implantation embryos. *Theriogenology*, **182**: 63-70.

Sakanashi Y, Oyama K, Matsui H, Oyama TB, Oyama TM, Nishimura Y, Sakai H, and Oyama Y (2008) Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca<sup>2+</sup>: a model experiment. *Life Sciences*, **83 (5–6)**: 164–9.

Salama SA, Kamel M, Awad M, Ben Nasser AH, Al-Hendy A, Botting S and Arrastia C (2008) Catecholestrogens induce oxidative stress and malignant transformation in human endometrial glandular cells: Protective effect of catechol-O-methyltransferase. *Int. J. Cancer*, **123**: 1246–1254.

Salamonsen LA (1999) Role of proteases in implantation. *Rev Reprod*, **4**: 11-22.

Sameni HR, Javadinia SS, Safari M, Amjad MHT, Khanmohammadi N, Parsaie H, Zarbakhsh S (2018) Effect of quercetin on the number of blastomeres, zona pellucida thickness, and hatching rate of mouse embryos exposed to actinomycin D: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*, **16(2)**: 101-108.

Saugandhika S, Sharma V and Khatak K (2022) Illustrating the past, present and future perspective of Human Embryo Culture Media. *Animal Reproduction Update*, **2(1)**.

Scheil V, Zurn A, Kohler HR, Triebkorn R (2010) Embryo development, stress protein (Hsp70) responses, and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos, and binary mixtures of them. *Environ Toxicol*, **25**: 83–93.

Schlafke S and Enders AC (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biology of reproduction*, **12**: 41-65.

Schofield CJ and Ratcliffe PJ (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **338**: 617–626.

Sciorio R and Esteves SC (2020) Clinical utility of freeze-all approach in ART treatment: A mini-review. *Cryobiology*, **92**: 9-14.

Semenza GL (2000) HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, **88**: 1474–1480.

Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3(10)**: 721–732.

Semenza GL, Roth PH, Fang H-M, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **269**: 23757–23763

Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, **12**: 5447–5454.

Sfontouris IA, Kolibianakis EM, Lainas GT, Petsas GK, Tarlatzis BC, Lainas TG (2017) Blastocyst development in a single medium compared to sequential media: a prospective study with sibling oocytes. *Reprod Sci (Thousand Oaks, Calif)*, **24(9)**: 1312–1318.

Shahbazi MN (2020) Mechanisms of human embryodevelopment: from cell fate to tissue shape and back. *Development*, **147**, dev190629.

Shahzad H, Giribabu N, Karim K, Kassim N, Muniandy S, Kumar KE, *et al.* (2017) Quercetin interferes with the fluid volume and receptivity development of the uterus in rats during the peri-implantation period. *Reprod Toxicol*, **71**: 42–54.

Shih YF, Lee TH, Liu CH, Tsao HM, Huang CC, Lee MS (2014) Effects of reactive oxygen species levels in prepared culture media on embryo development: a comparison of two media. *Taiwan J Obstet Gynecol*, **53(4)**: 504–8.

Sies H (1985) Oxidative stress: Introductory remarks. In *Oxidative Stress*; Sies, E., *Ed.*; Academic Press: London, UK, 1–8.

Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol*, **11**: 613–619.

Silva E, Almeida H, Castro JP (2020) Fertility and Oxidative Stress: New Insights into Novel Redox Mechanisms Controlling Fundamental Reproductive Processes. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 4674896.

Silvestris E, Lovero D, and Palmirotta R (2019) Nutrition and Female Fertility: An Interdependent Correlation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **10**: 346.

Simon C and Dominguez F (2004) Embryonic-endometrial interactions at implantation in humans. *Gynecologic and obstetric investigation*, **57**: 28-30.

Simon C, Gimeno MJ, Mercader A, O'Connor JE, Remohi J, Polan ML and Pellicer A (1997) Embryonic regulation of integrins beta 3, alpha 4, and alpha 1 in human endometrial epithelial cells in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **82**: 2607-2616.

Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG (2003) Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim Reprod Sci*, **77**: 21–32.

Song H, Lim H, Das SK, Paria BC and Dey SK (2000). Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol Endocrinol*, **14**: 1147-1161.

Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros F, Lopes FG and Leal C (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod Domest Anim*, **52**: 561–9.

Stephoe PC, Edwards RG (1976) Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet*, **307(7965)**:880–882.

Stephoe PC, Edwards RG (1978) Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet*, **2(8085)**: 366.

Stochmalová A, Sirotkin A, Kádasi A and Alexa R (2013) Physiological and medical effects of plant flavonoid quercetin. *The Journal of Micro-biology, Biotechnology and Food Sciences*, **1915(34)**: 318.

Sunde A, Brison D, Dumoulin J, Harper J, Lundin K, Magli MC, Van den Abbeel E and Veiga A (2016) Time to take human embryo culture seriously. *Human Reproduction*, **31(10)**: 2174–2182.

Swain JE (2012) Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF? *Hum Reprod Update*, **18(3)**: 333-9.

Swain JE, Carrell D, Cobo A, Meseguer M, Rubio C and Smith GD (2016) Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertility and Sterility*, **105 (3)**: 571-587.

Taepongsorat L, Tangpraprutgul P, Kitana N and Malaivijitnond S (2008) Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. *Asian Journal of Andrology*, **10(2)**: 249–258.

Takahashi M (2012) Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev*, **58(1)**: 1–9.

Takeuchi M, Seki M, Furukawa E, Takahashi A, Saito K, Kobayashi M, Ezo K, Fukui E, Yoshizawa M, Matsumoto H (2017) Improvement of implantation potential in mouse blastocysts derived from IVF by combined treatment with prolactin, epidermal growth factor and 4-hydroxyestradiol. *Molecular Human Reproduction*, **23(8)**: 557–570.

Tao P, Zhou W, Yan X, Wu R, Cheng L, Ye Y, Wang Z, Li Y (2021) Effect of sequential versus single-step culture medium on IVF treatments, including embryo and clinical outcomes: a prospective randomized study. *Arch Gynecol Obstet*, 1-9.

Tao P, Zhou W, Yan X, Wu R, Cheng L, Ye Y, Wang Z, Li Y (2022) Effect of sequential versus single-step culture medium on IVF treatments, including embryo and clinical outcomes: a prospective randomized study. *Arch Gynecol Obstet*, **305(3)**: 757-765.

Tarahomi M, Vaz FM, van Straalen JP, Schrauwen FAP, van Wely M, Hamer G, Repping S and Mastenbroek S (2019) The composition of human preimplantation embryo culture media and their stability during storage and culture. *Hum Reprod*, **34(8)**: 1450-1461.

Tebboub I and Kechrid Z (2019). Effect of curcuma on zinc, lipid profile and antioxidants levels in blood and tissue of streptozotocin-induced diabetic rats fed zinc deficiency diet. *Arch Physiol Biochem*, **19**: 1–8.

Teklenburg G, Macklon NS (2009) Review: in vitro models for the study of early human embryo-endometrium interactions. *Reprod Sci*, **16**: 811–818.

Thompson J, Feil D, Edwards L, Lane Michelle, Karen K (2004) Mouse fetal development is perturbed by culture in low oxygen concentration that increases expression of oxygen-sensitive genes via hypoxia inducible factors: A non-epigenetic embryonic programming phenomenon? *The Society for the Study of Reproduction*, 2004: **547**.

Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR (1990) Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil*, **89**: 573–578.

Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, *et al.*, (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, **269**: 230-234.

Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD *et al.* (1999) Vasos sanguíneos resistentes a fugas en ratones que sobreexpresan transgénicamente angiopoyetina-1. *Ciencia*, **286**: 2511–2514.

Tian H, Mcknight SL and Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes and Development*, **11**: 72–82.

Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S (2014) Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. *J Reprod Infertil*, **15**: 173–183.

Truong T and Gardner DK (2017) Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Hum Reprod*, **32**: 2404–13.

Turhan A, Pereira MT, Schuler G, Bleul U, Kowalewski MP (2021) Hypoxia-inducible factor (HIF1alpha) inhibition modulates cumulus cell function and affects bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*, **104(2)**: 479–491.

Ufer C, Wang CC, Borchert A, Heydeck D, Kuhn H (2010) Redox control in mammalian embryo development. *Antioxid. Redox Signal*, **13**: 833–875.

Ullah O, Li Z, Ali I, Xu L, Liu H, Shah SZA and Fang N (2019) Pterostilbene alleviates hydrogen peroxide-induced oxidative stress via nuclear factor erythroid 2 like 2 pathway in mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev*, **65**: 73–81.

Wale PL and Gardner DK (2012) Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. *Biol Reprod*, **87(1)**: 24. 1–8.

Wale PL, Gardner DK (2016) The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update*, **22**: 2-22.

Wang H, Dey SK (2006) Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, **7**: 185–199.

- Wang H, Jo YJ, Oh JS and Kim NH (2017) Quercetin delays postovulatory aging of mouse oocytes by regulating SIRT expression and MPF activity. *Oncotarget*, **8(24)**: 38631.
- Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK (2002) Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*, **78(6)**: 1272-7.
- Wang X, Wang H, Matsumoto H, Roy SK, Das SK, Paria BC (2002) Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster. *Development*, **129**: 4125–4134.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA and Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *PNAS*, **92**: 5510–5514.
- Weidemann A and Johnson RS (2008) Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death and Differentiation*, **15**: 621–627.
- Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub> sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J*, **16**: 1151–1162.
- Whitten WK (1956) Culture of tubal mouse ova. *Nature*, **177(4498)**: 96.
- Whitten WK (1957) Culture of tubal ova. *Nature*, **179(4569)**: 1081-2.
- Whitten WK and Biggers JD (1968) Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil*, **17(2)**: 399-401.
- Wigger M, Kisiełowska K, Filimonow K, Plusa B, Maleszewski M and Suwińska A (2017) Plasticity of the inner cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *PLoS One*, **7(1)**: 1-13.
- Wolff GS, Chiang PJ, Smith SM, Romero R, Armant DR (2007) Epidermal growth factor-like growth factors prevent apoptosis of alcohol-exposed human placental cytotrophoblast cells. *Biol Reprod*, **77**: 53–60.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (1999) Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev*, **53**: 8–18.

Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, Giulini S, La Marca A, Tirelli A, Volpe A (2010) Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril*, **93** (6): 1859-63.

Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ and Li HB (2017) Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci*, **18**: 96.

Yao T and Asayama Y (2016) Human preimplantation embryo culture media: Past, present, and future. *J Mamm Ova Res*, **33**(1): 17-34.

Yaseen MA, Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H (2001) Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction*, **122**: 601–610.

Yoon J, Juhn KM, Ko JK, Yoon SH, Ko Y, Lee CY and Lim JH (2013) Effects of oxygen tension and IGF-I on HIF-1 $\alpha$  protein expression in mouse blastocysts. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **30**: 99–105.

Yoshinaga K (2014) Progesterone and its downstream molecules as blastocyst implantation essential factors. *Am J Reprod Immunol*, **72**: 117–128.

Yu S, Long H, Lyu QF, Zhang QH, Yan ZG, Liang HX, Qi C (2014) Protective effect of quercetin on the development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury. *PLoS One*, **9**(2): e89520.

Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FO, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ (2003) Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, **59**: 1585-1596.

Zacchini F, Toschi P and Ptak GE (2017) Cobalamin supplementation during in vitro maturation improves developmental competence of sheep oocytes. *Theriogenology*, **93**: 55-61.

Zagórska A and Dulak J (2004) HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta biochimica polonica*, **51**(3).

Zander-Fox D and Lane M (2012) The future of human embryo culture media-or have we reached the ceiling. In *'The Human Embryo'* (Ed. Dr. Shigehito Yamada), 73-98.

Zander-Fox D and Lane M (2014) Amino acids and ammonium. In P. Quinn (Ed.), *Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART*, 95-111, Cambridge: Cambridge University Press.

Zandstra H, Van Montfoort AP and Dumoulin JC (2015) Does the type of culture medium used influence birthweight of children born after IVF?. *Human Reproduction*, **30**: 530–542.

Zarbaksh S (2021) Effect of antioxidants on preimplantation embryo development in vitro: a review. *Zygote*, **29**: 179–193.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W (2016) ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling Oxid. *Med Cell Longev*, **1620**: 4350965.

Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, Armant DR (2013) Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*, **34**: 939–980.

Zhao Y and Chegini N (1994) Human fallopian tube expresses granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptors and contain immunoreactive GM-CSF protein. *J Clin Endocrinol Metab*, **79(2)**: 662-5.

Zhao Y, Brezina P, Hsu CC, Garcia J, Brinsden, PR Wallach E (2011) In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *Biochim Biophys Acta*, **1810**: 843-852.



## **ANEXO I: Publicaciones derivadas de la tesis doctoral**



## ANEXO I: Publicaciones derivadas de la tesis doctoral

1. Nuria Hernández, Marta López-Morató, Mario J. Perianes, Soledad Sánchez Mateos, Vanessa Casas-Rua, José Antonio Domínguez-Arroyo, Francisco M. Sánchez-Margallo, and Ignacio S. Álvarez. **4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability *in vitro* and implantation rates.** *Molecular Human Reproduction*, pp. 1–17, 2020. doi:10.1093/molehr/gaaa075.

2. Nuria Hernández-Rollán, Soledad Sánchez-Mateos, Marta López-Morató, Francisco M. Sánchez Margallo, Ignacio S. Álvarez. **Supplementation of culture medium with quercetin for short periods of time ameliorates its harmful effects and improves mouse embryo development *in vitro* by increasing the expression of HIF-1 $\alpha$  protein.** *Zygote*. En revisión.

3. Nuria Hernández-Rollán, Soledad Sánchez-Mateos, Marta López-Morató, Francisco M. Sánchez-Margallo, Ignacio S. Álvarez. **Effect of the addition of 4OHE<sub>2</sub> and quercetin in culture media on ROS levels and gene expression in mouse blastocysts.** *Reproduction, fertility and development*. Acceptados con revisiones menores.





Home

Help ▾

Live Chat

Nuria Hernández Rollán ▾

### 4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability *in vitro* and implantation rates



Author: Hernández, Nuria; López-Morató, Marta

Publication: Molecular Human Reproduction

Publisher: Oxford University Press

Date: 2020-11-25

Copyright © 2020, Oxford University Press

#### Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Mrs. Nuria Hernández Rollán ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5330750143727

[Printable Details](#)

License date Jun 16, 2022

#### Licensed Content

Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Molecular Human Reproduction
Licensed Content Title	4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability <i>in vitro</i> and implantation rates
Licensed Content Author	Hernández, Nuria; López-Morató, Marta
Licensed Content Date	Nov 25, 2020
Licensed Content Volume	27
Licensed Content Issue	2

#### Order Details

Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Author of this OUP content
Format	Print and electronic
Portion	Text Extract
Number of pages requested	17
Will you be translating?	No

#### About Your Work

Title	4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability <i>in vitro</i> and implantation rates.
Institution name	Jesús Usón M inimally Invasive Surgery Centre
Expected presentation date	Oct 2022

#### Additional Data

Portions	Main text
----------	-----------

16/6/22, 13:31

Rightslink® by Copyright Clearance Center

 Requestor Location	 Tax Details
Mrs. Nuria Hernández Rollán ctra N-521, KM 41.8	Publisher Tax ID GB125506730
<b>Requestor Location</b> Cáceres, 10071 Spain Attn: Mrs. Nuria Hernández Rollán	
<b>\$ Price</b>	
<b>Total</b>	0.00 EUR
<b>Total: 0.00 EUR</b>	
<a href="#">CLOSE WINDOW</a>	<a href="#">ORDER MORE</a>

© 2022 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customer care@copyright.com](mailto:customer care@copyright.com)

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Jun 16, 2022

---

This Agreement between Mrs. Nuria Hernández Rollán ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number 5330750143727

License date Jun 16, 2022

Licensed content publisher Oxford University Press

Licensed content publication Molecular Human Reproduction

Licensed content title 4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability *in vitro* and implantation rates

Licensed content author Hernández, Nuria; López-Morató, Marta

Licensed content date Nov 25, 2020

Type of Use Thesis/Dissertation

Institution name

Title of your work 4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability *in vitro* and implantation rates.

Publisher of your work Jesús Usón M inimally Invasive Surgery Centre

Expected publication date Oct 2022

Permissions cost 0.00 EUR

Value added tax 0.00 EUR

Total 0.00 EUR

Title 4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability in vitro and implantation rates.

Institution name Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre

Expected presentation date Oct 2022

Portions Main text

Mrs. Nuria Hernández Rollán  
c/tra N-521, KM 41.8

Requestor Location Cáceres, 10071  
Spain  
Attn: Mrs. Nuria Hernández Rollán

Publisher Tax ID GB125506730

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL  
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.

3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.

4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.

5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.

6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from [www.oxfordjournals.org](http://www.oxfordjournals.org) Should there be a problem clearing these rights, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.

8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.

10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Other Terms and Conditions:

v1.4

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or**

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

3/4

16/6/22, 13:31

RightsLink Printable License

**+1-978-646-2777.**

---

---

# 4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding capability *in vitro* and implantation rates

Nuria Hernández <sup>1,\*</sup>, Marta López-Morató <sup>1</sup>, Mario J. Perianes <sup>2</sup>, Soledad Sánchez-Mateos <sup>1</sup>, Vanessa Casas-Rua <sup>2</sup>, José Antonio Domínguez-Arroyo <sup>3</sup>, Francisco M. Sánchez-Margallo <sup>1</sup>, and Ignacio S. Álvarez <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Assisted Reproduction Unit, Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre, Cáceres, Spain <sup>2</sup>Department of Cell Biology, University of Extremadura, Badajoz, Spain <sup>3</sup>Instituto Extremeño de Reproducción Asistida—Quirónsalud, Badajoz, Spain

\*Correspondence address. Assisted Reproduction Unit, Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre, CN521, Km 41.8, Cáceres 10071, Spain. Tel: +34-927181032; Fax: +34-927181033; E-mail: nhernandez@ccmijesususon.com <https://orcid.org/0000-0002-6812-1189> (N.H.); Department of Cell Biology, School of Medicine, University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain. E-mail: ialvarez@unex.es <https://orcid.org/0000-0003-2352-7895> (I.S.A.)

Submitted on May 14, 2020; resubmitted on October 30, 2020; editorial decision on November 6, 2020

**ABSTRACT:** Embryo implantation in the uterus is a critical step to achieve success following ART. Despite favorable uterine conditions, a great number of good quality embryos fail to implant, often for reasons that are unknown. Hence, improving the implantation potential of embryos is a subject of great interest. 4-Hydroxyestradiol (4-OH-E<sub>2</sub>), a metabolic product of estradiol produced by endometrial cells, plays a key role in endometrial–embryonic interactions that are necessary for implantation. Nonetheless, the effects of 4-OH-E<sub>2</sub> on embryos obtained *in vitro* have not been yet described. This study was designed to determine whether culture media enriched in 4-OH-E<sub>2</sub> could improve the quality and implantation rate of embryos obtained *in vitro*, using both *in vitro* and *in vivo* models. We also analyzed its effects on the epidermal growth factor (EGF)-binding capability of the embryos. Our results showed that the presence of 4-OH-E<sub>2</sub> in the culture media of embryos during the morula to blastocyst transition increases embryo quality and attachment to endometrial cells *in vitro*. 4-OH-E<sub>2</sub> can also improve viable pregnancy rates of mouse embryos produced *in vitro*, reaching success rates that are similar to those from embryos obtained directly from the uterus. 4-OH-E<sub>2</sub> improved the embryos' ability to bind EGF, which could be responsible for the increased embryo implantation potential observed. Therefore, our results strongly suggest that 4-OH-E<sub>2</sub> is a strong candidate molecule to supplement human IVF culture media in order to improve embryo implantation. However, further research is required before these findings can be translated with efficacy and safety to fertility clinics.

**Key words:** 4-hydroxyestradiol / 4-OH-E<sub>2</sub> / implantation / embryo / catecholestrogens / reproduction / epidermal growth factor / IVF / ART

## Introduction

The World Health Organization estimates that between 60 and 80 million couples suffer from infertility-related issues (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). The underlying causes can be extremely diverse, such as genetics, congenital or acquired diseases, and other multiple factors, including lifestyle. Additionally, embryo implantation into the uterus is one of the most important and critical steps in the process of achieving a pregnancy. Nowadays, approximately 30% of single embryo transfers

from IVF cycles using the patient's eggs result in implantation and development of the embryos. This number is higher in the case of egg donation, with around 50% of single embryo transfers resulting in implanted embryos (Sociedad Española de Fertilidad (SEF), 2017). Nonetheless, the numbers are a long way from being optimal, and enhancing the implantation rates is crucial for fertility centers worldwide.

Embryo implantation can only occur during specific days of the menstrual cycle, a period known as the 'implantation window', between days 16 and 22 of a normal menstrual cycle (Psychoyos, 1986;

Ma et al., 2003). The process requires a precise molecular and cellular interaction between the uterine luminal epithelium and the blastocyst, involving two co-ordinated events: the preparation of the receptive uterus and the activation of the embryo, a change that is required to enable interaction of the blastocyst with the endometrial cells to allow implantation. Understanding the mechanisms and molecular signals that control this synchronized maternal–embryo interaction is a common objective in reproduction research programs, as strategies could be developed with the ultimate goal of improving not only preimplantation embryo development but also implantation rates, both in animal production and human assisted reproduction.

Initially, uterine sensitivity to implantation is orchestrated by the complementary actions of estrogen ( $E_2$ ) and progesterone ( $P_4$ ).  $E_2$  is necessary to render the uterus pre-receptive for implantation (proliferative phase), while  $P_4$  allows the uterus to enter the receptive phase (secretory phase) (Paria et al., 1993). At the time of implantation,  $E_2$  and  $P_4$  secreted by the granulosa cells and the corpus luteum, respectively, elevate the specific 4-hydroxylase activity (Mondschein et al., 1985; Paria et al., 1990a), resulting in a surge of 4-hydroxyestradiol (4-OH- $E_2$ ), a catechol metabolite produced from  $E_2$ . It has been proposed that it is the secreted 4-OH- $E_2$ , and not the  $E_2$  itself, that acts on the embryo as the principal signal to render it ready for implantation, by triggering its change into a competent state (Paria et al., 1998a). The rationale for this proposed mechanism is that the embryo must recognize the well-functioning endometrial cells, and consequently the implantation window, in order to begin the implantation process. A possible molecular signaling pathway to do so would be the capacity of the embryo to detect and react to this catecholesterogen, meaning that the uterine cells are properly metabolizing  $E_2$ , and thus producing one of its main metabolites (4-OH- $E_2$ ) at the appropriate time, i.e. when the blastocyst reaches the uterine cavity. Furthermore, 4-OH- $E_2$ , by binding to its receptors in the trophoblast cells, has been shown to affect the final blastocyst quality, although the mechanism involved needs to be elucidated (Takeuchi et al., 2017).

On the other hand, it is well known that the epidermal growth factor (EGF) family of growth factors, through their receptors ErbB1 and ErbB4, are key players in the acquisition of implantation potential (Johnson and Chatterjee, 1993; Chobotova et al., 2002, 2005). Around the window of implantation, both the endometrium and the blastocyst secrete EGF and, as its receptor is present in trophoblast cells, the embryo can potentially bind EGF through autocrine (from the blastocyst) and paracrine (from epithelium) pathways (Hamatani et al., 2004). However, studies on the potential benefits of supplementing culture media with EGF during the initial stages of embryo development still yield contradictory results, with some investigators reporting no effects (Lee and Fukui, 1995; Martin et al., 1998; Sirisathien et al., 2003), and others demonstrating changes in protein synthesis, cell number, differentiation and hatching processes (Richter, 2008; Ahumada et al., 2013). It has been shown *in vivo* that, independent of catecholesterogen-induced activation, the activation of only 5–10% of the total EGF receptor molecules present on the embryo surface is sufficient to trigger all early embryo responses required for initiation of the embryo–endometrial molecular crosstalk necessary for implantation (Paria and Dey, 1990b; Wang et al., 2002). Finally, it is well known that catecholestrogens are able to induce a plethora of

growth factors, including the EGF family in cultured cells and embryos (Paria et al., 1998a).

Notably, in the IVF process, the early development of the embryos occurs in the absence of direct cell contact with the reproductive tract, and therefore, outside the endocrine environment of the female reproductive tract, where a specific temporal and spatial expression of numerous growth factors and hormones occurs to regulate development of the preimplantation mammalian embryo, from a fertilized egg to a blastocyst (Díaz-Cueto and Gerton, 2001). Hence, it has been suggested that the absence and/or the dilution of such hormones and growth factors in the culture media (Paria and Dey, 1990b; Rizos et al., 2002; Lonergan, 2007) could account, at least partially, for the impaired development of preimplantation embryos *in vitro* (Rawson et al., 1991; Collins et al., 1994). Nonetheless, some of these embryos can reach the blastocyst stage *in vitro* and finally implant when transferred to an appropriately prepared uterus, indicating a more complex mechanism in the regulation of the implantation process in the IVF system.

In the present study, we aimed to determine whether culture media supplemented with 4-OH- $E_2$  could be advantageous to embryos obtained *in vitro*. We utilized the mouse as a model of preimplantation development owing to its small size, prolificacy, ease of handling, ease of gamete extraction and relatively low cost: but with the aim of translating its significance to human IVF, as the 4-OH- $E_2$  could be used to supplement the culture media used in IVF clinics worldwide in order to improve implantation rates, and potentially the success rates of ART.

## Materials and methods

### Animals

Female B6D2F1/J (C57BL/6)OlaHsd × DBA/2OlaHsd, Envigo RMS, Holland) hybrid mice were used as oocyte and embryo donors, and male B6D2F1/J hybrid mice were used as semen donors. Female Hsd:ICR (CD-1) (Animal Service of University of Extremadura, Spain) mice were used as recipient mothers, and male ICR strain vasectomized mice were mated with the female ICR recipient mothers. All mice were 8–12 weeks old. Animals were housed in the animal facility of the Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre (certified by ES100370001499) under controlled conditions, with a 12 h light: 12 h dark cycle, 20–25°C temperature, 40–70% relative humidity and food and water *ad libitum*. Males were individually housed in cages, whereas females were housed in groups of two or four per cage. To study different qualities of the embryos (cell count, apoptosis, diameters), 12 B6D2 animals were used. For the EGF-binding assay, 24 B6D2 animals were used ( $n=12$ , to obtain embryos IVF;  $n=12$ , to obtain embryos *in utero*). For the implantation models, 10 B6D2 animals were used to study the implantation potential in an *in vitro* model (co-culture with endometrial cells) and 94 ICR females were used to perform *in vivo* embryo transfers, in which they were used as recipient mothers of embryos obtained from the 10 B6D2 animals. *In vitro* experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Extremadura on the 21 December of 2007 according to RD 53/2013 as of 1 February, and *in vivo* experiments were approved by the Ethics Committee of the Junta de Extremadura on the 10 May

2016, and all procedures followed the guiding principles for research involving animals in accordance with the Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and the Spanish Regulation (RD1201/2005).

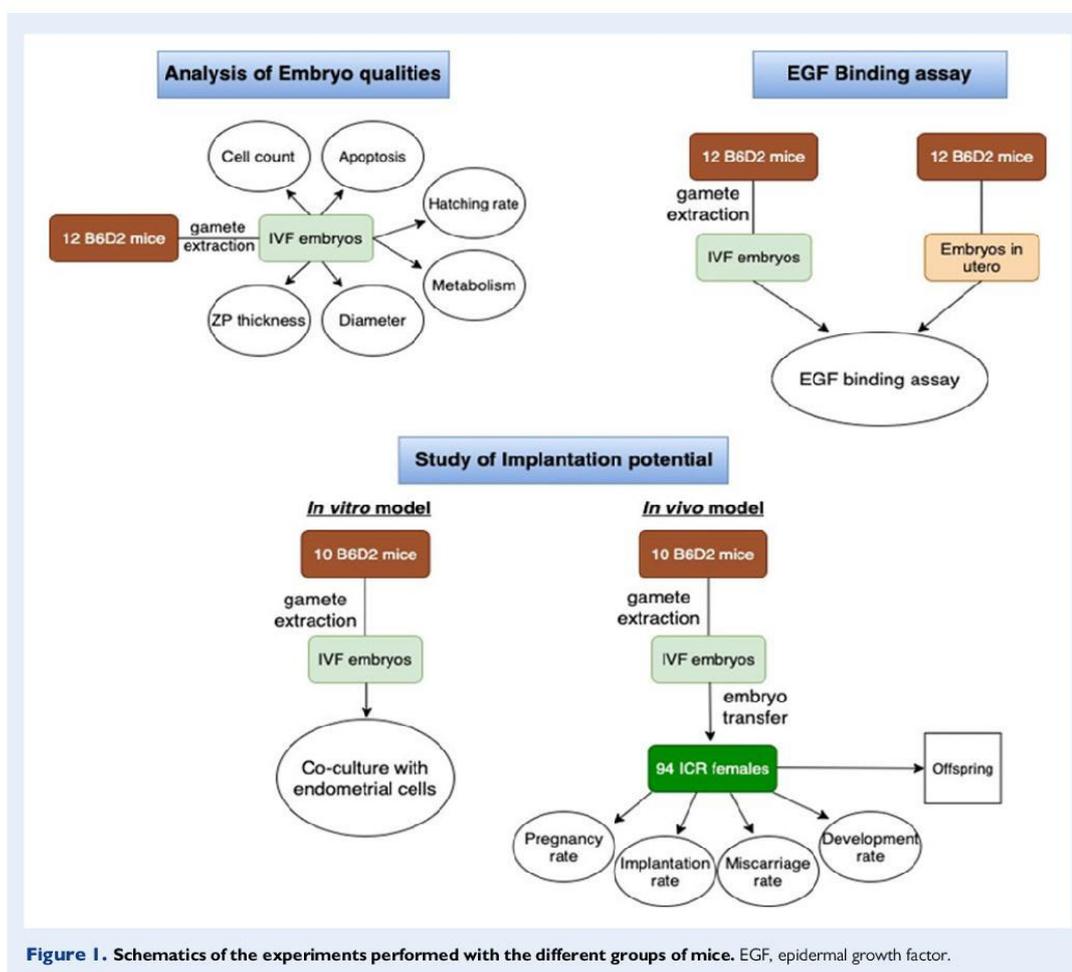
A flow diagram to clarify the experiments performed is shown in Fig. 1.

