



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Control asistido por magnetismo de ovocitos y embriones a través  
de nanopartículas unidas a la zona pelúcida

**D.<sup>a</sup> Gabriela Garrappa**  
**2024**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Control asistido por magnetismo de ovocitos y embriones a través de nanopartículas unidas a la zona pelúcida

Autor: D.<sup>a</sup> Gabriela Garrappa

Director/es: D.<sup>a</sup> María Jiménez Movilla

D. Francisco A. García Vázquez



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR***Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Gabriela Garrappa

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología y Tecnología de la Salud Reproductiva

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Control asistido por magnetismo de ovocitos y embriones a través de nanopartículas unidas a la zona pelúcida.

y dirigida por,

D./Dña. María Jimenez Movilla

D./Dña. Francisco Alberto García Vázquez

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 24 de septiembre de 2024

Fdo.: Gabriela Garrappa

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

| Información básica sobre protección de sus datos personales aportados |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Responsable:                                                          | Universidad de Murcia.<br>Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia.<br>Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es                                                                                                                                                                                                                         |
| Legitimación:                                                         | La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos                                                                                                                       |
| Finalidad:                                                            | Gestionar su declaración de autoría y originalidad                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Destinatarios:                                                        | No se prevén comunicaciones de datos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Derechos:                                                             | Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia |



Este trabajo fue financiado por la  
Fundación Séneca-Agencia de  
Ciencia y Tecnología de la Región de  
Murcia “Ayudas a la realización de  
proyectos para el desarrollo de  
investigación científica y técnica por  
grupos competitivos (20887/PI/18 y  
22001/PI/22)” y “Fundación  
Séneca-Prueba de concepto”  
(21637/PDC/21). Ministerio de  
Ciencia, Innovación y Universidades  
(PID 2020–114109GB-  
I00/AEI/10.13039/501100011033) y  
Ministerio de Ciencia e Innovación  
(PID2019- 106380RB-  
I00/AEI/10.13039/501100011033).





## AGRADECIMIENTOS

Expresar en un par de palabras lo inmensamente feliz y orgullosa que estoy de haberlo logrado es sencillamente imposible. Este camino ha sido mucho más de lo pensado, y me ha dejado mucho más de lo esperado. No había imaginado posible llegar al fin de una tesis doctoral, mirar hacia atrás y sentir que los momentos de felicidad y alegría fueron los que primaron, en todo momento. Gracias por vivir conmigo este viaje, no estaría aquí de no ser por todos ustedes:

Especialmente y, en primer lugar, mi agradecimiento sin fin a mis directores, Fran y María. Me ayudaron a cumplir este sueño, que hoy se materializa y no puedo estar más agradecida. Han sido años intensos de aprender y crecer y ha sido un honor hacerlo junto a ustedes, con su apoyo, motivación y confianza. Gracias por su paciencia, realmente infinita, por motivarme a mejorar siempre, por preocuparse por ayudarme en todo momento, por celebrar conmigo cada logro. ¡¡¡GRACIAS!!!

Gracias a todos los amigos que mi paso por España me regalo. Mis compañeros de largas horas en laboratorio, apoyo para superar frustraciones y compañía en la alegría de cada logro. Chiara, Juli, Sergio, Ale, Ernesto, Jordana, Analu: gracias! por cada café de avellana, por cada almuerzo, por cada caña, por cada viaje, por cada día de aspiración con la mejor musicalización, por tanto que hemos vivido y tan felices hemos sido! Viviré eternamente con *saudades* de todos ustedes.

Gracias al departamento de Fisiología, los he sentido mi hogar.

Agradecer a todos aquellos que de alguna manera colaboraron con la elaboración de esta tesis, personas que incluso no he conocido personalmente y que sin ellas no hubiese sido posible este trabajo.

A mi Rami, mi Porotito, que llegó en el medio del proceso para hacerme más feliz de lo que nunca había imaginado ser, para enseñarme que puedo con todo y con más. Por ser el mejor compañerito de vida. Todo es mejor con vos.

A mis padres, por su apoyo incondicional y por compartir conmigo cada alegría y cada angustia.

A mis amigas, todas, por estar, por preguntar, por acompañar, por reírnos y festejar conmigo todo siempre. Por no dejarme nunca sola, aún en la distancia.

Gracias a todos y cada uno: ¡hoy soy muy feliz!



# ÍNDICE

# ÍNDICE

## ÍNDICE

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN.....                                                                                                                               | 7  |
| 2. SUMMARY.....                                                                                                                               | 17 |
| 3. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                          | 25 |
| 3.1. Nanotechnology.....                                                                                                                      | 25 |
| 3.2. Nanotechnology applied to Assisted Reproductive Technologies (ART) .....                                                                 | 28 |
| 3.2.1. Nanotechnology applied to sperm .....                                                                                                  | 29 |
| 3.2.1.1. Sperm magnetic sorting.....                                                                                                          | 29 |
| 3.2.1.2. Sperm mediates gene transfer (SMGT) .....                                                                                            | 30 |
| 3.2.1.3. Sperm antioxidant activity.....                                                                                                      | 31 |
| 3.2.1.4. Sperm movement control based on surface charged MNP.....                                                                             | 33 |
| 3.2.2. Nanotechnology applied to oocytes and embryos .....                                                                                    | 34 |
| 3.2.2.1. Attachment of NP and microparticles to ZP-targeting and drug delivery .....                                                          | 34 |
| 3.2.2.2. NP for enhancing ART and developmental competences of oocyte in vitro maturation .....                                               | 36 |
| 3.2.2.3. NP for ARTs improvements for increasing the oocytes survival after vitrification .....                                               | 37 |
| 3.2.3. NP for ART improvements of oocytes manipulation and culture systems .....                                                              | 38 |
| 3.2.3.1. Oocyte culture recreating the physiological follicular environment .....                                                             | 38 |
| 3.2.3.2. Magnetic force application for oocytes manipulation.....                                                                             | 39 |
| 3.3. Concerns about the use of nanomaterials on reproduction, potential harmful risk- toxic concerns .....                                    | 40 |
| 4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....                                                                                                                | 44 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                                                                 | 47 |
| 5.1. Reactivos.....                                                                                                                           | 47 |
| 5.2. Autorización ética .....                                                                                                                 | 47 |
| 5.3. Producción y purificación de las proteínas recombinantes oviductina (Ov) porcina truncada (pOVGP1t) y oviductina de coneja (rOVGP1)..... | 47 |
| 5.4. Conjugación de nanopartículas (NP) con Ov y análisis de su estabilidad en el tiempo .....                                                | 48 |
| 5.5. Obtención de gametos, fecundación <i>in vitro</i> y producción de embriones <i>in vitro</i> .....                                        | 49 |
| 5.5.1. Biomodelo porcino .....                                                                                                                | 49 |
| 5.5.1.1. Maduración in vitro de ovocitos porcinos (MIV) .....                                                                                 | 49 |
| 5.5.1.2. Obtención de espermatozoides porcinos .....                                                                                          | 50 |
| 5.5.1.3. Fecundación in vitro porcina (FIV) .....                                                                                             | 50 |
| 5.5.1.4. Cultivo in vitro de embriones porcinos (CE) .....                                                                                    | 51 |
| 5.5.2. Biomodelo de conejo.....                                                                                                               | 51 |
| 5.5.2.1. Sincronización de las hembras y obtención de embriones.....                                                                          | 51 |
| 5.5.2.2. Cultivo in vitro de embriones de conejo.....                                                                                         | 52 |
| 5.6. Co-incubación de NPOv con gametos y embriones.....                                                                                       | 52 |

# ÍNDICE

|              |                                                                                                                                                                          |           |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.6.1.       | Co-incubación de ovocitos/embriones porcinos con NPOv .....                                                                                                              | 52        |
| 5.6.2.       | Co-incubación de espermatozoides porcinos con NPOv .....                                                                                                                 | 52        |
| 5.6.3.       | Co-incubación de embriones de conejo con NPOv.....                                                                                                                       | 53        |
| <b>5.7.</b>  | <b>Análisis del porcentaje de cobertura de la ZP de ovocitos porcinos por NPOv.....</b>                                                                                  | <b>53</b> |
| <b>5.8.</b>  | <b>Evaluación de la viabilidad de gametos y embriones.....</b>                                                                                                           | <b>55</b> |
| 5.8.1.       | Biomodelo porcino .....                                                                                                                                                  | 55        |
| 5.8.1.1.     | Análisis de la actividad metabólica de gametos porcinos incubados con NPOv .....                                                                                         | 55        |
| 5.8.1.2.     | Análisis de la calidad de los espermatozoides sometidos a la presencia de NPOv .....                                                                                     | 57        |
| 5.8.1.3.     | Tiempo de digestión de la ZP .....                                                                                                                                       | 59        |
| 5.8.1.4.     | Análisis de los resultados de la FIV y CE porcinos.....                                                                                                                  | 59        |
| 5.8.2.       | Biomodelo conejo.....                                                                                                                                                    | 61        |
| 5.8.2.1.     | Estudios in vitro: tasa de desarrollo embrionario.....                                                                                                                   | 61        |
| 5.8.2.2.     | Estudios in vivo: tasa de implantación, tasa de nacidos vivos y peso corporal al nacimiento .....                                                                        | 62        |
| <b>5.9.</b>  | <b>Respuesta del tejido oviductal y uterino de conejas a la presencia de embriones-NPOv.....</b>                                                                         | <b>63</b> |
| <b>5.10.</b> | <b>Estudio de la capacidad de atracción de ovocitos/embriones unidos a NPOv sometidos a un campo magnético .....</b>                                                     | <b>65</b> |
| <b>5.11.</b> | <b>Secuenciación del ARN (ARN-seq) de embriones porcinos .....</b>                                                                                                       | <b>67</b> |
| <b>5.12.</b> | <b>Análisis de la del estado oxidativo de ovocitos porcinos unidos a NPOv y atraídos por un campo magnético .....</b>                                                    | <b>69</b> |
| <b>5.13.</b> | <b>Reversibilidad de la unión de ovocitos porcinos a NPOv .....</b>                                                                                                      | <b>70</b> |
| <b>5.14.</b> | <b>Evaluación de la dinámica de desplazamiento (velocidad-aceleración) del complejo ovocito-NPOv cuando se someten a campos magnéticos de diferente intensidad .....</b> | <b>71</b> |
| <b>5.15.</b> | <b>Eficacia de un dispositivo magnético sobre el manejo de los complejos ovocito/embriones-NPOv .....</b>                                                                | <b>72</b> |
| <b>5.16.</b> | <b>Análisis estadístico .....</b>                                                                                                                                        | <b>74</b> |
| <b>6.</b>    | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                                                                                  | <b>77</b> |
| <b>6.1.</b>  | <b>Conjugación de las NP con OVGP1 y análisis de su estabilidad en el tiempo .....</b>                                                                                   | <b>77</b> |
| <b>6.2.</b>  | <b>Análisis de la unión específica de NPOv a la ZP de ovocitos y embriones porcinos.....</b>                                                                             | <b>78</b> |
| <b>6.3.</b>  | <b>Evaluación de la viabilidad de gametos y embriones en presencia de NPOv .....</b>                                                                                     | <b>79</b> |
| 6.3.1.       | Biomodelo porcino.....                                                                                                                                                   | 79        |
| 6.3.1.1.     | Análisis de la actividad metabólica de gametos porcinos incubados con NPOv .....                                                                                         | 79        |
| 6.3.1.2.     | Parámetros de calidad de los espermatozoides sometidos a la presencia de NPOv.....                                                                                       | 81        |
| 6.3.1.3.     | Evaluación del tiempo de digestión de la ZP en presencia de NPOv .....                                                                                                   | 87        |
| 6.3.1.4.     | Análisis de los resultados de la fecundación in vitro y el cultivo in vitro embrionario .....                                                                            | 87        |
| 6.3.2.       | Biomodelo conejo .....                                                                                                                                                   | 90        |
| 6.3.2.1.     | Estudios in vitro: Tasa de desarrollo embrionario. ....                                                                                                                  | 90        |
| 6.3.2.2.     | Estudios in vivo: tasa de implantación, tasa de nacidos vivos y peso corporal al nacimiento .....                                                                        | 91        |

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.4. Estudio de la capacidad de atracción de ovocitos y embriones unidos a NPOv cuando se someten a un campo magnético .....                                           | 94  |
| 6.5. Secuenciación del ARN (ARN-seq) de embriones porcinos .....                                                                                                       | 97  |
| 6.6. Análisis del estado oxidativo de ovocitos porcinos incubados con NPOv y sometidos a la atracción por un campo magnético .....                                     | 99  |
| 6.7. Estudio de la reversibilidad de la unión de ovocitos a NPOv .....                                                                                                 | 101 |
| 6.8. Evaluación de la dinámica de desplazamiento (velocidad-aceleración) del complejo ovocito-NPOv cuando se someten a campos magnéticos de diferente intensidad ..... | 103 |
| 6.9. Determinación de la eficacia de un dispositivo magnético sobre el manejo de los complejos ovocitos/embriones-NPOv.....                                            | 106 |
| 7. DISCUSIÓN .....                                                                                                                                                     | 109 |
| 8. CONCLUSIONS.....                                                                                                                                                    | 131 |
| 9. ABREVIATURAS.....                                                                                                                                                   | 134 |
| 10. ABBREVIATIONS .....                                                                                                                                                | 138 |
| 11. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL .....                                                                                                                 | 141 |
| 12. REFERENCIAS.....                                                                                                                                                   | 144 |

# RESUMEN



### 1. RESUMEN

Las tecnologías de reproducción asistida (TRA) son una serie de técnicas sofisticadas y de alta complejidad empleadas con el fin de obtener mejoras reproductivas. En las últimas décadas se ha visto un auge en el empleo de estas tecnologías, principalmente debido al incremento en los problemas de fertilidad en las parejas, pero también en búsqueda de mejoras en los resultados productivos, así como una tecnología que permite la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Para el uso de las TRA es necesario la manipulación de los gametos (espermatozoides y ovocitos) y embriones. No obstante, a pesar de los importantes avances en este campo, aún existe gran margen de mejora sobre todo en la manipulación celular la cual requiere de especial manejo y precisión, necesarias para mantener inalterada la capacidad de fecundación de ovocitos y de desarrollo en embriones.

La búsqueda constante de mejoras en las TRA ha dado lugar a numerosos estudios basados en comprender el proceso de fecundación, con el objetivo de mimetizar las condiciones naturales en cultivos *in vitro*. Muchos de estos estudios se han centrado en el oviducto, sus funciones y particularidades fisiológicas, proporcionando información valiosa sobre las proteínas involucradas en la fecundación. Entre estas, la oviductina (OVGP1) ha sido identificada como una de las principales proteínas presentes del fluido oviductal. Su capacidad de adhesión específica a las proteínas de la ZP de los ovocitos, y los efectos derivados de esta interacción, han despertado gran interés y expectativas sobre sus posibles aplicaciones. En particular, se destaca el rol fundamental de la OVGP1 durante la fecundación de ovocitos porcinos en el oviducto, habiendo sido asociada a mecanismos de reducción de la poliespermia. La producción de OVGP1 recombinante ha permitido utilizar sus propiedades para el desarrollo de biotecnologías reproductivas.

Por otro lado, la nanotecnología, un campo relativamente nuevo en la ciencia cuyas aplicaciones crecen continuamente en todo el mundo y en los más variados ámbitos de la vida, se presentan como tecnologías disruptivas con el potencial de resolver problemas que hasta ahora no tenían solución en múltiples áreas. Desde materiales de construcción autolimpiantes y sistemas dirigidos a la recuperación ambiental para la purificación de cursos de aguas naturales contaminados, hasta innovaciones en la

## RESUMEN

industria textil y cosmética, la nanotecnología está revolucionando múltiples sectores. Sin embargo, el desarrollo de aplicaciones nanotecnológicas en biomedicina ha experimentado un progreso extraordinario. La aplicación de nanopartículas (NP) para el diagnóstico de enfermedades tanto *in vivo* como *in vitro*, su uso para dirigir estratégicamente fármacos a células blanco de difícil o imposible acceso, y especialmente, los tratamientos oncológicos revolucionarios, han marcado un avance significativo en el campo médico.

Las aplicaciones nanotecnológicas en el área de la reproducción han acompañado este crecimiento, fundamentalmente para la selección y separación de espermatozoides. El desarrollo de aplicaciones basadas en la funcionalización de NP con moléculas específicas que actúan como biomarcadores para la selección de espermatozoides mediante campos magnéticos, ha recibido un impulso especial. La selección y separación de espermatozoides portadores de algún carácter de interés ha cobrado gran importancia, y su uso se ha incorporado de manera rutinaria en las clínicas de reproducción humana. Sin embargo, las aplicaciones nanotecnológicas desarrolladas para su uso en ovocitos y embriones son más limitadas. Algunos estudios se han centrado en el empleo de NP para mejorar los medios de cultivo *in vitro*, logrando mayores tasas de maduración. En otros casos, se han utilizado para mejorar los resultados de vitrificación, logrando mejores tasas de desarrollo tras el proceso de descongelación. También se han ideado nuevos sistemas para marcar e identificar ovocitos y en base al uso de la nanotecnología, con resultados prometedores. Sin embargo, hasta el momento, no se ha desarrollado ningún sistema basado en nanotecnología para la manipulación de ovocitos y embriones, a pesar de que esta es una de las principales limitaciones en las TRA.

En este trabajo planteamos la hipótesis de que las nanopartículas (NP) superparamagnéticas conjugadas con la proteína oviductina (OVGP1) forman un complejo capaz de unirse específicamente a la parte externa de la zona pelúcida (ZP) de ovocitos maduros y embriones, permitiendo su manipulación sin contacto físico mediante la aplicación de campos magnéticos externos, sin comprometer la viabilidad de gametos y embriones.

## RESUMEN

Con el propósito de desarrollar esta hipótesis planteamos como objetivo general de esta Tesis Doctoral el desarrollo de un sistema para la manipulación de ovocitos y embriones mediante el uso de NP con capacidad de ser atraídas magnéticamente, utilizando la proteína oviductina (OVGP1) como enlace con la ZP a. Para la consecución del objetivo principal nos planteamos los siguientes objetivos específicos: 1) Evaluar la unión entre NP y la OVGP1 (NPOv) y analizar la estabilidad de esta unión; 2) Analizar la unión de los complejos NPOv a la ZP de ovocitos y embriones; 3) Analizar el efecto de las NPOv sobre la viabilidad de gametos y embriones; 4) Evaluar la capacidad de atracción de ovocitos y embriones unidos a NPOv al someterlos a un campo magnético; 5) Analizar el efecto del campo magnético sobre la calidad de los embriones producidos a partir de ovocitos-NPOv; 6) Describir la dinámica del movimiento de ovocitos-NPOv al ser sometidos a campos magnéticos externos de diferente intensidad; y 7) Determinar la eficiencia de un dispositivo magnético para la manipulación de ovocitos y embriones NPOv.

Para el desarrollo de los objetivos en este trabajo se utilizaron dos biomodelos animales, porcino y conejo. El biomodelo porcino se ha utilizado para los estudios *in vitro*, debido a que en esta especie la aplicación de las TRA ha avanzado ampliamente, existiendo gran cantidad de referencias sobre protocolos de maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y cultivo de embriones *in vitro* (CE). Por otro lado, el biomodelo conejo se ha empleado para los estudios *in vivo*, dado sus ventajas fisiológicas tales como un corto periodo de gestación, gran número de crías por parto, posibilidad de transferencia de embriones, y especialmente, la presencia en esta especie de un doble útero y cérvix que permite hacer transferencias con diferentes grupos experimentales a una misma hembra.

Para el desarrollo de los objetivos, en primer lugar, se analizó la capacidad de las NP superparamagnéticas para unirse a la proteína recombinante OVGP1 y su estabilidad a lo largo del tiempo. Para ello, se obtuvieron las proteínas recombinantes OVGP1 porcina (pOVGP1t) y la proteína OVGP1 de conejo (rOVGP1), y se conjugaron con NP superparamagnéticas. A continuación, se analizó la eficiencia y la estabilidad de la conjugación mediante *Western blot*. Los resultados demostraron la presencia de la proteína unida a las NP, manteniendo su estabilidad hasta 31 días después de la conjugación. Posteriormente, se analizó la capacidad del complejo NP-OVGP1 (NPOv)

## RESUMEN

para adherirse de manera específica a la ZP de ovocitos madurados *in vitro* y embriones mediante estudios de co-incubación probando dos volúmenes de NPOv (10 y 20  $\mu$ l) y tres tiempos de incubación (0,5, 1 y 6 h). Los complejos cúmulo-ovocitos (COCs) porcinos se obtuvieron de ovarios recolectados en matadero y sometidos a un proceso de MIV para el análisis de la unión de NPOv a ZP de ovocitos maduros. Adicionalmente, se obtuvo otro grupo de COCs que fue sometido a un protocolo de MIV. Posteriormente, los ovocitos maduros se utilizaron en un protocolo de FIV, y a continuación en CE, con el fin de obtener embriones en diversas etapas de desarrollo para analizar su unión a las NPOv. Los resultados demostraron que una incubación de 30 minutos de NPOv con ovocitos era suficiente para observar la adhesión específica de la NPOv a la parte externa de la ZP. El porcentaje de área cubierta de la ZP de los ovocitos por NPOv se analizó a través de un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador. El mayor porcentaje de área cubierta por NPOv se observó después de 1 h de co-incubación. Del mismo modo, los resultados demostraron la unión de NPOv a la ZP de embriones en diferentes etapas de desarrollo (4 células, mórula y blastocisto).

Tras confirmar la afinidad de la NPOv a la ZP de ovocitos y embriones, se continuó con la evaluación de la viabilidad de gametos y embriones en presencia de NPOv. Para ello, en una primera etapa se trabajó sobre el biomodelo porcino, evaluando el efecto de NPOv sobre los gametos tanto masculino como femenino. En primer lugar, se evaluó la actividad metabólica de los gametos expuestos a NPOv mediante un analizador de flujo extracelular. Los resultados mostraron que no hubo diferencias en la tasa de consumo de oxígeno (OCR) ni en la tasa de acidificación extracelular (ECAR) tanto en ovocitos como en espermatozoides, en comparación con el grupo control sin NPOv. A continuación, se evaluó el efecto de la presencia de NPOv co-incubados con espermatozoides en medios comúnmente empleados en TRA, tanto para la conservación de espermatozoides porcinos para Inseminación Artificial (IA) como para la FIV porcina, evaluando diversos parámetros de calidad espermática. Los espermatozoides se incubaron con dos volúmenes de NPOv (10 y 20  $\mu$ l) en tres tiempos diferentes (0, 30 y 60 min). Los resultados mostraron que no hubo efectos negativos sobre la calidad de los espermatozoides en ninguna de las condiciones analizadas.

## RESUMEN

Por otro lado, se evaluó el efecto de NPOv sobre el endurecimiento de la ZP a través del análisis de su resistencia a ser digerida por proteasas. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el tiempo de digestión de la ZP al comparar los ovocitos del grupo control con los ovocitos unidos a NPOv. Con el fin de analizar el posible efecto de la presencia de NPOv unidos a la ZP de ovocitos maduros sobre su capacidad fecundante, estos se sometieron a un protocolo de FIV. Para ello, se compararon los porcentajes de penetración, monospermia y eficiencia de FIV de tres grupos experimentales: ovocitos unidos a NPOv, ovocitos-NPOv separados de las NP a través de un pipeteo mecánico y ovocitos controles sin NPOv. Los resultados demostraron que no hubo diferencias en ninguno de los parámetros analizados entre los grupos de estudio, indicando que tanto la presencia de NPOv adheridas a la ZP de ovocitos maduros, así como su separación posterior no generan efectos deletéreos en la capacidad fecundante. Adicionalmente, se realizó una FIV con los mismos grupos experimentales de ovocitos y se continuó con CE hasta blastocisto para analizar posibles efectos sobre calidad de los embriones obtenidos. No se observaron diferencias en la tasa de división celular, en la tasa de blastocistos obtenidos, en el diámetro de los blastocistos ni en el número de células por blastocistos en ninguno de los grupos analizados, indicando que la presencia de NPOv no afecta el desarrollo embrionario temprano.

Una vez demostrada la ausencia de efectos sobre gametos y embriones *in vitro* en el biomodelo porcino, continuamos con la segunda etapa del análisis de seguridad biológica *in vivo*, utilizando el biomodelo conejo. En primer lugar, se analizó el efecto de las NPOv adheridas a embriones (cigotos/mórulas tardías) sobre el desarrollo embrionario *in vitro*. Para ello, se incubaron los cigotos/mórulas tardías con NPOv y se continuó con su desarrollo embrionario bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos no evidenciaron efectos adversos en la presencia de las NPOv adheridas a la ZP sobre el desarrollo embrionario hasta blastocisto eclosionado, de manera similar a lo observado en el modelo porcino. A continuación, se evaluó el efecto de la presencia de embriones (cigotos) con NPOv en oviducto y útero de las hembras. Para ello, se transfirieron cigotos con NPOv mediante laparoscopia a hembras receptoras. En primer lugar, se analizó la tasa de implantación, y posteriormente la tasa de gazapos nacidos vivos y su peso al nacimiento. Los resultados obtenidos demostraron

## RESUMEN

la ausencia de un efecto negativo de los embriones-NPOv sobre los parámetros analizados, no observándose diferencias entre el grupo de embriones unidos a NPOv y el grupo control. Adicionalmente, se evaluó la respuesta del tejido oviductal y uterino a la presencia de embriones con NPOv. Con este fin, en día 2 y 6 tras la transferencia de cigotos con NPOv en hembras receptoras, se obtuvieron muestras de tejido oviductal y uterino para su análisis mediante tinción para histopatología convencional. Además, se analizó la proliferación celular (Ki-67) y la respuesta inflamatoria (CD3) en células epiteliales de oviducto y en tejido uterino. Los resultados se compararon con los grupos controles, un grupo de hembras transferidas con cigotos sin NPOv y un control adicional de hembras no gestantes. Los resultados demostraron que la presencia de embriones con NPOv no tuvo ningún efecto sobre el tejido oviductal ni uterino.

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran la seguridad del uso de esta metodología sobre gametos y embriones en las condiciones analizadas. A continuación, se validó su posible aplicación para la manipulación de ovocitos y embriones. Para ello, se estudió la capacidad de ovocitos y embriones unidos a NPOv de ser atraídos por un campo magnético externo tras su exposición. En este análisis, se analizaron tres tiempos de incubación con NPOv para ovocitos (0,5, 1 y 6 h) y dos tiempos para embriones (1 y 2 h). Tras la incubación a cada uno de los tiempos establecidos, los ovocitos/embriones-NPOv se expusieron a un campo magnético, y se contabilizó la cantidad de estructuras atraídas por dicho campo. Los resultados mostraron que, para los ovocitos, una incubación de 0,5 h fue suficiente para obtener una atracción cercana al 90% de las estructuras por el campo magnético. Por su parte, los ovocitos control, incubados con NP sin OVGP1, resultaron escasamente atraídos cuando se incubaron 0,5 y 1 h. Sin embargo, tras una incubación de 6 h, tanto los ovocitos incubados con NPOv y el control eran igualmente atraídos por el campo magnético, indicando que a ese tiempo de incubación las NP se unen inespecíficamente a la ZP y los ovocitos son igualmente atraídos. En el caso de los embriones, los resultados mostraron que se necesitaron 2 h de co-incubación para obtener un porcentaje de atracción alto (cercano al 90%). Adicionalmente, se evaluó la condición de maduración de ovocitos atraídos y no atraídos por el campo magnético, diferenciándolos en maduros o inmaduros. Este estudio evidenció que los ovocitos atraídos por el campo magnético externo correspondían a

## RESUMEN

ovocitos maduros, mientras que los ovocitos no atraídos correspondían principalmente a ovocitos inmaduros, lo que indica una selección de ovocitos competentes a través de esta metodología.