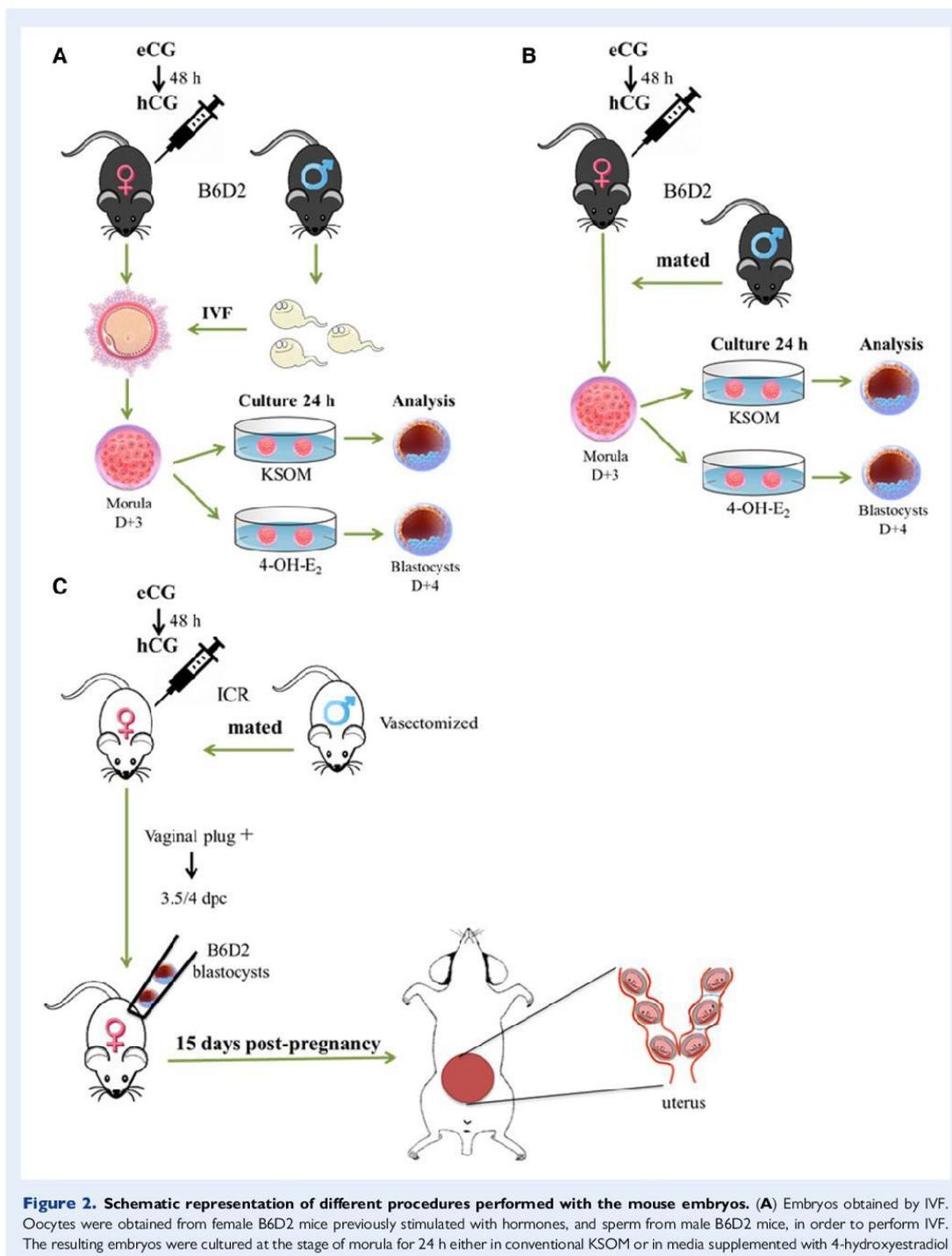
### Embryo collection and IVF

Embryos developed *in utero* (Fig. 2B): mature B6D2 female mice were previously stimulated with 8 IU of equine CG (eCG; Syncrostim, CEVA Animal health, S.A. Barcelona, Spain), and 8 IU of hCG (Veterin Corion, Divisa Farmavic, S.A. Barcelona, Spain) 48 h later. To induce pregnancy over-night, the females were mated with fertile B6D2 males of the same age (1♂:1♀). Pregnancy was confirmed by visualization of the vaginal plug, termed Day 1 of embryo development. To collect the

embryos, females were killed by cervical dislocation. Developing embryos were recovered in potassium simplex optimized medium (KSOM; Merck-Millipore, Madrid, Spain) after flushing the uterus with M2 medium (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) 72 h and 96 h post-hCG injection (for morula and blastocyst stages, respectively).

Embryos obtained by IVF (Fig. 2A): mature B6D2 female mice were previously stimulated with 8 IU eCG, followed by 8 IU hCG 48 h later. To perform the IVF procedure, human tubal fluid (HTF) medium (Merck-Millipore, Madrid, Spain) was equilibrated in an incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub> controlled atmosphere) 1 day before the experiment. To extract the semen, male B6D2 mice were euthanized by cervical dislocation and the caudal epididymis were collected. The dense sperm mass was squeezed out and incubated in HTF medium for 45 min at 37°C under a controlled atmosphere to enhance the fertilization potential (capacitation). To collect mature oocytes, females were killed by cervical dislocation 12 h post-hCG injection and





cumulus–oocyte complexes were recovered from the ampulla of the oviduct and cultured in KSOM medium.

Capacitated spermatozoa were added to 600  $\mu$ l of HTF medium containing the freshly ovulated oocytes to achieve a final sperm concentration of  $3 \times 10^6$  sperm/ml. Six hours later, fertilized oocytes were washed and cultured in fresh HTF medium until they reached the morula stage (72 h). Then, morulae were placed in KSOM, designed for the culture of preimplantation stage embryos, in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37°C up to the blastocyst stage.

#### 4-OH-E<sub>2</sub> treatment

To investigate the effect of 4-OH-E<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) in the different experiments performed, two different concentrations of 4-OH-E<sub>2</sub> were used: 0.1  $\mu$ g/ml for *in vivo* experiments; 1  $\mu$ g/ml for *in vitro* experiments. 4-OH-E<sub>2</sub> was added to the embryo culture media at two different stages and left for 24 h: from fertilization to the pronuclear (PN) stage, and then embryos were cultured in KSOM media up to the blastocyst stage; and from morula to blastocyst stage. Embryos cultured from the fertilization stage were those obtained only by IVF, whereas embryos cultured from morula to blastocyst stage with 4-OH-E<sub>2</sub> were those obtained by IVF and from *in utero*. All embryos were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> until the blastocyst stage and used for the experiments described below. Additional experiments were performed to check the specificity of 4-OH-E<sub>2</sub> by treating some embryos with E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain).

#### EGF488 binding assay

After the appropriate treatment with 4-OH-E<sub>2</sub>, embryos obtained *in utero* and *in vitro* (from 24 B6D2 females; n = 12 for *in utero* and n = 12 for *in vitro*) were incubated with Alexa Fluor 488-conjugated EGF (5  $\mu$ g/ml; E-3476, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in KSOM for 2 h. Thereafter, they were thoroughly washed in KSOM to discard non-specifically bound EGF and transferred to a new plate with microdroplets of 90  $\mu$ l KSOM for visualization using an inverted microscope, Nikon Eclipse TE2000-U, equipped with a micro-incubation platform DH-40i (Warner Instruments, Inc., Hamden, CT, USA) at 37°C. Fluorescence images were obtained with excitation filters at 340 and 380 nm, a 510 nm dichroic mirror, and a 520 nm emission filter (Semrock, Rochester, NY, USA). Digital images were obtained with a Hamamatsu C9100-02 electron multiplier CCD camera, under the control of the Metafluor fluorescence imaging software (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA), using identical exposure conditions (6 s) and gain (2.40 $\times$ ). To quantify the intensity of fluorescence, the Sigma Scan Professional, SpSSinc software package was used. The quantity of EGF bound to the embryo surface was extrapolated

individually from the fluorescence intensity in a standard scale of 0–255 units, where 0 represents no fluorescence, and 255 is equivalent to the maximum intensity of fluorescence.

*In utero* and *in vitro* embryos cultured in the absence of Alexa Fluor 488-conjugated EGF were used as negative controls for the fluorescence signal.

#### Nuclear staining

To enumerate the cell number, blastocysts were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) for 15 min, then incubated in permeabilization buffer Triton X-100 (0.1%; Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) in PBS (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) for 30 min, and finally washed three times in 0.05% PBS-Tween (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) at room temperature. Nuclei were stained by incubating the embryos with 1 ml PBS containing 2  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Eugene, OR, USA) for 10 min at 37°C. Then, the embryos were mounted on a slide with glycerol, sealed with a cover, and examined using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U), equipped with an ultraviolet lamp (405 nm laser line). Cell number was analyzed using the Fiji Image-J Software (1.45q, Wayne Rasband, National Institutes of Health, MD, USA).

#### TUNEL assay

Apoptotic cells in embryos were detected using the In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL; Roche, Mannheim, Germany). All reagents were prepared according to the manufacturer's instructions. *In utero* and IVF obtained embryos were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, incubated in the permeabilization buffer of 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min, and washed three times in 0.05% PBS-Tween at room temperature. Then, blastocysts were incubated with the TUNEL reaction mixture containing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and labeled nucleotides (fluorescein-dUTP) at a 1:10 concentration for 1 h at 37°C, in the dark. As a positive control for the fluorescence signal, IVF embryos were cultured in KSOM and incubated with RQ1 DNase (50 U/ml; Promega, Madison, WI, USA), which cleaves all DNA, for 20 min at 37°C before performing the TUNEL assay. Nuclei were stained with Hoechst 33342 as described above. Fluorescence images were obtained using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U), equipped with a 488 nm laser (green channel).

#### *In vitro* attachment assay

For the *in vitro* attachment assay, endometrial cells were collected from the uteri of mature B6D2 female mice previously stimulated to perform IVF (n = 10). The uterine horns were excised and cut open longitudinally to expose the luminal surface. Uterine luminal epithelial

(4-OH-E<sub>2</sub>) and the blastocysts obtained were studied. **(B)** Embryos obtained *in utero*: female B6D2 mice were stimulated with hormones and mated with male B6D2 mice in order to obtain embryos *in utero*, at the morula stage. These embryos were cultured for 24 h either in conventional KSOM or in media supplemented with 4-OH-E<sub>2</sub> and the blastocysts obtained were studied. **(C)** Embryo transfers into ICR recipient mothers: female ICR mice stimulated with hormones were mated with vasectomized male ICR mice. Females with a vaginal plug were used as recipient mothers to transfer embryos from B6D2 mice at 3.5/4 days post coitum (dpc). On Day 15 of pregnancy, female ICR recipient mothers were killed and the uterus was examined in order to determine the implantation, miscarriage and development rates. D+3, day 3 of embryo development; D+4, day 4 of embryo development.

cells were removed using a sterile scraper and placed in 1% collagenase in DMEM/Ham's Nutrient Mixture F12 (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) for 1 h at 37°C, and filtered to eliminate residual tissue. Epithelial cells were pelleted by centrifugation at 300 g for 5 min and resuspended in DMEM containing 10% fetal bovine serum (Lonza, Basel, Switzerland), 1% L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland), and 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain). Cells were grown up to 80% confluency, detached, counted and plated in culture dishes at the appropriate concentration.

Embryos to be evaluated for implantation capability were co-cultured with endometrial cells. The co-culture was maintained for 48 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. To assess the attachment capability of embryos, dishes were agitated for a few seconds, and all adhered and loose embryos were counted to establish the ratios (competent/non-competent for implantation) corresponding to each experimental group. Here, implanted embryos were those in which endometrial cells were displaced by trophectoderm cells at 72 h of co-culture.

### Analysis of metabolic activity

To determine changes in embryo metabolic activity, the vital dye AlamarBlue<sup>®</sup> (AB; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used. Embryos were analyzed based on the different conditions of development by culture in micro drops of KSOM supplemented with 10% AB under mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 2 h. In the culture media, reduced AB, an indicator of metabolic activity, was determined by measuring fluorescence intensities using a multi-mode microplate reader (Synergy<sup>™</sup> Mx, BioTek Instruments Inc., Winooski, USA), according to the manufacturer's instructions.

### Measurement of blastocyst diameter and zona pellucida thickness

Digital images of all embryos were obtained using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-U); the selected focal plane was the embryonic equator. The blastocyst diameter was measured along the longest axis, using a known distance of 100 μm, with the Sigma Scan Professional Sp5Sinc Image analysis software package. The zona pellucida thickness was similarly measured.

### Surgical transfer of embryos into recipient mothers

In the case of recipient mothers, female ICR mice were mated with vasectomized male ICR mice. In females presenting a vaginal plug, the following day was established as Day 1 of the pseudo-pregnancy. Using the intra-endometrial technique, embryo transfers were performed on Days 3.5–4 of pseudo-pregnancy (Fig. 2C). Recipient mothers were administered the following analgesics i.p.; meloxicam (Chanelle Pharmaceutical, VIRBAC, Barcelona, Spain) and buprenorphine (Karizoo Laboratories, Barcelona, Spain). Mice were anesthetized using inhalational isoflurane (Steve Laboratories, UK).

The uterine horn was exposed with a dorsal incision using tweezers. A 24G Abbocath (Hospira Laboratories, Madrid, Spain) was inserted near the uterus-tube junction in the endometrial cavity. Using a glass micropipette, 10 embryos per horn were transferred in a small volume of culture media (KSOM) into the endometrial cavity. The direction of the insertion was nearly parallel to the uterus. The same procedure

was repeated on the other horn. In total, 94 ICR females were used to perform transfers, divided into three experimental groups as follows: 25 females received embryo extracted *in utero* at the blastocyst stage; 34 females received *in vitro* obtained embryos, cultured in conventional media up to the blastocyst stage; 35 females received *in vitro* obtained embryos, cultured in media supplemented with 0.1 μg/ml of 4-OH-E<sub>2</sub> from the morula to blastocyst stage.

### Post-surgical care

After surgery, the ICR recipient mothers were administered Apiretal (Acetaminophen, Laboratorios ERN, Barcelona, Spain) mixed in the water for pain relief and were allowed to recover in individual cages under a red light to provide heat. These mice were observed until the recovery of responses and consciousness. The viability of transferred embryos was assessed 15 days after the transfer by euthanizing the recipient mothers and examining the uterus to determine the rates of pregnancy, implantation, viable fetuses and miscarriages. The presence of a hemorrhagic yolk sac, embryos of a smaller size than expected at Day 15 of development and showing a slow development were considered to determine the miscarriage rate.

To evaluate whether 4-OH-E<sub>2</sub> produces negative effects on the offspring, some recipient mothers carried pregnancy to term and gave birth.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA), and a *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant. ANOVA was used to compare embryo proliferation and quality parameters, the Mann-Whitney-Wilcoxon non-parametric test was performed to compare EGF-binding competence, and the Tukey test was used to analyze data from embryo transfers.

## Results

### Effects of 4-OH-E<sub>2</sub> on blastocyst total cell count, the incidence of apoptosis and some embryonic features

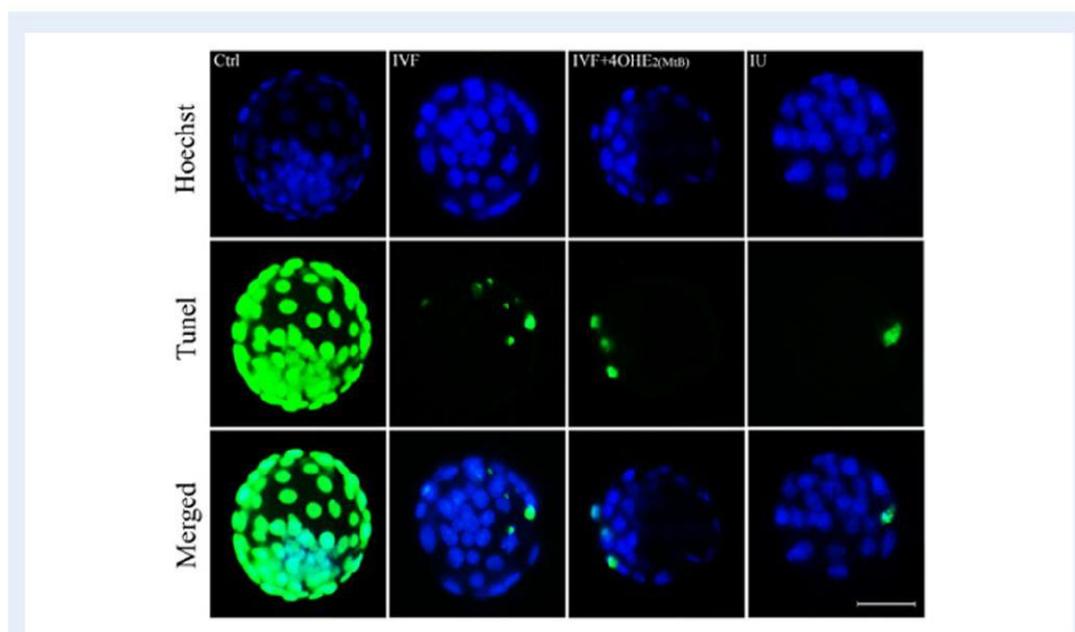
To determine whether the 4-OH-E<sub>2</sub> treatment could enhance the quality of *in vitro* obtained embryos, cell proliferation, cell death and other quality-related features were examined. Embryos developed *in vitro* up to the morula stage and then cultured in the presence or absence of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub> up to the blastocyst stage were analyzed and compared with embryos that developed fully *in utero* and were extracted from the female duct at the blastocyst stage.

The results demonstrated that *in vitro* obtained embryos treated with 1 μg/ml 4-OH-E<sub>2</sub> during the last stages of development (from morula to blastocyst (MtB): IVF + 4-OH-E<sub>2</sub>(MtB) group), presented an increase, although not significant, in the total cell count when compared with embryos cultured in conventional media (IVF group); additionally, the incidence of cell death was marginally reduced. Compared to embryos developed *in utero* and then extracted (IU group), the statistical differences were significant in both the IVF group and the

IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (MtB) group, with the former demonstrating results more similar to those observed in the IU group (Fig. 3, Table I).

In contrast, 4-OH-E<sub>2</sub> enhanced other-related parameters. Compared to IVF embryos cultured only in KSOM, the hatching rate was marginally increased in IVF embryos cultured with 4-OH-E<sub>2</sub>, and diameter and zona pellucida thickness ( $P < 0.001$ ) were also significantly improved. Furthermore, 4-OH-E<sub>2</sub>-treated embryos

demonstrated a slight increase in embryo metabolism as indicated by reduced AB, although not significant when compared with IVF embryos cultured in KSOM (Table II). Although these results differed significantly when compared with *in utero* embryos, the addition of 4-OH-E<sub>2</sub> to the IVF embryos at the morula stage improved their quality when compared with IVF embryos cultured in conventional KSOM media (Table II).



**Figure 3. Representative images illustrating the total cell count and incidence of cell death in mouse embryos.** Nuclei were stained with Hoechst 33342. Fragmented DNA was labeled using TUNEL (green). Merged images represent the proportion of positive TUNEL cells (apoptotic, middle row) with respect to the embryo total cell count (bottom row). IVF group: *in vitro* obtained embryos cultured in conventional media.  $n = 30$ ; IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (MtB) group: *in vitro* obtained embryos cultured in 4-OH-E<sub>2</sub>-supplemented media from morula to blastocyst stage.  $n = 31$ ; IU group: embryos developed *in utero*.  $n = 30$ . The positive control consisted of *in vitro* obtained embryos treated with DNase to induce apoptosis before incubation with TUNEL reagents. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .

**Table I Effects of 4-hydroxyestradiol on total cell count and cell death in mice embryos.**

	IVF (n = 30)	IVF + 4-OH-E <sub>2</sub> (MtB) (n = 31)	IU (n = 30)
	Cells (mean $\pm$ SD)	Cells (mean $\pm$ SD)	Cells (mean $\pm$ SD)
Total cell count	91 $\pm$ 14.5**	97.8 $\pm$ 17.8*	109.7 $\pm$ 21.3
Incidence of apoptosis (%)	4.3 $\pm$ 5.1**	3.9 $\pm$ 3.3**	1.2 $\pm$ 1.9

4-OH-E<sub>2</sub>, 4-hydroxyestradiol.

IVF: *in vitro* obtained and fully developed embryos; IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (MtB): *in vitro* obtained embryos cultured in supplemented media from morula to blastocyst stage; IU: embryos entirely developed *in utero*.

\*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  versus IU

ANOVA and Tukey test for total cell count, and Kruskal–Wallis test for Apoptosis. Mann–Whitney *U* test to compare both groups.

**Table II** Effects of 4-OH-E<sub>2</sub> on some features of mouse embryo quality.

	IVF		IVF + 4-OH-E <sub>2</sub> (MtB)		IU	
	n	Cells (mean ± SD)	N	Cells (mean ± SD)	n	Cells (mean ± SD)
Hatching rate (%)	97	23.71	114	37.72	109	65.8
AB Reduction (%)	37	1.4 ± 1.1 <sup>***</sup>	19	1.8 ± 1.8 <sup>***</sup>	17	9.5 ± 8.9
Diameter (μm)	107	82.7 ± 7.7 <sup>***</sup>	154	86 ± 9.3 <sup>***a</sup>	90	95.9 ± 10.5
ZP Thickness (μm)	107	7.6 ± 1.4 <sup>***</sup>	154	6.9 ± 1.8 <sup>***b</sup>	90	5.7 ± 1.5

AB, alamarBlue; ZP, zona pellucida.

<sup>\*\*\*</sup>P < 0.001 versus IU

<sup>a</sup> P < 0.05

<sup>b</sup> P < 0.01 versus IVF, ANOVA and Tukey test.

### Effects of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub> on the embryo EGF-binding capability of *in vitro* obtained embryos

To determine whether exogenous catecholestrogens could improve the EGF-binding capability of *in vitro* obtained embryos, 4-OH-E<sub>2</sub> (1 μg/ml) was added to the culture medium, followed by incubation with Alexa Fluor 488-conjugated EGF. In the presence of 4-OH-E<sub>2</sub> during the early stages of development (from fertilization to PN; (IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (PN) group), the *in vitro* obtained embryo culture demonstrated a significant decrease in the EGF-binding capability ( $P < 0.05$ ); however, the presence of 4-OH-E<sub>2</sub> during the later stages of preimplantation development (from morula to blastocyst stage; IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (MtB) group) demonstrated a statistically significant increase in attached EGF ( $P < 0.001$ ) when compared with *in utero* obtained embryos developed entirely in a conventional culture media (KSOM) (Fig. 4, Supplementary Fig. S1). Besides, E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> were not able to emulate the results produced with 4-OH-E<sub>2</sub> in IVF embryos, indicating that this increase in the binding of EGF is specific for the catecholestrogen (Supplementary Fig. S2).

### Effects of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub> on the EGF-binding capability of *in utero* embryos removed during the last stages of preimplantation development

To analyze the importance of the culture environment on the last stages of preimplantation embryo development, the EGF-binding capability was compared between embryos entirely developed *in utero* up to the blastocyst stage (IU group) and embryos developed *in utero* up to morula stage and then cultured *in vitro* (IVC group) up to blastocyst stage in the absence (IU + IVC (MtB) group) or presence (IU + 4-OH-E<sub>2</sub> (MtB) group) of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub>. The results showed that *in utero* developed embryos, extracted at the morula stage and then cultured *in vitro* from morula to blastocyst stage in KSOM, presented a statistically significant decrease in their capability to bind EGF when compared with embryos fully developed *in utero* ( $P < 0.05$ ). Nevertheless, when morulae developed *in utero* were extracted from the female duct and then cultivated to the blastocyst stage in the presence of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub>, the final capacity to bind EGF was partially restored (Fig. 5).

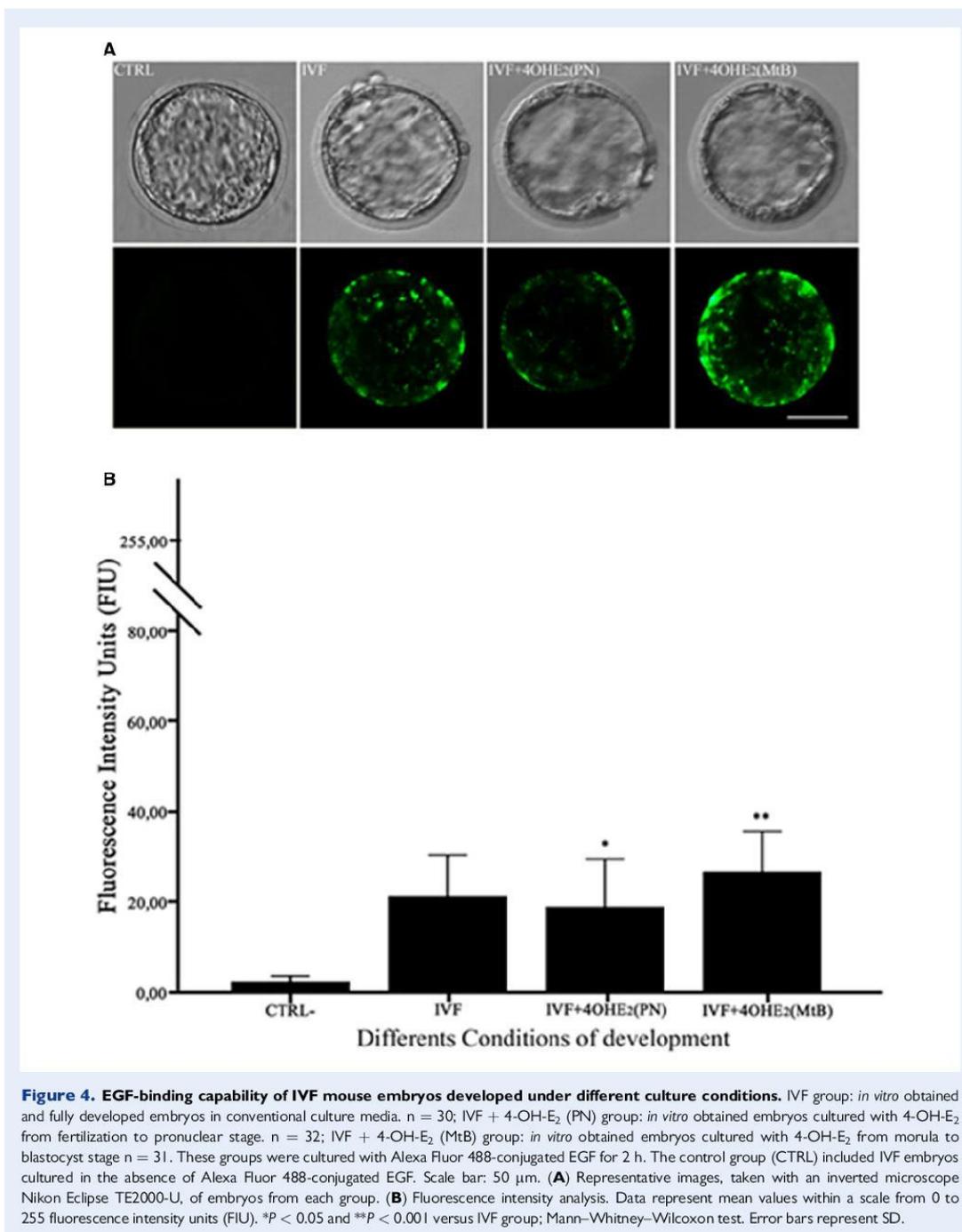
### Effects of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub> on embryo implantation rates in an *in vitro* model

During different phases of embryo development, exogenous 4-OH-E<sub>2</sub> was added to culture media; next, the blastocysts were placed over a monolayer of endometrial cells to test attachment capability. The effects of 4-OH-E<sub>2</sub> on the embryo attaching capability differed according to the stage of embryo development. The *in vitro* obtained embryo culture with 4-OH-E<sub>2</sub> supplemented only during the early stages of development (during fertilization and PN phase) demonstrated no significant effect on the *in vitro* attaching rate; however, 4-OH-E<sub>2</sub> supplementation during the later stages of preimplantation development (from morula to blastocyst) demonstrated a statistically significant increase in the *in vitro* attachment rate ( $P < 0.05$ ). Interestingly, the embryo culture with 4-OH-E<sub>2</sub> supplementation during the whole culture process blocked most embryos at the 2-cell stage (IVF + 4-OH-E<sub>2</sub>(C) group) (Fig. 6). We have also checked in this case that the improvement in *in vitro* implantation is specific for 4-OH-E<sub>2</sub>, as embryos treated with E<sub>2</sub> or P<sub>4</sub> do not show increased adhesion to the endometrial cells (Supplementary Fig. S3).

### Effects of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub> on embryo implantation rates in an *in vivo* model

To investigate the effect of 4-OH-E<sub>2</sub> supplementation on embryos during the last stages of the embryo development in an *in vivo* model, and to determine whether the results obtained correlated with those observed in our *in vitro* model of implantation, IVF blastocysts cultured in conventional KSOM (IVF<sub>c</sub> group) or 0.1 μg/ml 4-OH-E<sub>2</sub> (IVF<sub>[0.1]</sub> group), as well as blastocysts extracted directly from the uterus of female B6D2 mice (IU) group, were transferred to female ICR mice on days 3.5–4 of the pseudo-pregnancy. In each group, the number of pregnant mice was determined and the rate of pregnancy was calculated (Fig. 7, Table III). To determine further data from the *in vivo* model, the results were calculated considering only female mice that achieved pregnancy, and the number of blastocysts initially transferred to those females.

As pregnancy in mice lasts 21 days, pregnant mice were euthanized on Day 15 post-transfer. After dissecting the uterus, the number of blastocysts implanted in the uterus was determined in the three groups; IU group, IVF<sub>c</sub> group and IVF<sub>[0.1]</sub> group (Fig. 7A, Table III).



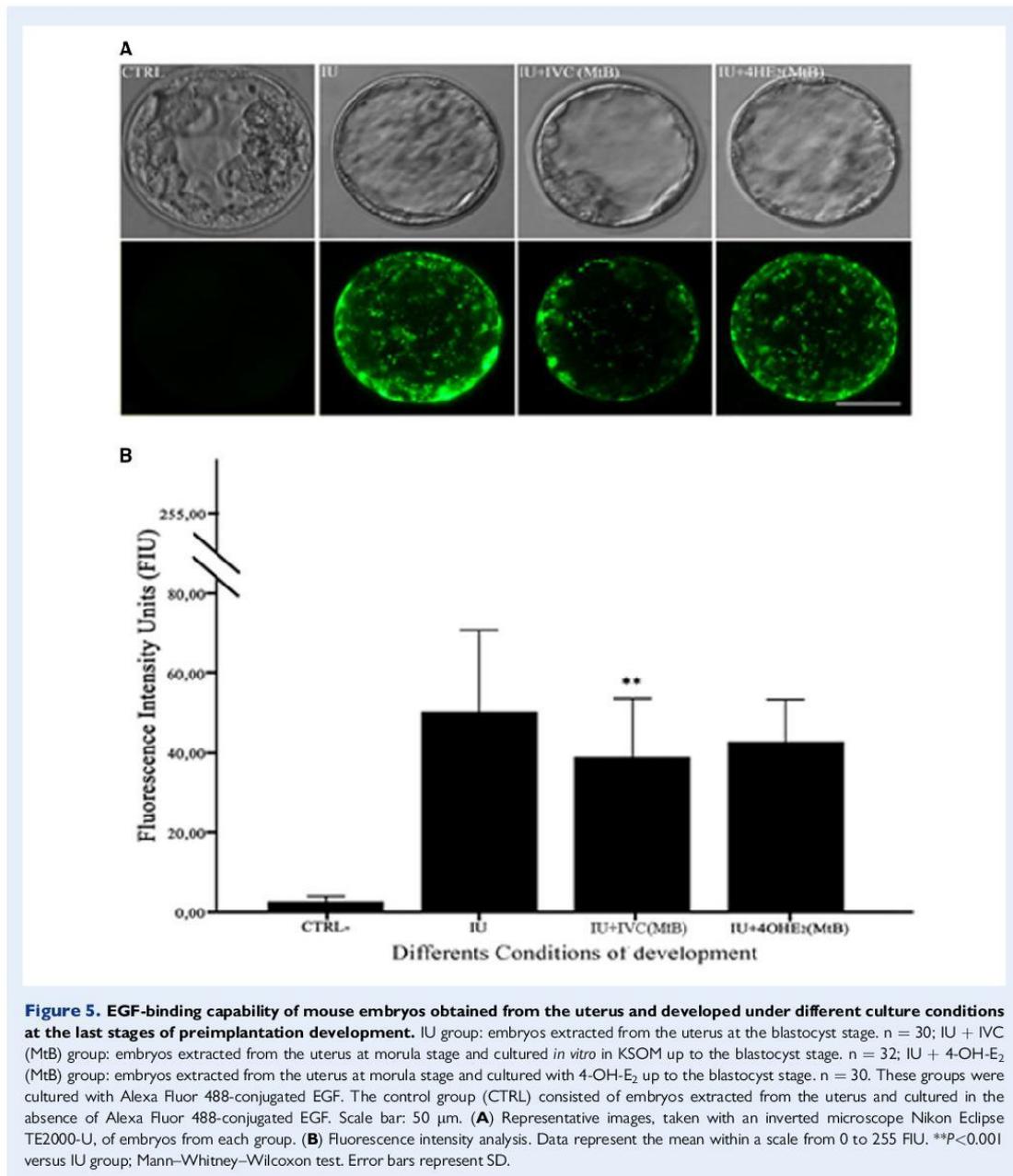
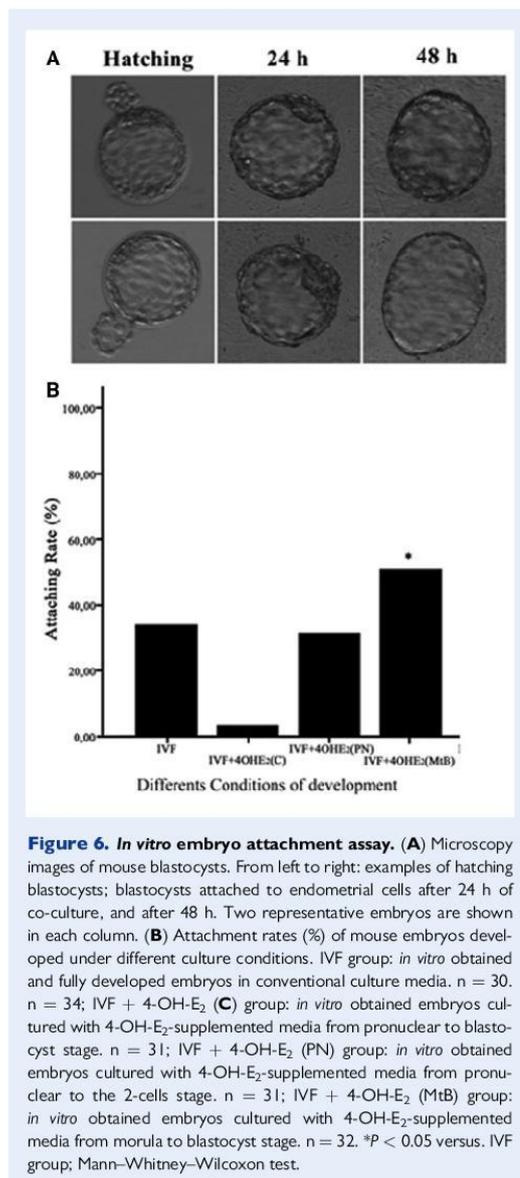


Table III presents the statistical difference determined by comparing the IU group with either the IVF<sub>c</sub> group or IVF<sub>[0.1]</sub> group and there were no significant differences between the IVF<sub>c</sub> and IVF<sub>[0.1]</sub> groups. The implantation rate was higher in the IU group than in the IVF<sub>c</sub> or

the IVF<sub>[0.1]</sub> groups; however, the difference was statistically significant only when the IU group was compared with the IVF<sub>[0.1]</sub> group, with the former presenting a reduced implantation rate in the *in vivo* model (Fig. 7B, Table III).



**Figure 6.** *In vitro* embryo attachment assay. **(A)** Microscopy images of mouse blastocysts. From left to right: examples of hatching blastocysts; blastocysts attached to endometrial cells after 24 h of co-culture, and after 48 h. Two representative embryos are shown in each column. **(B)** Attaching rates (%) of mouse embryos developed under different culture conditions. IVF group: *in vitro* obtained and fully developed embryos in conventional culture media.  $n = 30$ .  $n = 34$ ; IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (C) group: *in vitro* obtained embryos cultured with 4-OH-E<sub>2</sub>-supplemented media from pronuclear to blastocyst stage.  $n = 31$ ; IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (PN) group: *in vitro* obtained embryos cultured with 4-OH-E<sub>2</sub>-supplemented media from pronuclear to the 2-cells stage.  $n = 31$ ; IVF + 4-OH-E<sub>2</sub> (MtB) group: *in vitro* obtained embryos cultured with 4-OH-E<sub>2</sub>-supplemented media from morula to blastocyst stage.  $n = 32$ . \* $P < 0.05$  versus IVF group; Mann-Whitney-Wilcoxon test.

Based on the blastocysts that implanted in the uterus of the recipient mothers, the rates of miscarriage and embryo development were determined by observing the embryo placentae. Hemorrhagic placentae were determined as non-viable fetuses, and their number was used to calculate the rate of miscarriage (Fig. 7C, Table III). Statistically significant differences were observed between the IU and IVF<sub>c</sub> groups (\*\* $P < 0.01$ ). However, the results obtained from the IVF<sub>[0.1]</sub> group

were similar to those obtained in the IU group. Conversely, the number of embryos implanted in the mice uterus and presenting a bloodless placenta with clear amniotic fluid was used to calculate the rate of implanted embryo development (Fig. 7D, Table III). Statistically significant differences were observed between the IU and IVF<sub>c</sub> groups (\*\* $P < 0.001$ ) but not between the IU and the IVF<sub>[0.1]</sub> groups. Indeed, the number of viable fetuses was much higher in the IVF<sub>[0.1]</sub> group than in the IVF embryos not treated with 4-OH-E<sub>2</sub> (IVF<sub>c</sub>), demonstrating considerable similarity with the IU group, although no significant differences were observed.

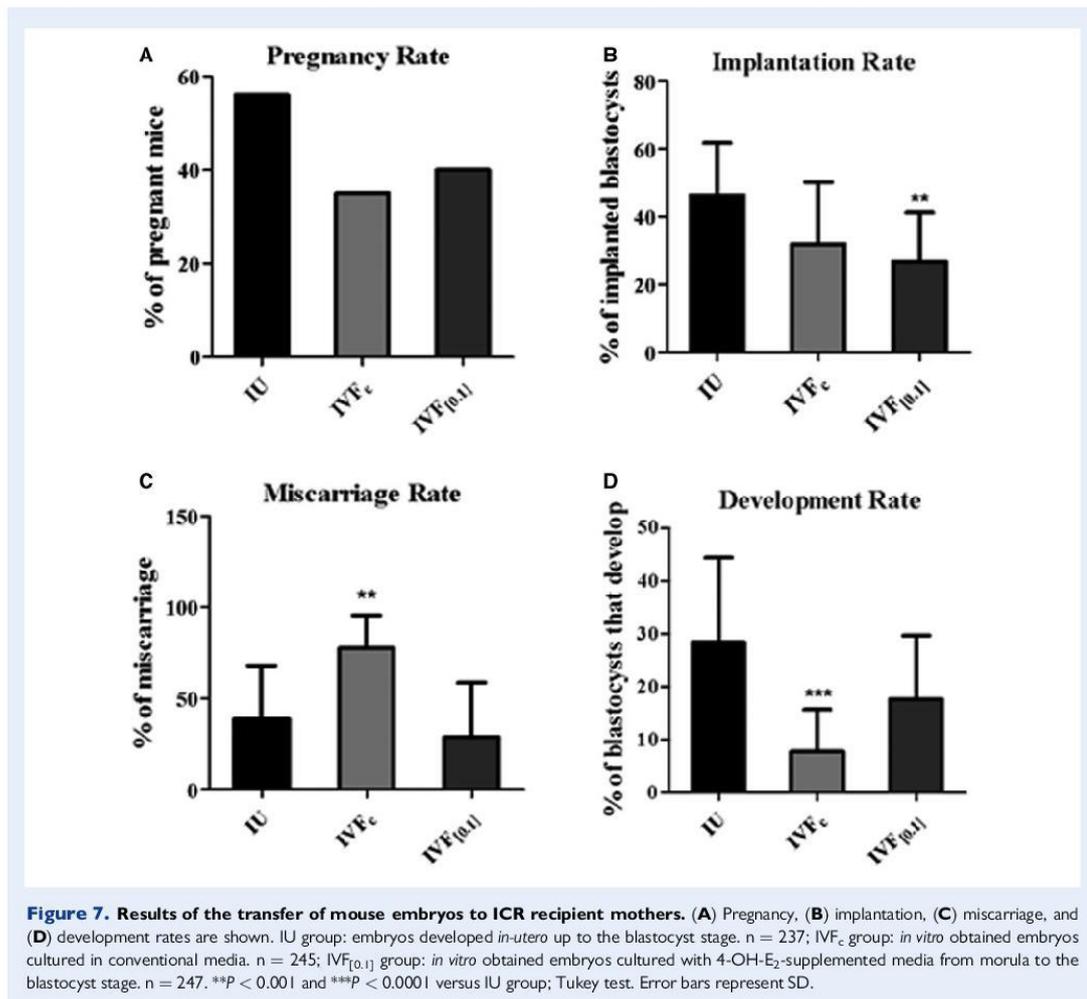
As an additional experiment, six female ICR mice transferred with blastocysts treated with 4-OH-E<sub>2</sub> carried the pregnancy to term and gave birth. In total, this resulted in 13 live births. Figure 8A shows one of the recipient mothers during pregnancy, and the offspring obtained from the blastocysts transferred at different days post-delivery (Fig. 8B-D). The offspring lived for 2 years, corresponding to the normal life expectancy of mice, with no malformations or defects observed. Moreover, their fertility was evaluated by mating them, and all, both female and male, were able to produce offspring (data not shown).

Furthermore, no adverse events were observed during this study. All mice responded well to hormonal stimulation and embryo transfers, as well as after giving birth.

## Discussion

Currently, it is well known that the implantation ability of embryos is related to the embryo quality during the blastocyst stage (Huisman *et al.*, 2000). The morphology and some other features of the developing embryo, from zygote to the time of implantation, correlate with the success of pregnancy in IVF models, in both animals and humans (Niakan *et al.*, 2012). Additional characteristics, such as metabolite production, oxygen consumption, morphokinetics or genetic information of the embryo, are used to determine information regarding the ability of the transferable embryo to successfully implant into the uterine wall. However, even fully developed blastocysts with superior features can fail to implant because of unknown factors when the endometrial conditions appear to be correct in clinical and molecular terms. Among other factors, this failure in implantation could be associated with inadequate culture conditions and suboptimal embryo development (Das and Holzer, 2012; Timeva *et al.*, 2014).

Conversely, it has been well demonstrated that the so-called dormant or arrested embryos of certain species, which possess good morphology at the blastocyst stage, do not implant unless they have been previously activated. This situation occurs naturally after some environmental and physiological conditions in a wide variety of species but can also be produced in rodents during lactation, or induced experimentally by depriving the mother of the natural estrogen source (Zhang *et al.*, 2013). These embryos with delayed implantation can be reactivated and resume implantation when the conditions are favorable or the estrogen source is restored (Renfree and Shaw, 2000; Ptak *et al.*, 2012). Using the delayed implantation mouse model, it has been reported that catecholestrogens are essential in re-activating the blastocysts for embryo implantation, rendering them competent to interact with the uterine epithelium for implantation (Hoversland *et al.*, 1982; Kantor *et al.*, 1985; Dey *et al.*, 1986; Wang and Dey, 2006).



**Table III Results for the pregnancy, implantation, miscarriage and development rate.**

	IU	IVF <sub>c</sub>	IVF <sub>[0.1]</sub>
Pregnancy rate	56%	35%	40%
Implantation rate	46.34%	32.04%	26.77%**
Miscarriage rate	39.83%	77.46%**	28.71%
Development rate	28.41%	7.77%***	17.69%

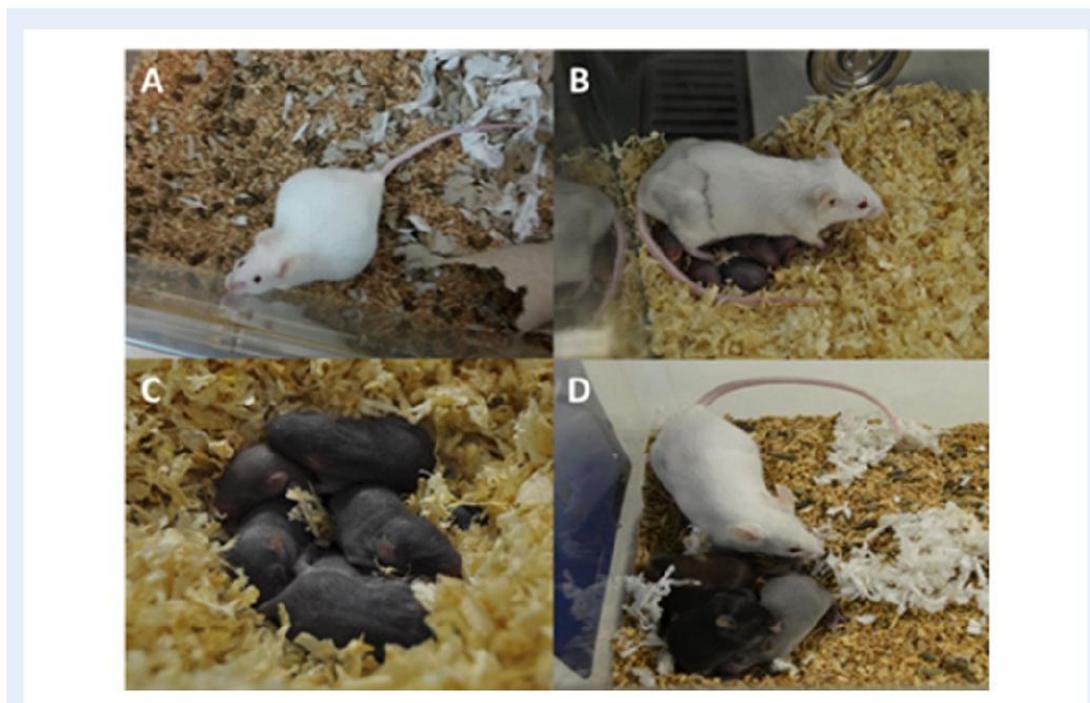
Results calculated as a percentage of the embryos obtained from *in utero* (IU), IVF cultured in normal KSOM media (IVF<sub>c</sub>) and IVF cultured with 4-OH-E<sub>2</sub> (IVF<sub>[0.1]</sub>), transferred into recipient mothers that resulted in a pregnancy and implanted in the uterus and started development, and those that resulted in a miscarriage.

\*\*P < 0.001

\*\*\*P < 0.0001 versus IU. Tukey test.

Nevertheless, little is known regarding the mechanisms by which estrogen and its metabolites initiate the implantation process. It has been suggested that while E<sub>2</sub> is necessary for prepping the P<sub>4</sub>-primed uterus to the receptive state, 4-OH-E<sub>2</sub>, one of its metabolites produced in the uterus, mediates embryo activation through prostaglandins. PGE<sub>2</sub> stimulates cAMP production, which, in turn, induces the activation of protein kinase A (Dey and Hubbard, 1981; Hughes et al., 1997), enabling inactive embryos to interact with maternal growth factors (Paria et al., 1998b).

Some investigators have suggested that certain limitations demonstrated by embryos developed *in vitro*, including failure to implant properly, could be attributed to the absence of growth factors that are normally secreted under physiological conditions in the reproductive tract (Thompson, 1997; Rizo et al., 2002; Lonergan, 2007), and/or to the dilution of growth factors released by embryos in the



**Figure 8.** Images of a recipient ICR mother and offspring born after transferring *in vitro* obtained embryos cultured in the presence of 4-OH-E<sub>2</sub> from the morula to blastocyst stage. (A) Pregnant recipient mother at day 19 of pregnancy. (B) B6D2 offspring newly born. (C) B6D2 offspring 5 days after birth. (D) B6D2 offspring 16 days after birth.

culture medium (Paria and Dey, 1990b). From this perspective, it has been reported that the quality of *in vitro* obtained embryos is diminished when compared with embryos developed *in utero* (Mahdavinezhad *et al.*, 2019). Additionally, embryo metabolism is reportedly depressed during *in vitro* culture (Jung, 1989; Ho *et al.*, 1994; Wrenzycki *et al.*, 1999), and suboptimal culture conditions have frequently been observed to decrease the final embryo cell number.

Some studies have demonstrated beneficial effects of adding EGF to the culture medium, considering protein synthesis, cell number and hatching processes (Richter, 2008; Ahumada *et al.*, 2013). Furthermore, recent reports have documented that EGF added to the embryo culture medium decreases the apoptosis rates of *in vitro* cultured blastocysts (Moll *et al.*, 2007; Wolff *et al.*, 2007; Ahumada *et al.*, 2013). In this work, we observed similar results for embryos developed in 4-OH-E<sub>2</sub>-enriched culture. Our results revealed that *in vitro* obtained embryos cultured in media supplemented with 4-OH-E<sub>2</sub> showed an increase in both metabolism and total cell count, with a lower cell death incidence when compared with IVF embryos cultured in the absence of 4-OH-E<sub>2</sub>. The rupture of the zona pellucida and subsequent hatching of the embryo are essential for implantation to occur successfully (Teklenburg and Macklon, 2009). Recently, it has been proposed that the effects of EGF in accelerating morula progression to fully expanded blastocyst increases the natural expanding effects

of the blastocyst on the zona pellucida, which could enhance its implantation ability (Desai *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2010). In the presence of 4-OH-E<sub>2</sub>, the culture of *in vitro* obtained embryos induced a statistically significant increase in blastocyst diameter and a decreased zona pellucida thickness (although differences are still observed when compared with *in utero* embryos), which would increase the implantation potential of embryos. Therefore, we can conclude that 4-OH-E<sub>2</sub> supplementation of culture media for *in vitro* obtained embryos, from the morula to blastocyst stage, improves embryo quality and development.

It has been also well established that *in vitro* obtained embryos demonstrate a lower quality and potential to implant than those developed under physiological conditions, a situation that could be attributed, at least in part, to a reduced ability of embryos to interact with EGF (Ho *et al.*, 1994; Doherty *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 2003; Tesfaye *et al.*, 2004; Wrenzycki *et al.*, 2005; Fong *et al.*, 2007; Warzych *et al.*, 2007; Nowak-Imialek *et al.*, 2008; Scheil *et al.*, 2010; Das and Holzer, 2012). In order to see whether the beneficial effects of exogenous 4-OH-E<sub>2</sub> on the embryos are related to an enhanced capability to interact with EGF, the EGF-binding capability of *in utero* and *in vitro* obtained embryos was studied. Surprisingly, using the enriched culture media from the beginning of the *in vitro* development (from the fecundation to PN stage) we observed a significant decrease in the final

capability of blastocysts to interact with EGF. Nevertheless, our results show that when the supplementation takes place from morula to blastocyst, the embryos demonstrated a statistically significant increase in their final capability to bind EGF when compared with embryos fully developed *in vitro* and cultured in a conventional media, highlighting the importance of environmental conditions on morula to blastocyst transitioning for the potential of the embryo to interact with EGF. These results confirmed that the endocrine environment in which the *in vitro* culture takes place could decisively affect embryo fate, with elevated levels of catecholestrogens being detrimental at early stages of cleavage, but beneficial in the morula to blastocyst transition (Cline et al., 1977; Stone and Hamner, 1977; Ortiz et al., 1979; Lattanzi et al., 2003). This situation could be explained at the physiological level if elevated levels of E<sub>2</sub> metabolites, including 4-OH-E<sub>2</sub>, when detected by the embryo at early stages, were interpreted as a signal that indicates a post-receptive endometrium, impairing further development.

Finally, we needed to check that these advantageous effects of 4-OH-E<sub>2</sub> could be translated to an improvement in the implantation rate. Accordingly, we tested whether the effects of 4-OH-E<sub>2</sub> on *in vitro* obtained embryos were reflected in the embryo capability to attach to endometrial cells. Using an *in vitro* model of implantation, consisting of a co-culture of embryos with endometrial cells, our results demonstrated that embryos cultured in the presence of 4-OH-E<sub>2</sub> during the last stages of preimplantation development showed a significant increase in their adhesiveness to endometrial cells when compared with embryos cultured during the same period in the absence of 4-OH-E<sub>2</sub>. Nevertheless, the adhesive capacity of treated embryos does not reach the potential demonstrated by *in utero* obtained embryos. Furthermore, the beneficial effects of the enriched culture are restricted to the last stages of preimplantation development, precisely during the physiological increase in catecholestrogens and when the window of implantation is opening (Paria et al., 1993, 1998a). Moreover, some embryos exposed to 4-OH-E<sub>2</sub> the before first division demonstrated a significant decrease in their potential to attach to endometrial cells at the blastocyst stage.

In our study, we also aimed to evaluate the potential of 4-OH-E<sub>2</sub> to improve the implantation rates of *in vitro* obtained embryos using an *in vivo* transplantation model. Here, embryos were cultured in different experimental conditions and then transferred to the recipient ICR mice. Notably, the quality of the transfer technique affects pregnancy rates and can be responsible for up to 30% of the implantation failures (Cohen, 1998). In the present study, embryo transfers were performed by trained personnel at our laboratory to minimize the potential embryo loss and reduce the number of animals used. On Day 15 of pregnancy, mice were killed and their uterus and placenta were observed to determine the implantation, miscarriage, and development rates. Our results confirmed that *in vitro* obtained embryos showed a lower implantation potential and higher miscarriage rate when compared with embryos developed *in vivo*. However, blastocysts that were cultured in the presence of 4-OH-E<sub>2</sub> from morula to blastocyst, although maintaining similar implantation rates had lower miscarriage rates and similar fetal development rates than embryos developed *in utero*. As additional information to confirm experimental safety, some recipient mothers, transferred with embryos cultured in 4-OH-E<sub>2</sub>, were allowed to carry the pregnancy to term and give birth. Notably, no defects, malformations, or fertility problems were observed in the offspring during the 2 years of observation.

Although the main purpose of this work was to check 4-OH-E<sub>2</sub> as a possible source in the media to improve embryo characteristics and implantation, here we also carried out similar experiments with other hormone candidates for this role, namely estradiol and progesterone, and no similar beneficial effects were noted. These results strongly suggest that 4-OH-E<sub>2</sub> supplementation in the culture media of *in vitro* obtained embryos, at the last stages of preimplantation development, improves the quality of embryos as well as the potential of implanted embryos to develop and become viable fetuses. These effects may be related to the efficacy of 4-OH-E<sub>2</sub> to activate embryos to acquire implantation potential, rendering activated embryos more prone to develop once implanted (Paria et al., 1998a).

The situation of an altered endocrine and proteomic environment during *in vitro* culture, utilized as a basis for this study, can be translated to ART, especially in human IVF. First, tubal and uterine fluids contain several more components, including hormones and growth factors (Aguilar and Reyley, 2005; Avilés et al., 2010), than commercially supplied culture media. Second, during ART there is a clear deregulation of the hormonal environment in women, produced by the stimulation and transfer protocols (Timeva et al., 2014; Shrestha et al., 2015). The alteration of the hormonal profile could account for incorrect levels of catecholestrogens at the point of embryo transfer to the uterine cavity, impairing the necessary embryo activation, and affecting implantation. This discrepancy should be considered by the clinics in order to determine the hormonal levels and take them into account when deciding when to transfer the embryos, considering the possibility of vitrifying embryos and transfer them in a deferred cycle or avoiding the transfer of embryos at Day 3 when estrogen levels are high. These results are consistent with previous reports (Lattanzi et al., 2003), highlighting the importance of synchronization between the endocrine environment and the embryo's state of activity during preimplantation development. The results also suggest that enrichment of the culture media with 4-OH-E<sub>2</sub> at the last stages of *in vitro* culture could be advantageous for embryos, favoring at least the early phases of the implantation process. Also, consideration of different media compositions for different stages of development according to the supplementation of estrogens or their derivatives should be further investigated.

Collectively, the results presented in this work demonstrate the significant role of 4-OH-E<sub>2</sub> on the embryo, improving its quality and success of implantation, probably by increasing the blastocyst's capability to interact with EGF. However, the effects of 4-OH-E<sub>2</sub> enriched culture media are insufficient to reach the physiological values shown by embryos fully developed *in utero*, opening the door for the investigation of additional factors involved in this process.

These conclusions could have important implications for ART as the modification of culture conditions or patient hormonal levels, based on the data obtained, could provide an interesting strategy to improve IVF success. However, further research is crucial before these findings can be translated with efficacy and safety to fertility clinics.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *Molecular Human Reproduction* online.

## Data availability

Part of the data that support the findings of this study are openly available in Teseo—Ministerio de Educación at <https://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarRef.do?ref=966450>.

The rest of the data are available and will be shared on reasonable request to the corresponding author, as they belong to an ongoing thesis not yet defended.