Una vez validada y demostrada la atracción de ovocitos y embriones unidos a NPOv, en un siguiente estudio se evaluó el efecto del uso de campos magnéticos sobre la viabilidad y capacidad fecundante de los ovocitos tratados. Con este fin, ovocitos-NPOv sometidos a la atracción por un campo magnético y ovocitos controles sin NP no sometidos a un campo magnético se emplearon en un protocolo de FIV y CE. Los resultados indicaron que no existían diferencias en la tasa de división y de blastocistos al comparar ambos grupos. Además, se comparó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en ovocitos-NPOv atraídos y ovocitos controles sin NPOv ni campo magnético. Los niveles observados de producción de ROS intracelular en ovocitos de ambos grupos experimentales no mostraron diferencias. Adicionalmente, se realizó un estudio de secuenciación del ARN en embriones de 7 días post-inseminación, obtenidos a partir de FIV de ovocitos unidos a NPOv, atraídos por un campo magnético y posteriormente sometidos a un protocolo de CE, a fin de analizar el efecto de la exposición a NPOv y a campos magnéticos sobre la calidad de embriones obtenidos. Los resultados mostraron que las NPOv y el campo magnético no tuvieron efectos significativos sobre el transcriptoma de los embriones obtenidos a partir de ovocitos expuestos a ambos factores. Menos del 0,3% de los genes estudiados presentaron una expresión diferencial en comparación con los embriones control no expuestos a los factores indicados anteriormente (NPOv y campos magnéticos). Además, a partir de estos resultados, se realizó la evaluación particular de genes relacionados con el estrés oxidativo (CAT, GPX1, GPX3, GPX4, SOD 1 y SOD2) para analizar posibles efectos sobre el estado oxidativo de los ovocitos-NPOv expuestos al campo magnético. De igual manera, los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la expresión de genes en los embriones obtenidos a partir de ovocitos-NPOv atraídos y ovocitos control sin NPOv ni expuestos al campo magnético.

Los diferentes experimentos realizados han demostrado que la aplicación de esta tecnología no afecta negativamente la eficiencia de las TRA. Sin embargo, dado que en algunas TRA podría ser deseable la ausencia de NP, se realizó un estudio para analizar la

## RESUMEN

viabilidad de separar los ovocitos de las NPOv. En este ensayo, se estudiaron dos métodos: uno mecánico (pipeteo con micropipeta) y otro químico (presencia de tripsina en bajo porcentaje (0,5%)), así como, la combinación de ambos. Los resultados demostraron que la unión entre los ovocitos y las NPOv es reversible, indicando que podrían separarse efectivamente de manera sencilla si fuese preciso.

Adicionalmente, se estudió la dinámica del desplazamiento de ovocitos unidos a NPOv al ser sometidos a campos magnéticos de diferente intensidad. Para ello, se utilizó un estereomicroscopio acoplado a una cámara digital para grabar el desplazamiento, y posteriormente, se analizó el movimiento mediante un programa informático. Se probaron tres imanes con diferentes fuerzas magnéticas. Los resultados demostraron que la distancia recorrida por los ovocitos y el tiempo empleado aumentaron al aumentar la fuerza de sujeción del imán. En todos los casos, la velocidad inicial era lenta y la aceleración casi nula cuando los ovocitos se encontraban distantes del imán. Con imanes de baja fuerza magnética, el movimiento de los ovocitos mostró una respuesta lineal, mientras que, con imanes de mayor fuerza, el movimiento se volvió no lineal.

Finalmente, se demostró que los ovocitos y los embriones pueden ser manipulados de manera eficiente en medios de trabajo como el PBS, así como en medios de vitrificación, utilizando una pipeta magnética diseñada específicamente para este fin. Además, se analizó el tiempo empleado para movilizar ovocitos-NPOv dentro de los 4 pocillos de una placa en medio PBS, comparando los dos sistemas: pipeta magnética y pipeta tradicional de aspiración (Stripper®). Los resultados mostraron una mayor eficiencia al utilizar la pipeta magnética en comparación con la aspiración mecánica de la pipeta tradicional, tanto al trabajar con ovocitos de manera individual como en grupos de 10 y 20 ovocitos, logrando una reducción significativa en los tiempos de manipulación para tareas rutinarias de laboratorio. Por otro lado, al analizar el tiempo empleado en realizar un protocolo de vitrificación completo comparando ambas pipetas (magnética y aspiración), se evidenció una reducción en los tiempos de trabajo cuando se desplazaban grupos de ovocitos-NPOv (3 y 5), pero no se observaron diferencias significativas en el tiempo empleado para completar el protocolo de vitrificación cuando se trabajó con ovocitos-NPOv de manera individual.



## RESUMEN

En resumen, esta Tesis Doctoral ha desarrollado y validado una herramienta sólida e inocua, basada en la funcionalización de NP magnéticas con una proteína recombinante que actúa de nexo específico con la ZP de ovocitos y embriones. Este trabajo ha demostrado que el sistema puede ser utilizado de manera segura para la manipulación de ovocitos y embriones mediante campos magnéticos, permitiendo su direccionamiento y/o posicionamiento. Esta novedosa herramienta tiene un gran potencial en las TRA, con aplicaciones prometedoras en diferentes especies.

# S U M M A R Y

## 2. SUMMARY

Assisted reproductive technologies (ART) encompass a series of sophisticated and highly complex techniques used to achieve reproductive improvements, whether for reproductive purposes in humans or for productive purposes in the animal world. In recent decades, the use of these technologies has undergone a rapid development, driven primarily by the increasing incidence in fertility problems in couples, but also due to their growing importance as tools for improving productive results (efficiency and quality of livestock production) and their essential role in the conservation of endangered species. Despite significant advancements in this field, one of the major limitations of reproductive technologies remains unsolved: the need for extremely precise handling of oocytes and embryos, as they require highly controlled conditions to maintain their fertilization potential in the case of the oocyte and their development quality in the case of the embryos.

The constant search for improvements in ART has resulted in countless studies aimed at deciphering the mystery of fertilization to mimic natural conditions *in vitro*. Understanding the role of reproductive organs in this process has been the main objective of several works. Particularly, those investigating the oviduct, its functions, and physiological particularities, which have provided detailed insights into the proteins involved in fertilization. Among these, oviductin (OVGP1) has been described as one of the most significant proteins present in oviductal fluid. Its specific and intrinsic capacity to bind to the ZP of oocytes, and the consequences of this interaction, have aroused great interest, generating expectations about its potential applications. Notably, OVGP1 plays a crucial role in the fertilization of porcine oocytes in the oviduct, having been associated to mechanisms that reduce polyspermy. The production of recombinant OVGP1 has opened up possibilities for using its particularities in various biotechnological developments.

On the other hand, nanotechnologies, a relatively new rapidly expanding field, is being applied across a wide range of industries and is emerging as a disruptive technologies with the potential to solve previously intractable problems. From self-cleaning construction materials and systems for environmental remediation, such as treating

## S U M M A R Y

contaminated natural water sources, to advancements in the textile and cosmetics industries, its impact is far-reaching. Nonetheless, the most remarkable progress has been made in the development of nanotechnology for biomedical applications. Numerous innovative uses of nanoparticles (NP) have been developed for *in vivo* and *in vitro* diagnostic, drug delivery, and revolutionary oncological treatments.

The development of NP-based applications in reproduction also experienced significant growth, mainly in the area of sperm selection. Various systems based on the functionalization of NP with specific biomarkers for selecting high-quality spermatozoa via magnetic fields have been developed and are now used in human reproduction clinics. However, the use of nanotechnology for oocytes and embryos remains limited. Some improvements have been achieved, such as in improved maturation rates through the addition of NP in *in vitro* culture media and enhanced post-thaw development rates by incorporating NP during the vitrification process. Moreover, a novel NP-based tool for labelling and identifying oocytes and embryos has shown promising results. Despite these advancements and considering the handling of oocytes and embryos remains one of the greatest challenges in ART, no technologies have yet been developed specifically to facilitate their manipulation.

The main objective of this Doctoral Thesis was to develop, validate, and ensure the safety of a new system for manipulating oocytes and embryos based on the specific attachment of magnetic NP to the zona pellucida using the oviductin protein as a link (NPOv). This novel system enables the external labeling of oocytes and embryos with NP conjugated to OVGP1, allowing their manipulation and guidance via an external magnetic field. This technology turns out as a promising tool for use in ART. Since NPOv are designed to be in direct contact with ZP of gametes and embryos, ensuring their biological safety was a primary objective of this work. On the other hand, analyzing the functionality of this system became another fundamental aim.

First, the conjugation of superparamagnetic NP with the recombinant OVGP1 protein was probed, and its stability over time was analyzed. To achieve this, two recombinant proteins were obtained: porcine OVGP1 proteins (pOVGP1t) and rabbit OVGP1 proteins (rOVGP1), and subsequently conjugated with NP. The efficiency and stability of the conjugation were analyzed by Western blot, confirming the presence of both proteins

## S U M M A R Y

bound to the NP. Also, the stability of the conjugation was proven for up to 31 days. Subsequently, the ability of NPOv complex to specifically adhere to the ZP of *in vitro* matured oocytes and embryos was analyzed through co-incubation analysis testing two NPOv volumes and three different incubation times. For this purpose, porcine cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained from ovaries collected in the slaughterhouse and subjected to *in vitro* maturation (IVM), followed by *in vitro* fertilization (IVF) and embryo culture (CE) protocols to obtain embryos at different developmental stages for binding analysis. The results demonstrated that a 30-minutes incubation of oocytes with NPOv was enough to observe the specific adhesion of NPOv to the external part of the ZP. The percentage of ZP surface covered by NPOv was analyzed through a computer-assisted image analysis system, which revealed a maximum coverage after 1 h of co-incubation. Embryos at different developmental stages (4-cell, morula, and blastocyst) were also co-incubated with NPOv. The observation under an inverted microscope also confirms the specific adhesion of NPOv to the ZP surface.

After confirming the affinity of NPOv for the ZP of oocytes and embryos, the next step was to discard any negative effects of NPOv on the viability of gametes and embryos. Two biological models were used: the porcine model for *in vitro* analysis, and the rabbit model for *in vivo* evaluation. The initial stage of the study was done using the porcine model. First, the metabolic activity of gametes exposed to NPOv compared to a control group was analyzed using an extracellular flow analyzer. The results showed no differences in either the oxygen consumption rate (OCR) or the extracellular acidification rate (ECAR) in both gametes: oocytes and sperm. Moreover, the effect of NPOv on sperm quality was assessed in two standard ART media: BTS (a sperm preservation medium) and TALP (an IVF medium). Two volumes of NPOv were tested at three different incubation times. The results indicated that NPOv had no negative effects on sperm quality under the analyzed conditions.

According to the bibliography, OVGP1 bound to NP could modify ZP by increasing its resistance to protease digestion. However, no differences were observed in ZP digestion time between oocytes in the NPOv group and the control group. To analyze the possible effects of NPOv attached to the ZP on oocyte quality and fertilization capacity, the oocytes were subjected to an IVF protocol. The percentages of penetration,

## S U M M A R Y

monospermy, and IVF efficiency were compared across the three treatment groups: oocytes bound to NPOv, oocytes where NPOv were mechanically separated by gentle pipetting, and control oocytes without NP. The results obtained showed no significant differences in any of the parameters among the groups, indicating that the presence of NPOv attached to the ZP, or their subsequent removal, did not negatively affect oocyte fertilization capacity. Additionally, to analyse the effects of NPOv on embryo quality, fertilized oocytes from the same experimental groups were *in vitro* cultured and continued their development until blastocyst. The results showed no significant differences in any of the parameters evaluated, including cleavage rate, blastocyst formation rate, blastocyst diameter, or cell number per blastocyst across the groups. This indicates that the presence of NPOv does not affect embryo development.

Once the absence of effects of the *in vitro* exposure to NPOv of gametes and embryos has been demonstrated in the porcine model, the next phase of the analysis focused on assessing *in vivo* safety using the rabbit model. First, the effect of NPOv bound to embryos (zygotes-late morulas) on *in vitro* embryo development was analyzed. Zygotes/late morulas were incubated with NPOv and cultured under *in vitro* conditions. The results showed no adverse effects on embryo development rates up to the hatched blastocyst stage, similar to porcine results. Later, the effect of the presence of embryos (zygotes) with NPOv on implantation rate, live birth rate, and newborn weight were evaluated, and the results demonstrated no significant differences between NPOv-bound embryos and the control groups, indicating no negative effects on these parameters.

Additionally, the response of the rabbit oviduct and uterus to the presence of NPOv-bound embryos was evaluated. Reproductive tracts from foster mothers were collected on days two and six after the transfer of zygotes-2 cell embryos with NPOv. Oviducts and uterine horns histological samples were stained with a hematoxylin and eosin (H&E) stain for histopathological evaluation. The proliferative rate of epithelial cells in the oviducts and the inflammatory response (CD3) in uterine tissue were evaluated. Results were compared to control groups: females transferred with zygotes without NPOv and non-pregnant rabbits. The findings showed no adverse effects of NPOv-bound zygotes or 2-cell embryos on either oviductal or uterine tissues.

## S U M M A R Y

The results obtained so far confirm the safety of this novel technology for gametes and embryos under the analyzed conditions. The next step in this work was to validate the application of this method for oocyte and embryo handling. The ability of oocytes and embryos bound to NPOv to be attracted by an external magnetic field was studied. To achieve this, three incubation times for oocytes (0.5, 1, and 6 h) and two times for embryos (1 and 2 h) with NPOv were evaluated. After each incubation period, oocytes/embryos with NPOv were exposed to an external magnetic field, and the attracted structures were registered. The results showed that a 0.5 h incubation with NPOv was enough to attract approximately 90% of the structures. Control oocytes incubated with NP without OVGP1 were only weakly attracted after 0.5 and 1 h incubations. However, after a 6 h incubation, both oocytes incubated with NPOv and control oocytes were equally attracted to the magnetic field, indicating that at this incubation time, the attraction became nonspecific. For embryos, the results showed that two hours of co-incubation were needed to obtain an attraction rate close to 90%. Additionally, the maturation condition of oocytes attracted and not attracted by the magnetic field was evaluated, differentiating between mature and immature oocytes. This study showed that the oocytes attracted by the magnetic field were predominantly mature, while non-attracted oocytes were mainly immature. These results indicate the valuable possibility of using this tool for the selection of mature oocytes.

After validating the attraction of oocytes and embryos with NPOv by magnetic fields, a subsequent study was conducted to assess the effects of exposure to an external magnetic field on oocyte viability and fertilization ability. For this, oocytes-NPOv exposed to an external magnetic field and control oocytes without NPOv (and not exposed to the field) were fertilized and cultured *in vitro* until the blastocysts stage. Cleavage and blastocyst rate was addressed, and the results demonstrated no differences between the groups, indicating the neither NPOv nor magnetic field exposure had any adverse effects on embryo development. Additionally, an RNA sequencing study was performed on 7 dpi embryos obtained from IVF of NPOv-attached oocytes that were attracted by a magnetic field and then subjected to a CE protocol. This was done to analyze the effects of NPOv exposure and and magnetic fields on embryos quality. The results demonstrated no detrimental effects on either embryo

## S U M M A R Y

development or the transcriptome, with less than 0.3% of the genes studied displaying differential expression when compared to unexposed control embryos.

Up to this point, any harmful effects of NPOv on gametes, embryos, and oviductal and uterine tissue have been ruled out. However, since certain ART procedures may require the absence of NP, a study was conducted to analyze the feasibility of separating oocytes from NPOv. In this trial, both mechanical (soft pipetting with a micropipette) and chemical (using a low concentration of trypsin) methods were tested, as well as the combination of the two). The results have shown that the oocyte-NPOv bind is reversible, indicating that separation is possible if needed.

Furthermore, the dynamics of oocytes-NPOv movement in response to different magnetic fields strengths were studied through a descriptive analysis. The movement of oocytes-NPOv was recorded using a stereomicroscope coupled to a digital camera, and the data were analyzed with a computer program. Three different magnetic strengths were tested. The results showed that the distance traveled, and the time needed for oocyte movement increased with higher magnetic strength. In all cases, when oocytes were far from the magnet, their movement was slow with near-zero acceleration. At low magnetic strength, the oocyte movement was linear, but at higher magnetic strengths, response became nonlinear.

Finally, it was demonstrated that oocytes and embryos can be efficiently manipulated in two different media: PBS, a working medium, and in vitrification media, by a magnetic pipette designed for this purpose. The time needed to complete three transfers across a 4-well plate was measured in both media (PBS and vitrification). The results showed that the magnetic pipette was more efficient than the traditional pipette in PBS, significantly reducing handling times, whether working with individual oocytes or groups. In the vitrification medium, efficiency improved when handling groups of oocytes, but no differences were detected when working with individual oocytes.

In summary, this doctoral thesis has developed and validated a robust and safe tool based on the functionalization of magnetic NPs with a recombinant protein that acts as a specific link to the ZP of oocytes and embryos. This work has demonstrated that the system can be used safely to manipulate oocytes and embryos through external



## S U M M A R Y

magnetic fields for precise direction and positioning. This novel technology has great potential for application in ART across various mammalian species, representing an invaluable advancement toward a new era of reproductive technologies.

# INTRODUCCIÓN

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1. Nanotechnology

Nanotechnology is a relatively new field in science in charge of studying molecules within the nanoscale, known as nanoparticles (NP) (Durfey et al., 2019; Hill & Li, 2017). This new area of knowledge has arrived in recent years as a disruptive technology with the potential to solve unresolved difficulties in many areas, especially biomedicine. In this sense, nanotechnology can help resolve current technological challenges but also, provides an opportunity for novel and radical technologies to be born when it seemed impossible before (Bilgili & Uysal, 2019).

Since nanotechnology allows to elaborate, characterize, and adapt specifically the functional properties of NP for many uses, numberless nano-applications have attracted followers in almost all aspects in life (Angelakeris, 2017; Mehta, 2017; Mohammed, Gomaa, Ragab, & Zhu, 2017). Research, industrial communities, biomedicine, environmental process and many other fields are using nowadays nanotechnologies benefices (Berry & Curtis, 2003; Feugang, 2017; Mehta, 2017). In an overly optimistic view, it has been proposed that nanotechnologies have the potential to change the global economy, leading to changes of incalculable dimensions in human life over the next 15 to 20 years (Bilgili & Uysal, 2019).

Although the overall concept of NP defines them as particles between 1 and 1000 nm in size (Kreuter, 1996), there is no consensus on the limits of the size of a particle to be considered a nanoparticle (Lu, Salabas, & Schüth, 2007). Even though, a large number of authors point out the importance of reduced size for their use on organisms (for example, the recommended size for it uses in cancer treatment vary between 70 and 200 nm), size influences both the clearance and the biodistribution of NP (Gaumet, Vargas, Gurny, & Delie, 2008). In this sense, exposure routes and duration, dose, size, shape, charge, composition or surface-coating of NP are some of the key factors in determining their impact (Silva et al., 2021). As a general rule, all NP should have an exceptionally high surface area/volume ratio; this is one of the reasons for some of its most impressive properties (Christian, Von Der Kammer, Baalousha, & Hofmann, 2008).

## INTRODUCCIÓN

In general terms, a nanoparticle consists of a basic structure divided into two or three layers, a core material (which usually gives it its name), a protective layer that covers the core, and a functionalizable surface layer, responsible for the functionality of the NP (Christian et al., 2008; Feugang, 2017). Different NP classifications have been proposed according to specific particularities of NP. For example, a widely used criterion is to classify the NP i) by their shape as: spherical, cylindrical, tubular, conical, hollow core, spiral, flat, etc.; ii) by its application or utility for: therapeutic, diagnosis, nutrition, etc. (El-Sayed & Kamel, 2020); or iii) by its composition, which is divided into two types of NP: organic and inorganic. Organic nanomaterials are proteins, lipids and polymers, being these NP the most widely used in biomedical field for drug delivery since they are highly biodegradable and non-toxic. In the inorganic NP group, many sub-categories can be recognized: carbon based (fullerenes, nanotubes), semiconductors (cadmium, selenium, etc.), metal based (gold, silver, platinum) and oxides-based NP (magnetic and superparamagnetic iron oxides) (Anselmo & Mitragotri, 2016; Barkalina, Jones, & Coward, 2016; Ealias & Saravanakumar, 2017).

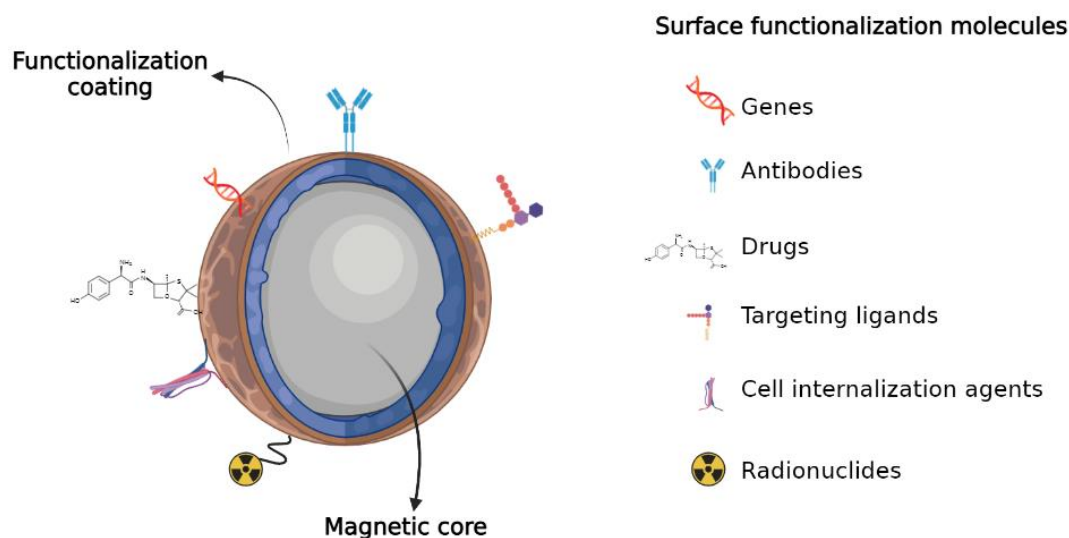
Within the great variety of NP, magnetic nanoparticles (MNP) have gained great interest in the last decades, mainly due to their characteristics and properties. A numberless of high-impact applications have been developed with MNP, with special emphasis on the biomedical industry (Cardoso et al., 2017; Huang & Juang, 2011; Mohammed, Gomaa, Ragab, & Zhu, 2017; Reddy, Arias, Nicolas, & Couvreur, 2012).

The MNP are usually constituted of two different parts: a magnetic core material (cobalt, nickel and iron oxide being the most popular) and a functionalization coating (Cristea, Tertis, & Galatus, 2017; Kozissnik, Bohorquez, Dobson, & Rinaldi, 2013) (Fig 1). Their nucleus gives them the peculiarity of being manipulated and directed to a defined location, using external magnetic fields, while their coating (silica, phospholipids, fatty acids, polysaccharides, peptides, or other surfactants and polymers) allows researchers to functionalize them according to almost every interest (Cristea et al., 2017; Lu et al., 2007; Xiao & Du, 2020).

Moreover, MNP have many special attributes, one of the most fundamental being their biotolerance. In general, all iron oxide MNP, also called superparamagnetic iron oxide NP (SPIONs), are well tolerated by the cells since this kind of iron is endogenous to the

## INTRODUCCIÓN

body. Furthermore, most of SPIONs are coated with materials that are highly biocompatible and also allows to functionalize the external cover with molecules as drugs, proteins, plasmids, etc. (Neuberger, Schöpf, Hofmann, Hofmann, & Von Rechenberg, 2005).



**Figure 1:** Schematic image of a magnetic nanoparticle composition.

Other properties of SPIONs include their superparamagnetism, which prevents these MNP from retaining magnetism once the magnetic field is removed, a process known as hysteresis (Xiao & Du, 2020). This particularity helps in avoiding the formation of agglomerates are characteristic especially necessary for its use *in vivo*, since the agglomerations can give rise to embolisms (Berry & Curtis, 2003; Feugang, 2017; Kim, Shin, & Cho, 2012; Singh, Jenkins, Asadi, & Doak, 2010). Also, their limited size (nanometer) and huge surface area to mass ratio are benefits for biological novel application (Lu et al., 2007; Singh et al., 2010). Medical imaging, magnetic guided vectors, targeted drug delivery, gene therapy, protein purification, biolabeling, bioseparation, magnetic resonance imaging and many other applications give to MNP a privileged place in biomedicine (Kim et al., 2012; Laurent, Saei, Behzadi, Panahifar, & Mahmoudi, 2014).

### 3.2. Nanotechnology applied to Assisted Reproductive Technologies (ART)

The term ART was defined as all interventions that include the *in vitro* handling oocytes and sperm or embryos for a reproductive purpose, representing a set of highly sophisticated techniques and improvements in order to brought reproduction (Zegers-Hochschild et al., 2017). In recent decades, ART have experienced a spectacular increase in demand, mainly due to the increase in fertility problems in human couples (Chambers et al., 2021), but also due to the productive improvements that their implementation in livestock entails and the possibility of their application in the conservation of the genome of endangered species (Bolton et al., 2022; García-Vázquez et al., 2019; Hansen, 2020).

This increase in demand came along with a significant advancement in the development and effectiveness of these techniques, driven by the medical and scientific community's interest in further improving them (Sutcliffe & Ludwig, 2007). Techniques like *in vitro* fertilization (IVF) have become essential today that they are now being implemented even in middle-income countries, with some governments offering them to their citizens (Adamson et al., 2006). Moreover, other technologies have also arrived and revolutionized ART as we known, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), cryopreservation of gametes and embryos, or novel systems for embryo culture (El-Toukhy, 2019; Hwang et al., 2010).

Even though recent advances in this field, many challenges and limitations remain to be addressed (Mishra & Lohiya, 2016). In this context, nanotechnology has found a more than productive and broad niche for developing applications aimed at improving ART. For some time now, biomedicine has been focused on developing nanotechnological applications to enhance the diagnosis and treatment of fertility issues (Shandilya, Mishra, Pathak, Lohiya, & Sharma, 2020). The study and development of new uses of nanotechnology for ART could represent a significant advancement in improving these techniques.

Applications of nanomaterials were developed mainly directed to the male gamete, as tools for high-quality spermatozoa selection (Durfey et al., 2019; Feugang et al., 2019). Many NP uses to improve sperm-related biotechnologies were reported, such as sex

sorting (Rath et al., 2013), sperm quality selection (Durfey et al., 2019; Feugang et al., 2015, 2019; Odhiambo et al., 2014; Yousef et al., 2020), sperm-mediated gene transfer (SMGT) (Kim et al., 2009; Wang et al., 2017), spermatozoa imaging and detection (Vasquez, Feugang, Willard, Ryan, & Walters, 2016), and the protection of high-quality sperm to extend their preservation (Jahanbin et al., 2021; Sánchez-Rubio et al., 2020). Recently, some approaches have even been made for the production of sperm microrobots, achieving control of sperm movement by MNP and producing microswimmers that emulate the movement of motile sperm cells (Chang, Chang, Wang, & Yu, 2019; Magdanz et al., 2020). On the other hand, the development and application of nanotechnology for oocyte and embryos are scarce, though this area is increasingly attracting the interest of researchers (Fynnewever et al., 2007; Kim et al., 2021; Kim et al., 2018; Novo et al., 2013; Remião et al., 2018).

### **3.2.1. Nanotechnology applied to sperm**

#### **3.2.1.1. Sperm magnetic sorting**

Recently, novel techniques for the selection and separation of abnormal spermatozoa were developed based on nanotechnological tools due to the many advantages MNP applications offered (Feugang et al., 2015). Simplicity and low cost, along with high sensitivity and specificity make nanotechnologies an excellent tool (Odhiambo et al., 2014; Said et al., 2008). Biomarker-based sperm selection has undergone a great deal of development and application since abnormal sperm have been shown to have a particular expression of surface determinants molecules (Feugang et al., 2019; García-Vázquez, Luongo, Garrappa, & Rodríguez Tobón, 2020). The basis of the technology is simple, the functionalization of the MNP with these molecules allows the separation of damaged spermatozoa through their selective binding and subsequent separation by applying an external magnetic field (Bisla et al., 2021; Gil, Sar-Shalom, Melendez Sivira, Carreras, & Checa, 2013; Kang & Park, 2005; Yousef et al., 2020).

For example, when acrosomal damage happens, glycans are exposed to the surface and a variety of lectins have the ability to bind specifically to these glycoconjugates and can be excellent candidates for its use in this technique (Graham, Kunze, & Hammerstedt, 1990; Nagy, Jansen, Topper, & Gadella, 2003). Moreover, another molecule, ubiquitin is exposed on the surface of abnormal sperm, so an anti-ubiquitin antibody could be

## INTRODUCCIÓN

employed to recognize defective sperm and remove them from the semen sample (Bisla et al., 2021).

Among the first published applications of this technology was its use for the separation of apoptotic spermatozoa in human ejaculates by functionalize MNP with annexin V for its ability to target apoptotic sperm (Dirican et al., 2008). This method was proposed as a tool for the improvement of ART outcome, especially in the conception rate of couples with un-explained infertility (Dirican et al., 2008; Khalid & Qureshi, 2011; Romany, Meseguer, Garcia-Herrero, Pellicer, & Garrido, 2010). The integration of this method as part of sperm preparation techniques is currently used routinely in human reproduction laboratories (Falchi, Khalil, Hassan, & Marei, 2018; Zhang et al., 2018).

On the other hand, in the animal world, one of the first approaches in this area was made by Odhiambo et al. in 2014 (Odhiambo et al., 2014) using bull semen. In this study the authors achieve sustainable improvement in viability and fertilizing ability *in vitro* and *in vivo* by magnetic nanopurification of spermatozoa. About the 30% of abnormal sperm were removed from the sample, using two different functionalized MNP: one coated with the lectin peanut agglutinin and another coated with an anti-ubiquitin antibody (Odhiambo et al., 2014). Other subsequent work has shown the efficiency of lectins (Feugang et al., 2015). The results showed an improvement in sperm motility after nanopurification, showing no detrimental effect neither in sperm fertilization capacity nor in piglet viability. Moreover, Durfey et al. (Durfey et al., 2019) found similar results, an upgrade in boar sperm motility on nanoselected spermatozoa, employed MNP functionalized with annexin V for apoptotic sperm elimination (Gil et al., 2013). Similarly, significant improvements have been achieved in studies involving donkey (Yousef et al., 2020), camel (Rateb, 2021), and buffalo (Bisla et al., 2021) semen samples.

### **3.2.1.2. Sperm mediates gene transfer (SMGT)**

The pioneer study of Brackett et al. in 1971 (Brackett, Baranska, Sawicki, & Koprowski, 1971) describes for the first time that sperm cells have the capacity to capture foreign DNA. This knowledge was the basis for the develop of a method described by Lavitrano et al. (Lavitrano et al., 1989) based on this intrinsic ability of sperm cells to bind and internalize exogenous DNA and transfer it inside the oocyte at fertilization (Lavitrano, French, Zani, Frati, & Spadafora, 1992; Lavitrano et al., 1989) called SMGT. SMGT



## INTRODUCCIÓN

represents a simple and low-cost alternative technology for producing transgenic animals (Katebi, Esmaeili, & Ghaedi, 2016; Lavitrano et al., 1992). This promising technique has been widely applied in a wide variety of animal species (Gadea, Garcia-vazquez, Canovas, & Parrington, 2012; García-Vázquez, García-Roselló, Gutiérrez-Adán, & Gadea, 2009; Ma et al., 2011). Not with standing, the mayor limitation of this method is its low efficiency, mostly due to the low uptake of exogenous DNA by spermatozoa (García-Vázquez et al., 2011; Lavitrano et al., 2006; Spadafora, 2007) but also because the spermatozoon can be severely damaged during the process, beyond the possibility of repair (Ma et al., 2011; Spadafora, 2007).

Focusing on tools to improve sperm cells' DNA uptake and its survival rate, many approaches have been proposed (Wang et al., 2017). In this sense, MNP exhibit several valuables properties that make them a well-suited tool for its use as gene carrier for SMGT. MNP have the ability to carry long DNA strands, exhibit very low immunogenicity, are easy functionalized with desired molecules, possess high cell penetration capability, and are relatively low-cost (Kim et al., 2012; Makhuf, Qasem, Rubinstein, Gedanken, & Breitbart, 2006; Wang et al., 2017). Magnetofection is a technique based on the possibility of associating a transgene with MNP and introducing these complexes into a cell (sperm in this case) by applying a magnetic field and has the advantage of creating an improved expression of the transgene and minimizing the damage to the cell (Kim et al., 2009; Makhuf et al., 2006). Additionally, complexes DNA and MNP were demonstrated to be bound to spermatozoa at a higher efficiency when compared to traditional methods (just DNA incubation or lipofection). SMGT-NANO was successfully applied to produce transgenic pigs (Kim et al., 2009), mice (Wang et al., 2017), and cattle (Campos et al., 2011).

### ***3.2.1.3. Sperm antioxidant activity***

Cryopreservation and storage of semen at -196 °C in liquid nitrogen is the most widely used technique to maintain the fertilizing capacity of spermatozoa in cattle and humans for an unlimited time (Bisla et al., 2021, 2020; Santo, Tarozzi, Nadalini, & Borini, 2012). Controversially, there is a large amount of evidence indicating that this procedure could cause several damages to spermatozoa (DNA damage, aneuploidy, chromosome fragmentation, among others) (Jahanbin et al., 2021; Ozkavukcu, Erdemli, & Isik, 2008).

## INTRODUCCIÓN

These damages would result in a decrease in viable sperm cells and, consequently, worse reproductive rates. Oxidative damage is one of the major limitations on sperm quality conservation after cryopreservation (Bisla et al., 2020a), mostly due to changes in sperm plasma membrane and nucleus (Bisla et al., 2020a, 2020b). In any living cell, there is a balanced system that maintains the generation of reactive oxygen species (ROS) in correct equilibrium. When something alters this equilibrium, leading to an imbalance between the production of ROS and the possibility to clear these molecules, a phenomenon known as oxidative stress begins (Cetica, Pintos, Dalvit, & Beconi, 2001).

The use of numerous antioxidants for ROS elimination and/or neutralization have been proposed in order to reduce the negative effects of semen cryopreservation (Kumar et al., 2022; Kumar, Prasad, Srivastava, & Ghosh, 2019). In this sense, metallic oxides of NP have been postulated as antioxidant with a great effectiveness in reducing the damages produced by cryopreservation in sperm. For example, the use of zinc oxide NP (ZnO NP) was tested with a significant improvement in sperm quality in ram by oral administration (Zhang et al., 2015) and in rats by intraperitoneal path (Afifi, Almaghrabi, & Kadasa, 2015). Moreover, several studies have been done testing the supplementation of semen samples with ZnO NP as antioxidants in order to achieve an improvement in sperm quality, viability, and fertilizing capacity. The addition of different volumes of ZnO NP on bull semen samples showed an improvement in mitochondrial sperm activity, a decrease in malondialdehyde (MDA) (one of the final products of fatty acids peroxidation in cells) (Yazdanshenas et al., 2016), an enhancement on the functionality of sperm plasma membrane (Jahanbin et al., 2015), and an increase in blastocysts rate with no adverse effect on further embryo development and pregnancy rate (Jahanbin et al., 2021). Also, the addition of these NP in the cryopreservation medium reduced the injury to human spermatozoa due to freeze and thaw techniques (Isaac et al., 2017).

The administration of cerium oxide NP (CeO<sub>2</sub> NP) has also been successfully tested intraperitoneally in rats (Moridi et al., 2018), and by supplementation in semen samples, achieving in improved sperm quality and sperm DNA integrity, along with a reduction in membrane lipid peroxidation (Falchi, Khalil, Hassan, & Marei, 2018; Hosseinmardi, Siadat, Sharafi, Roodbari, & Hezavehei, 2022).

**3.2.1.4. Sperm movement control based on surface charged MNP**

Over the past decade, the development of microrobots has emerged in the scientific community, with researchers from a wide variety of fields making significant contributions to this area (Giltinan, Sridhar, Bozuyuk, Sheehan, & Sitti, 2021; Sitti & Wiersma, 2020). Moreover, the advances of nanotechnological applications have given even more impetus to the development of microrobots or better called nanomicrobots (Shen, Cai, Wang, Ge, & Yang, 2023). The moving control of these tiny robots is realized by humans or computer programs, based on optical, acoustic, or magnetic fields (Sitti & Wiersma, 2020). Between these sources, magnetic field control has undergone more impressive innovation and application in microrobots development. This is largely due to the advantages this technology offers for medical applications, including being harmless to organisms and allowing for easy, precise, and fast remote control (Chang, Chang, Wang, & Yu, 2019; Giltinan et al., 2021; Shen et al., 2023; Sitti & Wiersma, 2020).

Among many limitations, asthenozoospermia (reduced percentage of motile sperm in the ejaculate below the lower reference limit) is a substantial issue related to male fertility alteration (Chang et al., 2019; Singh, Hasan, Ansari, & Mahajan, 2020). In this condition, the spermatozoon is normal and healthy but incapable of moving effectively in order to achieve oocyte fertilization. Although there are technologies capable of performing IVF, independent to a certain extent from the movement of the sperm, they are pretty complex and their cost is often excessive (Singh et al., 2020). In this sense, several studies have been carried out in an attempt to provide the sperm with the ability to move quickly and effectively and to reach the oocytes based on magnetic fields uses.

One of the first approaches was made by Khalil et al. (Khalil, Dijkslag, Abelman, & Sarthak, 2014), where they demonstrated the possibility of imitating the shape and movement of sperm in a self-propelled microrobot referred to as MagnetoSperm. These microrobots consist of a magnetic head and a flexible tail that can swim using a propulsion mechanism based on oscillating weak magnetic fields.

Some years later, Chang et al., (Chang et al., 2019) designed a mechanism to manipulate sperm movement by an external magnetic field using surface charged MNP. This advance demonstrates that the simple fact that the membrane on the surface of the

spermatozoa has a negative charge allows it to attract MNP with a positive charge and when this duo is subjected to a magnetic field, the NP are attracted, mobilizing the sperm. In addition, the authors postulate that the use of a magnetic field and iron oxide ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) MNP has the advantage of being harmless to the organisms in which it must be used (Chang et al., 2019). Some years later, in 2020, a new technique for the production of soft magnetic microswimmers that emulate sperm movement via electrostatic self-assembly propulsion was presented (Khalil, Magdanz, Simmchen, Klingner, & Sarthak, 2020; Magdanz et al., 2020). The authors proposed that applying a partial coating of the sperm head with NP through electrostatic self-assembly enable the propagation of motion waves in the flagellum under the influence of a magnetic field (Khalil et al., 2020; Magdanz et al., 2020). This technology was called IRONSperm, and the biocompatibility of these microrobots was successfully demonstrated.

## **3.2.2. Nanotechnology applied to oocytes and embryos**

### ***3.2.2.1. Attachment of NP and microparticles to ZP-targeting and drug delivery***

The zona pellucida (ZP) is a relatively thick acellular glycoprotein matrix that fully surrounds and protects the oocyte's plasma membrane (Bleil & Wassarman, 1980; Shabanowitz & O'Rand, 1988). ZP has a vital role in mammalian oocytes and embryos up to the early blastocysts stage (Wassarman, 2008). This external structure is responsible for the protection of the oocytes from the foreign environment but also have fundamental functions on fertilization (prevents polyspermy) and early development of the embryo prior to implantation (Bleil & Wassarman, 1980; Kim et al., 2021; Shabanowitz & O'Rand, 1988).

However, due to the presence of ZP it is extremely difficult to achieve molecules as drugs or genes delivery into oocytes/embryos by traditional carriers (Kim et al., 2021). In this respect, several advances have been proposed regarding the addition of molecules (either microparticles or NP) to the external part of the ZP in oocytes and embryos (Fynewever, Agcaoili, Jacobson, Patton, & Chan, 2007; Novo, Ibáñez, Barrios, Castell, & Nogués, 2013). Additionally, there have been efforts to facilitate the entry of these molecules through the ZP (Kim et al., 2021; Kim et al., 2018) either for tagging purposes or for drug and factor delivery. In this sense, one of the earliest approaches was conducted by Fynewever et al. (Fynewever et al., 2007), which aimed to compare

## INTRODUCCIÓN

different methods of NP applications for embryo tagging in mice. The study compared intracytoplasmic injection of NP into embryos with the external application of NP to the ZP for tagging. The authors concluded that external tagging was more effective, but only up to the blastocyst stage, as the presence of NP beyond this stage inhibited embryo hatching.

Furthermore, a novel method for labeling oocytes and embryos using encoded microparticles was developed and patented (Santaló Pedro et al., 2010). In this method, micrometer-sized polysilicon barcodes were attached to the ZP for individual labeling of oocytes and embryos, with mouse samples used as the model. Three different biomolecules were tested for barcode binding to the ZP: two lectins, wheat germ agglutinin (WGA) and phytohemagglutinin-L, and an anti-ZP2 antibody. WGA demonstrated to be the most suitable biomolecule for the attachment to the ZP, as it remained bound to the ZP during and after the zona reaction and persisted up to blastocyst stage in *in vitro* embryo culture (Novo et al., 2013). In another approach, these authors analyzed the possibility of binding these polysilicon barcodes to the ZP of human oocytes and embryos during ART. In this case, the tagging system was effective only for oocytes used in ICSI and for embryos, but not for oocytes destined for IVF or for sperm (Novo et al., 2014). Furthermore, this technology was tested in bovine ART, where effective labeling and identification of zygotes from different donors were confirmed, allowing for successful collective embryo culture. Targeting bovine embryos with this biomolecule proved feasible, without affecting embryo development rates or vitrification/devitrification survival percentages (Novo et al., 2014). This method promises a simple and secure manner to identify oocytes and embryos, ensuring safe traceability. It holds great potential application in assisted reproduction programs, both in humans and in animal production (Santaló Pedro et al., 2010).

On the other hand, Kim et al. (Kim et al., 2018), have demonstrated the successful delivery of polylactic-co-glycolic acid NP (PLGA-NP) labeled with a fluorescence dye inside sperm, oocytes, and early embryos without harmful effects on embryo development. Further, the same group in 2021, have studied the use of NP as a drug delivery carriers inside the oocytes, by passing through the ZP (Kim et al., 2021). Among three different types of NP tested, only tetramethylrhodamine-loaded PLGA- NP (TRNP)

were able to completely pass through the ZP and can be proposed as feasible and safe oocyte's drug delivery carrier. Interestingly, in this work it was found that size was not the main limiting factor for the entry of NP into the oocyte cytoplasm. The authors confirm that the effect of the charge and the composition of the NP surface was greater than their size in the efficiency to penetrate the ZP. In this sense, neutral charge NP have shown a greater acceptance to enter the oocyte.

### ***3.2.2.2. NP for enhancing ART and developmental competences of oocyte in vitro maturation***

The *in vitro* maturation (IVM) technique involves the collection and selection of immature oocytes (complex cumulus-oocytes) from non-stimulated females, followed by their exposure to an IVM medium to achieve gametes ready for fertilization by spermatozoa. This procedure is the first step in *in vitro* embryo production, and it is well-established that the quality of the embryo directly depends on the success of IVM in obtaining a high-quality mature oocyte (Ferris, Mahboubi, MacLusky, King, & Favetta, 2016; Lonergan et al., 2003).

It has been shown that the IVM process could alter mRNA expression and DNA integrity, leading to oocyte damage that reduces its quality (Cetica, Pintos, Dalvit, & Beconi, 2001; Lonergan et al., 2003). One of the main causes of damage to the oocyte during IVM is the increase on the ROS production due to *in vitro* environments conditions (Cetica et al., 2001; Dalvit, Cetica, Pintos, & Beconi, 2005; Tamura et al., 2008; Wang et al., 2014). The supplementation of the IVM medium with antioxidant biomolecules was raised as a possible solution to oxidative stress while the oocytes are under *in vitro* conditions, but it was shown that these molecules are unstable under culture conditions (reviewed by Remião et al., 2018).

In this sense, Remião et al. (Remião et al., 2016) confirmed that the addition of nano-encapsulated melatonin significantly improves bovine embryonic development *in vitro*. The study demonstrated improvements in cleavage and blastocyst rate, embryo quality, reduced levels of ROS, a low number of apoptotic cells per blastocyst, and better gene expression regulation when melatonin was supplemented in nano-encapsulated form compared to its unencapsulated counterpart. The authors conclude that this effect is

due to the fact that melatonin encapsulation improved its release throughout the *in vitro* embryo production process.

Other approaches for improving bovine oocyte IVM have involved supplementing the maturation medium with selenium (Se), copper (Cu), or zinc oxide (Zn-O) NP (Abdel-Halim, Moselhy, & Helmy, 2018; Abdel-Halim & Helmy, 2017). The addition of these Se, Cu, and Zn-O NP to the IVM medium resulted in better maturation rates. Additionally, a decrease in DNA damage and an increased in intracellular glutathione (GSH) concentrations in both oocytes and cumulus cells were observed.

Moreover, the addition of cerium dioxide NP (CeO<sub>2</sub> NP) during IVM of oocytes from prepubertal ovine was also analyzed. While these NP were internalized by cumulus cells, they were not found in the oocytes. The study observed a lower abundance of mRNA related to the apoptosis pathway and oxidative stress. It was confirmed that a low concentration of CeO<sub>2</sub> NP improved *in vitro* embryo production using oocytes from prepubertal ovine (Ariu et al., 2017). Additionally, another study tested the addition of chitosan NP to the IVM medium, achieving a significant reduction in the oxidative damage (higher levels of GSH, lower ROS levels) and better developmental competence in porcine oocytes (Roy et al., 2021).

### **3.2.2.3. NP for ARTs improvements for increasing the oocytes survival after vitrification**

Similar to sperm cryopreservation, the cryopreservation of oocytes and embryos is a valuable tool for the conservation and storage of genetic material for future use (Bernard & Fuller, 1996). Vitrification, an ultra-rapid cooling technique, has emerged as one of the most effective strategies for oocytes and embryos cryopreservation (Amir & Roth, 2008; Chang et al., 2019). The main advantages of vitrification include preventing ice crystal formation within the cells and the minimizing exposure to potentially toxic cryoprotective agents (Zhou, Li, Fang, Zhang, & Dai, 2015). Despite being one of the most effective cryopreservation techniques for oocytes, vitrification still presents limitations, as fertility results and embryo development rates after warming are often inferior to those achieved with fresh gametes (Zhou et al., 2015). In this sense, the incorporation of NP (specially MNP) into cryoprotectant has been shown to enhance the survival and

## INTRODUCCIÓN

development rates of oocytes after vitrification (Abbasi et al., 2021; Li et al., 2016; Zhou et al., 2015).

One of the first approaches for improving porcine oocyte vitrification demonstrated that the survival rate of oocytes was significantly higher when hydroxyapatite NP (HA-NP) were added to the vitrification solution (Zhou et al., 2015). The authors hypothesized that the presence of HA-NP at an optimal concentration improved oocyte survival rates by preventing recrystallization of the solution during rewarming (Zhou et al., 2015). In a subsequent study, the vitrification of porcine germinal vesicle (GV) oocytes was analyzed using four different types of NP. HA-NP not only improved oocyte survival but also enhanced embryo development rates with minimal toxicity (Li et al., 2016).

Moreover, the effects of supplementing cryoprotectants with zinc oxide NP (Zn-O NP) on vitrified bovine oocytes and embryos were also studied (Abdel-Halim & Helmy, 2017). The study described a significantly higher percentage of normal oocytes after vitrification and warming when Zn-O NP were added compared to the control group without NP. Likewise, blastocysts vitrified with Zn-O NP showed a higher rate of embryo re-expansion rate after vitrification-devitrification than those in the control group studied (Abdel-Halim & Helmy, 2017). Furthermore, the addition of MNP ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NP) into the vitrification medium was tested for the cryopreservation of mouse GV oocytes. The results indicated that  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NP may protect immature oocytes from cryodamage and help address some of the major issues associated with the vitrification of mouse GV oocytes (Abbasi, Baniasadi, Hajiaghalou, Ghalamboran, & Fathi, 2018; Abbasi et al., 2021).

### **3.2.3. NP for ART improvements of oocytes manipulation and culture systems**

#### **3.2.3.1. Oocyte culture recreating the physiological follicular environment**

Conventional oocyte culture systems (defined culture media) do not accurately recreate the physiological conditions that occur *in vivo* (Rossi et al., 2019). This challenge becomes even more difficult when culturing preantral follicles *in vitro*, as it is essential to mimic the dynamics of the physiological environment to achieve correct cellular communication and interaction of factors necessary for producing a quality oocyte ready for fertilization (Green & Shikanov, 2016). Potential applications of this technology



## INTRODUCCIÓN

include fertility restoration and/or preservation in women and girls undergoing aggressive chemotherapy treatments (De Vos, Smits, & Woodruff, 2014; Jeruss & Woodruff, 2009; Shea, Woodruff, & Shikanov, 2014). Similarly, it could aid in genome conservation efforts for endangered species (Santos et al., 2010). In livestock, the ability to culture preantral follicles *in vitro* would facilitate reproduction of prepubertal females with high genetic merit, reducing the generation interval (Baruselli et al., 2016).

Further work in this area has developed an easier and more cost-effective method for 3D culture using MNP (Antonino, 2017; Antonino et al., 2019). This system consists of the assembly of MNP (gold and iron oxide) to the external surface of bovine follicles, followed by levitating the follicle-NP complex using an external magnetic field. This technique resulted in higher follicle viability and lower degeneration rates of follicles compared to the traditional culture systems. Moreover, the culture models used in this approach were able to sustain follicle development for up to 16 days, whereas in traditional systems, follicles typically begin to degenerate as early as day 4 (Antonino et al., 2019).

### **3.2.3.2. Magnetic force application for oocytes manipulation**

The culture of a wide variety of cells is a routine activity in laboratories worldwide, often requiring continuous cell manipulation. In some cases, precise positioning of individual cells or groups of cells is necessary. The manipulation and positioning of cells have gained importance in recent years, driven by advances in targeted drug therapies, regenerative medicine, and reproductive technologies (Abdullah, Atazhanova, Chavez-Badiola, & Shivhare, 2022; Feng et al., 2021). Over the past decades, there has been a significant demand for improvements in cell handling techniques, alongside a growing need for automation in the manipulation of cells (Hu & Sun, 2011). It has been suggested that cell manipulation can be carried out in two ways, with physical contact or without physical contact (Feng et al., 2021). The more traditional technique involves the use of micropipettes (Zhang et al., 2012). However, advances in nano- and micro-robotics have led to numerous studies focused on achieving contactless cell manipulation which could ultimately enable the automation of cell culture processes (Feng et al., 2021).

In the field of reproduction, as the global demand and need for ART continues to increase, surpassing the current capacity of fertility clinics, there is a substantial

## INTRODUCCIÓN

requirement for automation in ART treatments automation is crucial for enhancing the efficiency and accessibility of these procedures (Abdullah et al., 2022). Furthermore, to enhanced outcomes and reduce costs, there is growing interest in minimizing reliance on highly qualified personnel. This can be achieved through the use of intelligent robots capable of performing standardized and automated tasks (Syed et al., 2020).

In recent decades, magnetic micro/nanoparticle-based techniques have been developed to contribute to the automatization of ART (Boukallel, Gauthier, Dauge, Piat, & Abadie, 2007). Novel systems designed for this purpose include devices for mechanical cell characterization, such as oocyte classification, and for non-invasive cell transport (Boukallel, Gauthier, Dauge, Piat, & Abadie, 2007). The first system measures the mechanical rigidity of the oocytes for cell characterization and classification, using a micro/nano-force sensor that levitates by a diamagnetic levitation principle. The second device, known as “micropusher” is a novel system for single-cell transportation. It consists of a ferromagnetic particle that can be mobilized by a magnetic field in a desire direction (Boukallel, Gauthier, Dauge, Piat, & Abadie, 2007). These developments were the first approaches toward potential automation in ART.

### **3.3. Concerns about the use of nanomaterials on reproduction, potential harmful risk- toxic concerns**

To ensure the safe use of NP-based applications, the absence of toxicity is one of the most critical requirements. Unfortunately, many general toxic effects of NP have been described (reviewed by Jiang et al., 2019). Toxicity from different nanomaterials have been observed in plants, fungi, vertebrates, and invertebrates (Levard, Hotze, Lowry, & Brown, 2012). Moreover, negative effects from their use were documented on environment and human health (Klaine et al., 2008; Levard et al., 2012). As a result, specialized field of toxicology, known as nanotoxicology, has emerged to study the adverse effects of NP on cells and organisms (Caldeira, Paulini, Silva, Azevedo, & Lucci, 2017). NP properties, that make NP so interesting for biomedical uses, such as size, shape, load, material, quantity, structure and surface coating, are highly correlated to their potential risks (Feugang, 2017; Hou & Zhu, 2017; Singh, Jenkins, Asadi, & Doak, 2010). It has been demonstrated that NP biodistribution and accumulation *in vivo* are highly dependent on their size (Semmler-Behnke et al., 2014; Yang et al., 2015). A major

## INTRODUCCIÓN

limitation related to their small size is that the smallest NP can cross many physiological barriers, such as the blood-brain barrier (Hussain et al., 2009; Wang et al., 2010), potentially causing harmful effects on cells and organs (McAuliffe & Perry, 2007).