## Acknowledgements

This study was financed by Ayuda de Grupos Catalogados de la Junta de Extremadura, GR18199. We would also like to thank the Biomedicine Applied Techniques Facility of the University of Extremadura for permitting us the use of their confocal microscope, and the Animalarium service of the Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre for taking care and maintaining all the animals used in the experiments. We would also like to thank Editage for the thorough English language revision of this paper.

## Authors' roles

N.H., M.J.P., and V.C.-R. performed the experiments; N.H., M.L.-M., S.S.-M., and M.J.P. drafted the article; M.L.-M., S.S.-M., N.H., and I.S.A. participated in the critical review; I.S.A., J.A.D.-A., and F.M.S.-M. approved the final version.

## Funding

This publication has been partially supported by GR18199 from Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital de Junta de Extremadura (co-funded by European Regional Development Fund—ERDF. "A way to make Europe"). This work was performed as part of Project IRA116, funded by internal funding of the Foundation Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre and Junta de Extremadura (Expedient n° PCJ1008), and the European Regional Development Fund (FEDER).

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest. The treatment of embryos with 4-HO-E<sub>2</sub> is under the patent ES2439424B1, granted by The Oficina Española de Patentes y Marcas in 2014 to I.S.A. and M.J.P.

## References

Aguilar J., Reyley M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Anim Reprod* 2005;**2**:91–105.  
 Ahumada CJ, Salvador I, Cebrian-Serrano A, Lopera R, Silvestre MA. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on *in vitro* embryo development and quality. *Animal* 2013;**7**:455–462.

Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 2010;**16**: 896–906.  
 Chobotova K, Karpovich N, Carver J, Manek S, Gullick WJ, Barlow DH, Mardon HJ. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**: 913–919.  
 Chobotova K, Spyropoulou I, Carver J, Manek S, Heath JK, Gullick WJ, Barlow DH, Sargent IL, Mardon HJ. Heparin-binding epidermal growth factor and its receptor ErbB4 mediate implantation of the human blastocyst. *Mech Dev* 2002;**119**:137–144.  
 Cline EM, Randall PA, Oliphant G. Hormone-mediated oviductal influence on mouse embryo development. *Fertil Steril* 1977;**28**: 766–771.  
 Cohen J. *Embryo Replacement Technology. 31 Annual Post Graduate Course*. San Francisco: ASRM, 1998.  
 Collins MK, Perkins GR, Rodriguez-Tarduchy G, Nieto MA, Lopez-Rivas A. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *BioEssays* 1994;**16**:133–138.  
 Das M, Holzer HE. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. *Fertil Steril* 2012;**97**:1021–1027.  
 Desai N, Lawson J, Goldfarb J. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2000;**15**:410–418.  
 Dey SK, Hubbard CJ. Role of histamine and cyclic nucleotides in implantation in the rabbit. *Cell Tissue Res* 1981;**220**:549–554.  
 Dey SK, Johnson DC, Pakrasi PL, Liehr JG. Estrogens with reduced catechol-forming capacity fail to induce implantation in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986;**181**:215–218.  
 Díaz-Cueto L, Gerton GL. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res* 2001;**32**:619–626.  
 Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000;**62**:1526–1535.  
 Fang C, Li T, Miao BY, Zhuang GL, Zhou C. Mechanically expanding the zona pellucida of human frozen thawed embryos: a new method of assisted hatching. *Fertil Steril* 2010;**94**:1302–1307.  
 Fong B, Watson PH, Watson AJ. Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation. *BMC Dev Biol* 2007;**7**:2.  
 Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MS, Dey SK. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:10326–10331.  
 Ho Y, Doherty AS, Schultz RM. Mouse preimplantation embryo development *in vitro*: effect of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. *Mol Reprod Dev* 1994;**38**:131–141.  
 Hoversland RC, Dey SK, Johnson DC. Catechol estradiol induced implantation in the mouse. *Life Sci* 1982;**30**:1801–1804.  
 Hughes SJ, Hollingsworth M, Elliott KR. The role of a cAMP-dependent pathway in the uterine relaxant action of relaxin in rats. *Reproduction* 1997;**109**:289–296.  
 Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. Implantation rates after *in vitro* fertilization and transfer of a maximum of two

- embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril* 2000;**73**:117–122.
- Johnson DC, Chatterjee S. Embryo implantation in the rat uterus induced by epidermal growth factor. *J Reprod Fertil* 1993;**99**:557–559.
- Jung T. Protein synthesis and degradation in non-cultured and *in-vitro* cultured rabbit blastocysts. *J Reprod Fertil* 1989;**86**:507–512.
- Kantor BS, Dey SK, Johnson DC. Catechol oestrogen induced initiation of implantation in the delayed implanting rat. *Eur J Endocrinol* 1985;**109**:418–422.
- Lattanzi ML, Santos CB, Mudry MD, Baranao JL. Exposure of bovine oocytes to the endogenous metabolite 2-methoxyestradiol during *in vitro* maturation inhibits early embryonic development. *Biol Reprod* 2003;**69**:1793–1800.
- Lee ES, Fukui Y. Effect of various growth factors in a defined culture medium on *in vitro* development of bovine embryos matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1995;**44**:71–83.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod* 2003;**69**:1424–1431.
- Lonergan P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Reprod Dom Rum* 2007;**6**:315–325.
- Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:2963–2968.
- Mahdavinizhad F, Kazemi P, Fathalizadeh P, Sarmadi F, Sotoodeh L, Hashemi E, Hajarani H, Dashtizad M. *In vitro* versus *in vivo*: Development-, apoptosis-, and implantation-related gene expression in mouse blastocyst. *Iran J Biotechnol* 2019;**17**:e2157.
- Martin KL, Barlow DH, Sargent IL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 1998;**13**:1645–1652.
- Moll SJ, Jones CJ, Crocker IP, Baker PN, Heazell AE. Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. *Apoptosis* 2007;**12**:1611–1622.
- Mondschein JS, Hersey RM, Dey SK, Davis DL, Weisz J. Catechol estrogen formation by pig blastocysts during the preimplantation period: biochemical characterization of estrogen-2/4-hydroxylase and correlation with aromatase activity. *Endocrinology* 1985;**117**:2339–2346.
- Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Development* 2012;**139**:829–841.
- Nowak-Imialek M, Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lagutina I, Lemme E, Lazzari G, Galli C, Niemann H. Messenger RNA expression patterns of histone-associated genes in bovine preimplantation embryos derived from different origins. *Mol Reprod Dev* 2008;**75**:731–743.
- Ortiz ME, Villalon M, Croxatto HB. Ovum transport and fertility following postovulatory treatment with estradiol in rats. *Biol Reprod* 1979;**21**:1163–1167.
- Paria BC, Chakraborty C, Dey SK. Catechol estrogen formation in the mouse uterus and its role in implantation. *Mol Cell Endocrinol* 1990a;**69**:25–32.
- Paria BC, Das SK, Dey SK. Embryo implantation requires estrogen-directed uterine preparation and catecholesterogen-mediated embryonic activation. *Adv Pharmacol* 1998a;**42**:840–843.
- Paria BC, Dey SK. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990b;**87**:4756–4760.
- Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10159–10162.
- Paria BC, Lim H, Wang XN, Liehr J, Das SK, Dey SK. Coordination of differential effects of primary estrogen and catecholesterogen on two distinct targets mediates embryo implantation in the mouse. *Endocrinology* 1998b;**139**:5235–5246.
- Psychoyos A. Uterine Receptivity for Nidation a. *Ann NY Acad Sci* 1986;**476**:36–42.
- Ptak GE, Tacconi E, Czernik M, Toschi P, Modlinski JA, Loi P. Embryonic diapause is conserved across mammals. *PLoS One* 2012;**7**:e33027.
- Rawson CL, Loo DT, Duimstra JR, Hedstrom OR, Schmidt EE, Barnes DW. Death of serum-free mouse embryo cells caused by epidermal growth factor deprivation. *J Cell Biol* 1991;**113**:671–680.
- Renfree MB, Shaw G. Diapause. *Annu Rev Physiol* 2000;**62**:353–375.
- Richter KS. The importance of growth factors for preimplantation embryo development and *in-vitro* culture. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;**20**:292–304.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;**61**:234–248.
- Scheil V, Zurn A, Kohler HR, Triebkorn R. Embryo development, stress protein (Hsp70) responses, and histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos, and binary mixtures of them. *Environ Toxicol* 2010;**25**:83–93.
- Shrestha D, La X, Feng HL. Comparison of different stimulation protocols used in *in vitro* fertilization: a review. *Ann Transl Med* 2015;**3**:137.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2003;**77**:21–32.
- Sociedad Española de Fertilidad (SEF). National Registry of Activity 2017. Statistical Report of assisted reproduction techniques 2017. [http://www.cnrha.msrebs.gob.es/registros/pdf/Informe\\_estadisticoSEF\\_2017.pdf](http://www.cnrha.msrebs.gob.es/registros/pdf/Informe_estadisticoSEF_2017.pdf) (March 2020, date last accessed).
- Stone SL, Hammer CE. Hormonal and regional influences of the oviduct on the development of rabbit embryos. *Biol Reprod* 1977;**16**:638–646.
- Takeuchi M, Seki M, Furukawa E, Takahashi A, Saito K, Kobayashi M, Ezoe K, Fukui E, Yoshizawa M, Matsumoto H. Improvement of implantation potential in mouse blastocysts derived from IVF by combined treatment with prolactin, epidermal growth factor and 4-hydroxyestradiol. *Mol Hum Reprod* 2017;**23**:557–570.
- Teklenburg G, Macklon NS. Review: *in vitro* models for the study of early human embryo-endometrium interactions. *Reprod Sci* 2009;**16**:811–818.
- Tesfaye D, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Schellander K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. *Reprod Domest Anim* 2004;**39**:396–404.

- Thompson JG. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev* 1997;**9**:341–354.
- Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. *J Reprod Infertil* 2014;**15**:173–183.
- Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006;**7**:185–199.
- Wang X, Wang H, Matsumoto H, Roy SK, Das SK, Paria BC. Dual source and target of heparin-binding EGF-like growth factor during the onset of implantation in the hamster. *Development* 2002;**129**:4125–4134.
- Warzych E, Wrenzycki C, Peippo J, Lechniak D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 2007;**74**:280–289.
- Wolff GS, Chiang PJ, Smith SM, Romero R, Armant DR. Epidermal growth factor-like growth factors prevent apoptosis of alcohol-exposed human placental cytotrophoblast cells. *Biol Reprod* 2007;**77**:53–60.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev* 1999;**53**:8–18.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* 2005;**17**:23–35.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertil Steril* 2009;**92**:1520–1524.
- Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, Armant DR. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med* 2013;**34**:939–980.



**Supplementation of culture medium with quercetin improves mouse blastocyst quality and increases the expression of HIF-1 $\alpha$  protein**

Journal:	<i>Zygote</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hernández Rollán, Nuria; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Assisted reproduction Sánchez-Mateos, Soledad; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Assisted Reproduction López Morató, Marta; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Assisted Reproduction Sánchez-Margallo, Francisco; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Assisted Reproduction Álvarez, Ignacio; Universidad de Extremadura Facultad de Ciencias, Cell biology
Keywords:	culture medium, Embryo, IVF, HIF-1-alpha, quercetin, mouse, blastocyst, morula
Abstract:	Regarding the low number of embryos that reach the blastocyst stage when cultured in vitro, this study aimed to evaluate the effects of quercetin on pre-implantation mouse ( <i>mus musculus</i> ) embryos obtained by in vitro fertilization, specially during the passage from morula to blastocyst. Furthermore, we studied whether quercetin also affects the expression of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ . Culture medium of embryos was supplemented with quercetin, for long and short periods of time, and then the development potential, total cell number, apoptosis rates and expression of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ were studied to determine the effect of quercetin. Embryos fail to develop when cultured for long periods of time with quercetin, implying a possible toxic effect of this, otherwise antioxidant, compound. However, a short culture from morula to blastocyst significantly improves the development potential of in vitro produced embryos, increasing the final total cell number and reducing the apoptosis rate, observing similar results to those embryos cultured in low oxygen concentrations or developed in utero. Furthermore, in embryos treated with quercetin for 2 or 4 hours we found an increase of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ compared to untreated embryos. This work could imply a way to use quercetin in fertility clinics in order to improve the production of healthy blastocysts and consequently, increase the success rates in assisted reproduction techniques.

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Cambridge University Press

1 **Supplementation of culture medium with quercetin improves mouse blastocyst quality and**  
2 **increases the expression of HIF-1 $\alpha$  protein**

3

4 Nuria Hernández-Rollán<sup>1,2\*</sup>, Soledad Sánchez-Mateos<sup>1</sup>, Marta López-Morató<sup>1,3</sup>, Francisco M. Sánchez-  
5 Margallo<sup>1</sup>, Ignacio S. Álvarez<sup>4,5\*</sup>

6

7 1. Assisted Reproduction Unit, Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, Spain.

8 2. Criopreservation facility, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIs), Seville, Spain.

9 3. Genetics unit, Hospital HLA Vistahermosa, Alicante, Spain

10 4. Department of Cell Biology, Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain

11 5. Instituto Extremeño de Reproducción Asistida (IERA), Badajoz, Spain

12

13 \*Corresponding author: Nuria Hernandez Rollán. Centro de cirugía de mínima invasión Jesús Usón. C/  
14 Carretera N-521, Km 41.8, 10071, Cáceres, Spain. Email: [nuriahernandezrollan@gmail.com](mailto:nuriahernandezrollan@gmail.com) ORCID  
15 <https://orcid.org/0000-0002-6812-1189>

16 \*Corresponding author: Ignacio S. Álvarez. Dpto. Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad  
17 de Extremadura, 06071. Badajoz, Spain. Email: [ialvarez@unex.es](mailto:ialvarez@unex.es) ORCID [https://orcid.org/0000-0003-](https://orcid.org/0000-0003-2352-7895)  
18 2352-7895

19

20 Soledad Sánchez-Mateos ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7545-1485>

21 Marta López-Morató ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2194-7258>

22 Francisco Miguel Sánchez-Margallo ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2138-988X>

23

24 **Word count: 4.817**

25

26

27

28

29

30

31 **Abstract**

32 Regarding the low number of embryos that reach the blastocyst stage when cultured *in vitro*, this study  
33 aimed to evaluate the effects of quercetin on pre-implantation mouse (*mus musculus*) embryos obtained  
34 by *in vitro* fertilization, specially during the passage from morula to blastocyst. Furthermore, we studied  
35 whether quercetin also affects the expression of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ . Culture medium of  
36 embryos was supplemented with quercetin, for long and short periods of time, and then the development  
37 potential, total cell number, apoptosis rates and expression of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  were studied  
38 to determine the effect of quercetin. Embryos fail to develop when cultured for long periods of time with  
39 quercetin, implying a possible toxic effect of this, otherwise antioxidant, compound. However, a short  
40 culture from morula to blastocyst significantly improves the development potential of *in vitro* produced  
41 embryos, increasing the final total cell number and reducing the apoptosis rate, observing similar results  
42 to those embryos cultured in low oxygen concentrations or developed *in utero*. Furthermore, in embryos  
43 treated with quercetin for 2 or 4 hours we found an increase of Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  compared to  
44 untreated embryos. This work could imply a way to use quercetin in fertility clinics in order to improve  
45 the production of healthy blastocysts and consequently, increase the success rates in assisted reproduction  
46 techniques.

47

48

49 **Key words:** Culture medium, embryo development, HIF-1 $\alpha$ , IVF, quercetin.

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

## 61 1. Introduction

62 *In vitro* embryo culture is an important step in order to achieve success in reproductive technology and is  
63 challenged by multiple factors. The development potential of embryos obtained by *in vitro* fertilization is  
64 related to the composition of the culture medium (Paternot *et al.*, 2010, Sameni *et al.*, 2018). Even though  
65 many advances have been made in cell culture techniques, the proportion of embryos that reach the  
66 blastocyst stage remains variable (Sepulveda *et al.*, 2009, Sills *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2014). It is well  
67 known that one of the factors that negatively affect embryonic development is oxidative stress and  
68 therefore the oxygen (O<sub>2</sub>) concentration used in the incubation system emerges as a crucial factor to be  
69 considered. Some studies reported that *in vivo* oxygen tension in the female reproductive tract of  
70 mammals ranges from 2% to 8% (Bishop 1957, Mastroianni and Jones 1965, Morin 2017) and that  
71 oxygen tension decreases around the time of blastocyst formation (Morin 2017, Fischer and Bavister  
72 1993). Also, improved *in vitro* development of mammalian embryos under physiological oxygen tension  
73 has been reported (Morin 2017, Whitten 1969) and because the oxygen tension in the uterus is indeed  
74 lower than in the oviduct (Bishop 1957, Morin 2017, Steptoe *et al.*, 1971), a dynamic embryo culture  
75 system that adjusts oxygen concentration could represent the most physiological system.

76 Low O<sub>2</sub> tension triggers a wide range of cellular events on embryonic development, focused on the  
77 regulation of hypoxia-inducible factors (HIF) (Ma *et al.*, 2017, Mantikou *et al.*, 2013, Webster and Abela  
78 2007). HIFs are transcriptional regulators of cellular hypoxic responses and consist of two basic helix-  
79 loop-helix protein subunits, HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ . The  $\alpha$  subunit is activated and stable only in cells under  
80 conditions of low O<sub>2</sub> content (Dunwoodie 2009, Wang *et al.*, 1995), producing the activation of a wide  
81 range of genes (Caramelo *et al.*, 2006), although the expression and function of HIF-1 $\alpha$  in embryogenesis  
82 is still unclear (Yoon *et al.*, 2013). On the other hand, it has been shown that the expression of HIF1 $\alpha$   
83 protein can be induced by a variety of stimuli other than hypoxia, such as hormones, cytokines, growth  
84 factors (Yoon *et al.*, 2013, Carroll and Ashcroft 2006, Pringle *et al.*, 2010) and flavonoids (Bogacz *et al.*,  
85 2021).

86 On the contrary, high levels of atmospheric O<sub>2</sub> favors a greater production of reactive oxygen species  
87 (ROS), which are highly harmful and can cause cell damage to oocytes and embryos (Yu *et al.*, 2014,  
88 Guerin *et al.*, 2001, Sovemigo *et al.*, 2017, Martin-Romero *et al.*, 2008) being an important cause of low  
89 efficiency in oocyte maturation and embryo development in several species (Luberda 2005). The female  
90 reproductive system is rich in antioxidants, such as catalase and glutathione, among others (Carbone *et*

91 *et al.*, 2003) and it has been widely proposed that the use of substances with antioxidant properties could  
92 counteract the increase of ROS and improve embryo production (De Matos *et al.*, 2002, Kere *et al.*,  
93 2013). Therefore, culture medium often contains a wide variety of antioxidants in order to reduce ROS  
94 during *in vitro* embryo culture (Martín-Romero *et al.*, 2008, Kere *et al.*, 2013, Rocha-Frigoni *et al.*, 2016,  
95 Mishra *et al.*, 2016).

96 Flavonoids are phytophenolic compounds with a strong antioxidant effect that work as free radical  
97 scavengers. Within the flavonoid family, quercetin is the most potent scavenger of ROS (Cushnie and  
98 Lamb 2005, Boots *et al.*, 2008) and nitrogen species (Heijnen *et al.*, 2002). These antioxidant properties  
99 could be attributed to its abilities to chelate metals (Ferrali *et al.*, 1997, Aherne and O'Brien 2000),  
100 radical scavenging (Aherne and O'Brien 2000), enzymatic inhibition (Nagao *et al.*, 1999) and / or  
101 induction of repair mechanisms (Myhrstad *et al.*, 2002). Quercetin is very abundant in fruits and  
102 vegetables such as apple, strawberry, onion, tea and broccoli (Machiko *et al.*, 1977, Nakayama *et al.*,  
103 1998, Micek *et al.*, 2016). The effect of this compound has been extensively studied by researchers over  
104 the past 35 years in hamster embryonic cells (Machiko *et al.*, 1977), V79 Chinese hamster cells  
105 (Nakayama *et al.*, 1998), human sperm (Khanduja *et al.*, 2001), hepatocytes human HepG2 (Dong *et al.*,  
106 2006) and porcine oocytes (Kang *et al.*, 2016). It has been reported to have antioxidant, antimutagenic  
107 and anti-inflammatory activity, thereby reducing abnormalities in rat embryos, decreasing neural tube  
108 defects in diabetic mouse embryos and reducing damage of hair cells in zebrafish embryos (Kang *et al.*,  
109 2016, Karampour *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015).

110 On the contrary, there are several reports that indicate a possible toxic effect of quercetin in *in vitro*  
111 obtained mouse embryos by unknown mechanisms, and therefore there is still controversy about its  
112 possible utilization in IVF (Hashemzai *et al.*, 2017, Pérez-Pastén *et al.*, 2010). Consequently, the  
113 objective of this study was to gain insights on the effect of quercetin on pre-implantation mouse embryos  
114 obtained by *in vitro* fertilization, specially during the passage from morula to blastocyst. Furthermore, we  
115 studied whether quercetin influences embryonic development by stimulating the expression of HIF-1 $\alpha$ .

## 116 2. Materials and Methods

### 117 2.1. Animals

118 Female B6D2F1/J (C57BL/6JOLAHsd x DBA/2OlaHsd, Envigo RMS, Holland) hybrid mice were used as  
119 oocyte and embryos donors, and male B6D2F1/J hybrid mice were used as semen donors. All mice were

120 8–12 weeks old. Animals were housed in the animalarium of the Jesús Usón minimally invasive surgery  
121 centre (certified by ES100370001499) under controlled conditions, 12 h light: 12 h dark, 20-25 °C  
122 temperature and 40-70% relative humidity, with food and water *ad libitum*. Males were housed  
123 individually in cages, whereas females were housed in groups of 2 or 4 per cage, and were controlled by  
124 the vet throughout the entire realisation of this work. Confounders were not controlled. The number of  
125 animals used for the experiments were divided as follows: 60 females were used to obtain embryos by  
126 IVF and treat them with quercetin for long periods of time in order to study the development potential; 11  
127 females were used to obtain embryos by IVF and treat them with quercetin for short periods of time and  
128 to analyze the development potential, the cell number, the apoptosis rate and the expression of HIF-1 $\alpha$ ; 11  
129 females were used to obtain embryos *in utero* and treat them with quercetin for short periods of time and  
130 analyze the same parameters as before. This means a total of 82 females used in this work, along with a  
131 total of 40 males. All experiments were approved by the Ethics Committee of the University of  
132 Extremadura according to RD 53/2013 of 1<sup>st</sup> of February, and all procedures followed the guiding  
133 principles for research involving animals in accordance with the Institute for Laboratory Animal Research  
134 (ILAR) Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and the Spanish Regulation (RD1201/2005).

135

## 136 2.2. Collection of *in utero* embryos and *in vitro* (IVF) obtained embryos

137 2.2.1. Embryos developed under physiological conditions: Mature female mice were stimulated with  
138 8 IU of eCG (equine Chorionic Gonadotropin; Syncrostim, CEVA Animal health, S.A. Barcelona, Spain)  
139 and 48 hours later, with 8 IU of hCG (human Chorionic Gonadotropin; Veterin Corion, Divisa Farnavic,  
140 S.A. Barcelona, Spain). Females were mated with fertile males of the same age and strain to induce  
141 pregnancy (1♂:1♀) over-night. Pregnancy was confirmed by visualization of the vaginal plug at day 1 of  
142 embryo development. Females were sacrificed 72 h and 96 h post-hCG injection by cervical dislocation  
143 and developing embryos were recovered in potassium simplex optimized medium (KSOM; Merck-  
144 Millipore, Madrid, Spain) after flushing the uterus with M2 medium (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain).

145 2.2.2. Embryos obtained by IVF: Mature female mice were stimulated with 8 IU of eCG and 48  
146 hours later, with 8 IU of hCG. To perform the IVF, male mice were euthanized by cervical dislocation  
147 and sperm was obtained from the caudal epididymides and then incubated in HTF medium to allow  
148 capacitation. Mature oocytes were recovered from the ampulla of the oviduct of females sacrificed by  
149 cervical dislocation 12 h post-hCG injection and placed in HTF medium. Insemination was performed

150 with capacitated spermatozoa ( $3 \times 10^6$ ) in 600  $\mu$ l of HTF medium containing the oocytes. Fertilized  
151 oocytes were washed and cultured in KSOM medium at 37 °C and atmospheric oxygen concentration  
152 (21%) until required for the experiments.

### 153 2.3. Quercetin treatment and low oxygen concentration culture

154 Quercetin (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) diluted in DMSO (0.01%) (Sigma-Aldrich, Barcelona,  
155 Spain) at different concentration (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M), was added to the culture medium at  
156 different stages of development (pronucleus (PN) stage, 2 cells, 8-16 cells and morulae), and then  
157 embryos were cultured until the blastocyst stage, at 37 °C. To study the effect of the vehicle DMSO a set  
158 of embryos were cultured only with DMSO (0.01%), and all the results were compared to embryos  
159 cultured in KSOM media throughout the entire development (Fig. 1A).

160 Based on the results obtained, we performed new experiments exposing embryos to quercetin at 10 $\mu$ M for  
161 short periods of time. We added this flavonoid to the culture medium of embryos at the morula stage, for  
162 2 hours or 4 hours. These embryos were both obtained by IVF or developed *in utero* (IU) (Fig. 1B). Then,  
163 embryos were cultured again in conventional medium up to the blastocyst stage. For comparison, two  
164 other sets of embryos, both obtained by IVF and IU, were cultured either in KSOM media or under 3% of  
165 O<sub>2</sub>. Finally, once the embryos reached day 4.5 of development, the percentage of embryonic  
166 development, total cell number, number of apoptotic cells and expression of HIF-1 $\alpha$  protein were  
167 evaluated and compared to the control groups consisting of embryos cultured with DMSO but no  
168 quercetin, for 2h or 4h and then cultured in KSOM media up to blastocyst stage (Fig. 1B).

### 169 2.4. Nuclear staining

170 To count the total cell number, paraformaldehyde (PFA) 4 % fixed blastocysts were stained with 2  $\mu$ g/ml  
171 of Hoechst 33342 (Eugene, OR, USA) and the nuclei were examined using a confocal microscope (Nikon  
172 Eclipse TE2000-U) The cell number was analyzed using the Fiji Image-J Software (1.45q, Wayne  
173 Rasband, NIH, USA).

### 174 2.5. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

175 Apoptotic cells in the embryos were detected using the *in situ* Cell Death Detection kit (TUNEL) from  
176 Roche (Mannheim, Germany) using the manufacturer protocol and nuclei were counterstained with  
177 Hoechst 33342 as previously described. Fluorescence images were taken using the same confocal  
178 microscope.

179        **2.6. Immunofluorescence of HIF-1 $\alpha$  protein**

180        The immunodetection of HIF-1 $\alpha$  was performed by incubating fixed embryos with a 1:100 dilution of the  
181        HIF-1 $\alpha$  monoclonal antibody (Novus Biologicals; NB100-105) and using fluorescein isothiocyanate  
182        (FITC)-conjugated goat-anti-mouse IgG (Novus Biologicals; NB720-F) at 1:400 dilution as secondary  
183        antibody. Nuclei were counterstained again with Hoechst 33342 and embryos were observed in a confocal  
184        laser-scanning microscope (Nikon Eclipse TE2000-U). Control embryos were processed as described  
185        above, but the primary antibody was omitted. The expression of HIF-1 $\alpha$  was analyzed in a qualitative  
186        manner, to detect possible changes in its expression.

187        **2.7. Statistical analysis**

188        Statistical analyses were performed using the SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and a p-  
189        value lower than 0.05 was considered statistically significant. ANOVA was used to compare embryo  
190        proliferation, whereas the Mann-Whitney-Wilcoxon non-parametric test was performed to compare  
191        development rate and results from the tunel assay. Data expressed as percentages were analyzed using the  
192         $\chi^2$ -test.

193 **3. Results**194 **Effect of quercetin in the development potential of mouse embryos**

195 To investigate the effect of quercetin on embryo development, we first cultured with different  
196 concentrations of quercetin (50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 1  $\mu$ M) *in vitro* obtained zygotes and embryos at  
197 different stages of development until they reached the blastocyst stage. Zygotes and embryos cultured in  
198 KSOM media throughout the entire development were used as the control group. Our results show that  
199 regardless of the concentration of quercetin, the percentage of embryos that reached the blastocyst stage  
200 was significantly lower compared to the control (Table 1). Embryos cultured only with the dissolvent of  
201 the quercetin, DMSO at a concentration of 0.01 %, were also included in this experiment to analyze the  
202 potential effect of the dissolvent in the embryos and the development potential. Compared to control  
203 embryos, around of the 50% of the embryos reached the blastocyst stage, a number much higher than in  
204 the groups of embryos treated with quercetin. This first observation indicates a negative or toxic effect of  
205 quercetin on embryo development that cannot be attributed to the dissolvent. Despite these results, the  
206 Quer10 $\mu$ M group presented the highest number of embryos that developed to blastocyst stage (Table 1),  
207 so we decided to use this concentration for further studies shown next and to try to counteract this toxic  
208 effect of the quercetin.