In the field of reproduction, there has been a considerable increase in the development of NP-based applications aimed at improving reproductive technologies, which has consequently increased the need to study their potential toxicity. Research on the reproductive toxicity (reprotoxic effects) of NP remains controversial, with differing findings across studies. Some publications have specifically addressed their effects on gametes, highlighting the need for further investigation in this area (Falchi, Khalil, Hassan, & Marei, 2018). Numerous NP-based applications for male gamete selection techniques have been developed (Feugang et al., 2019). Selected sperm viability was analyzed in ART protocols, and no significant toxic effects were observed. For example, studies reported no alterations in motility, functionality or viability in bovine or porcine sperm (Caldeira et al., 2017; Durfey et al., 2019; Feugang et al., 2015). Even healthy offspring were obtained in some of these studies (Feugang et al., 2015; Makhluף et al., 2006; Odhiambo et al., 2014). Controversially, several studies have demonstrated the toxic effects of NP on sperm cells at different stages (Ema, Kobayashi, Naya, Hanai, & Nakanishi, 2010; Falchi et al., 2018; Lan & Yang, 2012). *In vitro* studies demonstrated cytotoxic effects of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) and carbon black (CB) (Komatsu et al., 2008) NP on mouse Leyding Cells, and alterations on mouse spermatogonia stem cells after exposure to silver (Ag), aluminum (Al) and molybdenum trioxide (MoO<sub>3</sub>) NP (Braydich-Stolle, Hussain, Schlager, & Hofmann, 2005). Likewise, toxic effects on human sperm motility have been observed caused by gold NP exposure (Wiwanitkit, Sereemasapun, & Rojanathanes, 2009). *In vivo* studies have shown adverse effects of TiO<sub>2</sub> and CB NP (Hong et al., 2015; Takeda et al., 2009; Yoshida et al., 2009) on spermatogenesis in mice, and of nickel (Ni) NP on sperm motility in rats (Kong et al., 2014).

Furthermore, female gametes are potentially at risk when exposed to nanoscale materials (Hou & Zhu, 2017; Taylor et al., 2015; Tiedemann et al., 2014). Some studies have reported detrimental effects of different types of NP on oocyte maturation and related parameters. The addition of gold, Ag, and gold-Ag alloy (Taylor et al., 2015), CeO<sub>2</sub> (Preaubert et al., 2015), Ag (Huang, Yeh, & Chan, 2018), and fullerenol NP (Lei et

## INTRODUCCIÓN

al., 2018) to *in vitro* maturation medium has shown an important reduction in oocyte quality, as evidenced by decreased meiosis resumption, and adverse effects on fertilization, cleavage, and blastocyst rate. In addition, evidence indicate that certain types of NP can cross reproductive barriers (Wang et al., 2018) such as the blood–testis barrier, placental barrier, and epithelial barrier, which protect reproductive tissues and the fetus. For example, translocation of gold NP from maternal blood to the fetus was observed in mice when the particle size ranged from 1.4 to 18 nm, whereas gold particles of 80 nm could not cross the placental barrier (Kim, Shin, & Cho, 2012; Semmler-Behnke et al., 2014). It has also been postulated that silver NP may be more toxic to oocytes and embryos than gold NP, with toxicity linked to dosage and particular size (reviewed by Taylor et al., 2015).

There is currently insufficient data to fully understand the potential harmful effects of NP on reproductive organs and cells. The lack of studies, especially regarding NP toxicity on oocytes and embryos, combined with the rapid development of novel nanomaterial-based techniques to improve ART, underscore the urgent need for further research and knowledge generation (Shandilya, Mishra, Pathak, Lohiya, & Sharma, 2020; Bisla et al., 2022).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis** de este trabajo se basa en que nanopartículas (NP) superparamagnéticas conjugadas con la proteína oviductina (OVGP1) crean un complejo capaz de unirse específicamente a la parte externa de la zona pelúcida (ZP) de ovocitos maduros y embriones, permitiendo así su manipulación sin contacto físico mediante la incorporación de campos magnéticos externos y sin alterar la viabilidad de gametos y embriones.

El **objetivo general** de este trabajo es desarrollar una metodología para la manipulación de ovocitos y embriones mediante NP con capacidad de atracción magnética, utilizando la proteína OVGP1 como nexo específico, utilizando dos modelos animales, porcino y conejo. Para ello, se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar la unión de las NP con la OVGP1 (NPOv) y la estabilidad de esta unión a lo largo del tiempo.
2. Evaluar y describir la unión de los complejos NPOv con la ZP de ovocitos y embriones.
3. Analizar el efecto de NPOv sobre la viabilidad de gametos y embriones mediante el estudio de los siguientes aspectos:
  - a. Efecto de la presencia de NPOv sobre el metabolismo celular de gametos, evaluado a través de la tasa del consumo de oxígeno y la acidificación del medio extracelular.
  - b. Efecto de NPOv unidos a ZP de ovocitos sometidos a protocolos de fecundación *in vitro* y cultivo embrionario *in vitro*.
  - c. Efecto de NPOv sobre la tasa de implantación, tasa de crías nacidas vivas y peso nacimiento.
  - d. Respuesta de los tejidos oviductal y uterino (morfometría, proliferación celular y respuesta inflamatoria) tras la transferencia de embriones NPOv.
4. Estudiar la capacidad de atracción de ovocitos y embriones unidos a NPOv cuando se someten a un campo magnético.
5. Analizar el efecto del campo magnético sobre la calidad de los embriones producidos a partir de ovocitos NPOv.

## HIPOTESISYOBJETIVOS

6. Describir la dinámica de movimiento de ovocitos-NPOv al ser sometidos a campos magnéticos externos de diferente intensidad.
7. Determinar la eficiencia de la aplicación de un dispositivo magnético para la manipulación de ovocitos-embriones NPOv.

# MATERIALES Y MÉTODOS



### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1. Reactivos

Los reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich Química (Madrid, España), a no ser que se indique lo contrario.

#### 5.2. Autorización ética

Aquellos procedimientos realizados en la especie porcina se aprobaron por el Comité Ético para la Experimentación con Animales de la Universidad de Murcia el 1 de junio de 2020 (proyecto de referencia PID2019-106380RB-I00 y comité ético de referencia 567/2019). Los procedimientos donde se utilizaron conejos se aprobaron por el Comité Ético de la Universitat Politècnica de València (código de investigación: 2018/VSC/PEA/0116). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los principios de regulaciones y guías recomendados por la directiva 2010/63/EU EEC.

#### 5.3. Producción y purificación de las proteínas recombinantes oviductina (Ov) porcina truncada (pOVGP1t) y oviductina de coneja (rOVGP1)

La expresión del plásmido, producción y purificación de las proteínas oviductina porcina truncada (pOVGP1t) y oviductina de coneja (rOVGP1) se realizaron como se describe en Algarra et al., 2016. Brevemente, la proteína recombinante oviductina (Ov) de cada especie se expresó en células HEK 293T usando un plásmido previamente purificado con el kit GenEluted Plasmid. Las células se cultivaron (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad) durante 48 a 72 h hasta que se alcanzó una confluencia del 80 al 90% usando medio DMEM (Dulbecco's Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE. UU.) y glutamina 4 mM (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE. UU.). La transfección se realizó con polietilenimina (PEI) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de 72 h, el medio que contenía la proteína se recogió y se ajustó con imidazol 10 mM, 20 mM Na-HEPES, pH 7.8, 150 mM NaCl y se incubó con Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden, Alemania) durante toda la noche a 4 °C. Finalmente, las proteínas recombinantes se eluyeron utilizando perlas de níquel

## MATERIALES Y MÉTODOS

con imidazol 500 mM, NaCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 150 mM y posteriormente se dializaron frente a TrisHCl 150 mM, NaCl 200 mM y glicerol al 10%. La concentración de proteína se midió por absorbancia a 280 nm. El análisis de las proteínas recombinantes purificadas obtenidas (pOVGP1t y rOVGP1) se realizó mediante espectrometría de masas a través del sistema HPLC/MS, conectando el equipo HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) a un Agilent Ion Trap XCT Plus Espectrómetro de masas (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) utilizando un electrospray.

### **5.4. Conjugación de nanopartículas (NP) con Ov y análisis de su estabilidad en el tiempo**

Se utilizaron nanopartículas paramagnéticas modificadas con carboxilo (-COOH) (Estapor®) (NP) con un diámetro de 0.365  $\mu\text{m}$  y una concentración de 1 mg/ml. La manipulación de las NP se realizó mediante una gradilla magnética (MagRack 6, GE Healthcare, Reino Unido). Para la conjugación se emplearon 10  $\mu\text{l}$  de NP previamente sometidas a un doble lavado en 500  $\mu\text{l}$  de agua milli-Q tras una vigorosa agitación en vórtex. En primer lugar, se activó la superficie de las NP para la conjugación resuspendiendo en 240  $\mu\text{l}$  de tampón de activación (fosfato de sodio 100 mM, pH 6,2), con 30  $\mu\text{l}$  de tampón de conjugación 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida HCl o EDC (ProteoChem, EE. UU.) (50 mg/ml diluido en agua) y 30  $\mu\text{l}$  de tampón de conjugación Sulfo NHS (50 mg/ml diluido en agua) (ProteoChem, EE. UU.). Posteriormente se mantuvieron en agitación suave durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, las NP se lavaron dos veces en 500  $\mu\text{l}$  de tampón de acoplamiento (bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8). Tras ello, se procedió a la conjugación de las NP, donde se incubaron con 6  $\mu\text{g}$  de pOVGP1t o rOVGP1 (Ov) en 300  $\mu\text{l}$  de tampón de acoplamiento a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, las NP conjugadas se lavaron dos veces en tampón de fosfato de sodio 20 mM y se mantuvieron en este medio a 4 °C hasta su uso en un volumen final de 400  $\mu\text{l}$ .

Para comprobar el éxito de la conjugación las proteínas se incubaron con un tampón de carga durante 10 min a 100 °C. Posteriormente, se realizó una electroforesis a 400 miliamperios y 200 voltios durante 40 min donde se utilizó un gel comercial polimerizado de acrilamida-bisacrilamida Novex™ WedgeWell™ 4-20% Tris-Glicina

## MATERIALES Y MÉTODOS

Gel 1.0 mm x 100 Well (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EE. UU.). Tras la electroforesis, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) con un tamaño de poro de 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, Inglaterra), tratado previamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transferencia se hizo en XCell II™ Blot Módulo (Invitrogen™) a 30 voltios y 400 miliamperios durante 1 h y 6 min. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó tres veces con TBS-T (50 mM Tris, pH 7,4, NaCl 150 mM y 0,1% de Tween 20). Posteriormente, se bloqueó la membrana en TBS-T con albúmina de suero bovino (BSA-Sigma A-8022) al 1% durante 1 h en agitación suave y a temperatura ambiente. Después del bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal Anti-OVGP1 (porcino) (Abcam, Cambridge, Inglaterra) en una concentración de 1:10000, o con el anticuerpo Anti-His (Pentahistidina, Qiagen) (porcino y conejo) durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4 °C. Seguidamente, se lavó la membrana con TBS-T tres veces durante 10 min y se incubó con el anticuerpo anti-rabbit-HRP (Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX, EE. UU.) a una concentración de 1:40.000, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 10 min con TBS-T y se reveló utilizando el reactivo Pierce ECL-Plus (Thermo Scientific, EE. UU.). Se utilizó el analizador de imágenes ImageQuant™ LAS 500® para detectar la proteína.

Para evaluar la eficiencia y estabilidad de la conjugación de las NP con la Ov (NPOv) a lo largo del tiempo se realizaron *Western Blot* seriados (de la misma manera que se describió anteriormente), a diversos tiempos de la conjugación (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 24, 31 días). Para garantizar la mejor conservación de la proteína hasta la realización del *Western Blot*, las NPOv conjugadas se almacenaron en tampón de carga hasta su evaluación a 4 °C.

### **5.5. Obtención de gametos, fecundación *in vitro* y producción de embriones *in vitro***

#### **5.5.1. Biomodelo porcino**

##### **5.5.1.1. Maduración *in vitro* de ovocitos porcinos (MIV)**

Los complejos de cúmulo-ovocitos (COCs) se obtuvieron de ovarios (hembras prepúberes) recolectados en un matadero local “El Pozo Alimentación S.A.” (Alhama de

## MATERIALES Y MÉTODOS

Murcia, Murcia, España). Los COCs se recolectaron mediante la aspiración de folículos antrales (3-6 mm de diámetro), se lavaron en un tampón fosfato salino (PBS-Dulbecco) suplementado con 1 mg/ml de alcohol polivinílico (DPBS-PVA), para ser lavados finalmente en medio de maduración (NCSU-37- (Funahashi, Cantley, & Day, 1997)). Los COCs obtenidos se analizaron en un estereomicroscopio, y se seleccionaron los de mejor calidad (ovocito intacto y simétrico, íntegramente rodeado por 3 a 5 capas de compactas de células del cumulus (CC), citoplasma homogéneo) (de Loos, Van Wet, Van Maurik, & Kruip, 1989; Roth, Inbar, & Arav, 2008). Posteriormente se dividieron en grupos de 50-55 COCs para la MIV. Para esto, se colocaron en un pocillo con 500 µl de NCSU-37 suplementado con 10% (v/v) de fluido folicular porcino, dibutilil cAMP 1 mM, 10 UI/ml de eCG y 10 UI/ ml de hCG durante 20-22 h a 38,5 °C en condiciones de 5% CO<sub>2</sub> y 7% O<sub>2</sub>, seguidas de 20-22 h adicionales en NCSU-37 suplementado únicamente con 10% (v/v) de fluido folicular porcino. Para evaluar el éxito de la MIV, los COCs se decumularon mediante pipeteos mecánicos con micropipeta de 200 µl para la obtención de ovocitos decumulados. Posteriormente, se fijaron en glutaraldehído (0,5% en PBS) durante 15 min y se tiñeron con Hoechst 33342 (10 µg/ml, 30 min). Finalmente, se montaron en un portaobjetos utilizando medio de montaje (DPBS-PVA, glicerol y 10 µg/ml de Hoechst 1:1:1 v/v) y se evaluó la maduración mediante microscopía de epifluorescencia (Leica DMR).

### **5.5.1.2. Obtención de espermatozoides porcinos**

Para la obtención de espermatozoides porcinos se recolectó la fracción rica del eyaculado de machos de fertilidad probada mediante el método de la mano enguantada. Una vez recolectada la muestra se transportó inmediatamente al laboratorio. Se estableció un criterio mínimo de calidad para utilizar los eyaculados: >85% de motilidad espermática total y <20% de morfología anormal de los espermatozoides.

### **5.5.1.3. Fecundación in vitro porcina (FIV)**

Tras la MIV, los COCs presuntamente maduros se decumularon como se ha descrito anteriormente, y se sometieron a un protocolo de FIV. Para ello se colocaron 20 ovocitos por pocillo en una placa de 4 pocillos (NUNC®) con 250 µl de medio TALP (Rath et al.,

## MATERIALES Y MÉTODOS

1999) previamente equilibrado a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. A cada pocillo se añadieron espermatozoides diluidos en medio TALP en un volumen final de 250 µl, obtenidos tras un proceso de selección por gradiente discontinuo de Percoll® y ajustando su concentración a 1,5x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml (López-Úbeda, García-Vázquez, Gadea, & Matás, 2017). A las 4 h post-inseminación (hpi), los ovocitos se sometieron a un pipeteo mecánico suave con una micropipeta automática con el fin de reducir el exceso de espermatozoides que permanecían alrededor de la zona pelúcida (ZP). Finalmente, 18-20 hpi, los presuntos cigotos obtenidos se fijaron y tiñeron del mismo modo que se realizó con los COCs tras la MIV (ver sección 5.1.1).

### **5.5.1.4. Cultivo in vitro de embriones porcinos (CE)**

Para el CE porcinos, los presuntos cigotos obtenidos tras la FIV se transfirieron al medio de cultivo de embriones NCSU23a (Macháty, Day, & Prather, 1998) durante 24 h a 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 7% de O<sub>2</sub>. A las 48 hpi se evaluó la tasa de división y se transfirieron los embriones observados en estadio de 2-4 células al medio de cultivo de embriones NCSU23b hasta el día 6 o 7 post inseminación (dpi) cuando se evaluó la tasa de formación de blastocistos (Petters & Wells, 1993).

### **5.5.2. Biomodelo de conejo**

#### **5.5.2.1. Sincronización de las hembras y obtención de embriones**

Se utilizaron conejas nulíparas de raza *New Zealand White*, sometidas a un protocolo de superestimulación con una combinación de FSH (Corifolitropina alfa, 3 µg, Elonva, Merck Sharp & Dohme S.A.) y hCG (7,5 UI) (Viudes-de-Castro, Marco-Jiménez, Cedano-Castro, & Vicente, 2017). A las 72 h de la superestimulación, las hembras se inseminaron con semen de machos de raza *New Zealand* de fertilidad probada. La ovulación se indujo mediante la aplicación de 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact; Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, España). Posteriormente, las hembras se sacrificaron en dos grupos, a las 14 h y 72 h tras la inseminación artificial, para la recolección inmediata del tracto reproductivo. Los presuntos cigotos y embriones se recuperaron mediante el lavado de los oviductos y cuernos uterinos con 10 ml de DPBS suplementado con BSA al 0,2% (p/v). Los cigotos y embriones recolectados se contabilizaron y evaluaron según los

## MATERIALES Y MÉTODOS

criterios de la IETS (Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones) bajo un estereoscopio (Nikon Motoc SMZ-168). Únicamente aquellos cigotos con presencia de 2 corpúsculos y 2 pronúcleos fueron categorizados como aptos a las 14 hpi mientras que a las 72 hpi se categorizaron como aptos aquellos embriones en estadios de mórula tardía y blastocisto temprano, con una masa celular homogénea, una capa de mucina esférica y presencia de ZP.

### **5.5.2.2. Cultivo *in vitro* de embriones de conejo**

Para el estudio de la tasa de desarrollo embrionario *in vitro*, los cigotos obtenidos se sometieron a cultivo en 500 µl de medio TCM199 que contenía 10% (v/v) de SFB en placas de cuatro pocillos durante 48 h a 38,5 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al finalizar el tiempo de cultivo *in vitro*, los embriones se evaluaron morfológicamente (según criterios de la IETS) para determinar su desarrollo bajo un estereomicroscopio. Se clasificaron como aptos los embriones en los estadios de mórula tardía y blastocisto temprano, que presentaban una masa celular homogénea, una capa de mucina esférica y ZP.

## **5.6. Co-incubación de NPOv con gametos y embriones**

### **5.6.1. Co-incubación de ovocitos/embriones porcinos con NPOv**

Los ovocitos/embriones se incubaron con diferentes volúmenes de NPOv (10 y 20 µl) en 500 µl de DPBS-BSA en placas de 4 pocillos, a 38,5 °C en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.6.2. Co-incubación de espermatozoides porcinos con NPOv**

Los espermatozoides porcinos se incubaron en una concentración final de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/ml con 10 o 20 µl de NPOv. La dilución de espermatozoides y posterior incubación con NPOv se realizó en dos medios, por un lado, un medio de conservación de semen porcino (BTS, *Beltsville Thawing Solution*, Zoitech), y, por otro lado, un medio de capacitación espermática, comúnmente empleado para FIV en porcino, el medio TALP. Para este ensayo, el medio TALP se suplementó con 1,5% de BSA con el objetivo disminuir la aglutinación de espermatozoides (Caldeira, Paulini, Silva, Azevedo, & Lucci, 2017). El estudio se realizó en 3 tiempos: en el mismo momento del inicio de la co-incubación (0 min), y tras 30 min y 60 min de co-incubación de espermatozoides con

NPOv en cada uno de los medios. Durante el periodo de incubación las muestras diluidas en TALP se mantuvieron a 38,5 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y las muestras diluidas en BTS a 15 °C.

### **5.6.3. Co-incubación de embriones de conejo con NPOv**

Los embriones de conejo (obtenidos en etapa de cigoto de 2 células, mórula tardía o blastocisto temprano) se incubaron con NPOv (10 y 20 µl) en 500 µl de DPBS-BSA en placas de cuatro pocillos por un tiempo aproximado de 30 min en agitación suave (agitador horizontal) a temperatura ambiente.

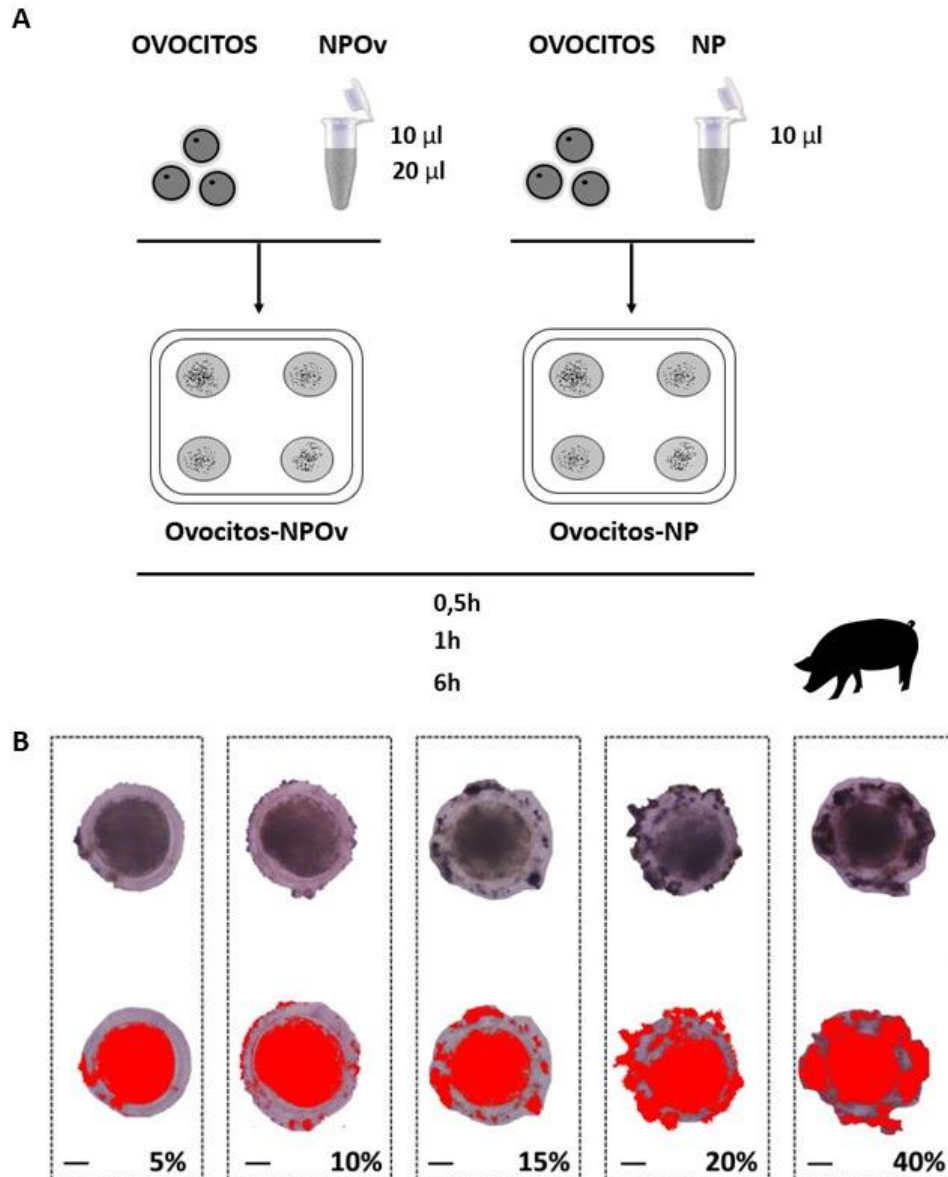
### **5.7. Análisis del porcentaje de cobertura de la ZP de ovocitos porcinos por NPOv**

Tras la incubación de ovocitos con NPOv, se evaluó el porcentaje de la ZP de ovocitos que se encontraba cubierta por NPOv (área de cobertura). El porcentaje de cobertura con NPOv de cada ovocito se calculó a través de un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador (Q5501W, Leica Microsystem Imaging Solutions Ltd, Cambridge, Reino Unido) con el programa Leica Qwin Pro (Versión 2.2). Este sistema adquiere imágenes digitales de alta definición de la muestra, y el operador selecciona las características de las imágenes adquiridas reconociéndolas por color, sombra y contraste. El área correspondiente a las NPOv y al ovocito completo se seleccionaron a partir del umbral automático de niveles de gris de las NPOv y del ovocito, respectivamente (Figura 2-B).

Se compararon los resultados de la incubación de ovocitos con dos volúmenes de NPOv (10 y 20 µl), con un grupo control que consistió en la incubación de ovocitos con NP sin Ov. Se estipularon tres tiempos de incubación para su estudio, 0,5, 1 y 6 h (Figura 2-A).

Adicionalmente, se obtuvieron imágenes representativas de la unión de ovocitos-NPOv utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) (ApreoS, Thermo Fisher Scientific). Para la microscopía electrónica de barrido se utilizaron grupos de 10-20 ovocitos-NPOv previamente fijados en glutaraldehído al 2% a 4 °C durante 2 h, seguido de tres lavados en DPBS. Las muestras se procesaron en el Servicio de Microscopía (Universidad de Murcia, España). Finalmente, los ovocitos-NPOv se observaron bajo un microscopio electrónico JEOL JSM 840 SEM (Jeol Limited, Londres, Reino Unido).

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 2:** Análisis de la distribución de NPOv (% de cobertura) sobre la ZP de ovocitos porcinos. (A) Esquema de la incubación de NPOv y NP con ovocitos maduros en tres tiempos (0,5, 1 y 6 h). (B) En el panel superior se muestran imágenes de ovocitos con NPOv (puntos negros) distribuidos alrededor de la ZP (barra de escala, 25  $\mu$ m). En el panel inferior se muestran imágenes obtenidas a través del sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador (Q5501W, Leica Microsystem Imaging Solutions Ltd, Cambridge, Reino Unido) con el programa Leica Qwin Pro (Versión 2.2) a través del cual se calcula el porcentaje de cobertura del ovocito por NPOv. El color rojo indica el área correspondiente a las NPOv y al citoplasma del ovocito. Posteriormente se seleccionaron a partir del umbral automático de niveles de grises el área correspondiente a NPOv y al ovocito. Se utilizaron un total de 328 ovocitos (control= 83, NPOv 10  $\mu$ l= 126, NPOv 20  $\mu$ l= 119). Las mediciones se realizaron por triplicado.



## 5.8. Evaluación de la viabilidad de gametos y embriones

### 5.8.1. Biomodelo porcino

#### 5.8.1.1. Análisis de la actividad metabólica de gametos porcinos incubados con NPOv

Se realizaron estudios del metabolismo de ovocitos y espermatozoides tras la incubación con NPOv. Para la realización de este estudio metabólico se utilizó un analizador de flujo extracelular (XFe96 Agilent Seahorse). A través de este equipo se obtuvieron mediciones del estado metabólico de ovocitos y espermatozoides mediante la tasa de consumo de oxígeno (OCR, pmol min<sup>-1</sup>) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR, milli-pH min<sup>-1</sup>) en tiempo real. Para este análisis, se emplearon fluorocromos sensibles a H<sup>+</sup> y O<sub>2</sub>, que permitieron monitorizar la fosforilación oxidativa y la glucólisis, respectivamente.

Previamente a su uso, el sistema requiere de una calibración y una preparación del kit de placas de Seahorse (PDL Cell Culture Microplate, Agilent Technologies). Este kit está compuesto por una placa de 96 pocillos donde se disponen las células a analizar y un cartucho de hidratación formado por 2 partes: una placa donde se realiza la hidratación de este (cartucho sensor) y posteriormente se coloca la solución de calibrado, y una placa donde se colocan las soluciones del kit comercial (*utility plate*). El día anterior a la realización del ensayo, se encendió el analizador de flujo extracelular (XFe96 Agilent Seahorse extracellular flux analyzer) y se dejó calentar durante toda la noche (un mínimo de 5 h). Ese mismo día también se hidrató la *utility plate* con agua estéril y se colocó el cartucho sensor encima de esta, asegurando que los sensores estaban completamente sumergidos en agua. Ambas se dejaron incubando toda la noche a 37 °C en ausencia de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, se preparó la plantilla en el programa del sistema para poderla ejecutar en el analizador de flujo. Esta plantilla permite informar al sistema del tipo de célula que vamos a analizar en cada pocillo, así como la densidad celular.