209 Based on the previous results that show a detrimental effect of quercetin when used for long periods of  
210 time in the culture media, the approach of this work was changed. Instead of studying the effect that  
211 quercetin produces on the development potential when used throughout the entire embryo culture, we  
212 decided to study its effects during short time intervals (2 hours or 4 hours) on embryos obtained directly  
213 from the uterus at the morula stage, a crucial stage in which embryos seem to be less susceptible to the  
214 negative effect of quercetin/DMSO treatment (see data in Table 1). Interestingly, as can be seen in the  
215 figure 2, in this case, the quercetin did not show a detrimental effect on embryo development potential but  
216 rather beneficial, with similar number of embryos reaching the blastocyst stage than in control or low O<sub>2</sub>  
217 treated embryos.

218 Therefore, we further studied the effect of quercetin on embryos obtained by *in vitro* fertilization, cultured  
219 up to the morula stage in KSOM medium, and then treated with quercetin for 2 or 4 hours. Our results  
220 indicate that there are statistically significant differences in all the experimental groups (Fig. 3) in favour  
221 of embryos cultured with quercetin, both for 2 and 4 hours. We also included for comparison embryos

222 cultured in low oxygen concentration (IVF O<sub>2</sub> 3% group), observing that they behave similarly to those  
223 developed to morula stage in the uterus (IU KSOM group), and in all the experimental cases, embryos  
224 had a higher development potential than those cultured in conventional KSOM medium (IVF KSOM  
225 group).

#### 226 **Effect of quercetin in the total cell number at blastocyst stage**

227 Once we confirmed the beneficial effect of quercetin in the development potential of embryos, we  
228 examined whether quercetin produced an increase in cell proliferation by analyzing the total cell number  
229 of the embryos that reached the blastocyst stage in our set of experiments. As can be seen in figure 4,  
230 embryos developed *in utero* up to the morula stage and treated either for 2 or 4 hours with quercetin,  
231 presented a statistically significant higher average of cells at the blastocyst stage, and in the case of  
232 embryos treated for 4h (IU Quer 4h group), their total cell number was even higher than embryos cultured  
233 in low oxygen concentrations (IU O<sub>2</sub> 3% group) (Fig. 4, B). Cell count was also performed in embryos  
234 obtained by *in vitro* fertilization and exposed to quercetin at the morula stage (Fig. 5). Results show again  
235 that embryos presented a higher total cell number in the quercetin and low oxygen groups, showing  
236 differences statistically significant (Fig. 5, B), and being the total cell number similar to those found in  
237 embryos developed *in utero* up to the morula stage.

#### 238 **Effect of quercetin in the number of apoptotic cells in the blastocysts**

239 We tested by TUNEL the number of apoptotic cells in *in utero* developed embryos up to the morula stage  
240 and then treated with quercetin for short periods of time. Results show that a treatment of quercetin for 4  
241 hours reduces the number of apoptotic cells found in embryos, even though differences are not  
242 statistically significant. Furthermore, morulae cultured in low oxygen concentration also presented a not  
243 statistically significant lower number of apoptotic cells (Fig. 6, Table 2).

244 On the other hand, programmed cell death was also evaluated in embryos obtained by *in vitro* fertilization,  
245 which usually present more apoptosis. Results show that embryos treated with quercetin for 4 hours (IVF  
246 Quer 4h group) presented lower apoptotic rates, and a higher number of embryos without apoptotic cells  
247 (Fig. 7, Table 3), although differences are not statistically significant.

#### 248 **Expression of HIF-1 $\alpha$**

249 Immunofluorescence was performed to study the expression of HIF-1 $\alpha$  in embryos cultured under  
250 different conditions, as explained before. Results show that in *in utero* obtained embryos, the expression  
251 of HIF-1 $\alpha$  is similar in all groups despite of the treatment used (Fig. 8). On the other hand, when we  
252 studied the protein expression in *in vitro* obtained embryos treated with quercetin, especially for 4h, or in  
253 embryos cultured in low oxygen conditions (IVF O<sub>2</sub> 3% group), there is a significant increase in the  
254 expression of HIF-1 $\alpha$  (Fig. 9) compared to embryos cultured in conventional conditions, which clearly  
255 show a reduction in the expression of HIF-1 $\alpha$ . Noticeably, the fluorescence signal observed in embryos  
256 treated with quercetin is similar to that observed in embryos developed *in utero*. Finally, we must mention  
257 that a clear decrease in expression of HIF-1 $\alpha$  can also be observed in embryos cultured only with DMSO.

258

### 259 1. Discussion

260 The development potential of embryos obtained by IVF, as well as their quality and viability, depends  
261 among other things on the composition of the culture medium in which they develop (Patemot *et al.*,  
262 2010). A non-optimal culture can suppose a failure in the fertilization of the gametes and an inadequate  
263 development of the embryos, which do not reach the blastocyst stage or fail to implant in the uterus due to  
264 their poor quality. Therefore, optimal culture conditions are of utmost importance for *in vitro* fertilization  
265 of gametes, pre-implantation embryonic development and implantation in all species. Hence, increasing  
266 the *in vitro* development potential of early embryos by supplementation of the culture medium has been  
267 of great interest to many researchers and consequently, there are several works in which the culture  
268 medium has been enriched with many compounds that improve the quality of the embryos obtained by  
269 IVF.

270 In the present work, we have analyzed the consequences of supplementation of the culture medium with  
271 quercetin, a flavonoid with antioxidant properties. Quercetin has been reported to have a protective effect  
272 in mouse embryos against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and a better rate of blastocyst formation was observed when embryos  
273 were cultured for 3 hours with quercetin (Yu *et al.*, 2014). It has been also reported that more than 100  
274  $\mu$ M of quercetin in the culture medium caused some defects and abnormalities, whereas 3  $\mu$ M of this  
275 molecule had a protective effect on mouse embryos against hydroxyurea (Pérez-Pastén *et al.*, 2010).  
276 Furthermore, a protective effect of quercetin was demonstrated in embryos against 0.005  $\mu$ g/ml of  
277 actinomycin D (Sameni *et al.*, 2018). Our results suggest that quercetin produces a detrimental effect on  
278 embryonic development when cultured for long periods of time regardless of the stage of development.

279 This could be because after 24 hours in culture medium, quercetin stops being stable (Hu *et al.*, 2012) and  
280 loses its effectiveness as an antioxidant, producing toxic products for embryos. Furthermore, quercetin  
281 has been seen as a antiproliferative and proapoptotic compound in several lines of cancer cells and this  
282 property could explain its negative effects on embryos in culture because they cannot growth properly  
283 (Hashemzai *et al.*, 2017). Additionally the DMSO, which is the usual vehicle for dissolving quercetin,  
284 has been proved to have cytotoxic effects in mouse preimplantational embryos (Min-Hee *et al.*, 2017),  
285 which could explain some of the results observed here but not the drastic effects observed with the  
286 quercetin. Other possibility is that this cytotoxic effect and the instability of quercetin after 24 hours could  
287 be producing a synergic effect with the DMSO and be responsible for the low rates of blastocyst  
288 development observed here.

289 Recently, Hernández *et al.* showed that an improvement in embryo quality occurs when 4OHE<sub>2</sub> is added  
290 at the time of compaction (day 3 of preimplantation development, morula stage), which indicate that  
291 embryos are more sensitive to certain environmental changes when they are at the morula stage  
292 (Hernández *et al.*, 2020). Nonetheless, in *in vitro* obtained embryos, our study corroborates that the  
293 addition of quercetin at the time of embryo compaction for a period of 2 hours or 4 hours, results in a  
294 greater number of embryos that develop to blastocyst stage, compared to embryos cultured in  
295 conventional medium, and results almost resemble those observed in embryos cultured in low oxygen  
296 concentration. These results indicate that quercetin does not negatively affect embryos and furthermore,  
297 appear to counteract the detrimental effects produced by the *in vitro* culture conditions.

298 Putting this information in the context of embryo development, it seems clear that exposing early  
299 cleavage embryos to certain compounds and for long periods of time impairs the normal development and  
300 they fail to reach the blastocyst stage. This could apply for hormones and their metabolites, or  
301 antioxidants as the quercetin, which reduces the viability of embryos in different means as stated above.  
302 Nevertheless, the introduction of the same compounds in the morula to blastocyst transition for short  
303 periods of time can have a beneficial effect when embryos are cultured *in vitro*. Obviously, the possible  
304 implications of this situation on human embryology and the culture of human embryos must be  
305 manifested.

306 There are two conventional possibilities for *in vitro* human embryo culture for IVF techniques. One is  
307 sequential culture, which implies changing the culture medium in day 3 of development to a more

308 appropriate medium for extended culture; and the other is the unique or one step culture, in which the  
309 same culture medium is used along the entire embryo development (Tao *et al.*, 2021). Our results would  
310 be in favor of the first type of culture, because the needs and susceptibility of the embryos are very  
311 different in early steps from zygote to morula, compared to later on when the blastocyst forms. Our data  
312 could gain insights in the possible modification of the culture medium at the morula stage in order to  
313 achieve better results in IVF. This information could also help some labs that do not have access to low  
314 oxygen incubators because the addition of quercetin at the morula stage resembles the success that these  
315 systems provide in the IVF clinics.

316 Besides improving the development potential our results show that there is an increase in the total cell  
317 number when we use quercetin, data in concordance with other works that show also this raise after using  
318 quercetin (Sameni *et al.*, 2018, Yu *et al.*, 2014) . It is important to mention that the increase was not  
319 uncontrolled and the maximum number of total cells observed remained around 160. This observation is  
320 interesting because a higher number of cells do not relate with a higher implantation potential, and it can  
321 be indicative of bad quality (Wigger *et al.*, 2017).

322 Regarding apoptosis rates, several studies demonstrated that there was a reduction in the number of  
323 apoptotic cells in blastocysts when embryos were treated with quercetin after treatment with stressful  
324 substances or in aged mice (Sameni *et al.*, 2018, Yu *et al.*, 2014, Cao *et al.*, 2020). Our results show that  
325 indeed, culturing embryos obtained by *in vitro* fertilization with quercetin produced a reduction in the  
326 number of apoptotic cells per embryo, finding fewer embryos with apoptotic cells when they were  
327 cultured with 4 hours of quercetin. However, when embryos are obtained from the uterus at the morula  
328 stage and cultured with quercetin, a reduction in the number of embryos that had apoptotic cells is not  
329 observed, and many of the embryos present only a single apoptotic cell, matching results observed in the  
330 control. Again, these results showing effects of the quercetin in *in vitro* obtained embryos but not in  
331 embryos developed *in utero* up to the morula stage, suggest that quercetin does not affect the embryos per  
332 se, but it appears to counteract the negative effects that the components and conditions of the *in vitro*  
333 culture medium produce in the embryos fertilized *in vitro*. The effects produced by the quercetin could be  
334 attributed to its antioxidant properties (De Matos *et al.*, 2002, Kere *et al.*, 2013, Rocha-Frigoni *et al.*,  
335 2016).

336 Oxygen tension is known to influence embryo development and cell number in various species and one of  
337 its major negative consequences is the production of reactive oxygen species (ROS). On the other hand,  
338 oxygen levels have a significant influence on gene expression patterns that are mediated by the  
339 heterodimeric transcription factor HIF-1 $\alpha$  (Rocha-Frigoni *et al.*, 2016, Myhrstad *et al.*, 2002). Harvey  
340 (Mastroianni and Jones 1965, Khanduja *et al.*, 2001) suggested that HIF may be involved in the molecular  
341 mechanisms that respond to changes in oxygen status during embryo development in mouse and bovine  
342 blastocysts. Some studies showed that HIF-1 $\alpha$  can be activated by the flavonoid quercetin for the healing  
343 of ulcers (Hyunchu *et al.*, 2007) and produced an increase of HIF-1 $\alpha$  in processes related to inflammation  
344 and vascular diseases in human placental cells (Bogacz *et al.*, 2021). Our study demonstrated that the  
345 localization of HIF-1 $\alpha$  was predominantly in the cytoplasm of cells, which is consistent with the previous  
346 study by Thompson *et al.* 2004 in which HIF-1 $\alpha$  was detected in the cytoplasm of mouse blastocysts  
347 when cultured in low oxygen concentration (2%) during compaction and blastulation. Furthermore,  
348 embryos obtained by *in vitro* fertilization and cultured with quercetin for 4 hours had a higher expression  
349 of the HIF-1 $\alpha$  protein. This increase was similar to that observed in embryos obtained by IVF cultured  
350 with 3% O<sub>2</sub>, and in embryos obtained directly from the uterus. On the contrary, embryos cultured in  
351 conventional medium hardly express HIF-1 $\alpha$  protein. Putting these results together, we can determine that  
352 quercetin, when added to the culture medium of embryos for short periods of time, produces an increase  
353 in the expression of HIF-1 $\alpha$ , which could produce an increase in the activation of the genes necessary for  
354 reduction of ROS levels and repairing mechanisms.

355 In conclusion, this study illustrates how changing the experimental conditions can turn a molecule from  
356 being toxic for the embryos when left in the culture media for long periods of time, to being beneficial for  
357 them when the exposure time is reduced to a short period. The results provided here illustrate a potential  
358 strategy for obtaining better quality embryos and improving the success rates of assisted human  
359 reproductive technologies, especially for those who do not have access to incubators with low oxygen  
360 concentration.

#### 361 **Acknowledgments**

362 This study was financed by a grant from Junta de Extremadura: Ayuda de Grupos Catalogados de la Junta  
363 de Extremadura, GR18199, co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF). We  
364 would also like to thank the Biomedicine Applied Techniques Facility of the University of Extremadura

365 for allowing us to use the confocal microscope and the Cell Therapy laboratory of the Jesus Uson  
366 Minimally Invasive Surgery Centre for allowing us to use the fluorescence microscope.

367

368 **Author's roles**

369 NH carried out all the experiments; NH, ML-M and SS-M drafted the article; ML-M, SS-M, NH and ISA  
370 participated in the critical review; ISA and FMS-M approved the final version and provided financial  
371 support.

372 **Financial support**

373 This work was financed by a grant from the Project HIF-MCERA IRA116, co-financed by the European  
374 Regional Development Fund (ERDF), and Ayuda a Grupos Catalogados de la Junta de Extremadura,  
375 GR18199.

376 **Conflict of interest**

377 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that  
378 could have appeared to influence the work reported in this paper.

379 **Ethical standards**

380 The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the  
381 relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals.

382 **References**

- 383 Aherne SA and O'Brien NM. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against  
384 tert-butylhydroperoxide and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic*  
385 *Biol Med* 2000; **29**:507–514.
- 386 Bishop DW. Metabolic conditions within the oviduct of the rabbit. *Int J Fertil Steril* 1957 **2**:11–22.
- 387 Bogacz A, Mikołajczak PL, Wolek M, Górska A, Szulc M, Ozarowski M, Kujawski R, Czerny B, Wolski  
388 H, Karpiński T.M, *et al.* Combined Effects of Methyldopa and Flavonoids on the Expression of Selected  
389 Factors Related to Inflammatory Processes and Vascular Diseases in Human Placenta Cells—An In Vitro  
390 Study. *Molecules* 2021; **26**:1259.
- 391 Cao Y *et al.* Quercetin promotes in vitro maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell death &*  
392 *disease* 2020; **11(11)**:1-15.

- 393 Caramelo C, Peña J, Castilla A, Justo S, De Solis AJ, Neria F, Peñate S, Gonzalez-Pacheco FR. Response  
394 to hypoxia a systemic mechanism based on the control of gene expression. *Medicine* 2006; **66**:155-164.
- 395 Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant  
396 enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Reproducción*  
397 *humana molecular* 2003; **9(11)**: 639-643.
- 398 Carroll VA and Ashcroft M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  versus HIF-2 $\alpha$  in the regulation of  
399 HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von hippel-lindau  
400 function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* 2006; **66**:6264.
- 401 Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **26**:343-356.
- 402 Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J*  
403 *Pharmacol* 2008; **585**:325-337.
- 404 De Matos DG, Gasparini B, Pasqualini SR & Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation  
405 during *in vitro* maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content.  
406 *Theriogenology* 2002; **57(5)**:1443-1451.
- 407 Dong GZ, Kim CY, Cho WS, Shin YJ, Lee K. Cryoprotective role of the flavonoid quercetin in  
408 mammalian cells. *Korean J. Genetics* 2006; **28**:269-277.
- 409 Dunwoodie SL. The role of hypoxia in development of the mammalian embryo. *Dev Cell* 2009;  
410 **17(6)**:755-73.
- 411 Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. Protection against  
412 oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating  
413 activity. *FEBS Lett* 1997; **416**:123-129.
- 414 Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and  
415 rabbits. *J Reprod Fertil* 1993; **99(2)**:673-9.
- 416 Guerin P, El Moutassim S & Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species  
417 in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update* 2001; **7(2)**:175-189.
- 418 Hashemzaei M *et al.* Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin *in vitro* and *in vivo*. *Oncol*  
419 *Rep* 2017; **38**: 819-828.
- 420 Heijnen CG, Haenen GR, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid  
421 peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res* 2002; **36**:575-581.

- 422 Hernández N, López-Morató M, Perianes MJ, Sánchez-Mateo S, Cassa-Rua V, Domínguez-Arroyo JA,  
423 Sánchez-Margallo FM, and Álvarez IS. 4-Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal  
424 growth factor-binding capability *in vitro* and implantation rates. *Molecular human reproduction* 2020;  
425 1:17.
- 426 Hu J, Chen L, Lei F, Tian Y, Xing D-M, Chai Y-S, Zhao S, Ding Y & Du LJ. Investigation of quercetin  
427 stability in cell culture medium: Role in *in vitro* experiment. *African Journal of Pharmacy and*  
428 *Pharmacology* 2012; 6(14):1069-1076.
- 429 Hyunchu J, Heejung K, Daekyu C, Duksoo K, Shi-Young Pa, Yung-Jin K, Young M K and Yunjin J.  
430 Quercetin Activates an Angiogenic Pathway, Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1-Vascular Endothelial  
431 Growth Factor, by Inhibiting HIF-Prolyl Hydroxylase: a Structural Analysis of Quercetin for Inhibiting  
432 HIF-Prolyl Hydroxylase. *Molecular Pharmacology* 2007; 71(6):1676-1684.
- 433 Kang JT *et al.* Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on *in vitro* maturation of porcine  
434 oocytes. *Asian-Australas J Anim Sci* 2016; 29:352-358.
- 435 Karampour NS, Arzi A, Varzi HN, Mohammadian B & Rezaei M. Quercetin preventive effects on  
436 theophylline-induced anomalies in rat embryo. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*  
437 2014; 9(3).
- 438 Kere M, Siriboon C, Lo NW, Nguyen NT, & Ju JC. Ascorbic acid improves the developmental  
439 competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation.  
440 *Journal of Reproduction and Development* 2013; 59(1):78–84.
- 441 Khanduja KI, Verma A, Bhardwaj A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is  
442 independent of lipid peroxidation. *Andrologia* 2001; 33:277-81.
- 443 Lee SK *et al.* Protective role of quercetin against cisplatin-induced hair cell damage in zebrafish embryos.  
444 *Hum Exp Toxicol* 2015; 34:1043-1052.
- 445 Lubarda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology* 2005; 5(1):5–17.
- 446 Ma Y-Y, Chen H-W and Tzeng C-R. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential  
447 and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured *in*  
448 *vitro*. *Journal of Ovarian Research* 2017; 10:47.
- 449 Machiko T, Yoichi K, Shozo T. *In vitro* transformation of hamster embryo cells by quercetin. *Toxicology*  
450 *Letters* 1977; 1:175-178.

- 451 Mantikou E, Bontekoe S, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen  
452 concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod Update* 2013;  
453 **19(3)**:209.
- 454 Martín-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Antonio Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Álvarez  
455 IS. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reproductive*  
456 *BioMedicine Online* 2008; **14(5)**: 652-661.
- 457 Mastroianni Jr L, Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil* 1965; **9**:99–  
458 102.
- 459 Micek J, Jurikova T, Skrovankova S & Sochor J. Quercetin and its anti-allergic immune response.  
460 *Molecules* 2016; **21(5)**: 623.
- 461 Min-Hee Kang, Joydeep Das, Jin-Hoi Kim *et al.* The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse  
462 preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics* 2017; **7(19)**: 4735–4752.
- 463 Mishra A, Reddy I, Gupta P & Mondal S. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration  
464 in transcript level of antioxidant menzymes in sheep embryos produced *in vitro*. *Reproduction in*  
465 *Domestic Animals* 2016; **51(2)**:311–321.
- 466 Morin SJ. Oxygen tension in embryo culture: does a shift to 2% O<sub>2</sub> in extended culture represent the most  
467 physiologic system? *J Assist Reprod Genet* 2017; **34**:309–314.
- 468 Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO. Flavonoids increase the intracellular  
469 glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit  
470 promoter. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**:386–393.
- 471 Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem*  
472 1999; **63**:1787–1790.
- 473 Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawakishi S. Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by  
474 flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998; **45**:265-7.
- 475 Patenot G, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Early embryo development in a sequential versus  
476 single medium: a randomized study. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; **8**:83.
- 477 Pérez-Pastén R, Martínez-Galero E, Chamorro-Cevallos G. Quercetin and naringenin reduce abnormal  
478 development of mouse embryos produced by hydroxyurea. *J Pharm Pharmacol* 2010; **62**:1003-1009.
- 479 Pringle KG, Kind KL, Sferuzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT. Beyond oxygen: complex  
480 regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum Reprod Updat* 2010; **16**:415.

- 481 Rocha-Frigoni NA, Leão BC, Dall'Acqua PC, & Mingoti GZ. Improving the cytoplasmic maturation of  
482 bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with  
483 increased rates of embryo development. *Theriogenology* 2016; **86(8)**:1897–1905.
- 484 Sameni H, Javadinia S, Safari M, TaAmjad MH, Khanmohammadi N, Parsaie H, ZARBAKHSH S. Effect of  
485 quercetin on the number of blastomeres, zona pellucida thickness, and hatching rate of mouse embryos  
486 exposed to actinomycin D: An experimental study. *Int J Reprod BioMed* 2018; **16**:101-108.
- 487 Sepulveda S *et al.* In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a  
488 single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril* 2009; **91**:1765–1770.
- 489 Sills ES, Palermo GD. Human blastocyst culture in IVF: current laboratory applications in reproductive  
490 medicine practice. *Rom J Morphol Embryol* 2010; **51**:441–445.
- 491 Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guevara S, Barros FDA, Lopes FG, Leal CLV. Effects of  
492 supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on  
493 subsequent embryo production. *Reprod Dom Anim* 2017; **1**–9.
- 494 Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM. Human blastocysts grown in culture. *Nature* 1971; **29(5280)** 132–3.
- 495 Tao P, Zhou W, Yan X, Wu R, Cheng L, Ye Y, Wang Z, Li Y. Effect of sequential versus single-step  
496 culture medium on IVF treatments, including embryo and clinical outcomes: a prospective randomized  
497 study. *Arch Gynecol Obstet* 2021; **1**-9.
- 498 Thompson J, Feil D, Edwards L, Lane Michelle, Karen K. Mouse fetal development is perturbed by  
499 culture in low oxygen concentration that increases expression of oxygen-sensitive genes via hypoxia  
500 inducible factors: A non-epigenetic embryonic programming phenomenon? The Society for the Study of  
501 Reproduction 2004; **547**.
- 502 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS  
503 heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92(12)**:5510–4.
- 504 Webster WS, Abela D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007;  
505 **81(3)**:215–28.
- 506 Whitten WK. The effect of oxygen on cleavage of mouse eggs. In: Abstracts of 2nd Annual Meeting,  
507 *Society for the Study of Reproduction, Davis, California* 1969; **29**.
- 508 Wigger M, Kisielewska K, Filimonow K, Plusa B, Maleszewski M & Suwińska A. Plasticity of the inner  
509 cell mass in mouse blastocyst is restricted by the activity of FGF/MAPK pathway. *PLoS One* 2017;  
510 **7(1)**:1-13.

- 511 Yoon J, Juhn KM, Ko JK, Yoon SH, Ko Y, Lee CY, *et al.* Effects of oxygen tension and IGF-I on HIF-1 $\alpha$   
512 protein expression in mouse blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 2013; **30(1)**:99–105.
- 513 Yu S, Long H, Lyu QF, Zhang QH, Yan ZG, Liang HX, Qi C. Protective effect of quercetin on the  
514 development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury.  
515 *PLoS One* 2014; **9(2)**:e89520.
- 516
- 517

For Peer Review

518 **Table 1: Development by fertilization *in vitro* of zygotes or embryos at different stages in the presence of quercetin, up to the blastocyst stage.** Differences between the  
519 groups were calculated using the  $\chi^2$ -test. Quer: quercetin. \*\*\*p<0.001 vs the control group.

Groups	% of zygotes/embryos that reach the blastocyst stage							
	Zygote stage	Blastocyst	Two-cell stage	Blastocyst	Six-eight cell stage	Blastocyst	Morula stage	Blastocyst
Control	102	42 (41,18%)	97	40 (41,23%)	156	85 (54,49%)	131	82 (62,59%)
Quer1 $\mu$ M	100	2 (2%)***	98	12 (12,24%)***	135	12 (8,88%)***	127	25 (19,68%)***
Quer5 $\mu$ M	96	2 (2,08%)***	97	2 (2,06%)***	118	8 (6,78%)***	125	20(16%)***
Quer10 $\mu$ M	101	2 (1,98%)***	97	2 (2,06%)***	123	11 (8,94%)***	117	28 (23,93%)***
Quer 50 $\mu$ M	103	9 (8,74%)***	97	1 (1,03%)***	120	7 (5,83%)***	116	24 (20,69%)***

520

521

522

523

524

525

526

527 **Table 2: Number of apoptotic cells in embryos obtained *in utero* from female mice and treated with quercetin or DMSO.** Differences between the groups were  
528 calculated using the  $\chi^2$ -test. Quer: quercetin.

529

Groups	N° embryos	TUNEL-positive nuclei (%)			
		0 apoptotic cells	1 apoptotic cell	2 apoptotic cells	> 3 apoptotic cells
IU DMSO 2h	25	20(80%)	3(12%)	2(8%)	0(0%)
IU DMSO 4h	25	22(88%)	1(4%)	2(8%)	0(0%)
IU Quer 2h	25	22(88%)	3(12%)	0(0%)	0(0%)
IU Quer 4h	25	24(96%)	1(4%)	0(0%)	0(0%)
IU O <sub>2</sub> 3%	25	23(92%)	2(8%)	0(0%)	0(0%)

530

531

532

533

534

535

536

537

538 **Table 3: Number of apoptotic cells in embryos obtained by *in vitro* fertilization and treated with quercetin or DMSO. Differences between the groups were calculated**  
 539 **using the  $\chi^2$ -test. Quer: quercetin. \* $p < 0.05$ , IVF Quer 4h vs IVF O<sub>2</sub>.**

540

541

TUNEL-positive nuclei (%)					
Groups	N° embryos	0 apoptotic cells	1 apoptotic cell	2 apoptotic cells	> 3 apoptotic cells
IVF DMSO 2h	25	15(60%)	6(24%)	2(8%)	2(8%)
IVF DMSO 4h	21	19(90,47%)	1(4,76%)	1(4,76%)	0(0%)
IVF Quer 2h	25	20(80%)	4(16%)	0 (0%)	1(4%)
IVF Quer 4h	23	22(95,26%)	1(4,35%)	0(0%)	0(0%)
IVF O <sub>2</sub> 3%	25	19(76%)*	4(16%)	1(4%)	1(4%)
IU KSOM	25	21(84%)	3(12%)	0(0%)	1(4%)

542 **Figure and Table legends**

543 **Figure 1: Diagram of the workflow of the treatment of the embryos with quercetin.** A. Treatment of  
544 the embryos during long periods of time. The top of the image shows how the embryos were obtained by  
545 *in vitro* fertilization and then cultured up to different stages of development. Embryos at different days of  
546 development were treated up to blastocyst stage with different concentrations of quercetin, and then the  
547 development potential was studied (bottom part). B. Treatment of the embryos for short periods of time.  
548 The top of the image shows the obtention of the embryos for the experiments, by *in vitro* fertilization (left  
549 side) or by extraction from the uterus at the morula stage (right side). The bottom of the image explains  
550 how the embryos were treated with quercetin, or DMSO for the control, and what parameters were then  
551 analysed.

552

553 **Figure 2: Results of the effect of quercetin culture during 2 hours or 4 hours in the pre-**  
554 **implantation development of embryos obtained *in utero* at the morula stage.** IU KSOM group:  
555 embryos obtained from the uterus at the morula stage and developed to blastocyst in conventional culture  
556 medium, n = 26. IU DMSO 2h group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and cultured  
557 with DMSO for 2 hours, n = 24. IU DMSO 4h group: embryos obtained from the uterus at the morula  
558 stage and cultured with DMSO for 4 hours, n = 24. IU Quer 2h group: embryos obtained from the uterus  
559 at the morula stage and cultured with quercetin for 2 hours, n = 18. IU Quer 4h group: embryos obtained  
560 from the uterus at the morula stage and cultured with quercetin for 4 hours, n = 24. IU O<sub>2</sub> 3% group:  
561 embryos obtained from the uterus at the morula stage and cultured in low oxygen concentrations until  
562 blastocyst stage, n = 15. The data are represented as the mean  $\pm$  the SD. p > 0.05 for all statistical  
563 analyses. Mann – Whitney – Wilcoxon test.