El día del ensayo, se extrajo el cartucho sensor de la *utility plate* y se eliminó el agua de los pocillos, reemplazándola por 200 µl de solución de calibración en cada pocillo. A continuación, se volvió a colocar el cartucho sensor encima y se incubó en ausencia de CO<sub>2</sub> durante 45-60 min a 37 °C. Conjuntamente, se procedió a la preparación de los componentes del kit comercial “*Real Time ATP Rate Assay kit*”, formado por oligomicina

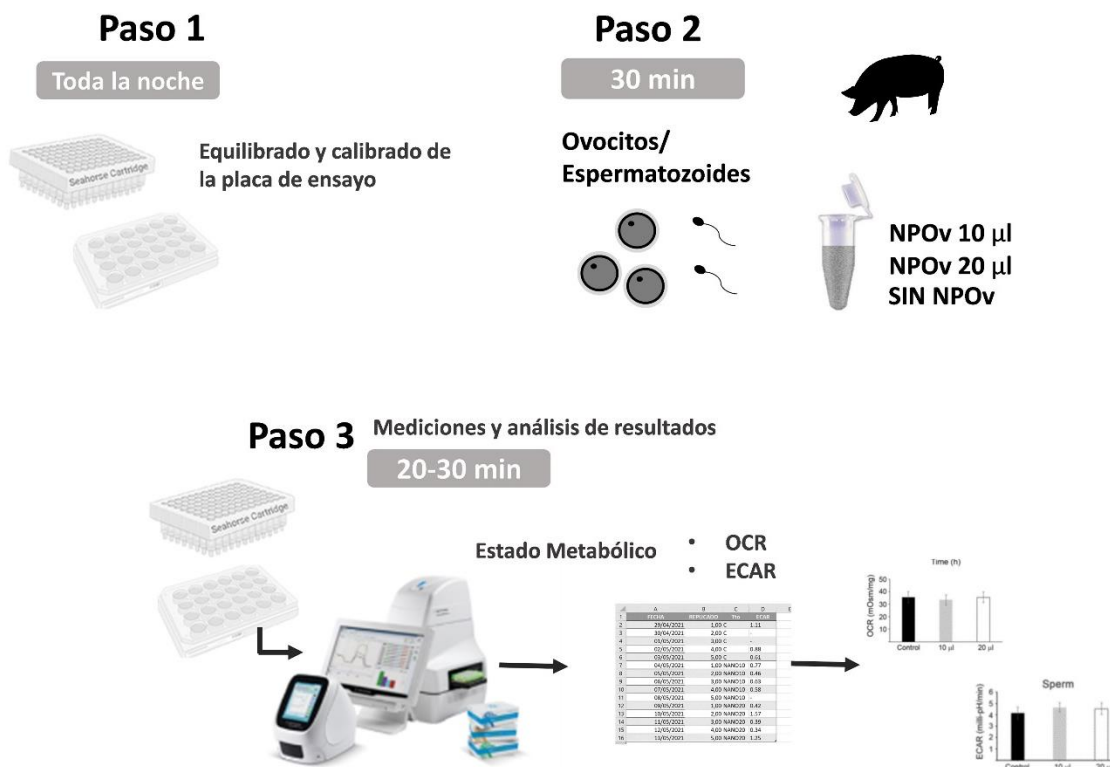
## MATERIALES Y MÉTODOS

150  $\mu\text{M}$  y rotenona 50  $\mu\text{M}$ . Ambos se completaron con 420  $\mu\text{l}$  y 540  $\mu\text{l}$  de medio Seahorse XF DMEM respectivamente y se sometieron a vórtex para asegurar la resuspensión completa de los componentes. De cada solución anterior preparada, se tomaron 300  $\mu\text{l}$  y se añadieron 2700  $\mu\text{l}$  de medio Seahorse XF DMEM (pH 7,4), poniendo cada una en un tubo Falcon de 15 ml. Estas soluciones se dejaron incubar a 37 °C hasta su uso. En el momento de la realización del ensayo, se pusieron 20  $\mu\text{l}$  de oligomicina y 22  $\mu\text{l}$  de rotenona en los puertos del cartucho sensor hidratado (haciendo uso de las guías incorporadas en el kit de la placa marcadas con las letras “A” y “B” respectivamente) y posteriormente se introdujeron en el analizador de flujo extracelular junto con la *utility plate* para realizar la calibración (tiempo aproximado 20 min).

Por último, tras completarse el proceso de calibración, se extrajo la *utility plate* y en su lugar se colocó la placa de 96 pocillos cargada con los ovocitos o espermatozoides, considerando que el volumen final de cada pocillo de la placa era de 50  $\mu\text{l}$ . Para ello, se colocó el material a analizar (ovocitos/espermatozoides) y se completó con medio Seahorse XF DMEM hasta el volumen final. Se dejaron cuatro pocillos sin células añadiendo 50  $\mu\text{l}$  del mismo medio para realizar las correcciones de fondo, en estos pocillos. A continuación, se centrifugó la placa a 300g durante 5 min con freno y a temperatura ambiente, se colocó en el incubador durante 10 min y seguidamente se cargó la placa en el analizador de flujo extracelular para comenzar la lectura. Tras finalizar el estudio (20-30 min), se generó un informe donde el sistema calculó automáticamente los parámetros en tiempo real (OCR y ECAR). Estos datos se recogieron en un USB, se abrieron con el software del sistema Wave Desktop 2.4 y se exportaron todos los datos a un Excel para su posterior análisis.

Se establecieron 3 grupos experimentales con 20 ovocitos o espermatozoides en una concentración de  $1 \times 10^6$  por pocillo: **1) Control:** ovocitos o espermatozoides sin NP, **2) NPOv 10 $\mu\text{l}$ :** ovocitos o espermatozoides incubados con 10  $\mu\text{l}$  de NPOv durante 30 min; y **3) NPOv 20 $\mu\text{l}$ :** ovocitos o espermatozoides incubados con 20  $\mu\text{l}$  de NPOv durante 30 min (Figura 3). Este estudio se realizó por triplicado para ovocitos y 8 replicados para espermatozoides.

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 3:** Esquema del diseño experimental para el análisis de la actividad metabólica de gametos porcinos tras ser incubados con NPOv a través del analizador de flujo extracelular (XFe96 Agilent Seahorse extracellular flux analyzer). El análisis consistió en tres pasos: 1) equilibrado y calibrado de la placa de ensayo; 2) co-incubación de gametos con dos volúmenes de NPOv; 3) medición y lectura de resultados del estado metabólico en medidas de OCR y ECAR, descargadas desde el equipo y posteriormente analizadas estadísticamente.

### 5.8.1.2. Análisis de la calidad de los espermatozoides sometidos a la presencia de NPOv

Para el análisis de la motilidad espermática se utilizó el sistema de análisis de semen computarizado (CASA) (software ISAS®, PROiSER R+D S.L., Valencia, España) acoplado a un microscopio de contraste de fases (objetivo pH negativo 10x; Leica DMR, Wetzlar, Alemania) y una cámara digital (Basler Vision, Ahrensburg, Alemania). Con este fin, se colocó una gota de 4 µl de la muestra en una cámara precalentada (38 °C) (cámara Spermtrack® de 20 micras, Proiser R+D, SL; Paterna, España) y se evaluó con un microscopio de contraste de fases negativo (objetivo 10x; Leica DMR, Wetzlar, Alemania). Los parámetros proporcionados por el sistema CASA fueron el porcentaje de motilidad total (MOT) y la motilidad progresiva (PMOT), velocidad media-VAP (µm/s), velocidad lineal-VSL (µm/s), velocidad curvilínea-VCL (µm/s), amplitud lateral media de la cabeza-ALH (µm), frecuencia de desplazamiento de la cabeza-BCF (Hz), coeficiente de

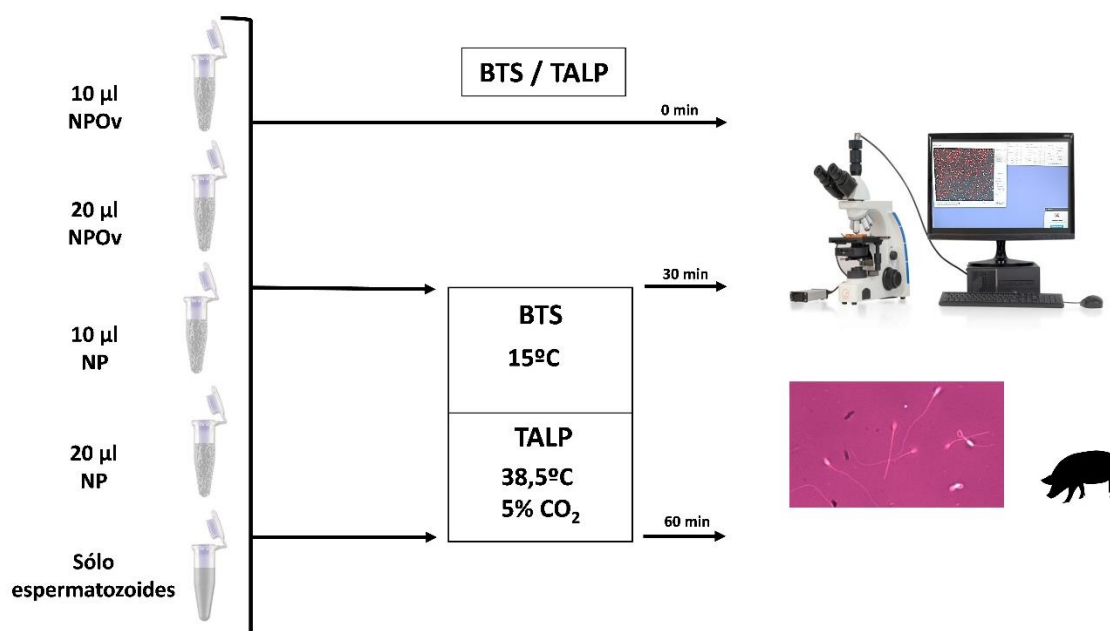
## MATERIALES Y MÉTODOS

rectitud-STR (%), coeficiente de linealidad-LIN (%) y coeficiente de oscilación-WOB (%). Se analizaron al menos 3 campos diferentes por muestra. Se consideró que un espermatozoide era móvil cuando presentaba una VAP > 10  $\mu\text{m/s}$ . Se consideró que existía motilidad progresiva cuando había una rectitud (STR) > 45%. Las determinaciones de motilidad se realizaron a 25 fotogramas por segundo durante un segundo (25 imágenes).

La viabilidad de los espermatozoides se evaluó mediante tinción con eosina-nigrosina de acuerdo con el método descrito previamente (Wells & Awa, 1970). Para la evaluación se utilizó un microscopio de campo claro (objetivo 40x; Nikon® Model YS100, Tokio, Japón). Los espermatozoides se clasificaron como: 1) membrana intacta: espermatozoides sin coloración, 2) membrana dañada: espermatozoides que muestran color rosado. La viabilidad de los espermatozoides se expresó como el porcentaje de células con membrana intacta. Se evaluaron al menos doscientos espermatozoides por muestra.

El experimento consistió en 5 grupos experimentales (Figura 4): **1) NPOv10:** 10  $\mu\text{l}$  NPOv, **2) NPOv20:** 20  $\mu\text{l}$  NPOv, **3) NP10:** 10  $\mu\text{l}$  NP, **4) NP20:** 20  $\mu\text{l}$  NP y **5) CONTROL:** grupo control sin NP. En los grupos NP10 y NP20, la Ov fue reemplazada por 15  $\mu\text{l}$  del mismo tampón de acoplamiento durante la conjugación. Se definió una concentración final de  $30 \times 10^6$  espermatozoides por ml para cada grupo. Se utilizaron dos medios diferentes de incubación BTS y TALP, a fin de analizar los efectos de las NPOv en los espermatozoides en condiciones normales de conservación espermática en esta especie (BTS, 15 °C) y en condiciones de FIV (TALP, 38,5 °C con 5% de  $\text{CO}_2$ ) (Figura 4). Se realizaron un total de 5 replicados utilizando 5 muestras de semen de verracos de fertilidad probada. La motilidad espermática, los parámetros cinéticos y la viabilidad se evaluaron en tres tiempos durante la incubación (0, 30 y 60 min).

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 4:** Representación del diseño experimental del ensayo de análisis de parámetros de calidad espermática porcina post incubación con NPOv y NP en los medios BTS y TALP. Se realizaron análisis de calidad seminal mediante el sistema CASA y tinción vital de eosina-nigrosina.

### 5.8.1.3. Tiempo de digestión de la ZP

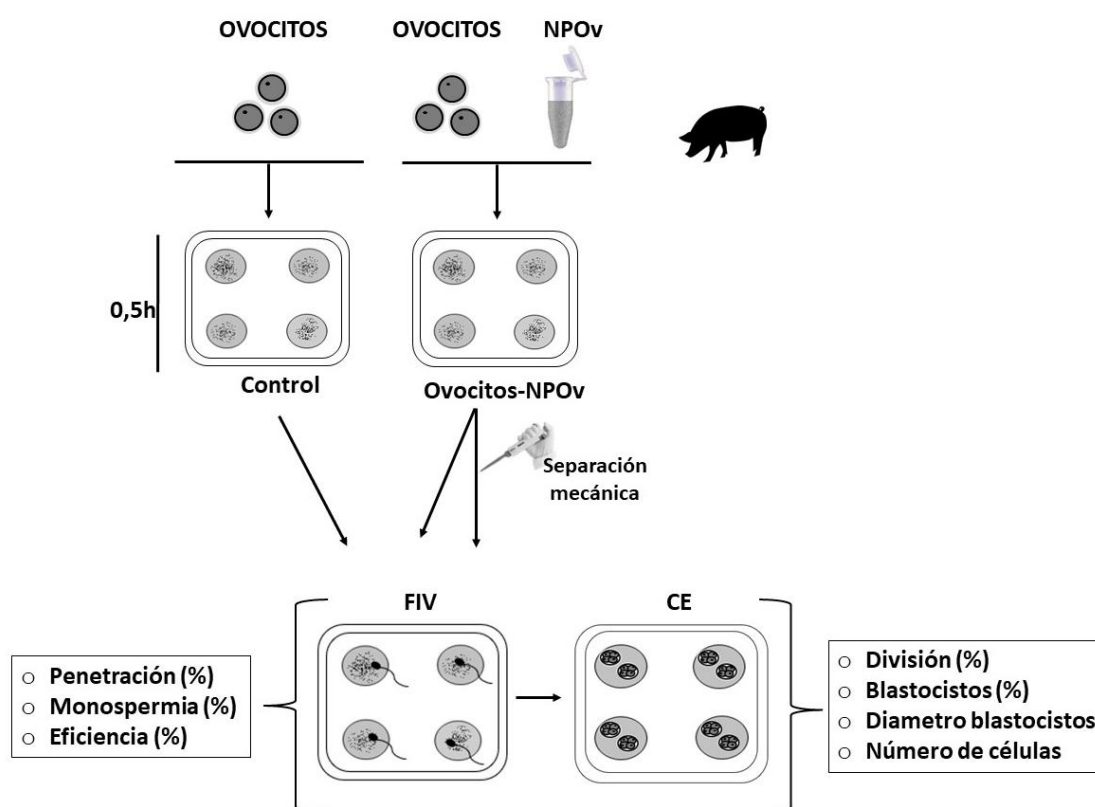
Tras la incubación de ovocitos con NPOv, los complejos ovocitos-NPOv se lavaron dos veces en PBS y se colocaron en gotas de 50 µl de pronasa al 0,5% (p/v en PBS). La digestión de la ZP se observó continuamente bajo un microscopio estereoscópico y se registró el tiempo requerido para la disolución completa de la ZP. En este estudio se analizaron dos grupos, ovocitos NPOv (incubados con NPOv durante 30 min) y un grupo control, que consistió en ovocitos sin NPOv. Se utilizaron un total de 119 ovocitos, 58 de grupo control y 61 de grupo ovocitos-NPOv.

### 5.8.1.4. Análisis de los resultados de la FIV y CE porcinos

Para el análisis de la FIV se evaluaron tres parámetros: tasa de penetración (%) (porcentaje de ovocitos con uno o más pronúcleos masculinos o espermatozoides descondensados del total de ovocitos utilizados), tasa de monospermia (%) (porcentaje de ovocitos penetrados con un solo pronúcleo masculino o un solo espermatozoide descondensado), y tasa de eficiencia (%) (porcentaje de ovocitos penetrados y monospermicos a partir del número de ovocitos inseminados). El cultivo de embriones

## MATERIALES Y MÉTODOS

se evaluó a través de la tasa de división (a las 48 hpi) y la tasa de blastocistos (en el día 7 dpi). El día 7 dpi se tomaron fotografías de los blastocistos obtenidos y se realizó un análisis de imágenes mediante el software *ImageJ* para evaluar el diámetro del blastocisto. Además, los blastocistos se fijaron, tiñeron y montaron en un portaobjeto del mismo modo que se explicó en sección 5.1.1. para la evaluación posterior del número de células al microscopio de epifluorescencia. Para los ensayos de FIV y CE se definieron tres grupos experimentales como se representa en la Figura 5: **ovocitos-NPOv**: ovocitos incubados con 20  $\mu$ l de NPOv durante 0,5 h; **separación mecánica**: ovocitos incubados con 20  $\mu$ l de NPOv durante 0,5 h y posteriormente separadas mecánicamente mediante pipeteo suave; y **Control**: ovocitos sin NP incubados durante 0,5 h. Para el estudio de los resultados de la FIV se utilizaron en total 721 ovocitos (ovocitos-NPOv (n= 200), separación mecánica (n= 177) y Control (n= 154)) divididos en siete replicados. En el caso de CE, se emplearon 1298 ovocitos totales (DO-NPOv (n= 493), separación mecánica (n= 404) y Control (n= 401)) divididos en 10 replicados.



**Figura 5:** Esquema del diseño experimental de los ensayos de FIV y CE porcino. Los ovocitos se incubaron en medio TALP con NPOv y sin éstas para el grupo control durante 0,5 h (38,5 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Posteriormente, un grupo de ovocitos-NPOv se someten a un pipeteo suave para separar las NPOv, constituyendo el grupo separación mecánica. Para

evaluar la FIV se analizó el porcentaje de penetración, monospermia y eficiencia. Para el CE se analizó el porcentaje de división, porcentaje de blastocistos, diámetro y número de células de cada blastocisto.

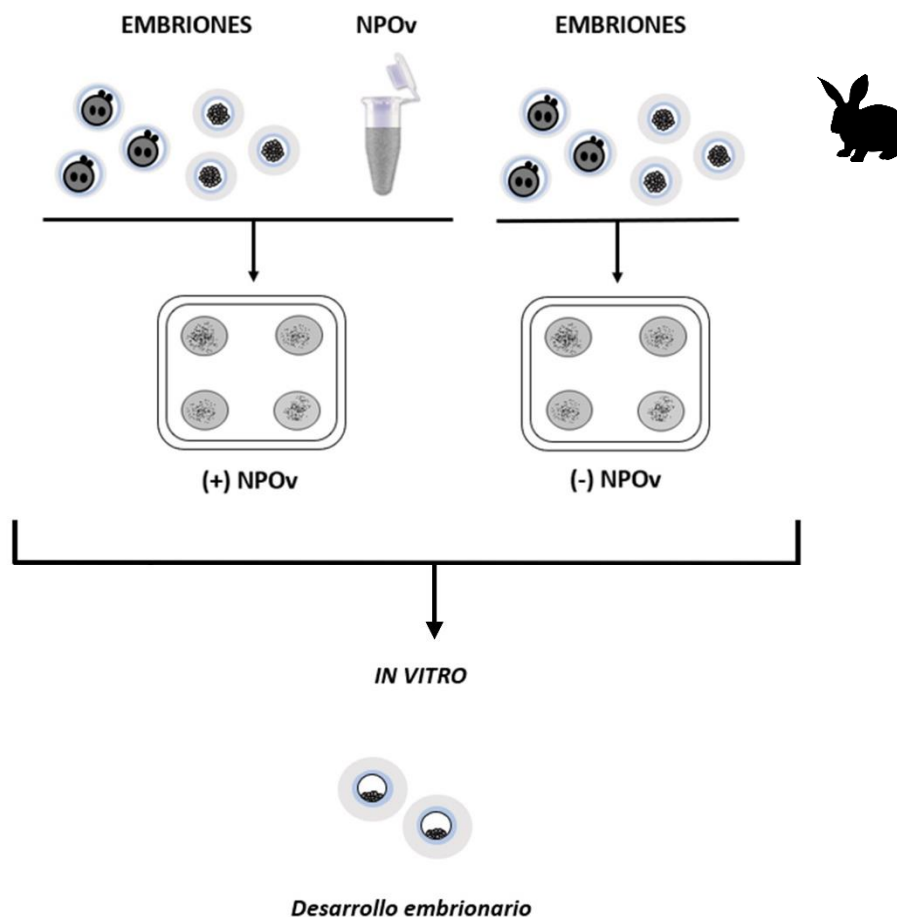
### 5.8.2. Biomodelo conejo

#### 5.8.2.1. Estudios *in vitro*: tasa de desarrollo embrionario

Para el análisis de la tasa de desarrollo embrionario *in vitro*, se utilizaron embriones en etapa de cigoto de 2 células y mórulas tardías obtenidos a partir de hembras sincronizadas, inseminadas y sacrificadas a 22-24 hpi (cigotos) y 72 hpi (mórulas tardías). Los cigotos y mórulas tardías obtenidas se incubaron con NPOv y se sometieron a cultivo embrionario *in vitro* adicional durante 72 y 22 h respectivamente. Posteriormente, los embriones obtenidos se evaluaron morfológicamente por su progresión de desarrollo hasta la etapa de eclosión de blastocisto utilizando un estereomicroscopio.

Para el análisis del desarrollo embrionario *in vitro* se utilizaron cigotos (n= 111) y mórulas tardías (n= 164), distribuidos en dos grupos experimentales: **(+) NPOv** (n= 56 cigotos, n= 84 mórulas tardías), el cual consistió en embriones incubados con NPOv en las condiciones anteriormente descritas, y **(-) NPOv** (n= 55 cigotos, n= 80 mórulas tardías), el cual se definió como grupo control y consistió en cigotos y mórulas tardías que no se incubaron con NPOv (Figura 6).

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 6:** Esquema del diseño experimental de los estudios *in vitro* realizados en el modelo conejo, donde se representa la incubación de embriones (cigotos y mórulas tardías) con NPOv tras ser recuperados *in vivo*. Posteriormente se analizó el desarrollo embrionario *in vitro*.

### **5.8.2.2. Estudios *in vivo*: tasa de implantación, tasa de nacidos vivos y peso corporal al nacimiento**

Para los estudios *in vivo*, la transferencia de embriones se realizó según García-Domínguez et al. (2019) (García-Domínguez, Marco-Jiménez, Viudes-de-Castro, & Vicente, 2019). Brevemente, se indujo la ovulación en hembras receptoras (determinado por el color de la vulva) administrando 1 µg i.m. de acetato de buserelina (Hoescht, Marion Roussel, Madrid, España). El día de la transferencia de embriones, las hembras fueron anestesiadas mediante una inyección i.m. de 4 mg/kg de xilazina (Bayer AG, Leverkusen, Alemania), seguida 5-10 min después de una inyección i.v. en la vena marginal de la oreja de 0,4 ml/kg de peso de clorhidrato de ketamina (Imalgene 500, Merial SA, Lyon, Francia). Durante la laparoscopia se administraron 3 mg/kg i.m. de clorhidrato de morfina (Morfina, B. Braun, Barcelona, España). La transferencia



## MATERIALES Y MÉTODOS

embrionaria se realizó por laparoscopia introduciendo los cigotos en cada oviducto (aproximadamente 10 por oviducto). Finalmente, las hembras se trataron con antibióticos (gentamicina 4 mg/kg cada 24 h durante 3 días, Ganadexil al 10%, Invesa, Barcelona, España) y analgésicos [clorhidrato de buprenorfina 0,03 mg/kg, (Buprex, Esteve, Barcelona, España) cada 12 h durante 3 días y 0,2 mg/kg de meloxicam (Metacam 5 mg/ml, Norvet, Barcelona, España) cada 24 h durante 3 días]. La tasa de supervivencia se evaluó por laparoscopia tras el procedimiento anterior, registrando la tasa de implantación (número de embriones implantados en el día 14 del total de embriones transferidos) y la tasa de natalidad (descendencia nacida/total de embriones transferidos). Además, se evaluó el peso corporal al nacimiento.

Para esta evaluación se procedió a la transferencia de 195 cigotos totales en estadio de 2 células distribuidos en dos grupos experimentales: 105 embriones del grupo **(+) NPOv**, el cual consistió en cigotos incubados con NPOv y 90 embriones del grupo **(-) NPOv**, el cual consistió en cigotos que no fueron incubados con NPOv. Para este ensayo se utilizaron 10 hembras receptoras, 5 para cada grupo (Figura 7).

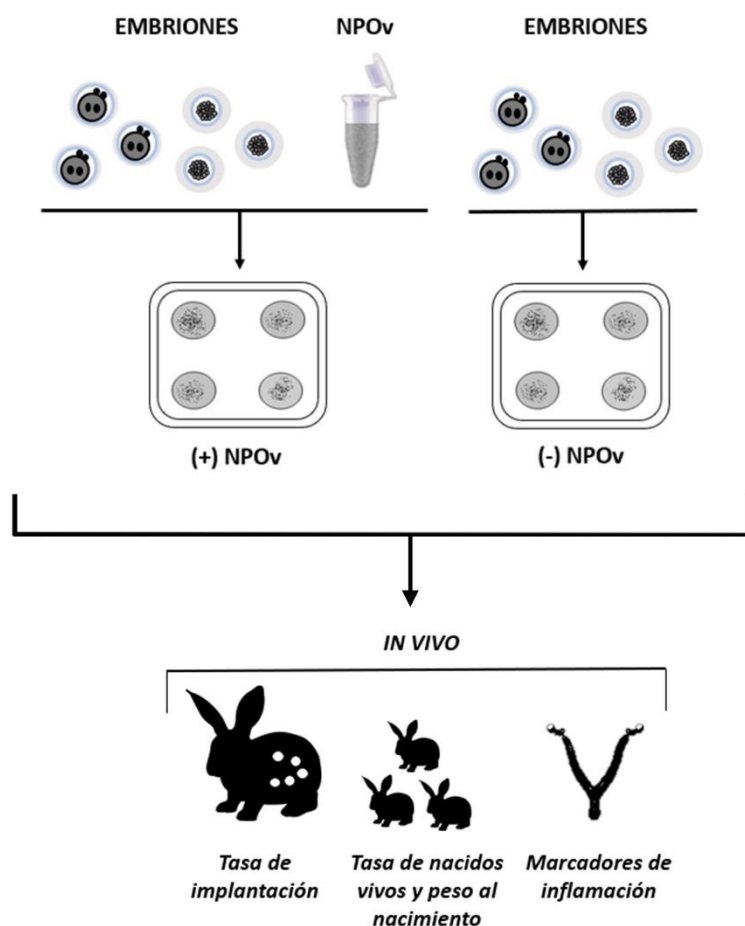
### **5.9. Respuesta del tejido oviductal y uterino de conejas a la presencia de embriones-NPOv**

Se obtuvieron tractos reproductivos de hembras, en los días 2 y 6 posteriores a la transferencia de los cigotos. Los oviductos y los cuernos uterinos se fijaron en solución formolada al 10% durante 24 h, se procesaron y se incluyeron en parafina. A continuación, se tiñeron secciones transversales de 3 µm de todas las muestras con una tinción estándar de hematoxilina y eosina (H&E) para la evaluación histopatológica convencional y determinar si los embriones unidos a NP presentan algún efecto sobre el tejido oviductal/uterino a través de marcadores de proliferación celular e inflamación. Para el análisis de la tasa de proliferación celular en células epiteliales de oviducto, se realizó un procedimiento inmunohistoquímico indirecto marcado con polímero-HRP que determina la expresión de la proteína Ki-67 (Agilent, Dako). La inmunorreacción positiva se evidenció por un precipitado de color marrón oscuro con un patrón nuclear. La tasa de proliferación se estimó mediante el porcentaje medio de células epiteliales positivas en 10 campos (X400). Además, se realizó inmunohistoquímica (IHC) a tejidos uterinos utilizando el anticuerpo anti-TCD3 (Agilent, Dako) para estudiar el grado de infiltrado

## MATERIALES Y MÉTODOS

inflamatorio de células T (con un patrón de membrana pericelular marrón oscuro), determinando la media de células positivas en 10 campos visuales (x400). El examen inmunohistológico se realizó utilizando un microscopio convencional de luz directa (Zeiss Axio Scope A10, Carl Zeiss, Jena, Alemania). Las imágenes representativas se obtuvieron con una cámara digital de alta resolución (Zeiss AxioCam 506, Zeiss) utilizando un software especializado (Zeiss ZEN, vs. 3.0).

Para este estudio se emplearon 6 hembras, 3 sacrificadas a día 2 post-transferencia y otras 3 sacrificadas al día 6 post-transferencia. En cada una de las hembras se transfirieron cigotos de ambos grupos experimentales en cada oviducto, siendo los de un lado pertenecientes al grupo **(+) NPOv** y en el oviducto contralateral cigotos del grupo **(-) NPOv** (Figura 7). Además, como control negativo, se utilizaron hembras no gestantes.



**Figura 7:** Esquema del diseño experimental de los estudios realizados *in vivo* en el modelo conejo. Esquema que representa la incubación de embriones (cigotos) con NPOv tras ser recuperados *in vivo*. Tras la co-incubación se realizó la transferencia de los cigotos-NPOv a madres receptoras, donde se analizaron la tasa de implantación y la respuesta del tejido oviductal y uterino a la presencia de los cigotos-NPOv.

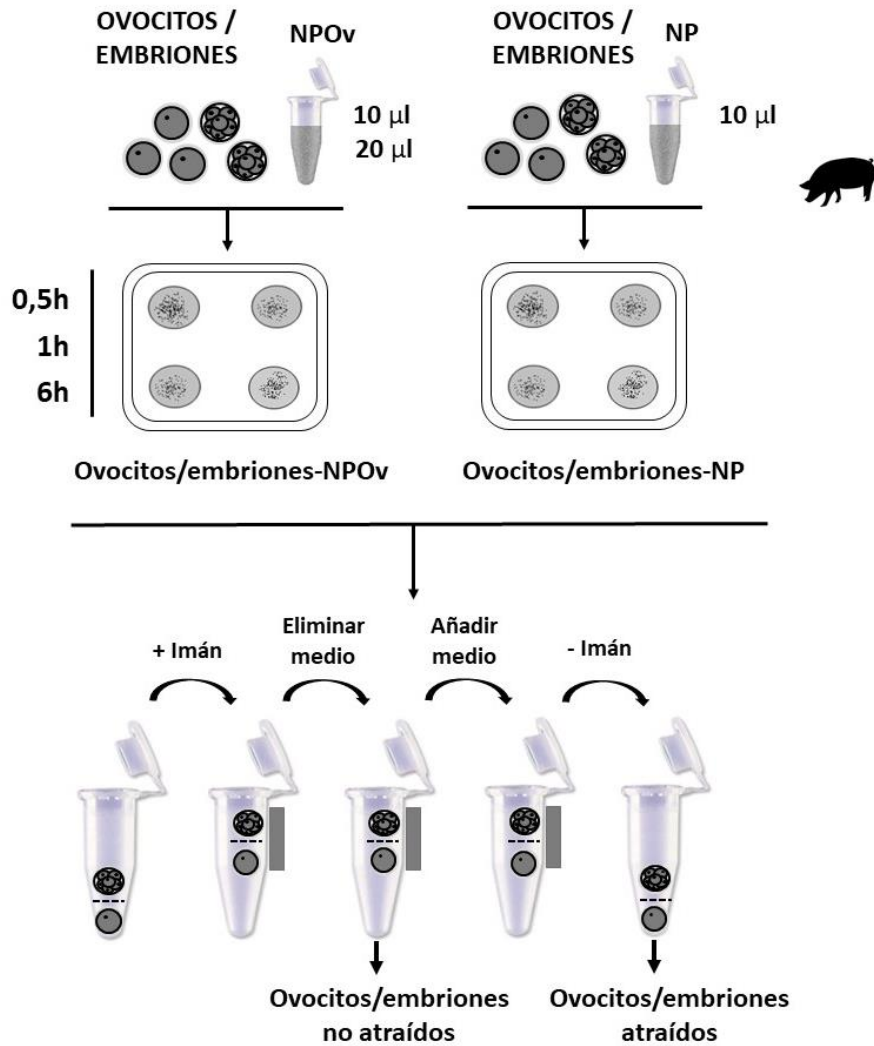
Posteriormente, al momento del parto, se evaluó la tasa de nacidos vivos y el peso al nacimiento de gazapos.

### **5.10. Estudio de la capacidad de atracción de ovocitos/embriones unidos a NPOv sometidos a un campo magnético**

Tras la incubación de ovocitos maduros y embriones porcinos (día 6) con NPOv, se evaluó la capacidad de estas células de ser atraídas por un campo magnético externo. Para ello, una vez que los ovocitos y embriones se incubaron con NPOv en un volumen final de 500  $\mu$ l se transfirieron a un tubo *ependorf* de 1,5 ml, que a su vez se colocó en una gradilla magnética (MagRack6) durante al menos un minuto. Tras este tiempo, el sobrenadante de cada tubo se recogió lentamente (mediante una micropipeta automática), y se añadió nuevo medio al tubo. Los ovocitos/embriones en el sobrenadante retirado se contabilizaron bajo un estereoscopio (Nikon Motic SMZ-168) y se clasificaron como ovocitos/embriones no atraídos. Posteriormente, se retiró el imán y se recogió la totalidad del contenido, que se evaluó bajo un estereomicroscopio para el recuento de las estructuras presentes (ovocitos/embriones atraídos). Los porcentajes de ovocitos y embriones que permanecieron unidos al imán se calcularon y referenciaron como ovocitos/embriones atraídos respecto al total.

En este ensayo se utilizaron un total de 322 ovocitos en 5 replicados, y 120 embriones en 4 replicados. Se compararon porcentaje de atracción al imán de ovocitos/embriones incubados con NPOv en dos volúmenes (10 y 20  $\mu$ l) en tres tiempos de incubación 0,5, 1 y 6 h, con ovocitos/embriones incubados con NP (sin Ov) en un volumen (10  $\mu$ l) en los mismos tres tiempos de incubación (Figura 8).

## MATERIALES Y MÉTODOS



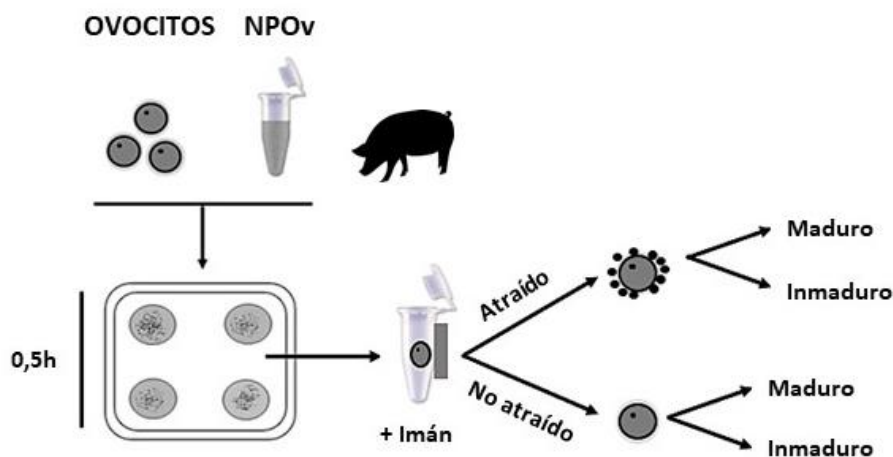
**Figura 8:** Diseño experimental del ensayo de atracción de ovocitos/embriones-NPOv a un campo magnético. Los ovocitos/embriones se incubaron con NPOv o con NP en los tiempos 0,5, 1 y 6 h. En cada tiempo analizado los ovocitos/embriones se colocaron en un tubo de 1,5 ml y se sometieron a la acción de un campo magnético externo.

Tras el estudio de atracción de ovocitos-NPOv a un campo magnético se procedió a la evaluación de la condición de maduración de estos ovocitos. Para esto, los ovocitos incubados con NPOv y sometidos a un campo magnético por al menos un minuto, se dividieron en ovocitos atraídos por el imán y no atraídos (Figura 9). Ambos grupos se fijaron, tiñeron y montaron en portaobjetos para la posterior evaluación del estado nuclear al microscopio de epifluorescencia como se describió en la sección 5.1.1.

Se consideró que un ovocito estaba maduro cuando el núcleo estaba en la etapa de metafase II y el primer corpúsculo polar estaba extruido, por otro lado, se consideró como inmaduro cuando el núcleo se encontraba en estadio de vesícula germinal,

## MATERIALES Y MÉTODOS

metafase I (sin extrusión de corpúsculo polar) o bien cuando se encontraban en estado de degeneración. Para este ensayo se utilizaron un total de 203 ovocitos, y se realizaron 4 replicados.



**Figura 9:** Esquema del diseño experimental sobre la evaluación de ovocitos-NPOv maduros e inmaduros y su atracción por un campo magnético. Tras la incubación de ovocitos con NPOv, los mismos se sometieron a la acción de un campo magnético y se separaron en atraídos (ovocitos-NPOv) y no atraídos (ovocitos no unidos a NPOv) por el imán. Posteriormente, se analizó el estado de maduración de estos ovocitos y se calculó el porcentaje de ovocitos maduros e inmaduros (no madurados o degenerados) en ambos grupos.

Además, los ovocitos-NPOv atraídos se sometieron a un protocolo de FIV y CE a fin de conocer su capacidad de desarrollo tras ser expuestos a las NPOv y a un campo magnético. Se utilizaron 386 ovocitos-NPOv atraídos y 269 ovocitos control que consistieron en ovocitos maduros no expuestos a NPOv ni a campos magnéticos. El protocolo de FIV y CE utilizado se detalla en la sección 5.5.1.3 y 5.5.1.4.

### 5.11. Secuenciación del ARN (ARN-seq) de embriones porcinos

Los blastocistos porcinos obtenidos el día 7 tras la FIV de ovocitos previamente unidos a NPOv y sometidos a un campo magnético externo, se almacenaron en buffer de conservación de ARN (RNAlater) a -80 °C para su posterior evaluación génica mediante secuenciación del ARN (Figura 9). Para ello, en primer lugar, se extrajo el ARN de embriones utilizando el micro kit QIAamp RNA miRNeasy (QIAcube/QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se realizaron controles de calidad de la integridad del ARN mediante el equipo Bioanalyser System 2100 (Agilent Technologies, CA, EE. UU.)

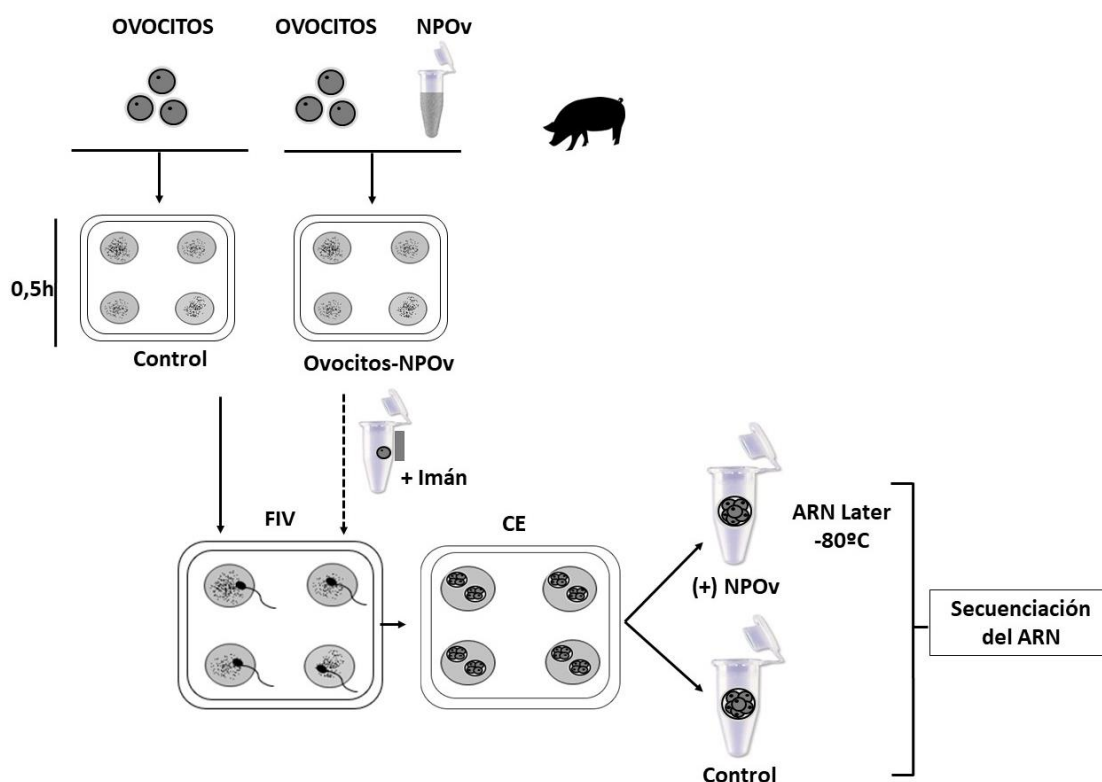
## MATERIALES Y MÉTODOS

para el cual se empleó el Kit ARN 6000 Nano. Posteriormente, el kit TruSeq Stranded Total RNA (Illumina, CA, EE. UU.) se empleó para la creación de bibliotecas a partir de 150-300 ng de ARN total de entrada según el protocolo del fabricante. Finalmente, las bibliotecas se enriquecieron por PCR, verificadas (concentración y calidad), normalizadas y agrupadas. Las bibliotecas agrupadas de ARN total se secuenciaron utilizando una secuenciación química de 75 bases de extremos emparejados mediante el sistema NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante con profundidades de secuenciación que oscilaron entre 80 y 90 millones de lecturas de extremos emparejados.

Para el análisis de datos de ARN-seq, se utilizaron los 15,957 genes obtenidos tras filtrar los datos (se eliminaron los genes que no tenían lecturas en ninguna de las muestras, y luego se eliminaron los genes que no tenían un mínimo de 10 lecturas en al menos 3 muestras). Para determinar los genes expresados diferencialmente (DE) se estableció un punto de corte de 0,1 para un  $\log_2FC > 1,5$  en valor absoluto ( $\log_2FC$  mayor de 1,5 o menor de -1,5). El análisis estadístico de los genes que se mostraron con expresión diferencial se realizó utilizando el paquete R Enhanced Volcano (Blighe, Rana, & Lewis, 2022). La expresión génica diferencial se representó como *log-fold-change* y se usó para la confección de un mapa de calor complejo y un gráfico volcán (Kolde, 2019; Warnes et al., 2020).

Se compararon dos grupos: 1) **(+) NPOv**: embriones producidos a partir de ovocitos-NPOv atraídos por imán y 2) **Control**: embriones producidos a partir de ovocitos no sometidos a las NPOv ni al campo magnético (Figura 10).

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 10:** Esquema de la evaluación de la expresión génica (ARNseq) de embriones producidos *in vitro*, tras la incubación de ovocitos con NPOv y su exposición a un campo magnético. Se emplearon 80 embriones de 7 dpi, ((+) NPOv= 40, Control= 40). Las mediciones se realizaron en 4 replicados.

### 5.12. Análisis de la del estado oxidativo de ovocitos porcinos unidos a NPOv y atraídos por un campo magnético

Se analizó el estado de estrés oxidativo en ovocitos tras su incubación con NPOv. Con este objetivo se realizaron dos estudios, en primer lugar, se evaluó la generación de ROS mediante el Kit DCFDA/H2DCFDA-Celular ROS y se observó la fluorescencia representativa bajo microscopio de fluorescencia. Se establecieron 3 grupos experimentales: 1) Control: ovocitos sin NPOv, 2) Ovocitos-NPOv: ovocitos incubados con 20  $\mu$ l de NPOv durante 60 min; y 3) Ovocitos-NPOv atraídos: ovocitos incubados con 20  $\mu$ l de NPOv durante 60 min y posteriormente atraídos por un campo magnético externo. Para este estudio se utilizaron un total de 104 ovocitos (n=31 control, n=41 ovocitos-NPOv, n=32 ovocitos-NPOv atraídos), en 3 replicados.

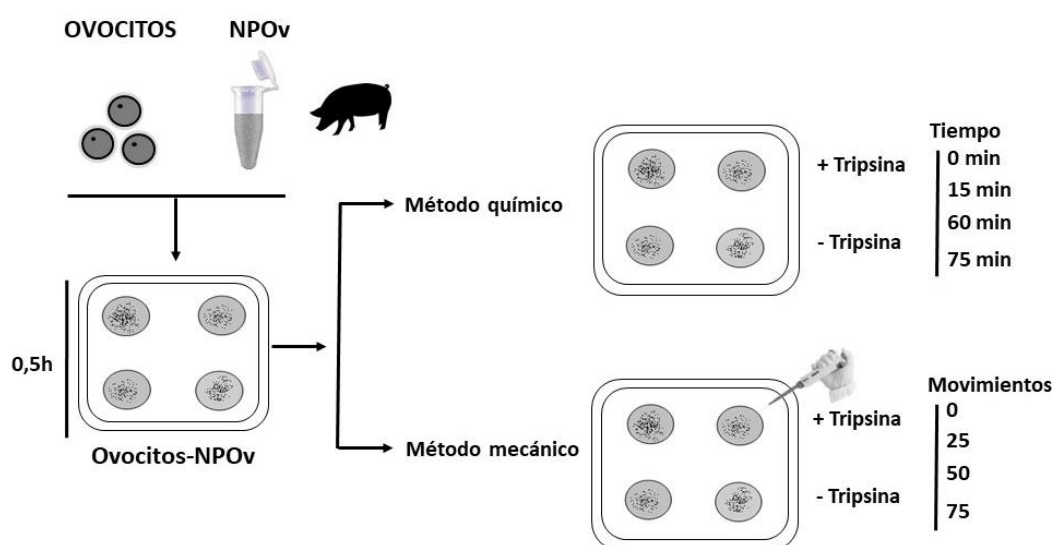
En segundo lugar, se analizó el efecto sobre los genes relacionados con el estrés oxidativo en embriones obtenidos tras un protocolo de FIV y CE a partir de ovocitos-NPOv atraídos por campo magnético en comparación con embriones control. Este

## MATERIALES Y MÉTODOS

estudio se realizó a partir de los resultados obtenidos en el estudio de ARNseq como ha sido comentado en el apartado 5.11. Se analizaron los siguientes genes: Catalasa (CAT), Glutación peroxidasa 1, 3 y 4 (GPX1, GPX3, GPX4) y las Superóxido dismutasas 1 y 2 (SOD 1, SOD2). Se realizaron 4 replicados, en cada replicado se analizó un grupo de 10 blastocistos por grupo experimental.

### 5.13. Reversibilidad de la unión de ovocitos porcinos a NPOv

La reversibilidad de la unión de NPOv a la ZP de los ovocitos porcinos se evaluó mediante un método químico y/o un método mecánico. Para el caso del tratamiento químico, los ovocitos NPOv se incubaron con tripsina (0,5%) o sin esta (grupo control) a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60 y 75 min). En el caso del tratamiento mecánico, los ovocitos NPOv se sometieron a un pipeteo suave con micropipeta de 200  $\mu$ l (0, 25, 50 o 75 movimientos) en combinación o no con tripsina (0,5%). El porcentaje de ovocitos-NPOv atraídos por el campo magnético se evaluó utilizando una gradilla magnética para los grupos del tratamiento químico a cada tiempo y para los grupos del tratamiento mecánico en cada serie de movimientos. Los ovocitos que no fueron atraídos por el campo magnético se consideraron libres de NPOv. Además, se tomaron fotografías de ovocitos NPOv de ambos grupos al final del período de evaluación para la medición del grosor de ZP utilizando el software *ImageJ*. En este estudio se utilizaron un total de 120 ovocitos y se realizaron 3 replicados (Figura 11).



**Figura 11:** Estudio de reversibilidad de la unión de ovocitos-NPOv con dos métodos. En el método químico se sometieron los ovocitos-NPOv a la acción de la tripsina al 0,5%

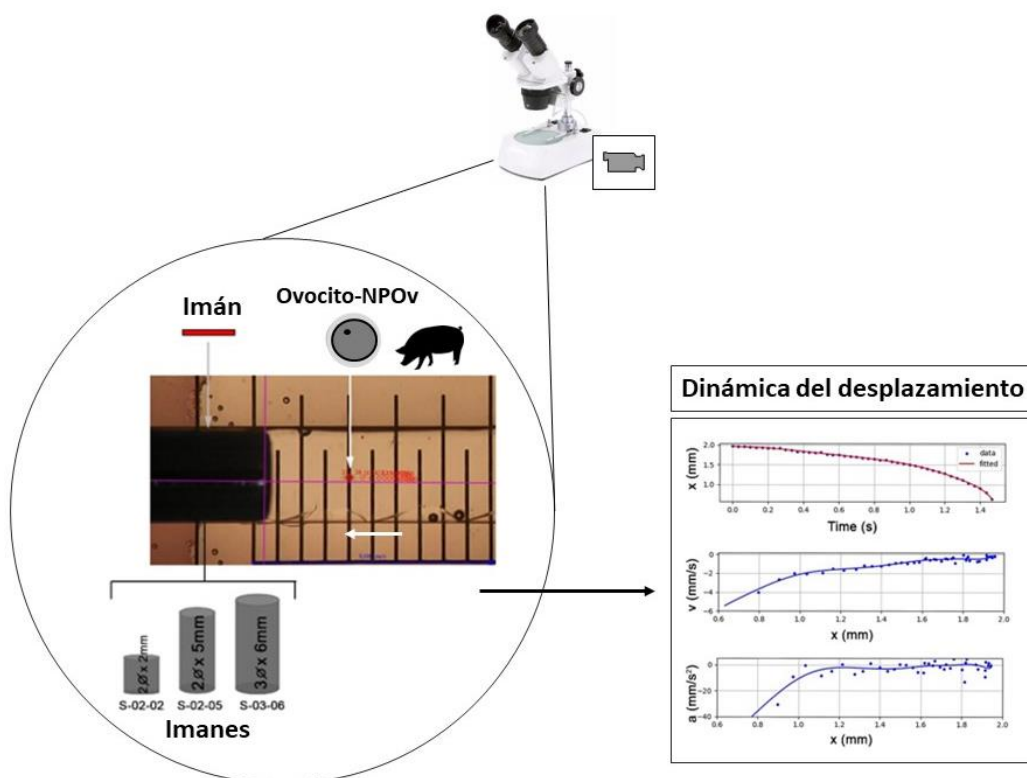


durante 0, 15, 60 y 75 min. El método mecánico consistió en la aplicación de pipeteos mecánicos mediante pipeta con o sin la presencia de tripsina. Los pipeteos comparados en este caso fueron: 0, 25, 50 y 75 movimientos.

### **5.14. Evaluación de la dinámica de desplazamiento (velocidad-aceleración) del complejo ovocito-NPOv cuando se someten a campos magnéticos de diferente intensidad**

Los ovocitos-NPOv se sometieron a la atracción de campos magnéticos externos generados por imanes cilíndricos de neodimio (Supermagnete™, Gottmadingen, Alemania) de diferentes características: 1) imán S0202N de 2 mm de diámetro, 2 mm de alto y fuerza de sujeción de 150 g aproximadamente; 2) imán S0205N de 2 mm de diámetro, 5 mm de alto y fuerza de sujeción de 170 g aproximadamente; 3) imán S0306N de 3 mm de diámetro, 6 mm de alto y fuerza de sujeción de 400 g aproximadamente. La dinámica del movimiento de los ovocitos-NPOv se registró bajo un estereomicroscopio acoplado a una cámara digital, para posteriormente ser analizado mediante el programa Tracker 6.0.8 (<https://physlets.org/tracker/>). Con los resultados obtenidos, se realizó la interpretación gráfica de la evolución temporal de la posición, así como la velocidad y la aceleración en función de su posición (velocidad y aceleración se calcularon utilizando diferencias finitas centradas).

Para este experimento se analizaron las trayectorias de 16 ovocitos totales, 7 para el imán S-02-02, 4 para el imán S-02-05 y 5 para el imán S-03-06 (Figura 12).



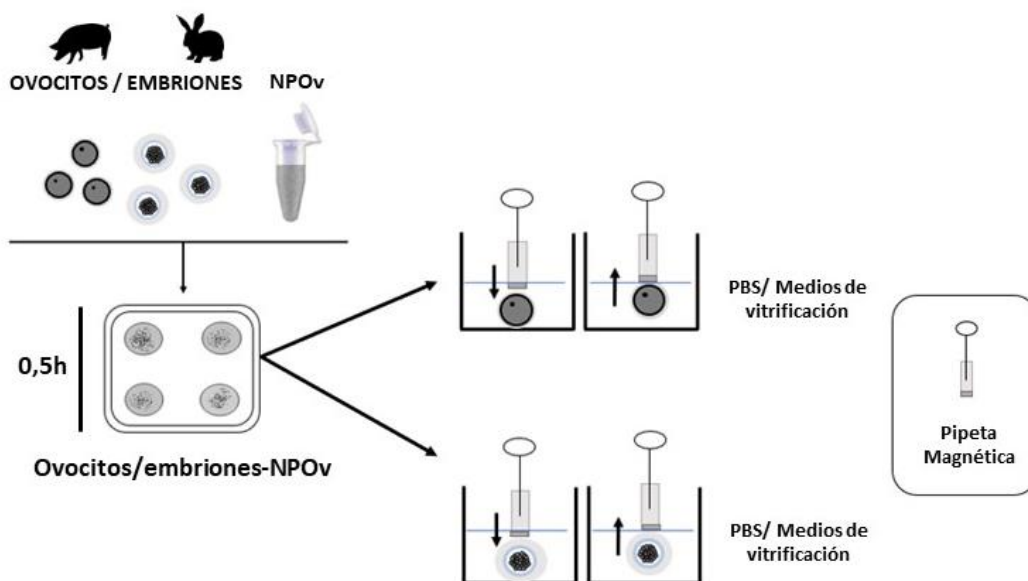
**Figura 12:** Diseño experimental sobre la cinética de movimiento de ovocitos-NPOv sometidos a diferentes campos magnéticos [imanes de neodimio: S-02-02 (2 mm  $\phi$  x 2 mm altura), S-02-05 (2 mm  $\phi$  x 5 mm altura), S-03-06 (3 mm  $\phi$  x 6 mm altura)]. El movimiento de los ovocitos (desde el movimiento inicial por la atracción magnética hasta la unión al imán) se registró bajo un microscopio estereoscópico acoplado a una cámara de grabación. Se analizaron el tiempo (s), la distancia (x, mm), la velocidad (v, mm/s) y la aceleración (a, mm/s<sup>2</sup>) de los ovocitos-NPOv.