564

565 **Figure 3: Results of the effect of quercetin culture during 2 hours or 4 hours in the pre-**  
566 **implantation development of embryos obtained by *in vitro* fertilization and compared to *in utero***  
567 **obtained embryos.** IVF KSOM group: embryos obtained by IVF and developed to the blastocyst stage in  
568 conventional culture medium, n = 18. IVF DMSO 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with  
569 DMSO for 2 hours at the morula stage, n = 20. IVF DMSO 4h group: embryos obtained by IVF and  
570 cultured with DMSO for 4 hours at the morula stage, n = 16. IVF Quer 2h group: embryos obtained by  
571 IVF and cultured with quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 16. IVF Quer 4h group: embryos

572 obtained by IVF and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 20. IVF O<sub>2</sub> 3% group:  
 573 embryos obtained by IVF and cultured with low concentrations of oxygen from morula to blastocyst  
 574 stage, n = 16. IU KSOM group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and developed to  
 575 blastocyst in conventional culture medium, n = 26. The data are represented as the mean  $\pm$  the SD. a, p  
 576 <0.01 vs IVF DMSO 2h group; b, p <0.005 vs IVF DMSO 4h group; and c, p <0.001 vs IU KSOM  
 577 group. Mann – Whitney – Wilcoxon test.  
 578

579 **Figure 4: Results of the total cell number in blastocysts obtained *in utero* at the morula stage.** IU  
 580 DMSO 2h group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with DMSO for 2 hours at the  
 581 morula stage, n = 30. IU DMSO 4h group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with  
 582 DMSO for 4 hours at the morula stage, n = 27. IU Quer 2h group: embryos obtained directly from the  
 583 uterus and cultured with quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 24. IU Quer 4h group: embryos  
 584 obtained directly from the uterus and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 30. IU  
 585 O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with low concentrations of oxygen  
 586 from morula to blastocyst stage, n = 24. (A) Representative images of the total cell number, taken with a  
 587 confocal microscope Nikon Eclipse TE2000-U, of embryos from each group. (B) Total cell number  
 588 analysis. The data are represented as the mean  $\pm$  the SD. a, p <0.001 IU DMSO 2h vs IU Quer 2h; b,  
 589 p<0.001 IU DMSO 4h vs IU Quer 4h. Mann – Whitney – Wilcoxon test.  
 590

591 **Figure 5: Results of the number of total cells in blastocysts obtained by *in vitro* fertilization.** IVF  
 592 DMSO 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 2 hours at the morula stage, n =  
 593 33. IVF DMSO 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 4 hours at the morula  
 594 stage, n = 27. IVF Quer 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 2 hours at the  
 595 morula stage, n = 35. IVF Quer 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 4  
 596 hours at the morula stage, n = 29. IVF O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained by IVF and cultured in low  
 597 concentrations of oxygen from morula to blastocyst stage, n = 29. (A) Representative images of the total  
 598 cell number, taken with a confocal microscope Nikon Eclipse TE2000-U, of embryos from each group.  
 599 (B) Total cell number analysis. The data are represented as the mean  $\pm$  the SD. a, p <0.001 IVF DMSO  
 600 2h vs IVF Quer 2h; b, p<0.001 IVF DMSO 4h vs IVF Quer group 4h, Anova, post-hoc Tukey.  
 601

602 **Figure 6: Representative images illustrating the incidence of cell death in mouse embryos obtained**  
603 ***in utero*.** Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Fragmented DNA was labeled using TUNEL  
604 assay (green). Merged images represent the proportion of positive TUNEL cells (apoptotic, middle row)  
605 with respect to the embryo total cell count (bottom row). IU DMSO 2h group: embryos obtained *in utero*  
606 at the morula stage and cultured with DMSO for 2 hours and grown to blastocyst stage in conventional  
607 culture medium, n = 25. IU DMSO 4h group: embryos obtained *in utero* at the morula stage and cultured  
608 with DMSO for 4 hours and grown to blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU Quer  
609 2h group: embryos obtained *in utero* at the morula stage and cultured with quercetin for 2 hours and  
610 developed to blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU Quer 4h group: embryos  
611 obtained *in utero* at the morula stage and cultured with quercetin for 4 hours and developed to blastocyst  
612 stage in conventional culture medium, n = 25. IU O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained *in utero* and cultured in  
613 low oxygen concentration from morula to blastocyst stage, n = 25. Ctrl: positive control, which consisted  
614 of *in utero* obtained embryos treated with DNase to induce apoptosis before incubation with TUNEL  
615 reagents. Scale bar: 50µm.

616

617 **Figure 7: Representative images illustrating the incidence of cell death in mouse embryos obtained**  
618 **by *in vitro* fertilization.** Nuclei were stained with Hoechst 33342. Fragmented DNA was labeled using  
619 TUNEL assay (green). Merged images represent the proportion of positive TUNEL cells (apoptotic,  
620 middle row) with respect to the embryo total cell count (bottom row). IVF DMSO 2h group: embryos  
621 obtained by *in vitro* fertilization and cultured with DMSO for 2 hours at the morula stage, n = 25. IVF  
622 DMSO 4h group: embryos obtained by *in vitro* fertilization and cultured with DMSO for 4 hours at the  
623 morula stage, n = 21. IVF Quer 2h group: embryos obtained by *in vitro* fertilization and cultured with  
624 quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 25. IVF Quer 4h group: embryos obtained by *in vitro*  
625 fertilization and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 23. IVF O<sub>2</sub> 3% group:  
626 embryos obtained by *in vitro* fertilization and cultured in low oxygen concentration from morula to  
627 blastocyst stage, n = 25. IU KSOM group: embryos obtained *in utero* at the morula stage and developed  
628 to blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. Ctrl: positive control, which consisted of *in*  
629 *vitro* obtained embryos treated with DNase to induce apoptosis before incubation with TUNEL reagents.  
630 Scale bar: 50µm.

631

632 **Figure 8: Immunofluorescence analysis of HIF-1 $\alpha$  protein expression in mouse embryos obtained *in***  
633 ***utero*.** Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). The expression of HIF-1 $\alpha$  was marked using FITC  
634 (green). IU DMSO 2h group: embryos developed *in utero* up to the morula stage and cultured with  
635 DMSO for 2 hours and cultured until blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU DMSO  
636 4h group: embryos developed *in utero* up to the morula stage and cultured with DMSO for 4 hours, then  
637 cultured until blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU Quer 2h group: embryos  
638 developed *in utero* up to the morula stage and cultured with quercetin for 2 hours, then developed until  
639 blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU Quer 4h group: embryos developed *in utero*  
640 up to the morula stage and cultured with quercetin for 4 hours, then developed to blastocyst stage in  
641 conventional culture medium, n = 25. IU O<sub>2</sub> 3% group: embryos developed *in utero* up to the morula  
642 stage and cultured in low oxygen concentration to blastocyst, n = 25. Ctrl: negative control, which  
643 consisted of embryos developed *in utero* from which the primary antibody was omitted. Scale bar: 50  $\mu$ m.  
644

645 **Figure 9: Immunofluorescence analysis of HIF-1 $\alpha$  protein expression in mouse embryos obtained *in***  
646 ***vitro*.** Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). The expression of HIF-1 $\alpha$  was marked using FITC  
647 (green). IVF DMSO 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 2 hours at the  
648 morula stage, n = 25. IVF DMSO 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 4  
649 hours at the morula stage, n = 21. IVF Quer 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with  
650 quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 25. IVF Quer 4h group: embryos obtained by IVF and  
651 cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 23. IVF O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained by  
652 IVF and cultured in low oxygen concentration from morula to blastocyst stage, n = 25. IU KSOM group:  
653 embryos obtained *in utero* at the morula stage and developed to blastocyst stage in conventional culture  
654 medium, n = 25. Ctrl: negative control, which consisted of embryos obtained by IVF from which the  
655 primary antibody was omitted. Scale bar: 50  $\mu$ m.  
656

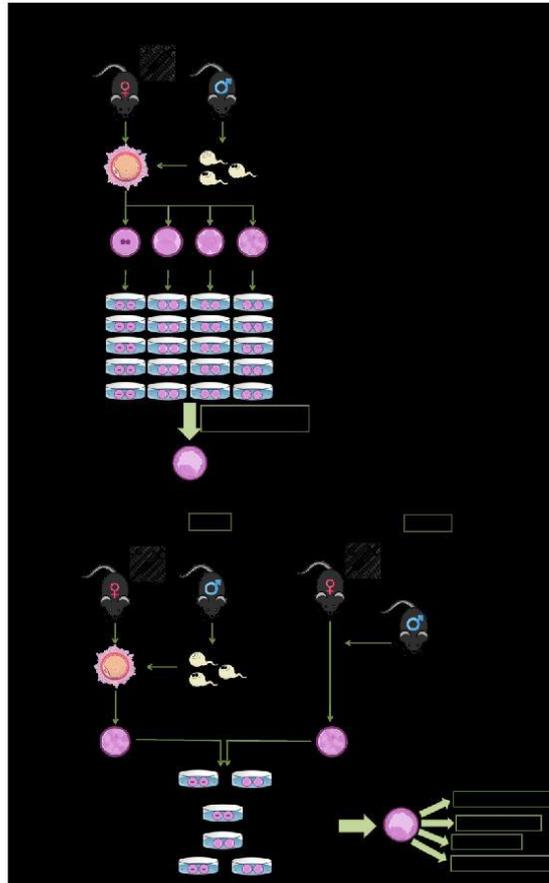


Figure 1: Diagram of the workflow of the treatment of the embryos with quercetin. A. Treatment of the embryos during long periods of time. The top of the image shows how the embryos were obtained by in vitro fertilization and then cultured up to different stages of development. Embryos at different days of development were treated up to blastocyst stage with different concentrations of quercetin, and then the development potential was studied (bottom part). B. Treatment of the embryos for short periods of time. The top of the image shows the obtention of the embryos for the experiments, by in vitro fertilization (left side) or by extraction from the uterus at the morula stage (right side). The bottom of the image explains how the embryos were treated with quercetin, or DMSO for the control, and what parameters were then analysed.

854x1379mm (59 x 59 DPI)

Figure 2

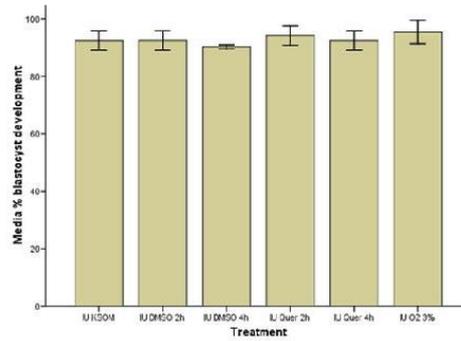


Figure 2: Results of the effect of quercetin culture during 2 hours or 4 hours in the pre-implantation development of embryos obtained in utero at the morula stage. IU KSOM group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and developed to blastocyst in conventional culture medium,  $n = 26$ . IU DMSO 2h group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and cultured with DMSO for 2 hours,  $n = 24$ . IU DMSO 4h group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and cultured with DMSO for 4 hours,  $n = 24$ . IU Quer 2h group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and cultured with quercetin for 2 hours,  $n = 18$ . IU Quer 4h group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and cultured with quercetin for 4 hours,  $n = 24$ . IU O2 3% group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and cultured in low oxygen concentrations until blastocyst stage,  $n = 15$ . The data are represented as the mean + the SD.  $p > 0.05$  for all statistical analyses. Mann – Whitney – Wilcoxon test.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 3

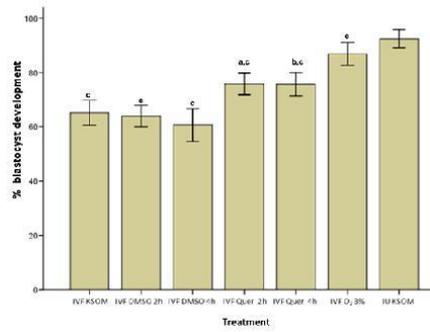


Figure 3: Results of the effect of quercetin culture during 2 hours or 4 hours in the pre-implantation development of embryos obtained by in vitro fertilization and compared to in utero obtained embryos. IVF KSOM group: embryos obtained by IVF and developed to the blastocyst stage in conventional culture medium, n = 18. IVF DMSO 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 2 hours at the morula stage, n = 20. IVF DMSO 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 4 hours at the morula stage, n = 16. IVF Quer 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 16. IVF Quer 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 20. IVF O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained by IVF and cultured with low concentrations of oxygen from morula to blastocyst stage, n = 16. IU KSOM group: embryos obtained from the uterus at the morula stage and developed to blastocyst in conventional culture medium, n = 26. The data are represented as the mean + the SD. a, p <0.01 vs IVF DMSO 2h group; b, p <0.005 vs IVF DMSO 4h group; and c, p <0.001 vs IU KSOM group. Mann – Whitney – Wilcoxon test.

2.54x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 4

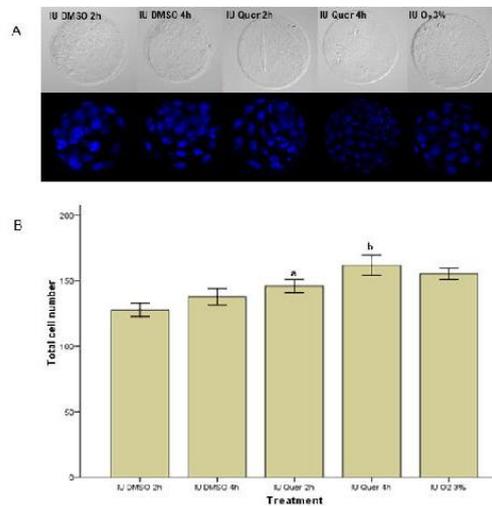


Figure 4: Results of the total cell number in blastocysts obtained in utero at the morula stage. IU DMSO 2h group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with DMSO for 2 hours at the morula stage, n = 30. IU DMSO 4h group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with DMSO for 4 hours at the morula stage, n = 27. IU Quer 2h group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 24. IU Quer 4h group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 30. IU O2 3% group: embryos obtained directly from the uterus and cultured with low concentrations of oxygen from morula to blastocyst stage, n = 24. (A) Representative images of the total cell number, taken with a confocal microscope Nikon Eclipse TE2000-U, of embryos from each group. (B) Total cell number analysis. The data are represented as the mean + the SD. a,  $p < 0.001$  IU DMSO 2h vs IU Quer 2h; b,  $p < 0.001$  IU DMSO 4h vs IU Quer 4h. Mann – Whitney – Wilcoxon test.

254x190mm (96 x 96 DPI)

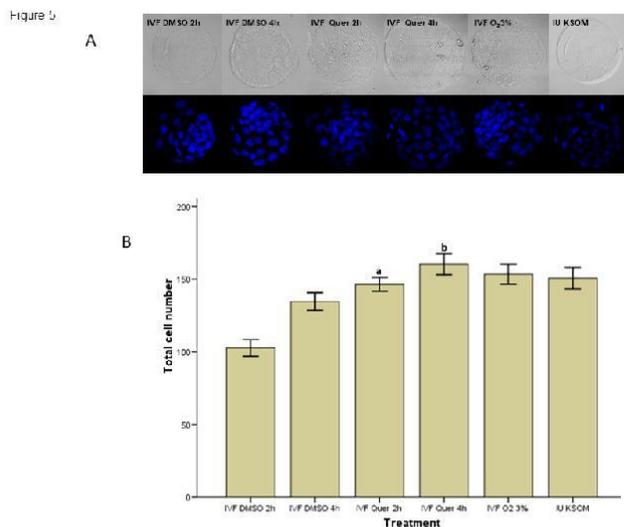


Figure 5: Results of the number of total cells in blastocysts obtained by in vitro fertilization. IVF DMSO 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 2 hours at the morula stage, n = 33. IVF DMSO 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 4 hours at the morula stage, n = 27. IVF Quer 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 35. IVF Quer 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 29. IVF O2 3% group: embryos obtained by IVF and cultured in low concentrations of oxygen from morula to blastocyst stage, n = 29. (A) Representative images of the total cell number, taken with a confocal microscope Nikon Eclipse TE2000-U, of embryos from each group. (B) Total cell number analysis. The data are represented as the mean + the SD. a,  $p < 0.001$  IVF DMSO 2h vs IVF Quer 2h; b,  $p < 0.001$  IVF DMSO 4h vs IVF Quer group 4h, Anova, post-hoc Tukey.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 6

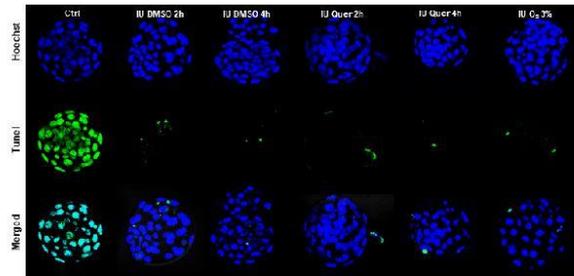


Figure 6: Representative images illustrating the incidence of cell death in mouse embryos obtained in utero. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Fragmented DNA was labeled using TUNEL assay (green). Merged images represent the proportion of positive TUNEL cells (apoptotic, middle row) with respect to the embryo total cell count (bottom row). IU DMSO 2h group: embryos obtained in utero at the morula stage and cultured with DMSO for 2 hours and grown to blastocyst stage in conventional culture medium,  $n = 25$ . IU DMSO 4h group: embryos obtained in utero at the morula stage and cultured with DMSO for 4 hours and grown to blastocyst stage in conventional culture medium,  $n = 25$ . IU Quer 2h group: embryos obtained in utero at the morula stage and cultured with quercetin for 2 hours and developed to blastocyst stage in conventional culture medium,  $n = 25$ . IU Quer 4h group: embryos obtained in utero at the morula stage and cultured with quercetin for 4 hours and developed to blastocyst stage in conventional culture medium,  $n = 25$ . IU O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained in utero and cultured in low oxygen concentration from morula to blastocyst stage,  $n = 25$ . Ctrl: positive control, which consisted of in utero obtained embryos treated with DNase to induce apoptosis before incubation with TUNEL reagents. Scale bar: 50 $\mu$ m.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 7

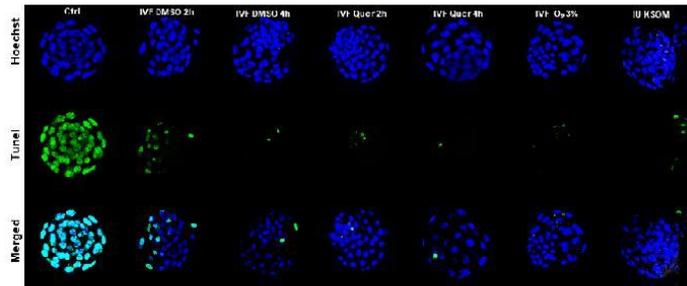


Figure 7: Representative images illustrating the incidence of cell death in mouse embryos obtained by in vitro fertilization. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Fragmented DNA was labeled using TUNEL assay (green). Merged images represent the proportion of positive TUNEL cells (apoptotic, middle row) with respect to the embryo total cell count (bottom row). IVF DMSO 2h group: embryos obtained by in vitro fertilization and cultured with DMSO for 2 hours at the morula stage,  $n = 25$ . IVF DMSO 4h group: embryos obtained by in vitro fertilization and cultured with DMSO for 4 hours at the morula stage,  $n = 21$ . IVF Quer 2h group: embryos obtained by in vitro fertilization and cultured with quercetin for 2 hours at the morula stage,  $n = 25$ . IVF Quer 4h group: embryos obtained by in vitro fertilization and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage,  $n = 23$ . IVF O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained by in vitro fertilization and cultured in low oxygen concentration from morula to blastocyst stage,  $n = 25$ . IU KSOM group: embryos obtained in utero at the morula stage and developed to blastocyst stage in conventional culture medium,  $n = 25$ . Ctrl: positive control, which consisted of in vitro obtained embryos treated with DNase to induce apoptosis before incubation with TUNEL reagents. Scale bar: 50 $\mu$ m.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 8

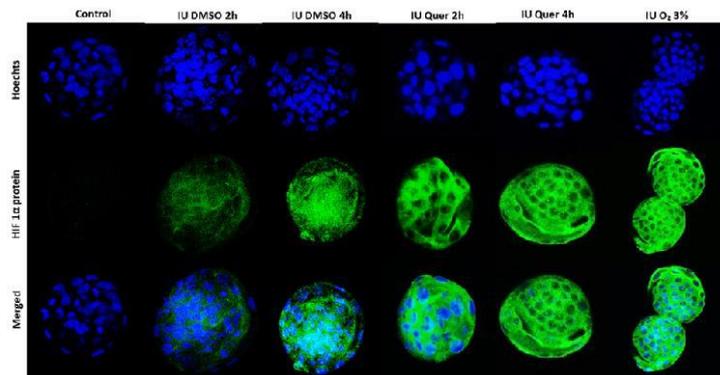


Figure 8: Immunofluorescence analysis of HIF-1 $\alpha$  protein expression in mouse embryos obtained in utero. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). The expression of HIF-1 $\alpha$  was marked using FITC (green). IU DMSO 2h group: embryos developed in utero up to the morula stage and cultured with DMSO for 2 hours and cultured until blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU DMSO 4h group: embryos developed in utero up to the morula stage and cultured with DMSO for 4 hours, then cultured until blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU Quer 2h group: embryos developed in utero up to the morula stage and cultured with quercetin for 2 hours, then developed until blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU Quer 4h group: embryos developed in utero up to the morula stage and cultured with quercetin for 4 hours, then developed to blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. IU O<sub>2</sub> 3% group: embryos developed in utero up to the morula stage and cultured in low oxygen concentration to blastocyst, n = 25. Ctrl: negative control, which consisted of embryos developed in utero from which the primary antibody was omitted. Scale bar: 50  $\mu$ m.

254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 9

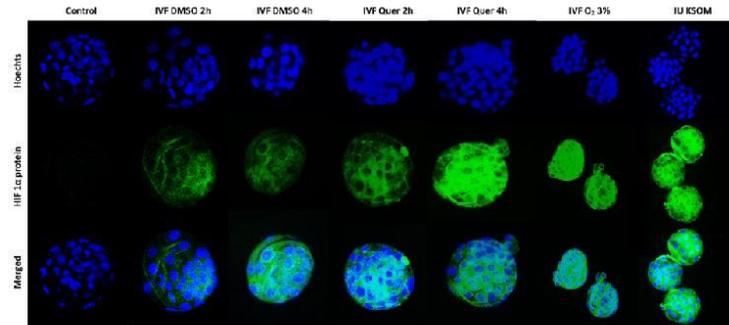


Figure 9: Immunofluorescence analysis of HIF-1 $\alpha$  protein expression in mouse embryos obtained in vitro. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). The expression of HIF-1 $\alpha$  was marked using FITC (green). IVF DMSO 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 2 hours at the morula stage, n = 25. IVF DMSO 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with DMSO for 4 hours at the morula stage, n = 21. IVF Quer 2h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 2 hours at the morula stage, n = 25. IVF Quer 4h group: embryos obtained by IVF and cultured with quercetin for 4 hours at the morula stage, n = 23. IVF O<sub>2</sub> 3% group: embryos obtained by IVF and cultured in low oxygen concentration from morula to blastocyst stage, n = 25. IU KSOM group: embryos obtained in utero at the morula stage and developed to blastocyst stage in conventional culture medium, n = 25. Ctrl: negative control, which consisted of embryos obtained by IVF from which the primary antibody was omitted. Scale bar: 50  $\mu$ m.

254x190mm (96 x 96 DPI)





**Effect of the addition of 4OHE2 and quercetin in culture media on ROS levels and gene expression in mouse blastocysts**

Journal:	<i>Reproduction, Fertility and Development</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hernández, Nuria; Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Cryopreservation facility; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Assisted reproduction Sánchez-Mateos, Soledad; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Assisted Reproduction López-Morató, Marta; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Assisted Reproduction Sánchez-Margallo, Francisco; Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón Álvarez, Ignacio; University of Extremadura Faculty of Sciences, Cell biology
Keyword:	assisted reproductive technology, blastocyst, cell culture, culture medium, development, embryology, fertilisation, gene expression, in vitro fertilisation, morula

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>

1 **Effect of the addition of 4OHE<sub>2</sub> and quercetin in culture media on ROS levels and**  
2 **gene expression in mouse blastocysts.**

3

4 Nuria Hernández-Rollán<sup>1,2,\*</sup>, Soledad Sánchez-Mateos<sup>1</sup>, Marta López-Morató<sup>1,3</sup>,  
5 Francisco M. Sánchez-Margallo<sup>1</sup>, Ignacio S. Álvarez<sup>4,5,\*</sup>.

6

7 1. Assisted Reproduction Unit, Jesús Usón Minimally Invasive Surgery Centre,  
8 Cáceres, Spain.

9 2. Criopreservation facility, biomedicine institute, Seville, Spain.

10 3. Genetics unit, Hospital HLA Vistahermosa, Alicante, Spain

11 4. Department of Cell Biology, University of Extremadura, Badajoz, Spain

12 5. Instituto Extremeño de Reproduccion Asistida (IERA), Badajoz, Spain.

13

14 \*Corresponding author: Nuria Hernandez Rollán. Cryopreservation service. Institute of  
15 Biomedicine. C/ Antonio Maura Montaner, 41013 Seville. Spain. Email: nhernandez-  
16 ibis@us.es ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6812-1189>

17

18 \*Corresponding author: Ignacio Santiago Álvarez ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2352-7895>

19

20 Soledad Sánchez-Mateos ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7545-1485>

21 Marta López-Morató ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2194-7258>

22 Francisco Miguel Sánchez-Margallo ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2138-988X>

23 **Contribution of authors**

24 NH carried out all the experiments; NH, ML-M and SS-M drafted the article; ML-M,  
25 SS-M, NH and ISA participated in the critical review; ISA and FMS-M approved the  
26 final version and provided financial support.

27

28

29

30 **Abstract**

31 Aims: The main objective of this work was to elucidate whether Quercetin (Qc) and 4-  
32 Hidroxistradiol (4OHE<sub>2</sub>) decrease the level of reactive oxygen species (ROS) in *in vitro*  
33 obtained embryos and to analyze which genes are activated under the treatments that  
34 could explain this improvement. Methods: Oxidative stress was induced during embryo  
35 culture by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and ROS production was measured and compared with  
36 embryos treated with Qc or 4OHE<sub>2</sub>. Gene expression was analyzed by Q-PCR in control  
37 embryos obtained *in utero* (IU) or by IVF and compared with the levels found in  
38 embryos cultured with Qc or 4OHE<sub>2</sub> to determine the effect of these compounds. Key  
39 results: Qc strongly reduces ROS levels in embryos after a treatment of 4 hours. On the  
40 contrary, 4OHE<sub>2</sub> had no effect in reducing ROS levels in embryos. On the other hand,  
41 the addition of these molecules to the culture media upregulate several hypoxia-related  
42 genes, when Qc is added to the culture media, and implantation-related genes, when  
43 4OHE<sub>2</sub> is used. Conclusions: Qc is a very strong antioxidant molecule that when used  
44 for short periods of time during culture can reduce ROS levels and improve embryo  
45 quality by activating antioxidant enzymes. 4OHE<sub>2</sub> supplementation, despite having no  
46 effects in reducing ROS levels, acts directly in the molecular signaling implicated in the  
47 implantation process and could be also considered as a supplement for embryo culture  
48 during IVF. Implications: Proper supplementation of the culture media could greatly  
49 improve the quality of embryos cultured *in vitro*, resulting in better results in the IVF  
50 clinics.

51

52 **Keywords**: 4-Hidroxistradiol, quercetin, oxidative stress, hypoxia, ROS, blastocysts,  
53 mouse, implantation, embryo development.

54

55

56

57

58

59

60

61

**62 Introduction**

63 Medical treatment of sterility includes different assisted reproductive techniques (ART)  
64 in which embryos are cultured *in vitro* and ultimately transferred to the uterus (Kirby,  
65 2018). There are many factors that can affect the correct development of  
66 preimplantation mammalian embryos when cultured *in vitro*. One of these factors,  
67 highly relevant, is the production of reactive oxygen species (ROS) (Li *et al.*, 2014).  
68 ROS species usually occur during embryo collection, handling and culture as these  
69 processes performed in a clinical laboratory cannot entirely recreate the conditions in  
70 which natural fertilization takes place (Rakhit *et al.*, 2013; Truong and Gardner, 2017).

71 In the reproductive tract, embryo development takes place at low oxygen concentrations  
72 of approximately 2 to 8% (Truong *et al.*, 2016). For this reason, *in vitro* embryo culture  
73 is, when possible, carried out at 5% oxygen to more closely resemble the physiological  
74 conditions (Wale and Gardner 2016). Also, in the natural environment, there is an  
75 antioxidant system that protects embryos from oxidative damage (Agarwal *et al.*, 2012),  
76 which is regulated by several antioxidant enzymes, including superoxide dismutase  
77 (SOD), peroxyredoxin (PRDX), and glutathione (GSH) (Rizzo *et al.*, 2012).  
78 Nonetheless, this endogenous antioxidant system is not available or is insufficiently  
79 covered *in vitro* (Abdelrazik *et al.*, 2009). Several studies report that the detrimental  
80 effect of oxidative stress in embryos cultured at atmospheric O<sub>2</sub> concentrations is  
81 correlated with increased ROS production (Harvey *et al.*, 2002, Takahashi *et al.*, 2012).  
82 Therefore, the quality of the embryo is affected during *in vitro* culture, leading to an  
83 increase in apoptosis, changes in gene expression and poor development, resulting in  
84 fewer embryos reaching the blastocyst stage (Ullah *et al.*, 2019).