### 5.15. Eficacia de un dispositivo magnético sobre el manejo de los complejos ovocito/embriones-NPOv

En primer lugar, se analizó la unión de ovocitos-NPOv porcinos y embriones-NPOv de conejo a un dispositivo magnético, el cual consiste en una estructura central, con embolo que accionamiento de campo magnético en su parte superior, y una zona de trabajo en la parte inferior, donde se encuentra un imán que es accionado por el embolo y el capuchón de plástico resistente al nitrógeno líquido, sobre el cual se ubican las células atraídas para su movilización. Este estudio se realizó en dos medios: PBS y medio de vitrificación (Kitazato, BioPharma, Shizuoka, Japón). Para ello, la pipeta magnética se introdujo en el pocillo conteniendo los ovocitos-NPOv o embriones-NPOv, y posteriormente se registró la cantidad de estructuras unidas a la misma. Para este

## MATERIALES Y MÉTODOS

experimento, se utilizaron 96 ovocitos-NPOv porcinos y 85 embriones-NPOv de conejo, para cada medio empleado (PBS o medio de vitrificación) (Figura 13).



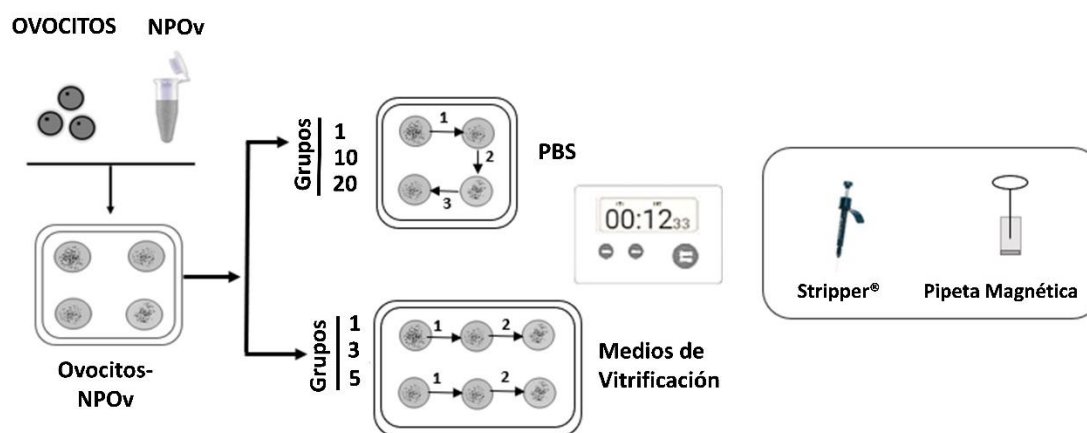
**Figura 13:** Diseño experimental para la evaluación de la unión de ovocitos-embriones NPOv a una pipeta magnética. Se cuantificó (%) la atracción de ovocitos/embriones-NPOv a la pipeta magnética en dos medios diferentes: PBS y medio de vitrificación.

Por otro lado, se evaluó el tiempo empleado para movilizar ovocitos-NPOv porcinos (en grupos de 1, 10 y 20) entre los pocillos en una placa de 4 pocillos (3 pases) con medio PBS. Para ello, se comparó el uso de dos dispositivos: una pipeta magnética y una pipeta de aspiración tradicional (Stripper®, CooperSurgical, Dinamarca) (n= 4 replicados; 416 ovocitos). El tiempo se calculó mediante un cronómetro, y se registraron los tiempos necesarios para movilizar los ovocitos-NPOv ubicados en pocillo 1 hasta llegar al pocillo 4 (pasando por el pocillo 2 y 3) (Figura 14).

Adicionalmente, ovocitos-NPOv porcinos se sometieron a un protocolo de vitrificación (Kitazato, BioPharma, Shizuoka, Japón) en grupos de 1, 3 y 5. En este caso, se comparó el tiempo empleado para realizar la totalidad del proceso de vitrificación utilizando cada uno de los dispositivos antes mencionados: pipeta magnética y Stripper® (n= 5 replicados; 45 ovocitos). La vitrificación se consideró finalizada en el momento en que todos los ovocitos-NPOv se unieron a la pipeta magnética en el último paso del protocolo de vitrificación, o bien, cuando se posicionaron sobre el Cryotop® (dispositivo de vitrificación de Kitazato® más utilizado tradicionalmente en clínicas de reproducción, el cual consiste en una fina lámina transparente (donde se cargan manualmente las

## MATERIALES Y MÉTODOS

estructuras a vitrificar) unida a un mango de plástico resistente al nitrógeno líquido) utilizando la pipeta de aspiración tradicional (Stripper®) (Figura 14).



**Figura 14:** Diseño experimental para la evaluación del tiempo empleado en movilizar grupos de ovocitos-NPOv en medio PBS y medio de vitrificación mediante dos pipetas: una pipeta magnética y una pipeta de aspiración (Stripper®). Se determinó el tiempo empleado para realizar 3 pases en placa de 4 pocillos con medio PBS de ovocitos-NPOv (en grupos de 1, 10 y 20) comparando dos pipetas (Stripper® y pipeta magnética). Además, se determinó el tiempo empleado para realizar los tres pases de ovocitos-NPOv (en grupos de 1, 3 y 5) en los diferentes medios de vitrificación necesarios para un protocolo de vitrificación, hasta finalizar el proceso comparando ambas pipetas (stripper® y magnética). Los tiempos fueron registrados utilizando un cronómetro.

### 5.16. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los parámetros espermáticos se realizó utilizando el software estadístico gratuito SAS University edition (SAS, 2016). Todos los parámetros de movimiento se compararon con el modelo mixto de SAS. Para otros resultados, el análisis estadístico se realizó con IBM SPSS v.23 (SPSS Inc. Chicago, IL, EE. UU.). Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson para analizar los datos porcentuales (penetración, monospermia, eficiencia, división embrionaria y tasa de blastocistos). Para el diámetro del embrión y el número de células del embrión, se utilizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov seguida del test de Kruskal Wallis. Para los resultados de actividad metabólica de los gametos a través del Seahorse se realizó una prueba de Shapiro-Wilks para la evaluación de la normalidad, dado que ambos parámetros (OCR y ECAR) mostraron una distribución normal se utilizó una prueba de ANOVA. Para los resultados de los estudios de atracción de ovocitos a campos magnéticos se utilizó la prueba chi-

## MATERIALES Y MÉTODOS

cuadrado para comparar las diferencias en la magnetización entre grupos. Por otra parte, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la cinética del desplazamiento de ovocitos-NPOv. Cuando se obtuvieron resultados significativos, se utilizó un análisis pos-hoc de Tukey.

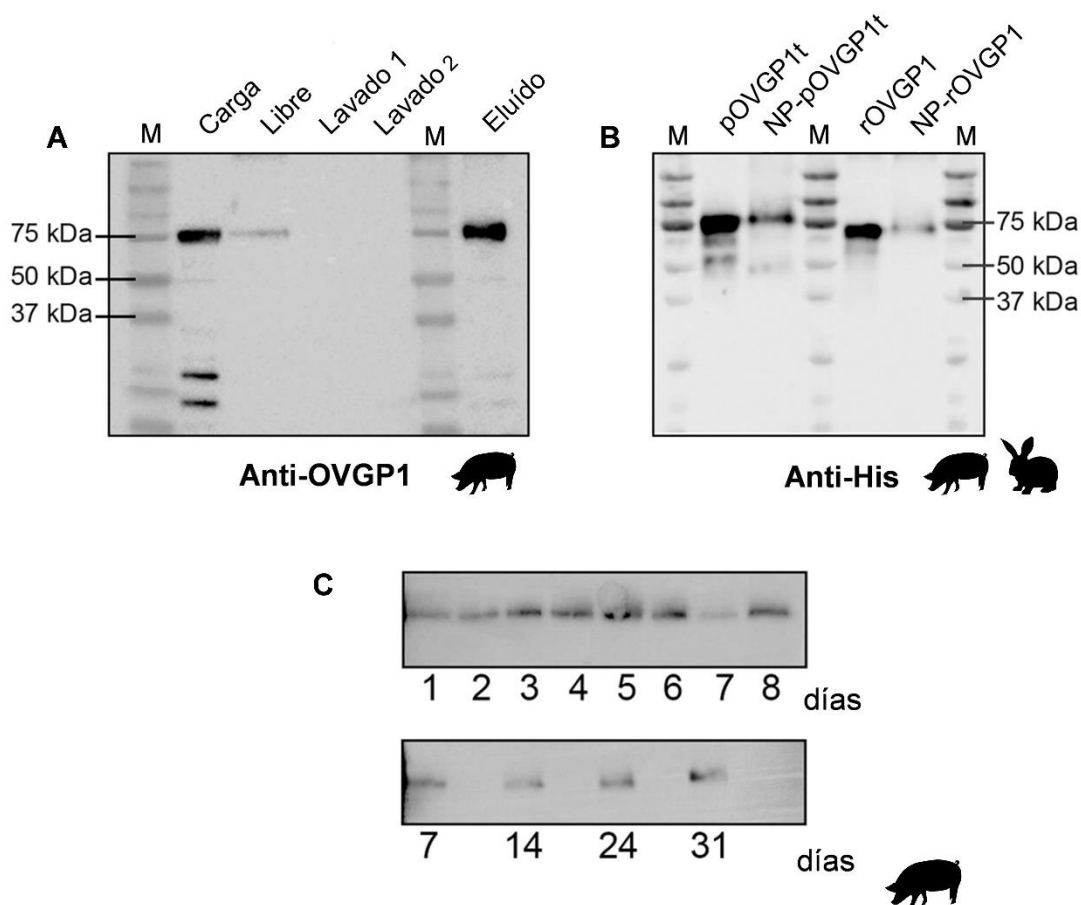
En cuanto a los estudios realizados en el modelo conejo, se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) que incluía el embrión de conejo [(+) NPOv y (-) NPOv] como efectos fijos. El error se designó con una distribución binomial utilizando la función de enlace probit. Los datos binomiales para el desarrollo *in vitro*, la tasa de implantación y la tasa de descendencia al nacer se asignaron como 1 si se había logrado un desarrollo positivo o como 0 en caso contrario. Además, se ajustó un GLM para el análisis del peso corporal incluyendo el grupo experimental como efecto fijo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $P < 0,05$ .

**R E S U L T A D O S**

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Conjugación de las NP con OVGP1 y análisis de su estabilidad en el tiempo

El análisis de la conjugación de la proteína OVGP1 recombinante truncada porcina (pOVGP1t) y la OVGP1 de conejo (rOVGP1) con las NP (NPOv), se realizó mediante una electroforesis y *Western blot*. Los resultados confirmaron la presencia de la proteína pOVGP1t con el peso molecular esperado (80 kDa (Algarra et al., 2016)) (Figura 15-A) retenida en la fracción que fue recuperada junto con las NP (Eluido), no encontrándose en las fracciones restantes. En la figura 15-B se observa la presencia de bandas del peso molecular esperado también para la proteína rOVGP1 (70 kDa (Algarra et al., 2016)). Estos resultados confirman la conjugación exitosa de NP con la proteína recombinante de los dos modelos biológicos que proponemos para este trabajo (porcino y conejo). Además, confirmamos la conjugación estable hasta al menos el día 31 después de la conjugación (último día de evaluación) (Figura 15-C).



## RESULTADOS

**Figura 15:** Conjugación de las NP con la proteína oviductina y su estabilidad en el tiempo. (A) *Western blot* de la proteína pOVGP1t con las NP, revelado con el anticuerpo anti-OVGP1. Las calles representan: Carga: pOVGP1t sin conjugar; Libre (medio recogido tras la conjugación): proteína excedente que no se conjugó; Lavado 1 y Lavado 2: lavados de las NP tras la conjugación; Eluído: pOVGP1t conjugada, M= marcador de peso molecular (kDa). (B) *Western blot* que demuestra la presencia de pOVGP1t y rOVGP1 unidas a NP, revelado con el anticuerpo anti-His. Las calles representan: pOVGP1t y rOVGP1 proteína pura sin conjugar, NP-pOVGP1t y NP-rOVGP1 proteína unida a NP. M= marcador de peso molecular (kDa). (C) *Western blot* de estabilidad de la conjugación NP-pOVGP1t a lo largo del tiempo. Cada punto de tiempo indica en una muestra la presencia de Ov unidas a las NP tras los días indicados (n= 3 replicados de cada WB).

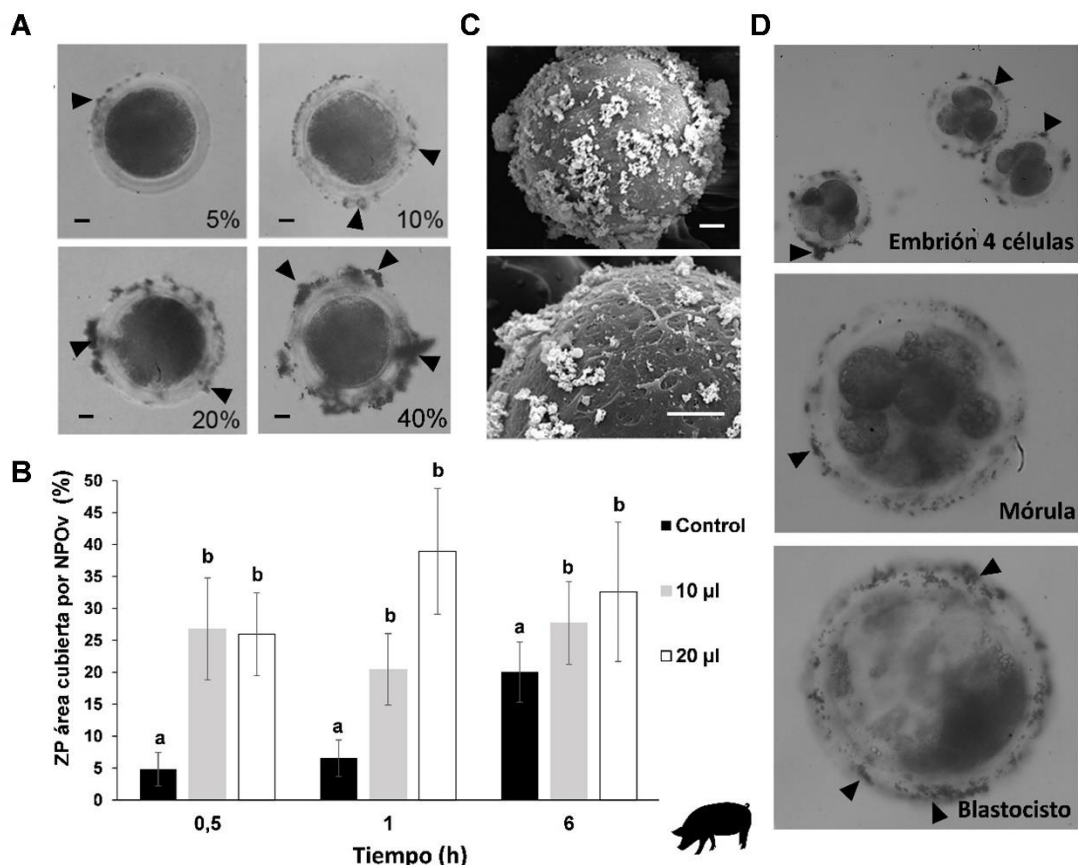
### 6.2. Análisis de la unión específica de NPOv a la ZP de ovocitos y embriones porcinos

Con el fin de analizar la unión específica de las NPOv a la zona externa de la ZP de ovocitos MIV se incubaron dos volúmenes de NPOv (10 y 20 µl) a tiempos crecientes con ovocitos MIV y se evaluó el porcentaje de área de la ZP cubierta por NP conjugadas y sin conjugar.

El análisis de imagen mostró que el área de la superficie de la ZP de los ovocitos incubados con NPOv fue significativamente mayor en comparación con los ovocitos co-incubados con NP sin conjugar en los tres tiempos de co-incubación 0,5, 1 y 6 h ( $P<0,05$ ) (Figura 16-B). La máxima superficie de la ZP cubierta por las NPOv fue del 40% y se obtuvo con una co-incubación de 1 h (Figura 16-A y B). Estos resultados nos indican que las NP se unen de manera específica a la parte externa de la ZP cuando son conjugadas con OVGP1. Las imágenes de SEM mostraron la presencia de NPOv en la parte externa de la ZP distribuidas de forma homogénea (Figura 16-C). Cuando incubamos embriones porcinos con NPOv observamos mediante microscopía la presencia de las NPOv en la parte externa de la ZP de embriones de 4 células, mórula y blastocisto (Figura 16-D).



## RESULTADOS



**Figura 16:** Unión específica de las NP conjugadas a OVGP1 (NPOv). (A) Imágenes de la distribución de NPOv (puntos negros, flechas negras indicativas) alrededor de la ZP de ovocitos obtenidas con el programa *Qwin* (Leica Microsystems Ltd., Barcelona, España) para la evaluación del porcentaje de área de la ZP cubierta por NPs (Barra escala, 25 µm). (B) Distribución (%) de NPOv en la ZP de ovocitos. Los ovocitos se incubaron con NP (control) o NPOv (10 y 20 µl) durante 0,5, 1 y 6 h para la posterior evaluación de la distribución de las NP alrededor de la ZP. (D) Imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) muestran NPOv (puntos blancos refringentes) distribuidas alrededor de la ZP de ovocitos (Barra escala, 25 µm). (C) Imágenes de microscopio invertido donde se observa la distribución de NPOv (puntos negros, flechas negras indicativas) en la ZP de embriones en diferentes etapas de desarrollo. Los valores se expresan como la media ± SEM (%) (n=3 replicados). Letras diferentes (a, b) entre barras en un mismo tiempo de incubación indican diferencias significativas (P<0,05).

### 6.3. Evaluación de la viabilidad de gametos y embriones en presencia de NPOv

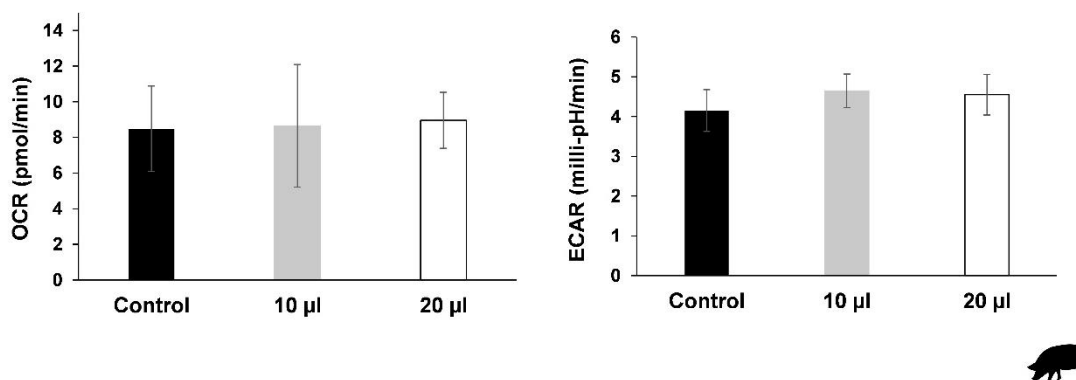
#### 6.3.1. Biomodelo porcino

##### 6.3.1.1. Análisis de la actividad metabólica de gametos porcinos incubados con NPOv

Para evaluar si la presencia de NPOv en la superficie de los ovocitos afecta su viabilidad, se analizó la actividad metabólica de los ovocitos tras la incubación con NPOv. A través

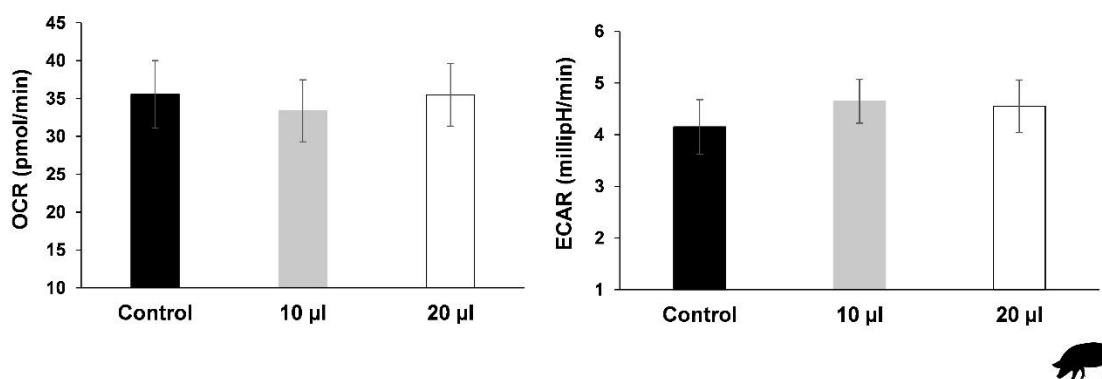
## RESULTADOS

de un analizador de flujo celular se estudiaron parámetros de fosforilación oxidativa y tasas glucolíticas, mediante la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, pmol/min) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR, milli-pH/min) respectivamente. Los resultados obtenidos del análisis del metabolismo en ovocitos no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados (OCR y ECAR) entre los grupos ovocitos-NPOv (10 y 20  $\mu$ l) con respecto al grupo control (ovocitos sin NPOv) ( $P>0,05$ ) (Figura 17).



**Figura 17:** Análisis de la actividad metabólica (OCR y ECAR) de ovocitos tras la incubación con dos volúmenes de NPOv (10 y 20  $\mu$ l) y el control (ovocitos sin NPOv). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  replicados, 20 ovocitos por grupo en cada replicado) ( $P>0,05$ ).

Por otro lado, evaluamos igualmente el efecto de la presencia de NPOv en medios de incubación sobre la actividad metabólica de los espermatozoides. Los parámetros analizados (OCR y ECAR) en los espermatozoides incubados con NPOv y el grupo control (espermatozoides sin NPOv) no mostraron diferencias significativas indicando que el metabolismo de los espermatozoides tampoco se vio afectado por la presencia de NPOv en el medio ( $P>0,05$ ) (Figura 18).



## RESULTADOS

**Figura 18:** Actividad metabólica (OCR y ECAR) de los espermatozoides tras la co-incubación con dos volúmenes de NPOv (10 y 20  $\mu$ l) y el control. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM (n = 8 replicados) ( $P>0,05$ ).

### **6.3.1.2. Parámetros de calidad de los espermatozoides sometidos a la presencia de NPOv**

Para conocer los posibles efectos de las NPOv sobre los espermatozoides en los medios de incubación se realizó el análisis de los parámetros de calidad espermática tras su co-incubación con NPOv a diferentes tiempos. En este estudio se emplearon dos medios: medio TALP, el medio rutinariamente utilizado para la realización de la FIV (Rath et al., 1997) y el medio BTS, uno de los medios de dilución más utilizados en la preparación de dosis seminales porcinas.

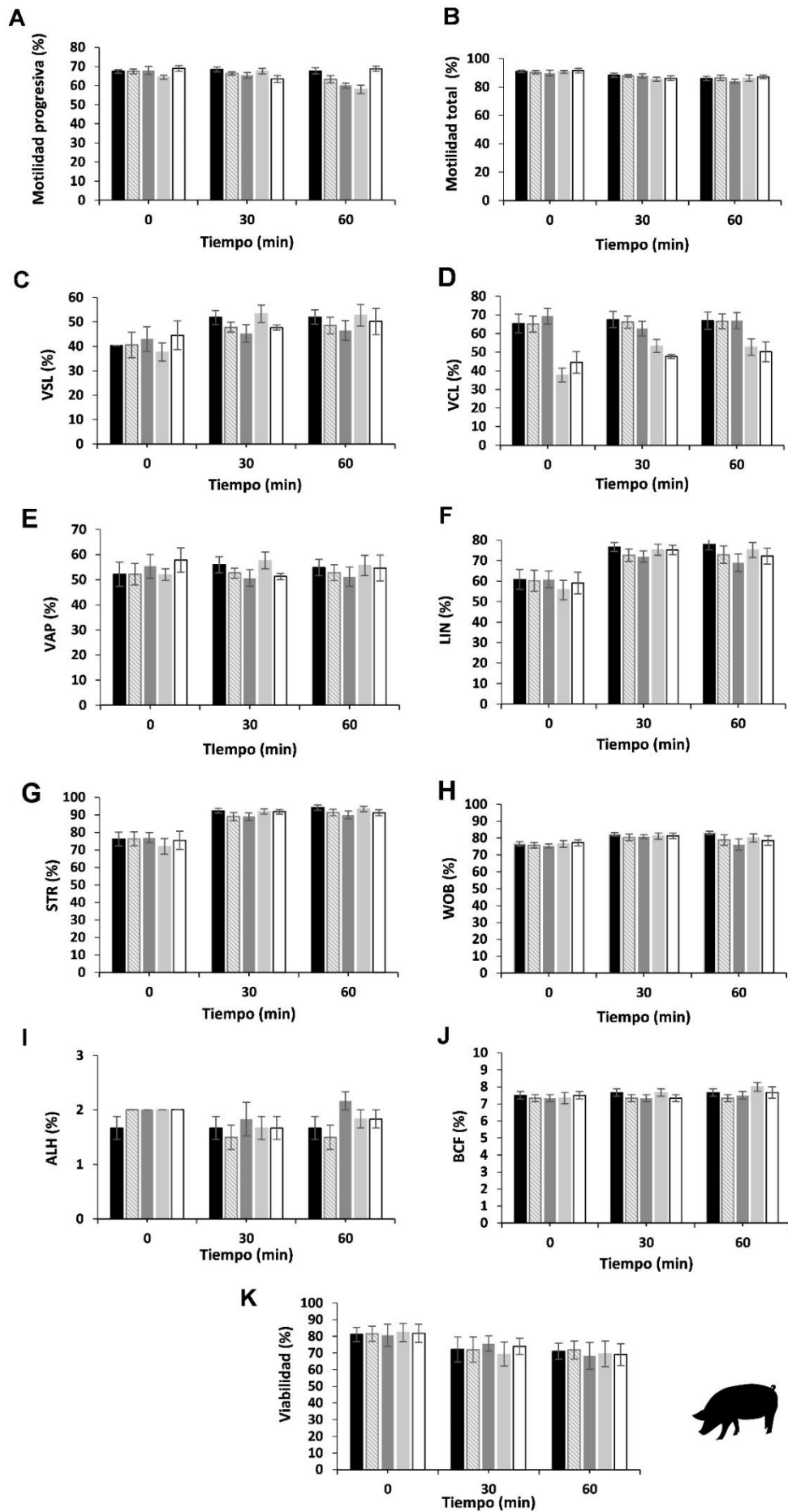
Los resultados de los parámetros de calidad espermática analizados cuando se utilizó medio TALP mostraron que la adición de NP y NPOv a la muestra seminal no afectó la funcionalidad espermática (Figura 19). La motilidad total y progresiva de los espermatozoides no difirió entre los grupos control y experimentales, no habiendo interacciones entre el tiempo y los grupos experimentales (Figura 19-A y B) ( $P>0,05$ ). Además, no se observaron diferencias en los parámetros cinéticos ni en la viabilidad de los espermatozoides entre los tratamientos cuando se utilizó TALP como medio de incubación (Tabla 1 y Figura 19-C-K) ( $P>0,05$ ).