85 Supplementation of culture media in order to improve embryo development is a matter  
86 of great interest. In previous works we improved embryo development and implantation  
87 by using two different classes of molecules: Quercetin (Qc) and 4-hydroxyestradiol  
88 (4OHE2), obtaining similar embryo quality than when embryos are cultured in low O<sub>2</sub>  
89 concentrations or obtained directly from the uterus (Hernández *et al.*, 2020;  
90 Hernández *et al.* under review). These compounds were effective when the addition was  
91 made at the morula to blastula transition, and not in other phases of development,  
92 indicating that embryos at this stage are more susceptible to stressors and also to  
93 protective treatments, and therefore it is possible that the molecular pathways involved  
94 are similar for the two molecules tested

95 Qc is a flavonoid found in fruits and vegetables (Machico et al., 1997; Nakayam et al.,  
96 1998; Micek et al., 2016) with a strong antioxidant effect, as it reduces ROS (Boots et  
97 al., 2008) and nitrogen species (Heijnen et al., 2002), and has the ability to chelate  
98 metals (Ferrali et al., 1997; Aherne et al., 2000), uptake radicals (Aherne et al., 2000)  
99 and inhibit enzymes (Nagao et al., 1999). Thus, the effect of this molecule has been  
100 widely studied in the past years in several animal models and cells (Machico et al.,  
101 1997; Nakayam et al., 1998; Khanduha et al., 2001; Dong et al., 2006; Kang et al.,  
102 2016). It has been reported to reduce abnormalities in rat embryos, decrease neural tube  
103 defects in diabetic mouse embryos, and reduce hair cell damage in zebrafish embryos,  
104 among other works (Karampour et al., 2014; Lee et al., 2015; Kang et al., 2016). On the  
105 other hand, it has been proposed that the catecholstrogen 4OHE<sub>2</sub>, and not the E<sub>2</sub>, acts on  
106 the embryo as the main signal to prepare it for implantation (Paria et al., 1998). It is  
107 well known that catecholstrogens are capable of inducing a wide range of growth  
108 factors, including the epidermal growth factor (EGF) family in cultured cells and  
109 embryos (Paria et al., 1998). Furthermore, it has been shown that 4-OHE<sub>2</sub>, improves the  
110 final quality of the blastocyst (Takeuchi et al., 2017) although the way by which this  
111 happens and its possible relationship with oxidative stress is still unknown.

112 Besides improving embryo quality, low O<sub>2</sub> concentration triggers a wide range of  
113 cellular events in embryonic development focused on the regulation of hypoxia-  
114 inducible factors (HIF) (Mantikou et al., 2013; Ma et al., 2017). HIFs are transcription  
115 regulators of cellular hypoxic responses and consist of two basic helix-loop-helix  
116 protein subunits, Hif-1 $\alpha$  and Hif-1 $\beta$ . The  $\alpha$  subunit is activated and is stable only in cells  
117 under conditions of low O<sub>2</sub> concentration, when it binds to hypoxia-response elements  
118 (HRE) (Wang et al., 1995; Dunwoodie et al., 2009), producing the activation of a wide  
119 range of genes involved in hypoxia signals (Caramelo et al., 2006). Although the  
120 expression and role of HIF-1 $\alpha$  in embryogenesis is still unclear (Yoon et al., 2013),  
121 some of the genes activated by HIF have been demonstrated to participate in the  
122 implantation process (Gao et al., 2004; Ganguly et al., 2007; Schmidt et al., 2009). On  
123 the other hand, it has been shown that the expression of the HIF1- $\alpha$  protein can be  
124 induced by a variety of stimuli other than hypoxia, such as hormones, cytokines, growth  
125 factors (Carroll et al., 2006; Yoon et al., 2013; Pringle et al., 2010; Jeong et al., 2016),  
126 flavonoids (Bogacz et al., 2021), and 4OHE<sub>2</sub> (Gao et al., 2004).

127 Based on all this information, the aim of this work was to evaluate the effects of the  
128 addition of Qc and 4OHE<sub>2</sub> at the passage from morula to blastocyst in the levels of ROS  
129 and in the expression of *Egf* and several hypoxia related genes in preimplantation mouse  
130 embryos obtained by *in vitro* fertilization. The final goal of this work would be to  
131 unravel molecules to supplement culture media that could act as potential candidates to  
132 mimic embryo culture at more physiological conditions.

### 133 **Materials and Methods**

#### 134 **Animals**

135 Female B6D2F1/J (C57BL/6J01aHsd x DBA/201aHsd, Envigo RMS, Holland) hybrid  
136 mice were used as oocyte and embryos donors, and male B6D2F1/J hybrid mice were  
137 used as semen donors. All mice were 8–12 weeks old. Animals were housed in the  
138 animalarium of the Jesús Usón minimally invasive surgery center (certified by  
139 ES100370001499) under controlled conditions, 12 h light: 12 h dark, 20–25 °C  
140 temperature and 40–70% relative humidity, with food and water *ad libitum*. All  
141 experiments were approved by the Ethics Committee of the University of Extremadura  
142 according to RD 53/2013 of 1st of February, and all procedures followed the guiding  
143 principles for research involving animals in accordance with the Institute for Laboratory  
144 Animal Research (ILAR) Guide for Care and Use of Laboratory Animals, and the  
145 Spanish Regulation (RD1201/2005).

#### 146 **Collection of *in utero* (IU) embryos and *in vitro* (IVF) obtained embryos**

147 Embryos developed under physiological conditions: Mature female mice were  
148 stimulated with 8 IU of eCG (equine Chorionic Gonadotropin; Syncrostim, CEVA  
149 Animal health, S.A. Barcelona, Spain) and 48 hours later, with 8 IU of hCG (human  
150 Chorionic Gonadotropin; Veterin Corion, Divasa Farmavic, S.A. Barcelona, Spain).  
151 Females were mated with fertile males of the same age and strain to induce pregnancy  
152 (1♂:1♀) over-night. Pregnancy was confirmed by visualization of the vaginal plug at  
153 day 1 of embryo development. Females were sacrificed 72 h and 96 h post-hCG  
154 injection by cervical dislocation and developing embryos were recovered in potassium  
155 simplex optimized medium (KSOM; Merck-Millipore, Madrid, Spain) after flushing the  
156 uterus with M2 media (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain).

157 Embryos obtained by IVF: Mature female mice were stimulated with 8 IU of eCG and  
158 48 hours later, with 8 IU of hCG. To perform the IVF, male mice were euthanized by

159 cervical dislocation and sperm was obtained from the caudal epididymis and then  
160 incubated in HTF medium to allow capacitation. Mature oocytes were recovered from  
161 the ampulla of the oviduct and placed in HTF medium of females sacrificed by cervical  
162 dislocation 12 h post-hCG injection. Insemination was performed with capacitated  
163 spermatozoa ( $3 \times 10^6$ ) in 600  $\mu$ l of HTF medium containing the oocytes. Fertilized  
164 oocytes were washed and cultured in KSOM medium until required for the experiments.

#### 165 **Hydrogen peroxide treatment**

166 Morula stage embryos were selected for the experiments. This experiment was  
167 performed both in embryos obtained by IVF (IVF groups) and in embryos developed IU  
168 up to morula stage (IU groups). To determine the oxidative damage, morulae were  
169 exposed for 15 min to a concentration of 5% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (Sigma-  
170 Aldrich, Barcelona, Spain) diluted in KSOM, in order to induce oxidative injury. Then  
171 morulae were then divided into different treatment groups. On the one hand, these  
172 embryos treated with  $H_2O_2$  were then cultured in KSOM media up to blastocyst stage  
173 (IVF/IU KSOM +  $H_2O_2$  group). Another group of embryos were cultured with Qc for 4  
174 h and then in KSOM media up to blastocyst stage (IVF/IU Qc +  $H_2O_2$  group). For the  
175  $4OHE_2$ , morulae were cultured for 24 h until blastocyst stage (IVF/IU  $4OHE_2$  +  $H_2O_2$   
176 group). As control groups, embryos cultured in KSOM media, both at atmospheric  
177 concentration (IVF/IU KSOM group) or low  $O_2$  concentration (IVF/IU  $O_2$  3%), were  
178 used and included in the results. Finally these embryos were used to study ROS levels.

#### 179 **Study of ROS levels**

180 To analyze oxidative stress, the CellRox Green reagent (Sigma-Aldrich, Barcelona,  
181 Spain) was used in living cells. After treating the embryos with  $H_2O_2$ , each set of  
182 embryos previously described was stained with CellRox for 30 minutes at 37 °C.  
183 Embryos were then washed with PBS 1x + PVP (Phosphate Buffered Saline; Sigma-  
184 Aldrich, Barcelona, Spain; Poliviny Polividona; Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain).  
185 They were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature  
186 and washed again with PBS 1x + PVP. Embryos were stained with Hoechst 3334 for  
187 10-15 minutes at 37 °C and washed in PBS 1x + PVP. Finally, embryos were mounted  
188 on a slide. Fluorescence images were taken using a confocal microscope (Nikon Eclipse  
189 TE2000-U), equipped with a 488 nm laser (green channel) and levels of ROS were  
190 analysed.

191 **Qc and 4-OHE<sub>2</sub> treatment, and low oxygen concentration culture**

192 To study the expression of different genes, different groups of embryos obtained by IVF  
193 were used, which were treated with different molecules or compounds that were added  
194 to the culture medium at the morula stage. The first group of embryos was treated with  
195 Qc (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) diluted in DMSO (0.01%) (Sigma-Aldrich,  
196 Barcelona, Spain) at a concentration of 10 µM (IVF Qc). Qc was added to the culture  
197 medium for 4 hours and then embryos were transferred to KSOM medium and cultured  
198 up to the blastocyst stage. The second group of embryos was treated with 4OHE<sub>2</sub>  
199 (Sigma-Aldrich, Barcelona, Spain) at a concentration of 0.1 mg / ml for 24 h, until the  
200 blastocyst stage (IVF 4OHE<sub>2</sub>). Another group of embryos was cultured at 3% O<sub>2</sub> from  
201 morula to blastocyst stage (IVF O<sub>2</sub> 3%). The control for this experiment was another  
202 group of embryos cultured in KSOM media throughout the entire development (IVF  
203 KSOM). Additionally, embryos developed IU up to the morula stage and cultured then  
204 in KSOM media (IU KSOM) were included in this experiment, to get an idea of the  
205 effects of the culture *in vitro* in the embryos. Once at the blastocyst stage, embryos were  
206 used for RNA extraction and analysis of gene expression of several genes.

207 **RNA extraction**

208 Total RNA was extracted from pools of 40–50 expanded blastocysts per treatment,  
209 using Tri Reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Frozen  
210 blastocysts were thawed, vortexed for 20 s, and allowed to stay at room temperature for  
211 5 min. Chloroform (Sigma-Aldrich) was added to embryos, samples were vigorously  
212 shaken and then incubated at room temperature for 15 min. Samples were centrifuged at  
213 13,000 rpm for 15 min at 4 °C and the upper aqueous phase was removed. Isopropanol  
214 (Sigma-Aldrich) was added and RNA was precipitated by overnight incubation at –80  
215 °C, followed by centrifugation at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C. RNA pellets were  
216 washed with 70% ethanol, air-dried, and redissolved in 10 mL of sterile water. The  
217 RNA solution was kept frozen at –80 °C until all samples were ready for reverse  
218 transcription.

219 **Reverse transcription and gene expression analysis by qPCR**

220 The reverse transcription assay was carried out using a QuantiTect Whole  
221 Transcriptome Kit (207,043; Qiagen, Hilden, Germany). Gene expression levels of (i)  
222 Hif-1α, (ii) Egf, (iii) HIF target genes: Glut-1 Glut-3, Cox-2 and Vegf, and (iii) the  
223 antioxidant enzyme gen PRDX5, were analyzed by quantitative real-time PCR (RT-

224 qPCR) performed in an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied  
225 Biosystems) with Sensi- Mix SYBR ® Hi-ROX kit (Bioline, Reagents Ltd., USA). The  
226 amplification program was as follows: 95 °C for 10 min; 40 cycles of 95 °C for 10 s and  
227 60 °C for 30s; melting curve from 65 to 95 °C. A cycle threshold (Ct) was calculated for  
228 each sample using the GeneAmp 7300 software. The Primer sequences are listed in  
229 Table 1. The comparative Ct method was used for quantification of mRNA expression  
230 levels using the amplification efficiency of each gene. All results were normalized to a  
231 reference gene ( $\beta$ -actin).

### 232 **Statistical analysis**

233 Statistical analyses were performed using the SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL,  
234 USA), and a p-value lower than 0.05 was considered statistically significant. After log  
235 transformation, Kolgomorov-Smirnov test was used for normality test. The comparison  
236 of ROS was studied using the Mann–Whitney–Wilcoxon non-parametric test.  
237 Differences in gene expression were analyzed using the student's t-test after log  
238 transformation.

### 239 **Results**

#### 240 **Effect of different treatments in ROS levels**

##### 241 Effect of Qc and 4OHE<sub>2</sub> in ROS levels in embryos obtained by IVF

242 When we study the effect of the different treatments in ROS levels, results show that  
243 compared to control embryos cultured in KSOM media (IVF KSOM group), the  
244 addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to embryos caused a significant increase in ROS levels (IVF KSOM +  
245 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IVF DMSO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IVF Qc + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and IVF 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> groups) (Fig. 1, B),  
246 and hence in the fluorescence detected (Fig. 1, A). As expected, embryos cultured in  
247 low oxygen concentration (IVF O<sub>2</sub> 3% group) presented lower ROS levels ( $p < 0.05$ ).  
248 Regarding the treatments employed, when ROS is induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Qc appeared to  
249 have a more protective effect for the embryos (IVF Qc + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group), reducing ROS  
250 levels to those observed in embryos cultured in KSOM medium. However, no  
251 differences were seen between the IVF KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the IVF 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
252 groups (Fig. 1. A, B), suggesting a lower effect of 4OHE<sub>2</sub> to protect embryos against  
253 ROS.

##### 254 Effect of Qc and 4OHE<sub>2</sub> in ROS levels in embryos developed IU

255 The effect of Qc and 4OHE<sub>2</sub> in ROS levels was carried out in embryos developed IU in  
256 the same way as for embryos obtained by IVF, and was studied by analyzing the  
257 intensity of the fluorescence emitted by the treated blastocysts (Fig. 2, A). Results  
258 demonstrate that compared to the control IU KSOM group, in embryos treated with  
259 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ROS levels were statistically higher (IU O<sub>2</sub> 3% group, IU KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group,  
260 IU DMSO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group and IU 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group) (p<0.001) (Fig. 2, B). As  
261 previously seen in IVF obtained embryos, embryos cultured in low oxygen  
262 concentration presented lower ROS levels (p<0.001) and hence a lower fluorescence  
263 intensity compared to all the experimental groups. In the groups treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, only  
264 those embryos treated with Qc for 4h presented reduced ROS levels, in a significant  
265 way (IU Qc + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group) (p<0.001), the rest of embryos presented much higher ROS  
266 levels. As previously seen for the 4OHE<sub>2</sub>, this molecule didn't have a protective effect  
267 against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> this time (IU 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group) (Fig. 2. A, B).

#### 268 Gene expression in IVF obtained blastocysts

269 Compared to embryos developed IU, analysis of gene expression levels in IVF obtained  
270 blastocysts showed that the culture *in vitro* causes a decrease in the expression of all the  
271 genes analyzed. Nonetheless, when embryos are treated with Qc, the expression of Hif-  
272 1 $\alpha$ , Cox-2, Vegf, Prdx5, Glut-3 and Egf significantly increased, and in the case of Glut-  
273 1 the expression also increased but not in a statistically significant way (Fig. 3, Fig. 4).  
274 In the case of embryos cultured with 4OHE<sub>2</sub>, the expression of hypoxia related genes  
275 (Fig. 3), except for Cox-2 which was decreased, also significantly increased compared  
276 to control embryos cultured in KSOM medium, although not as much as in the case of  
277 Qc. Interestingly, in the case of Egf and Vegf genes, 4OHE<sub>2</sub> produced a much  
278 significant increase in the expression of these genes (Fig. 4). In embryos cultured at low  
279 oxygen concentration, gene expression significantly increased to levels very similar to  
280 those observed in embryos developed IU (IU KSOM group), observing much better  
281 results than when cultured *in vitro* in atmospheric conditions (Fig. 3, Fig. 4).

#### 282 Discussion

283 Embryo culture conditions are crucial for the outcome of ART and have an impact in  
284 embryo development before and after implantation, and probably in the health of the  
285 future newborn (Nelissen et al., 2013; El Hajj and Haaf, 2013; Mantikou et al., 2013;  
286 Chronopoulou and Harper, 2014). The main challenge of culturing embryos *in vitro*  
287 culture is to recreate as much as possible the conditions given *in vivo*, both in the

288 fertilization process and during embryo development. There are many factors that need  
289 to be controlled during the *in vitro* development of embryos. Among these, O<sub>2</sub>  
290 concentration is critical of *in vitro* culture. Several studies suggest that low O<sub>2</sub>  
291 concentrations benefit embryo development from the 8-cell to blastocyst stage  
292 (Karagenc *et al.*, 2004). Indeed embryo development is delayed when cultured under  
293 atmospheric compared to low O<sub>2</sub> concentration (Karagenc *et al.*, 2004). The number of  
294 embryos that reach blastocyst stage is lower, and this is probably due to an increase in  
295 the generation of ROS-induced DNA damage in the cells (Karagenc *et al.*, 2004).  
296 However, results can greatly differ between laboratories, and part of this variation may  
297 be related to differences in the composition of the culture media used (Ma *et al.*, 2017).  
298 For this reason, the study and development of a more appropriate media for the culture of  
299 embryos developed *in vitro* has been of great interest lately.

300 To obtain an improved culture media, different molecules have been studied as potential  
301 candidates to supplement embryo culture medium. Two of these molecules, Qc and  
302 4OHE<sub>2</sub>, have been employed in this work. Our results show that in morulae obtained by  
303 IVF or developed IU, previously subjected to oxidative stress, supplementation of  
304 culture medium with 10µM of Qc decreased ROS levels to values close to those  
305 observed in embryos cultured in low O<sub>2</sub> concentration. These results suggest that Qc has  
306 a protective effect against oxidative stress, being able to improve the quality of the  
307 embryos as indicated in our previous work, in which morulae treated with Qc presented  
308 less apoptosis rates and increased total cell number at the blastocyst stage (Hernández *et al.*,  
309 2020). Similar results were already reported by Yu *et al.* in 2014, which showed that  
310 culturing embryos with Qc had a beneficial effect on embryo development.  
311 Nonetheless, our study is the first one that evaluates the effects of Qc specifically at the  
312 morula stage and for a short period of time.

313 In the case of 4OHE<sub>2</sub>, we demonstrated in a previous work that an improvement in  
314 embryo quality occurs when this molecule is added at the time of compaction (day 3 of  
315 pre-implantation development) (Hernández *et al.*, 2020). Nonetheless, in this work we  
316 showed that 4OHE<sub>2</sub> does not have a protective effect against oxidative stress in morulae  
317 obtained by IVF or developed IU, observing ROS levels equal to those produced by  
318 DMSO or KSOM when stress is induced to embryos. This result is consistent with other  
319 studies that show that 4OHE<sub>2</sub> does not reduce ROS levels, and it may even increase  
320 them (Salama *et al.*, 2008; Rempel *et al.*, 2009).

321 Additionally, as hypoxia induces *Hif*, we also studied the expression of *Hif-1 $\alpha$*  in  
322 different conditions, which is a response element to low oxygen conditions so that cells  
323 can adapt to hypoxia (Semenza 2000; Wenger 2002), and other several genes induced  
324 by this protein, due to the fact that before implantation, embryos are subjected to low  
325 concentrations of O<sub>2</sub> in the uterus and the role of HIF and the other genes is still unclear  
326 during preimplantation development. It has been observed that *Hif-1 $\alpha$*  levels increase  
327 exponentially as cells are exposed to low oxygen levels (Mantikou *et al.*, 2013; Ma *et al*  
328 2017), and it is closely regulated at the protein level through ubiquitin-mediated  
329 degradation under normoxic conditions, which means that it is rapidly degraded by O<sub>2</sub>  
330 and has a short half-life (Ma, *et al.*, 2017). It has also been shown that *Hif-1 $\alpha$*  can be  
331 stabilized under normoxic conditions by a variety of different stimuli including  
332 flavonoids (Bogacz *et al.*, 2021) and 4OHE<sub>2</sub> (Gao *et al.*, 2004). Consistent with this  
333 information, in this work we observed that the expression of *Hif-1 $\alpha$*  increased  
334 significantly in morulae obtained both by IVF or developed IU cultured in low oxygen  
335 concentration. Furthermore, embryos obtained by IVF and cultured with Qc under  
336 normoxic conditions showed an increased expression of *Hif-1 $\alpha$* , and similar results were  
337 obtained when embryos were cultured with 4OHE<sub>2</sub>.

338 These changes in the expression of *Hif-1 $\alpha$*  can affect its target genes and have an effect  
339 in embryo implantation. Our results show that in embryos obtained by IVF, Qc  
340 produces an increase in the expression of all genes studied in this work. The same can  
341 be observed in embryos treated with 4OHE<sub>2</sub>, except for the *Cox-2* gene, which slightly  
342 decreased. In the case of *Cox-2*, which has been observed to be expressed during the  
343 implantation window (Marions and Danielsson 1999), its increase caused by Qc in this  
344 work may be activating an important pathway for implantation, hence rendering  
345 embryos of better quality. It has been shown that embryos with increased *Cox-2*  
346 expression have a higher activation of prostaglandins, which are related to  
347 improvements in the implantation and decidualization (Lim *et al.*, 1997). Our results are  
348 consistent with those of Bolouki *et al.* in 2020, who demonstrated that treatment with  
349 Qc of preimplantation embryos in diabetic mice increased the expression of *Cox-2*.

350 In the case of *Ghut-1* and *Ghut-3*, we observed a significant increase of these genes when  
351 embryos were cultured with Qc or 4OHE<sub>2</sub>. An increase in *Ghut-3* levels may suggest an  
352 increase in the uptake of glucose, as it is believed to mediate glucose uptake into the  
353 blastocyst from the external environment (Lu *et al.*, 2002; Havery 2007). This increase

354 could generate sufficient amounts of ATP for the embryo. This positive regulation of  
355 *Glut-3* was similar to that observed by Kind *et al.* 2005, and is consistent with other  
356 reports of human (Gardner and Wale 2013) and mouse (Wale and Gardner 2012)  
357 embryos that significantly increased glucose uptake when cultured under low O<sub>2</sub>  
358 tension. It is worth mentioning that this is the first study in which the expression of  
359 glucose transporters is measured when morulae are cultured with 4OHE<sub>2</sub> for 24 hours  
360 and with Qc for 4 hours, observing an increase in *Glut-1* and *Glut-3*, necessary for  
361 obtaining energy and consequently, obtaining more competent blastocysts.

362 Regarding *Vegf*, a gene that plays an important role in the endometrial vascular  
363 permeability by directly inducing angiogenesis, recruiting endothelial cells, and  
364 stimulating their proliferation (Krussel *et al.*, 2001; Rabbani *et al.*, 2001), we observed a  
365 very significant increase in embryos cultured with Qc and 4OHE<sub>2</sub>. A greater  
366 angiogenesis could be beneficial for embryo implantation, however more studies are  
367 needed, as an excessive increase in angiogenesis could have very negative effects as  
368 well, leading to produce a tumor, therefore these results should be studied carefully. All  
369 these results suggest that *Hif-1α* may be a molecular mechanism through which the  
370 blastocyst can detect and respond to changes produced by different molecules in the  
371 culture medium. Further studies are required to determine whether gene expression  
372 regulated by Qc and/or 4OHE<sub>2</sub> in the embryo is mediated by HIF, and the range of  
373 genes regulated by these molecules in the preimplantation embryo.

374 Additionally, two other genes, not demonstrated to be targets of *Hif-1α*, were studied in  
375 this work, *Egf* and *Prdx5*. Our results showed that *Egf* levels were increased in all  
376 groups, but the increase was lower in the IVF Qc group. However, the levels between  
377 the IVF 4OHE<sub>2</sub> and IVF O<sub>2</sub> 3% groups are similar but lower than in embryos obtained  
378 *in vivo*. These results could corroborate the hypothesis in which embryos treated with  
379 Qc would activate the *Cox-2* pathway but not the *Egf* pathway. To ensure this, more  
380 studies would be needed. In a previous work we demonstrated that embryos cultured for  
381 24 hours with 4OHE<sub>2</sub> at the morula stage bound more EGF, which could improve  
382 implantation rates (Hernández *et al.*, 2020). It is also known that EGF can induce the  
383 expression of *Hif* through 4OHE<sub>2</sub>. These results hypothesize that 4OHE<sub>2</sub>, by binding  
384 EGF and expressing a greater amount of *Hif* than embryos grown in conventional  
385 media, could be a good candidate for adding it to culture media, but for this, more  
386 studies are needed since it also produces an increase in *Vegf*. On the other hand, several

387 studies demonstrated that Qc reduces EGF levels (Huang *et al.*, 1999; Kaneuchi *et al.*,  
388 2003). However, this is the first study in which the expression of *Egf* is measured when  
389 preimplantation embryos are cultured with Qc obtaining positive results, producing an  
390 increase in *Egf* that could help the embryo to establish a dialogue with the uterus in  
391 order to implant. Nonetheless, results are not statistically significant, which could be  
392 due to the fact that Qc has a dose-dependent effect and its effect depends on the tissue  
393 that is treated.

394 Finally we studied *Prdx5*, a protein that can enhance blastocyst development by  
395 protecting cells from oxidative stress by regulating ROS / ROS homeostasis and  
396 reactive nitrogen species (RNS) (Neumann *et al.*, 2009; De Simoni *et al.*, 2013). In this  
397 work we observed that Qc and low O<sub>2</sub> concentration increased the levels of *Prdx5* in  
398 morulae obtained by IVF. These results are consistent with those of a study in cattle  
399 (Balasubramanian *et al.*, 2007), which shows that low O<sub>2</sub> conditions may enhance  
400 antioxidant-mediated defense against oxidative stress by eliminating the extracellular  
401 ROS generated, thus providing embryos with an environment of less oxidative stress. In  
402 the case of Qc, this molecule could be reducing ROS levels in embryos through the  
403 increase of *Prdx5*. However, *Prdx5* levels in embryos cultured with 4OHE<sub>2</sub> were not as  
404 increased as in the other groups. Nonetheless, results also suggest that 4OHE<sub>2</sub> can  
405 express the antioxidant enzyme but at levels that do not eliminate all the existing ROS  
406 or that the amount of expression of the enzyme is not sufficient to perform its function.  
407 These data provide growing evidence that internal protection in embryos could be  
408 activated in addition to hypoxia by Qc through increased production of *Prdx5* to limit  
409 ROS during blastocyst development, but not by 4OHE<sub>2</sub>.

410 In summary, we can say that Qc and 4OHE<sub>2</sub>, separately, improve the quality of the  
411 embryos, and that Qc even reduces ROS levels, especially in the compaction stage,  
412 when the embryo is more susceptible to the environment that surrounds it. In addition,  
413 both molecules activate various genes when added to the culture media, including *Hif-*  
414 *1α*, to which several genes involved in embryo enhancement and implantation are  
415 associated. With the results obtained, we can hypothesize that culturing embryos with  
416 Qc could improve implantation through the *Cox-2* pathway and 4OHE<sub>2</sub> may do so  
417 through the *Egf* pathway, producing embryos more successful when transferred in  
418 assisted reproduction treatments, offered by reproduction clinics, although further  
419 studies are needed before this procedure could be used clinically. Additionally, adding

420 both compounds to the culture medium could produce a summation effect that would  
421 benefit both embryonic development and the implantation process, although more  
422 studies on the joint effect of both compounds would be necessary to support this  
423 statement.

#### 424 **Conflicts of Interest**

425 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal  
426 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### 427 **Declaration of Funding**

428 This work was financed by a grant from the Project HIF-MCERA IRA116, co-financed  
429 by the European Regional Development Fund (ERDF), and Ayuda a Grupos  
430 Catalogados de la Junta de Extremadura, GR18199.

#### 431 **Acknowledgments**

432 This study was financed by a grant from Junta de Extremadura: Ayuda de Grupos  
433 Catalogados de la Junta de Extremadura, GR18199, co-financed by the European  
434 Regional Development Fund (ERDF). We would also like to thank the Biomedicine  
435 Applied Techniques Facility of the University of Extremadura for allowing us to use the  
436 confocal microscope and the Cell Therapy laboratory of the Jesus Uson Minimally  
437 Invasive Surgery Centre for allowing us to use the fluorescence microscope and PCR.

#### 438 **Data Availability Statement (DAS)**

439 All data related to this work are part of a PhD so they are not published elsewhere.  
440 Nonetheless, they will be available upon request.

#### 441 **References**

- 442 Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R and Agarwal A (2009) l-Carnitine decreases DNA  
443 damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil*  
444 *Steril* 91, 589–96. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.067.
- 445 Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A and Gupta S (2012) The  
446 effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 10,  
447 49. doi: 10.1186/1477-7827-10-49.
- 448 Aheme SA, O'Brien NM (2000) Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin  
449 and rutin, against tert-butylhydroperoxide and menadione-induced DNA single strand

- 450 breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med* 29, 507–514. doi: 10.1016/s0891-  
451 5849(00)00360-9.
- 452 Balasubramanian S, Son WJ, Kumar BM, Ock SA, Yoo JG, Im GS, et al., (2007)  
453 Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various  
454 developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos.  
455 *Theriogenology* 68(2), 265–75. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.044.
- 456 Bogacz A, Mikołajczak PŁ, Wolek M, Górska A, Szulc M, Ozarowski M, Kujawski R,  
457 Czerny B, Wolski H, Karpiński TM, et al. (2021) Combined Effects of Methyl dopa and  
458 Flavonoids on the Expression of Selected Factors Related to Inflammatory Processes  
459 and Vascular Diseases in Human Placenta Cells—An In Vitro Study. *Molecules* 26,  
460 1259. doi: 10.3390/molecules26051259.
- 461 Bolouki A, Zal F and Alaei S (2020) Ameliorative effects of quercetin on the  
462 preimplantation embryos development in diabetic pregnant mice. *Obstet. Gynaecol. Res*  
463 46(5), 736–744. doi: 10.1111/jog.14219.
- 464 Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to  
465 nutraceutical. *Eur J Pharmacol* 585, 325–337. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008.
- 466 Caramelo C, Peña J, Castilla A, Justo S, De Solís AJ, Neria F, Peñate S, Gonzalez-  
467 Pacheco, FR (2006) Respuesta a la hipoxia. un mecanismo sistémico basado en el  
468 control de la expresión génica. *Medicina* 66, 155-164.
- 469 Carroll VA, Ashcroft M (2006) Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  versus HIF-  
470 2 $\alpha$  in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth  
471 factor-I, or loss of von hippel-lindau function: implications for targeting the HIF  
472 pathway. *Cancer Res* 66, 6264. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2519.
- 473 Chronopoulou E and Harper JC (2015) IVF culture media: past, present and future.  
474 *Human Reproduction Update* 21(1), 39–55. doi: 10.1093/humupd/dmu040.
- 475 De Simoni S, Linard D, Hermans E, Knoops B, Goemaere J (2013) Mitochondrial  
476 peroxiredoxin-5 as potential modulator of mitochondria-ER crosstalk in MPP<sup>+</sup>-induced  
477 cell death. *J Neurochem* 125(3), 473–85. doi: 10.1111/jnc.12117.
- 478 Dong GZ, Kim CY, Cho WS, Shin YJ, Lee K (2006) Cryoprotective role of the  
479 flavonoid quercetin in mammalian cells. *Korean J. Genetics* 28, 269-277.

- 480 Dumoulin J, Land J, Van Montfoort A, Nelissen E, Coonen E, Derhaag J, Schreurs I,  
481 Dunselman G, Kester A, Geraedts J, et al (2010) Effect of in vitro culture of human  
482 embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod* 25, 605-612. doi:  
483 10.1093/humrep/dep456.
- 484 Dunwoodie SL (2009) The role of hypoxia in development of the mammalian embryo.  
485 *Dev Cell* 17(6), 755-73. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.008.
- 486 El Hajj and Haaf T (2013) Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and  
487 embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril* 99, 632-641. doi:  
488 10.1016/j.fertnstert.2012.12.044.
- 489 Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M  
490 (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid  
491 quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 416, 123-129. doi:  
492 10.1016/s0014-5793(97)01182-4.
- 493 Ganguly A, McKnight RA, Raychaudhuri S, Shin BC, Ma Z, Moley K, and Devaskar  
494 SU (2007) Glucose transporter isoform-3 mutations cause early pregnancy loss and fetal  
495 growth restriction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*  
496 292(5), 21241-55. doi: 10.1152/ajpendo.00344.2006.
- 497 Gao N, Nester RA and Sarkar MA (2004) 4-Hydroxy estradiol but not 2-hydroxy  
498 estradiol induces expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and vascular endothelial  
499 growth factor A through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/FRAP pathway in OVCAR-  
500 3 and A2780-CP70 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology and Applied*  
501 *Pharmacology* 196(1), 124-135. doi: 10.1016/j.taap.2003.12.002
- 502 Gardner DK, Wale PL (2013) Analysis of metabolism to select viable human embryos  
503 for transfer. *Fertil Steril* 99(4), 1062-72. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.004.
- 504 Harvey AJ (2007) The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development  
505 and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98(1-2), 113-28. doi:  
506 10.1016/j.anireprosci.2006.10.008.
- 507 Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG (2002) REDOX regulation of early embryo  
508 development. *Reproduction* 123(4), 479-86. doi: 10.1530/rep.0.1230479.

- 509 Heijnen CG, Haenen GR, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A (2002) Protection  
510 offlavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free*  
511 *Radic Res* 36, 575–581. doi: 10.1080/10715760290025951.
- 512 Hernández N, López-Morató M, Perianes MJ, Sánchez-Mateo S, Cassa-Rua V,  
513 Domínguez-Arroyo JA, Sánchez-Margallo FM, and Álvarez IS (2020) 4-  
514 Hydroxyestradiol improves mouse embryo quality, epidermal growth factor-binding  
515 capability in vitro and implantation rates. *Molecular human reproduction* 1, 17. doi:  
516 10.1093/molehr/gaaa075.
- 517 Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, Kandaswami C,  
518 Middleton E and Lee M-T (1999) Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of  
519 tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells  
520 overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol* 128(5), 999–1010.  
521 doi: 10.1038/sj.bjp.0702879.
- 522 Jeong W, Bazer FW, Song G, Kim J (2016) Expression of hypoxia-inducible factor-1  
523 by trophoblast cells in response to hypoxia and epidermal growth factor.  
524 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469(2), 176-182. doi:  
525 10.1016/j.bbrc.2015.11.091.
- 526 Kaneuchi, Sasaki, Tanaka, Sakuragi, Fujimoto, Dahiya (2003) Quercetin regulates  
527 growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *International*  
528 *Journal of Oncology* 22(1), 159-164(6). doi: 10.3892/ijo.22.1.159.
- 529 Kang JT et al (2016) Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on in  
530 vitro maturation of porcine oocytes. *Asian-Australas J Anim Sci* 29, 352-358. doi:  
531 10.5713/ajas.15.0341.
- 532 Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahçeci M (2004) Impact of oxygen  
533 concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod BioMed Online*  
534 9(4), 409–17. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61276-x.
- 535 Karampour NS, Arzi A, Varzi HN, Mohammadian B & Rezaei M (2014) Quercetin  
536 preventive effects on theophylline-induced anomalies in rat embryo. *Jundishapur*  
537 *journal of natural pharmaceutical products* 9(3). doi: 10.17795/jjnpp-17834.

- 538 Khanduja KI, Verma A, Bhardwaj A (2001) Impairment of human sperm motility and  
539 viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. *Andrologia* 33, 277-81. doi:  
540 10.1046/j.1439-0272.2001.00432.x.
- 541 Kind KL, Collett RA, Harvey AJ, Thompson JG (2005) Oxygen-regulated expression of  
542 GLUT-1, GLUT-3, and VEGF in the mouse blastocyst. *Mol Reprod Dev* 70(1), 37-44.  
543 doi: 10.1002/mrd.20183.
- 544 Kirby RS (2018) Assisted reproductive technology and developmental outcomes.  
545 *Pediatrics* 142, e20183072. Doi:10.1542/peds.2018-3072.
- 546 Krussel JS, Behr B, Milki AA, Hirschhain J, Wen Y, Bielfeld P, et al., (2001) Vascular  
547 endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in  
548 human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 7(1), 57-63. doi: 10.1093/molehr/7.1.57.
- 549 Lee SK et al (2015) Protective role of quercetin against cisplatin-induced hair cell  
550 damage in zebrafish embryos. *Hum Exp Toxicol* 34, 1043-1052. doi:  
551 10.1177/0960327114567766.
- 552 Li XX, Lee KB, Lee JH, Kim KJ, Kim EY, Han KW, Park KS, Yu J and Kim MK  
553 (2014) Glutathione and cysteine enhance porcine preimplantation embryo development  
554 in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 81, 309-14. doi:  
555 10.1016/j.theriogenologia.2013.09.030.
- 556 Lim H, Paria BC, Das SK et al., (1997) "Multiple female reproductive failures in  
557 cyclooxygenase 2-deficient mice". *Cell* 91(2), 197-208. doi: 10.1016/s0092-  
558 8674(00)80402-x.
- 559 Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic  
560 glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277(26),  
561 23111-5. doi: 10.1074/jbc.M202487200.
- 562 Ma YY, Chen HW and Tzeng CR (2017) Low oxygen tension increases mitochondrial  
563 membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation  
564 protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *Journal of Ovarian Research* 10, 47. doi:  
565 10.1186/s13048-017-0344-1.

- 566 Machiko T, Yoichi K, Shozo T (1977) In vitro transformation of hamster embryo cells  
567 by quercetin. *Toxicology Letters* 1, 175-178. doi:10.1016/0378-4274(77)90009-1.
- 568 Mantikou E, Bontekoe S, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S (2013)  
569 Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies.  
570 *Hum Reprod Update* 19(3), 209. doi: 10.1002/14651858.CD008950.pub2.
- 571 Mantikou E, Youssef MAFM, van Wely M, van der Veen F (2013) Al-Inany HG  
572 Repping S Mastenbroek S Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a  
573 systematic review. *Hum Reprod Update* 19, 210-220. doi: 10.1093/humupd/dms061.
- 574 Marions L and Danielsson k.G (1999) "Expression of cyclo-oxygenase in human  
575 endometrium during the implantation period." *Molecular Human Reproduction* 5(10),  
576 961–965. doi: 10.1093/molhr/5.10.961.
- 577 Micek J, Jurikova T, Skrovankova S and Sochor J (2016) Quercetin and its anti-allergic  
578 immune response. *Molecules* 21(5), 623. doi: 10.3390/molecules21050623.
- 579 Nagao A, Seki M, Kobayashi H (1999) Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids.  
580 *Biosci Biotechnol Biochem* 63, 1787–1790. doi: 10.1271/bbb.63.1787.
- 581 Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawakishi S (1998) Suppression of active oxygen-  
582 induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 45, 265-7. doi: 10.1016/0006-  
583 2952(93)90402-i.
- 584 Nelissen ECM, Van Montfoort APA, Smits LJM, Menheere PPCA, Evers JLH, Coonen  
585 E, Derhaag JG, Peeters LL, Coumans AB, Dumoulin JCM (2013) IVF culture medium  
586 affects human intrauterine growth as early as the second trimester of pregnancy. *Hum*  
587 *Reprod* 28, 2067-2074. doi: 10.1093/humrep/det131.
- 588 Neumann CA, Cao J, Manevich Y (2009) Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling.  
589 *Cell Cycle* 8(24), 4072–8. doi: 10.4161/cc.8.24.10242.
- 590 Paria BC, Das SK, Dey SK (1998) Embryo implantation requires estrogendirected  
591 uterine preparation and catecholestrogen-mediated embryonic activation. *Adv*  
592 *Pharmacol* 42, 840–843. doi: 10.1016/s1054-3589(08)60877-7.

- 593 Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT (2010) Beyond  
594 oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy.  
595 *Hum Reprod Updat* 16, 415. doi:10.1093/humupd/dmp046.
- 596 Rabbani ML and Rogers PA (2001) Role of vascular endothelial growth factor in  
597 endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction* 122(1), 85–90.  
598 doi: 10.1530/rep.0.1220085.
- 599 Rakhit M, Gokul SR, Agarwal A, du Plessis SS (2013) Antioxidant strategies to  
600 overcome OS in IVF-Embryo transfer. In *Studies on Women's Health*. Humana Press  
601 237–262. doi: 10.1007/978-1-62703-041-0\_13.
- 602 Rempel MA, Hester B, DeHaro H, Hong H, Wang Y and Schlenk D (2009) Effects of  
603 17 $\beta$ -estradiol, and its metabolite, 4-hydroxyestradiol on fertilization, embryo  
604 development and oxidative DNA damage in sand dollar (*Dendraster excentricus*) sperm.  
605 *Sci Total Environ* 407(7), 2209–2215. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.12.054.
- 606 Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL (2012) Roles of reactive oxygen species in  
607 female reproduction. *Reprod Domest Anim* 47(2), 344–52. doi: 10.1111/j.1439-  
608 0531.2011.01891.x.
- 609 Salama SA, Kamel M, Awad M, Ben Nasser AH, Al-Hendy A, Botting S and Arrastia  
610 C (2008) Catecholestrogens induce oxidative stress and malignant transformation in  
611 human endometrial glandular cells: Protective effect of catechol-O-methyltransferase.  
612 *Int. J. Cancer* 123, 1246–1254. doi: 10.1002/ijc.23653.
- 613 Schmidt S, Hommel A, Gawlik V, Augustin R, Junicke N, Florian, S., ... and  
614 Schürmann A (2009) Essential role of glucose transporter GLUT3 for post-implantation  
615 embryonic development. *The Journal of endocrinology* 200(1), 23. doi: 10.1677/JOE-  
616 08-0262.
- 617 Semenza GL (2000) HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses  
618 to hypoxia. *J Appl Physiol* 88, 1474–1480. doi: 10.1152/jappl.2000.88.4.1474.
- 619 Takahashi M (2012) Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of  
620 mammalian embryos. *J Reprod Dev* 58(1), 1–9. doi: 10.1262/jrd.11-138n.

- 621 Takeuchi M, Seki M, Furukawa E, Takahashi A, Saito K, Kobayashi M, Ezoe K, Fukui  
622 E, Yoshizawa M, Matsumoto H (2017) Improvement of implantation potential in mouse  
623 blastocysts derived from IVF by combined treatment with prolactin, epidermal growth  
624 factor and 4-hydroxyestradiol. *Mol Hum Reprod* 23, 557–570. doi:  
625 10.1093/molehr/gax035.
- 626 Truong T and Gardner DK (2017) Antioxidants improve IVF outcome and subsequent  
627 embryo development in the mouse. *Hum Reprod* 32, 2404–13. doi:  
628 10.1093/humrep/dex330.
- 629 Truong TT, Soh YM and Gardner DK (2016) Antioxidants improve mouse  
630 preimplantation embryo development and viability. *Hum Reprod* 31, 1445–54. doi:  
631 10.1093/humrep/dew098.
- 632 Ullah O, Li Z, Ali I, Xu L, Liu H, Shah SZA and Fang N (2019) Pterostilbene alleviates  
633 hydrogen peroxide-induced oxidative stress via nuclear factor erythroid 2 like 2  
634 pathway in mouse preimplantation embryos. *J Reprod Dev* 65, 73–81. doi:  
635 10.1262/jrd.2018-089.
- 636 Wale PL and Gardner DK (2016) The effects of chemical and physical factors on  
637 mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human  
638 reproduction. *Hum Reprod Update* 22, 2–22. doi: 10.1093/humupd/dmv034.
- 639 Wale PL and Gardner DK (2012) Oxygen regulates amino acid turnover and  
640 carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development.  
641 *Biol Reprod* 87(1), 24. 1–8. doi: 10.1095/biolreprod.112.100552
- 642 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is  
643 a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl*  
644 *Acad Sci U S A* 92(12), 5510–4. doi: 10.1073/pnas.92.12.5510.
- 645 Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub> sensing protein hydroxylases,  
646 hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J*  
647 16, 1151–1162. doi: 10.1096/fj.01-0944rev.
- 648 Yoon J, Juhn KM, Ko JK, Yoon SH, Ko Y, Lee CY, et al (2013) Effects of oxygen  
649 tension and IGF-I on HIF-1 $\alpha$  protein expression in mouse blastocysts. *J Assist Reprod*  
650 *Genet* 30(1), 99–105. doi: 10.1007/s10815-012-9902-z.

651 Yu S, Long H, Lyu Qf, Zhang Qh, Yan Zg, Liang Hx, Chai Wr, Zheng Yan, Kuang  
652 Yp, and Qi C (2014) Protective Effect of Quercetin on the Development of  
653 Preimplantation Mouse Embryos against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Injury.  
654 PLoS One 9(2), e89520. doi: 10.1371/journal.pone.0089520.

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

Do Not Distribute

685 **Figure legends**

686 **Table 1:** List of the primer sequences used for the RT-PCR experiment. *Hif-1 $\alpha$* :  
 687 hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ; *Egf*: epidermal growth factor; *Glut-1*: glucose transporter  
 688 1; *Glut-3*: glucose transporter 3; *Vegf*: vascular endothelial growth factor; *Cox-2*:  
 689 cyclooxygenase 2; *Prdx5*: peroxiredoxin 5;  $\beta$ -Actin was used as a control.

690 **Figure 1: Quantification of ROS levels in blastocysts obtained by IVF exposed to**  
 691 **different treatments:** (A) Representation of ROS levels in blastocysts treated with Qc  
 692 and 4OHE<sub>2</sub>. Intracellular ROS was measured with the CellRox probe (Green). Bar, 50  
 693  $\mu$ m. (B) Relative quantification of ROS fluorescence intensity in blastocysts. IVF  
 694 KSOM group: n = 28; IVF O<sub>2</sub> 3% group: n = 28; IVF KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group: n = 30;  
 695 IVF Qc + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group: n = 28; IVF 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group: n = 30. The data are  
 696 represented as the mean  $\pm$  the SD. a), p <0.05 for IVF O<sub>2</sub> 3% vs. IVF KSOM group; b)  
 697 p <0.001 for IVF KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IVF DMSO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IVF 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. IVF  
 698 KSOM group. Mann - Whitney - Wilcoxon test.

699 **Figure 2: Quantification of ROS levels in blastocysts developed IU and exposed to**  
 700 **different treatments:** (A) Representation of ROS levels in morulae treated with Qc and  
 701 4OHE<sub>2</sub>. Intracellular ROS was measured with the CellRox probe (Green). Bar, 50  $\mu$ m.  
 702 (B) Relative quantification of ROS fluorescence intensity in blastocysts. IU KSOM  
 703 group: n = 30; IU O<sub>2</sub> 3% group: n = 30; IU KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group: n = 30; IU Qc + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 704 group: n = 30; IU 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group: n = 30. The data are represented as the mean  $\pm$   
 705 the SD. a) p <0.01 for IVF Qc + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs IVF KSOM group; b) p <0.001 for IVF  
 706 KSOM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IVF DMSO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, IVF 4OHE<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs IVF KSOM group. Mann -  
 707 Whitney - Wilcoxon test.

708 **Figure 3. Transcription levels of hypoxia related genes (*Hif-1 $\alpha$* , *Cox-2*, *Prdx5*, *Glut-***  
 709 ***1*, *Glut-3*) in IVF obtained embryos and in IU developed embryos.** Results analyzed  
 710 by RT-qPCR are plotted as the mean  $\pm$  SD, calculated by the  $\Delta\Delta$ Ct method, normalized  
 711 to  $\beta$ -actin. \*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p <0.0001 vs. IVF KSOM group.

712 **Figure 4. Transcription levels of *Egf* and *Vegf* genes in IVF obtained embryos and**  
 713 **in IU developed embryos.** Results analyzed by RT-qPCR are plotted as the mean  $\pm$   
 714 SD, calculated by the  $\Delta\Delta$ Ct method, normalized to  $\beta$ -actin. \*p <0.05, \*\*p <0.01, \*\*\*p  
 715 <0.0001 vs. IVF KSOM group.

716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738

Do Not Distribute

739 **Table 1**

Gene	Primer sequences (5'→3')
<i>Hif-1α</i>	Forward: ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG Reverse: ACTGTTAGGCTCAGGTGAACT
<i>Egf</i>	Forward: CCAGTTGCTACCCTGACTGG Reverse: GAAGGGCTCACTCGATCCTG
<i>Vegf</i>	Forward: CTGCCGTCCGATTGAGACC Reverse: CCCCTCCTTGTACCACTGTC
<i>Glut-1</i>	Forward: CCAGCTGGGAATCGTGTT Reverse: CAAGTCTGCATTGCCCATGAT
<i>Glut-3</i>	Forward: ATGGGGACAACGAAGGTGAC Reverse: GTCTCAGGTGCATTGATGACTC
<i>Cox-2</i>	Forward: CCAACCTCTCCTACTACACCAGGG Reverse: ACACCTCTCCACCAATGACCTGAT
<i>Prdx-5</i>	Forward: CGGAAAGAAGCAGGTTGGGA Reverse: CATCTGGCTCCACGTTCACT
$\beta$ -Actin	Forward: ACGGCCAGGTCATCACTATTG Reverse: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA

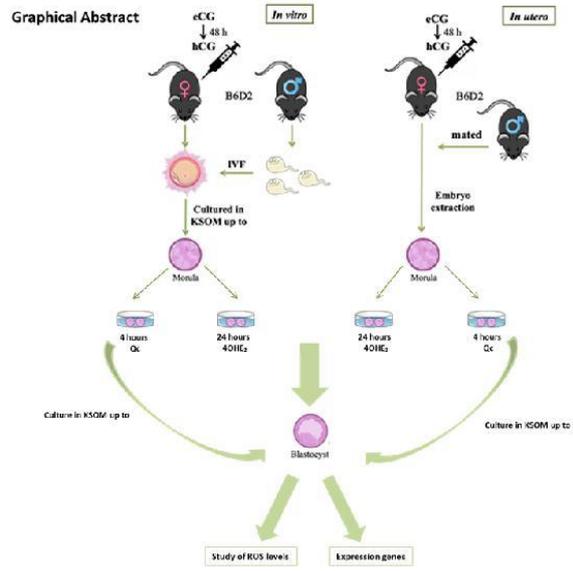
740

**Highlights**

We studied how we could improve the *in vitro* culture media to obtain better quality embryos.

Adding Quercetin and 4OHE<sub>2</sub> to the culture media decreases oxidative stress, improves the quality of the embryo obtained *in vitro* and increases the expression of genes involved in the implantation process.

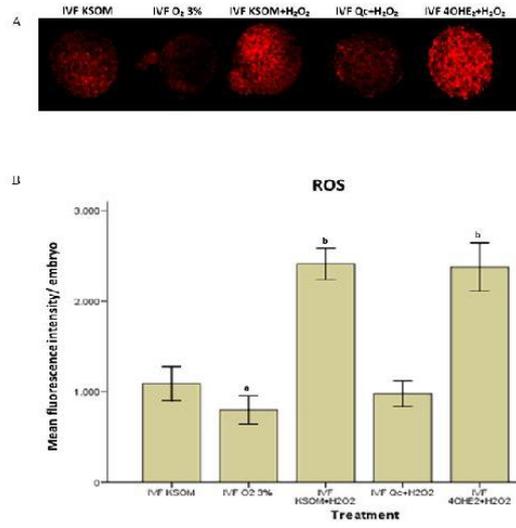
The supplementation of culture media with these compounds could improve the quality of embryos obtained *in vitro* in human IVF clinics and could increase the success rate of their treatments.



254x190mm (96 x 96 DPI)

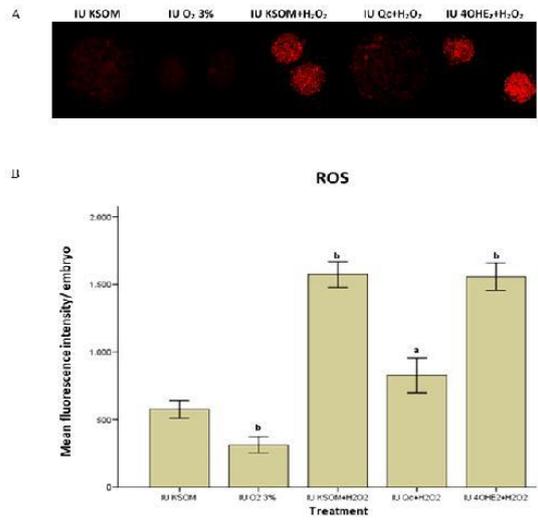
<http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>

Figure 1

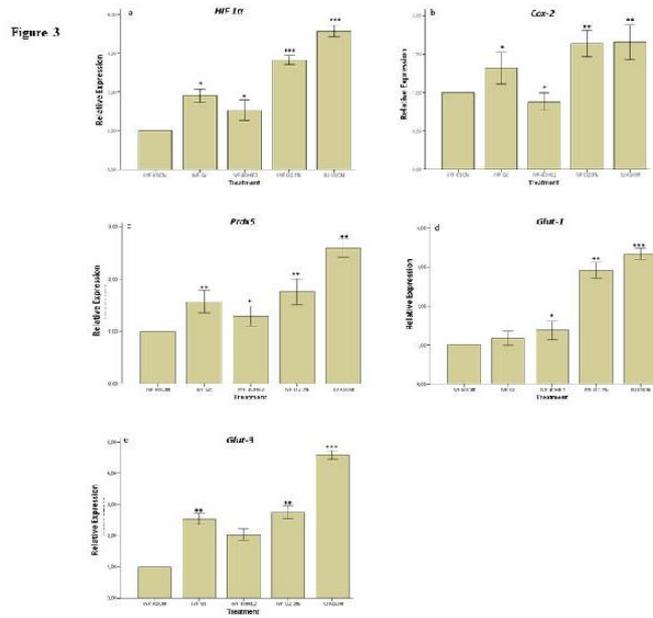


254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 2

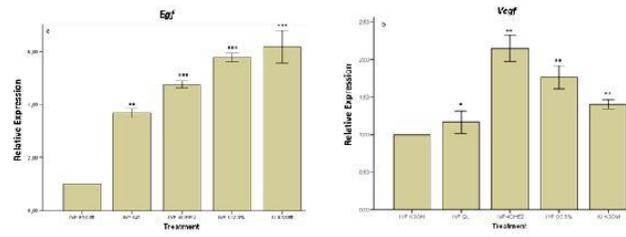


254x190mm (96 x 96 DPI)



254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 4



254x190mm (96 x 96 DPI)

## **ANEXO II: Otras publicaciones científicas**



## ANEXO II: Otras publicaciones científicas

### Otras publicaciones derivadas de la tesis doctoral

**Resumen de comunicación a congreso:** Quality of mouse IVF blastocysts after addition of quercetin to the culture media at the morula stage. Nuria Hernández Rollán, Marta López Morató, José Mijares Gordún, Soledad Sánchez Mateos, Francisco Miguel Sánchez Margallo, Ignacio Santiago Álvarez Miguel. *Anim. Reprod.*, v.16, n.3, p.690, Jul./Sept. 2019.

### Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

**Comunicación Poster:** N Hernández Rollán, M López Morató, J Mijares Gordún, S Sánchez Mateos, FM Margallo Sánchez, IS Álvarez Miguel. Efectos de la quercetina en los medios de cultivo de embriones de ratón obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV). X Congreso de ASEBIR (Cáceres), 23 - 25 Oct 2019.

**Comunicación Poster:** N Hernández Rollán, M López Morató, J Mijares Gordún, S Sánchez Mateos, FM Sánchez Margallo, IS Álvarez Miguel. Quality of mouse ivf blastocysts after addition of quercetin to the culture media at the morula stage. Annual meeting of AETE 2019 (Murcia), 13 – 14 Sep 2019

**Comunicación Oral.** N. Hernández Rollán, C. Tobajas Vega, E. Matilla Pinto, J. Mijares Gordún, F.M. Sánchez Margallo, I.S. Álvarez Miguel, B. Macías García. Efecto de la adición de quercetina en los medios de cultivo de fecundación *in vitro* (FIV): desarrollo embrionario y expresión del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (hif-1 $\alpha$ ). VII Congreso ASEBIR. Madrid. 15-17 Noviembre de 2017

**Comunicación Poster.** Hernández N., Tobajas C., Matilla E., Mijares J., Macías-García B. Efecto de la suplementación con quercetina en el desarrollo preimplantacional de mórulas de ratón. XXX Congreso Nacional de Técnico Superior en Laboratorio Clínico y Biomédico y Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico, celebrado en Cádiz (España) los días 26 y 27 de mayo del 2017

**Comunicación Poster.** Hernández N., Matilla E., Macías-García B., Tobajas C., Mijares J., Sánchez-Margallo F. M., Álvarez I.S. Addition of 4-hydroxyestradiol (4ohe2) improves

implantation rates of murine embryos. Congreso The European Society for Domestic Animal Reproduction-ESDAR. 27-29 de octubre 2016, Lisboa, Portugal.

**Comunicación Poster.** Hernández N., Matilla E., Tobajas C., Mijares J., Sánchez- Margallo F.M., Álvarez I.S. Improvement of implantation rates on mouse embryos obtained by *in vitro* fecundation by media supplementation. I Congreso Ibérico de Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), de 18-20 de noviembre del 2015 CCMIJU.

**Comunicación Oral.** N. Hernández Rollán, E. Matilla Pinto, C. Tobajas Vega, J. Mijares Gordún, FM. Sánchez Margallo, IS. Álvarez Miguel. Mejora del potencial implantatorio de embriones de ratón obtenidos por fecundación *in vitro*. Congreso ASEBIR en San Sebastián, de 18-20 de noviembre del 2015.