**Tabla 1:** Resultados de los parámetros de calidad espermática analizados (motilidad total (MOT), motilidad progresiva (PMOT), velocidad curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), velocidad media (VAP), coeficiente de linealidad (LIN), coeficiente de rectitud (STR), coeficiente de oscilación (WOB), frecuencia de desplazamiento de la cabeza (BCF), amplitud lateral de la cabeza (ALH), y viabilidad) tras la incubación con NP y NPOv en dos grupos experimentales (10 y 20  $\mu$ l) y en medio TALP durante 60 min (analizados a los 0, 30 y 60 min) incubados a 38,5 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Se realizó el análisis estadístico a través de un estudio de medidas repetidas en el tiempo (en un total de 5 replicados).

## R E S U L T A D O S

| Parámetros     | Tratamientos      |       |       |        |        |         | SEM  |
|----------------|-------------------|-------|-------|--------|--------|---------|------|
|                | CONTROL<br>(TALP) | NP10  | NP20  | NPOv10 | NPOv20 | p-valor |      |
| MOT (%)        | 88,44             | 88,17 | 87,28 | 88,22  | 88,28  | 0,82    | 0,01 |
| PMOT (%)       | 68,50             | 65,72 | 64,44 | 67,06  | 69,28  | 0,24    | 0,02 |
| VCL (μm/s)     | 66,55             | 65,94 | 66,33 | 67,72  | 68,77  | 0,85    | 3,25 |
| VSL (μm/s)     | 48,06             | 45,61 | 44,94 | 47,56  | 47,44  | 0,81    | 3,14 |
| VAP (μm/s)     | 54,33             | 52,56 | 52,39 | 54,33  | 54,61  | 0,83    | 2,90 |
| LIN (%)        | 71,83             | 68,56 | 67,28 | 69,61  | 68,78  | 0,60    | 3,09 |
| STR (%)        | 87,56             | 85,56 | 85,33 | 86,39  | 86,17  | 0,89    | 2,24 |
| WOB (%)        | 80,56             | 78,28 | 77,44 | 79,67  | 79,00  | 0,06    | 1,71 |
| BCF (Hz)       | 7,61              | 7,33  | 7,39  | 7,67   | 7,50   | 0,31    | 0,16 |
| ALH (μm)       | 1,67              | 1,67  | 2,00  | 1,72   | 1,83   | 0,09    | 0,13 |
| Viabilidad (%) | 76,89             | 79,28 | 78,56 | 77,78  | 77,00  | 0,45    | 3,94 |

# RESULTADOS



## RESULTADOS

**Figura 19:** Resultados de los parámetros de calidad espermática analizados: motilidad progresiva (A), motilidad total (B), VSL (C), VCL (D), VAP (E), LIN (F), STR (G), WOB (H), ALH (I), BCF (J) y viabilidad (K). Correspondientes a los grupos analizados CONTROL (■), NP10 (▨), NP20 (■), NPOv10 (■) y NPOv20 (□) cuando se utilizó medio TALP (periodo de incubación 0, 30 y 60 min) (media  $\pm$  SEM) (en un total de 5 replicados).

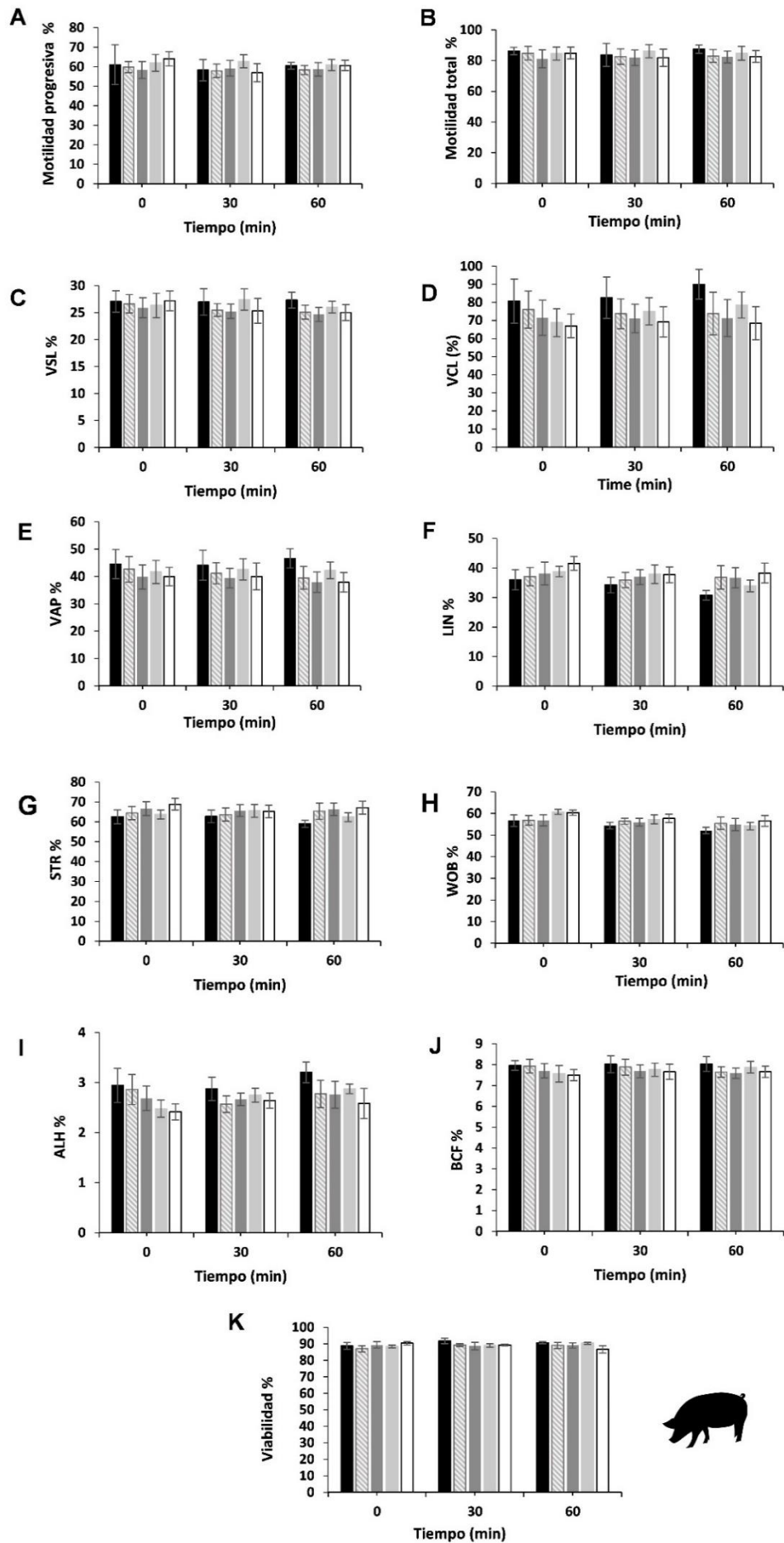
Cuando se utilizó el diluyente de semen BTS los resultados demostraron que la adición de NP y NPOv afecta sobre algunos parámetros de cinética espermática, entre los grupos experimentales (Tabla 2). En este caso, la motilidad total y progresiva, y la viabilidad de los espermatozoides no difirió entre el grupo control y el resto de los grupos experimentales, no existiendo interacción entre tiempo y grupos para ninguno de los parámetros analizados ( $P > 0,05$ ) (Figura 20-A-K). Sin embargo, se observaron algunas diferencias en los parámetros cinéticos de los espermatozoides (Tabla 2). Los parámetros VCL y ALH fueron significativamente mayores en el grupo control en comparación con el resto de los grupos experimentales ( $P \leq 0.001$  y  $P \leq 0.007$ , respectivamente). VSL y VAP del grupo control fueron mayores que NP10, NP20 y NPOv20 ( $P \leq 0.02$  y  $P \leq 0.001$ , respectivamente), pero no mostraron diferencias con el grupo NPOv10. VSL y VAP de NP20 fueron significativamente diferentes de NPOv10 ( $P \leq 0.03$  y  $P \leq 0.05$ , respectivamente). Finalmente, LIN y STR del grupo de control fueron menores que en los grupos NP20 y NPOv20 ( $P \leq 0.001$  y  $P \leq 0.007$ , respectivamente).

## RESULTADOS

**Tabla 2:** Resultados de los parámetros de calidad espermática analizados tras la co-incubación con NP y NPOv en dos volúmenes y en medio BTS durante 60 min (analizados a los 0, 30 y 60 min) conservados a 15 °C. Se realizó el análisis estadístico a través de un estudio de medidas repetidas en el tiempo. Los superíndices (a, b, c) indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) (en un total de 5 replicados).

| Parámetros              | Tratamientos       |                      |                    |                      |                      | p-valor | SEM  |
|-------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------|------|
|                         | CONTROL (BTS)      | NP10                 | NP20               | NPOv10               | NPOv20               |         |      |
| MOT (%)                 | 85,89              | 83,39                | 81,83              | 85,06                | 83,17                | 0,07    | 4,30 |
| PMOT (%)                | 59,89              | 58,67                | 58,72              | 61,89                | 60,56                | 0,19    | 3,08 |
| VCL ( $\mu\text{m/s}$ ) | 84,43 <sup>a</sup> | 74,51 <sup>b</sup>   | 71,30 <sup>b</sup> | 74,11 <sup>b</sup>   | 68,23 <sup>b</sup>   | 0,001   | 8,71 |
| VSL ( $\mu\text{m/s}$ ) | 27,13 <sup>a</sup> | 25,74 <sup>b,c</sup> | 25,27 <sup>c</sup> | 26,60 <sup>a,b</sup> | 25,84 <sup>b,c</sup> | 0,02    | 1,65 |
| VAP ( $\mu\text{m/s}$ ) | 45,10 <sup>a</sup> | 41,10 <sup>b,c</sup> | 39,03 <sup>c</sup> | 42,16 <sup>a,b</sup> | 39,27 <sup>b,c</sup> | 0,001   | 3,96 |
| LIN (%)                 | 33,67 <sup>b</sup> | 36,62 <sup>a,b</sup> | 37,26 <sup>a</sup> | 36,87 <sup>a,b</sup> | 39,19 <sup>a</sup>   | 0,04    | 2,58 |
| STR (%)                 | 61,44 <sup>b</sup> | 64,50 <sup>a,b</sup> | 66,21 <sup>a</sup> | 63,87 <sup>a,b</sup> | 67,07 <sup>a</sup>   | 0,02    | 2,78 |
| WOB (%)                 | 54,41              | 56,25                | 55,90              | 57,41                | 58,24                | 0,05    | 1,76 |
| BCF (Hz)                | 8,01               | 7,82                 | 7,66               | 7,73                 | 7,61                 | 0,06    | 0,29 |
| ALH ( $\mu\text{m}$ )   | 3,01 <sup>a</sup>  | 2,74 <sup>b</sup>    | 2,70 <sup>b</sup>  | 2,70 <sup>b</sup>    | 2,55 <sup>b</sup>    | 0,01    | 0,18 |
| Viabilidad (%)          | 90,33              | 88,44                | 89,00              | 89,22                | 88,77                | 0,84    | 1,20 |

# RESULTADOS



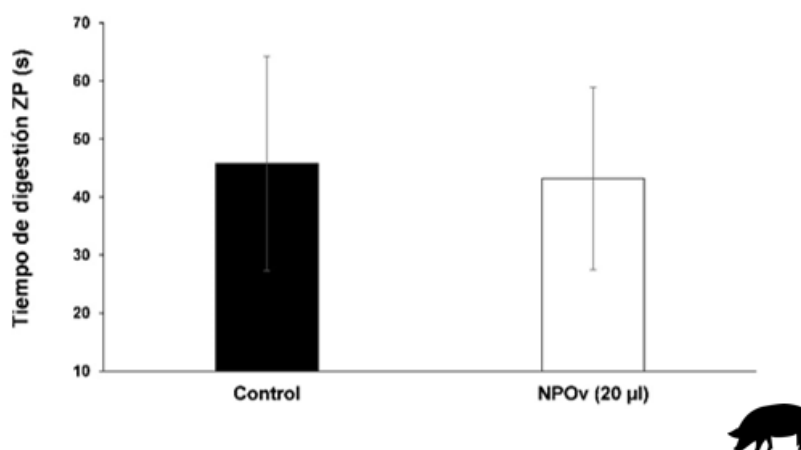


## RESULTADOS

**Figura 20:** Resultados de los parámetros de calidad espermática analizados: motilidad progresiva (A), motilidad total (B), VSL (C), VCL (D), VAP (E), LIN (F), STR (G), WOB (H), ALH (I), BCF (J) y viabilidad (K). Correspondientes a los grupos analizados CONTROL (■), NP10 (▨), NP20 (■), NPOv10 (■) y NPOv20 (□) cuando se utilizó medio BTS y fueron incubados hasta 60 min (media  $\pm$  SEM) (en un total de 5 replicados).

### 6.3.1.3. Evaluación del tiempo de digestión de la ZP en presencia de NPOv

Se ha comprobado previamente que la proteína OVGP1 está involucrada en el endurecimiento de la ZP de ovocitos (Coy et al., 2008), y en consecuencia su presencia en las NPOv podría tener un efecto sobre la ZP. Por lo tanto, evaluamos el tiempo de digestión con tripsina de la ZP de ovocitos incubados con NPOv. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en el tiempo de digestión de la ZP entre los grupos analizados (control=  $45,76 \pm 18,5$  s vs NPOv=  $43,22 \pm 15,77$  s;  $P > 0,05$ ) (Figura 21), sugiriendo que la presencia de OVGP1 conjugada a las NP no afecta la ZP.



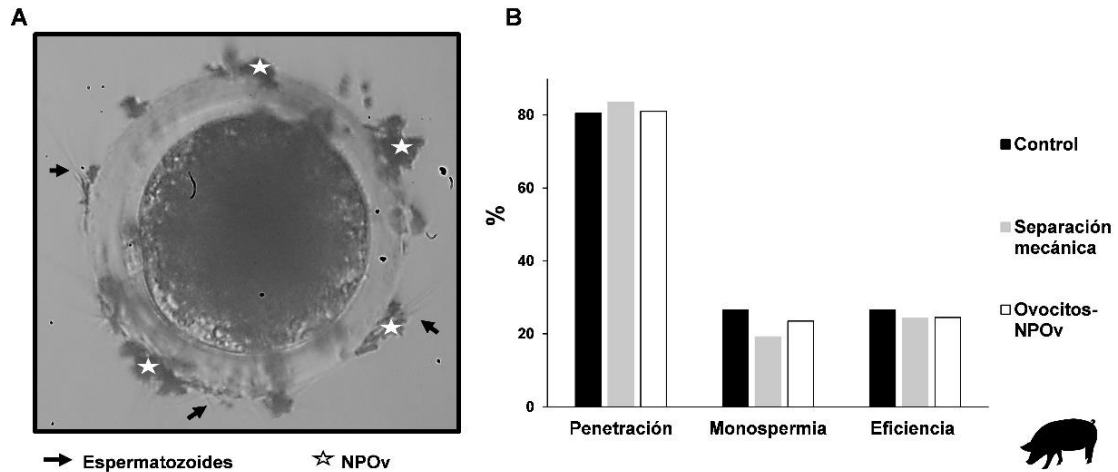
**Figura 21:** Tiempo (s) de digestión con tripsina de la ZP de ovocitos unidos a NPOv. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  DE (n= 58 y 61 ovocitos para el grupo control y NPOv respectivamente, en 3 replicados).

### 6.3.1.4. Análisis de los resultados de la fecundación in vitro y el cultivo in vitro embrionario

Para conocer el efecto de las NPOv sobre la capacidad de fecundación de los ovocitos estos se sometieron a un protocolo de FIV. Los resultados se observan en la Figura 22-A y B. Igualmente, se evaluó la capacidad fecundante de ovocitos incubados con NPOv tras su separación mecánica a través de pipeteos suaves (grupo separación mecánica) y el grupo control (sin NPOv). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias

## RESULTADOS

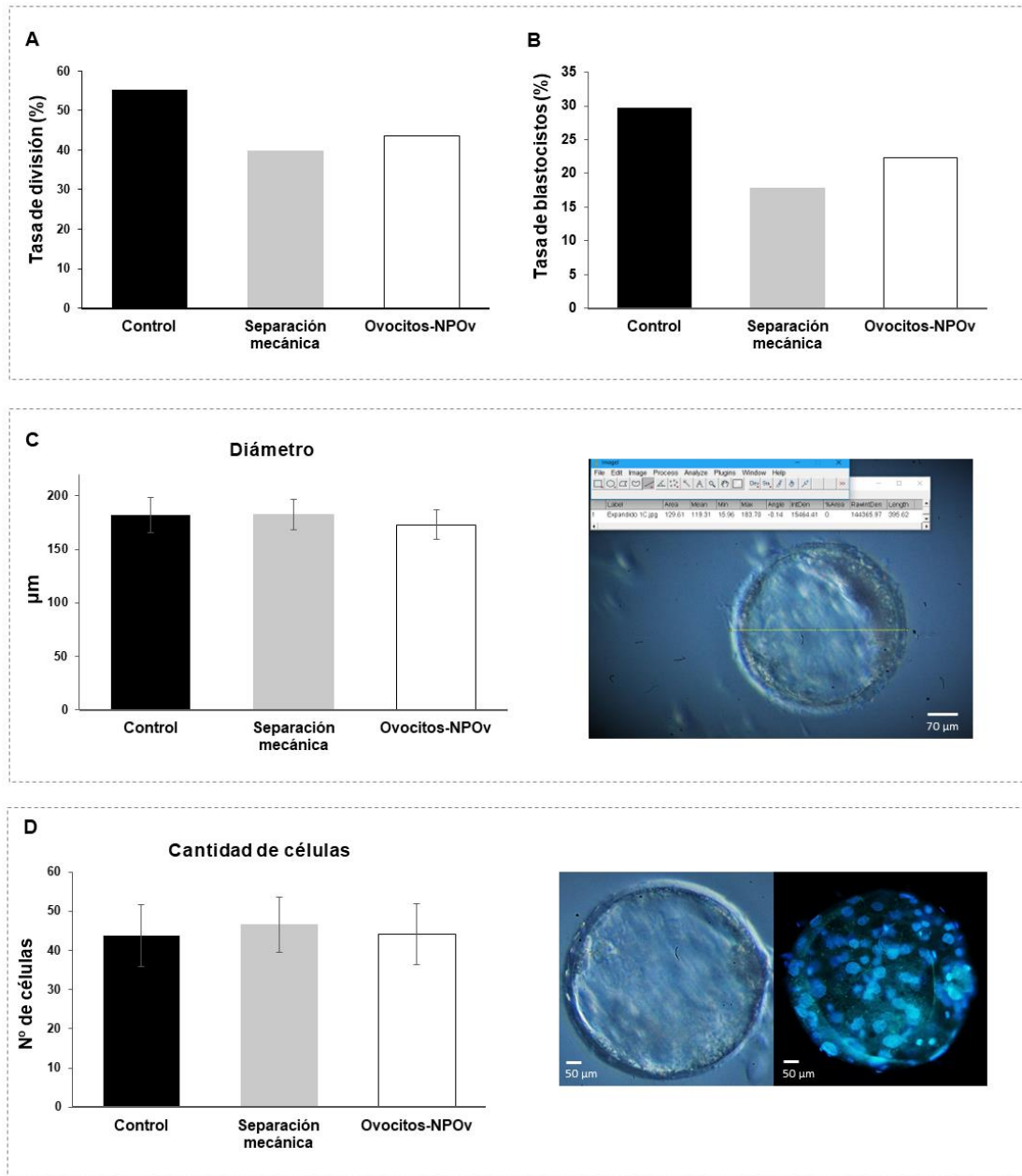
significativas en relación con el porcentaje de penetración (rango entre 80,51 y 83,65%), ni en el porcentaje de monospermia (rango entre 19,93 y 26,65%) entre los grupos estudiados ( $P>0,05$ ) (Figura 22-B). Asimismo, la eficiencia (número de presuntos cigotos obtenidos por cada 100 ovocitos penetrados) no presentó diferencias entre los grupos comparados (rango entre 24,29 y 26,62%) ( $P>0,05$ ) (Figura 22-B).



**Figura 22:** Efecto de las NPOv sobre la capacidad fecundante de ovocitos. (A) Imagen de un ovocito-NPOv con espermatozoides adheridos a la ZP. Estrellas indican NPOv adheridas a las ZP; flechas indican espermatozoides unidos a la ZP. (B) Gráfico mostrando los resultados de penetración, monospermia y eficiencia entre los grupos experimentales (Control, separación mecánica y ovocitos-NPOv). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados ( $P>0,05$ ). Los datos se presentan como porcentaje (Control= 157 ovocitos, Separación mecánica= 177 ovocitos y ovocitos-NPOv= 200 ovocitos, en un total de 7 replicados).

A continuación, se evaluó la competencia de los ovocitos incubados con NPOv para continuar su desarrollo hasta embriones tras la FIV comparando los resultados con el grupo control (Figura 23). No se observaron diferencias entre los grupos ( $P>0,05$ ) en términos de tasa de división (%) (48 hpi) (rango entre 43,64 y 55,37%) (Figura 23-A) y tasa de blastocistos (%) (7 dpi) (rango entre 22,28 y 29,67%) (Figura 23-B). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la calidad de los embriones evaluados a través de la medición del diámetro del blastocito (rango entre  $173,14\pm13,55$  y  $182,48\pm13,97$   $\mu\text{m}$ ) (Figura 23-C) y el número de células por blastocisto (rango entre  $43,77\pm7,97$  y  $46,52\pm6,97$  %) (Figura 23-D) ( $P>0,05$ ).

## RESULTADOS



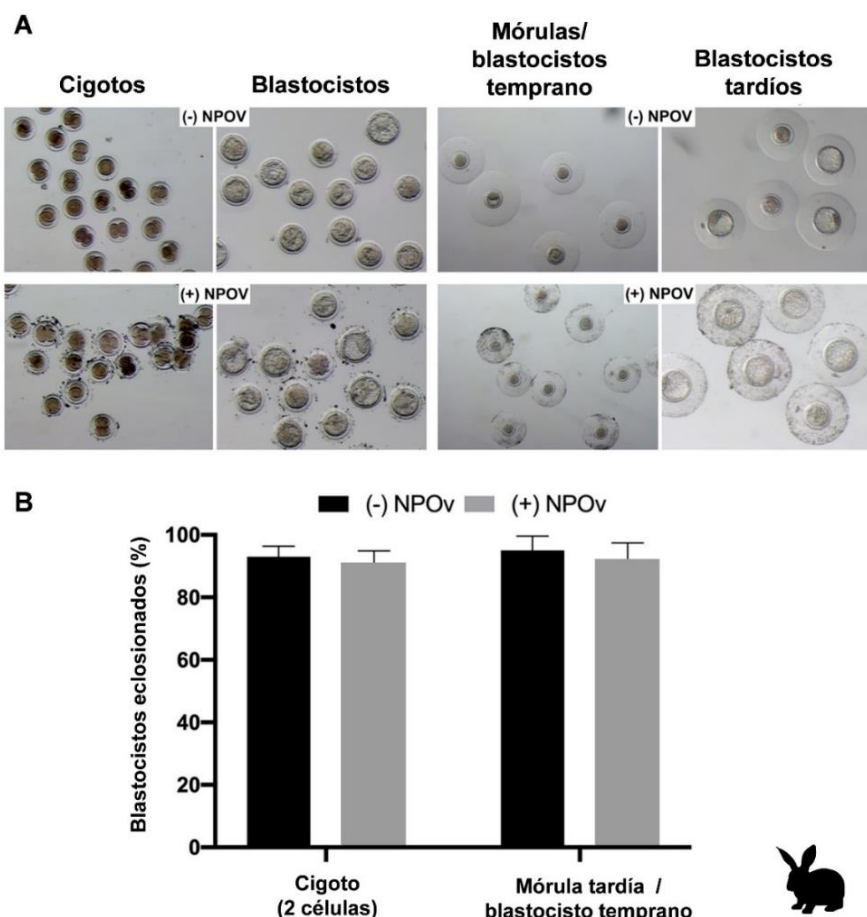
**Figura 23:** Evaluación del efecto de las NPOv sobre el desarrollo embrionario, analizado en tres grupos experimentales (Control, separación mecánica y ovocitos-NPOv). (A) gráfico mostrando los resultados de tasa de división (%), (B) gráfico con los resultados de la tasa de blastocistos (%), (C) gráfico (izquierda) mostrando los resultados del diámetro del blastocisto (μm), medido a través de *Image J* (imagen a la derecha) (barra de escala, 70 μm), y (D) gráfico (izquierda) de los resultados del número de células por blastocisto, imagen (derecha) de blastocisto mediante microscopio de campo claro y mediante microscopio de epifluorescencia. Teñidos con *Hoechst* (color azul) se observan los núcleos de cada blastómera (barra de escala, 50 μm). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados ( $P > 0,05$ ) (control= 493 ovocitos, separación mecánica= 404 ovocitos y ovocitos-NPOv= 401 ovocitos, distribuidos en un total de 10 replicados).

### 6.3.2. Biomodelo conejo

#### 6.3.2.1. Estudios *in vitro*: Tasa de desarrollo embrionario.

Complementariamente a los estudios realizados en la especie porcina, se analizó el efecto de las NPOv cuando se incubaron con embriones de conejo sobre la tasa de desarrollo embrionario *in vitro*. En primer lugar, la rOVGP1 se conjugó con NP y se procedió a la incubación con embriones en dos estadios diferentes: cigoto-2-células y mórula tardía/blastocisto temprano (grupos (+) NPOv) (Figura 24-A). Estos embriones-NPOv continuaron su desarrollo embrionario *in vitro* hasta la etapa de blastocisto eclosionado, lo que corresponde con 72 h de incubación para los cigotos de 2-células y 24 h para las mórulas tardías/blastocistos tempranos. Adicionalmente, se sometieron al mismo tratamiento grupos controles para ambas etapas correspondientes a cigotos de 2-células y mórulas tardías/blastocistos tempranos sin NPOv (grupos (-) NPOv). Los embriones con NPOv adheridas en la parte externa de la ZP no mostraron diferencias en la capacidad para llegar a la eclosión del blastocisto en cultivo *in vitro* cuando se comparó con el grupo control sin NPOv [(+) NPOv:  $92,0 \pm 5,43\%$  vs (-) NPOv:  $91,0 \pm 3,90\%$ ] ( $P > 0,05$ ) (Figura 24-B).

## RESULTADOS



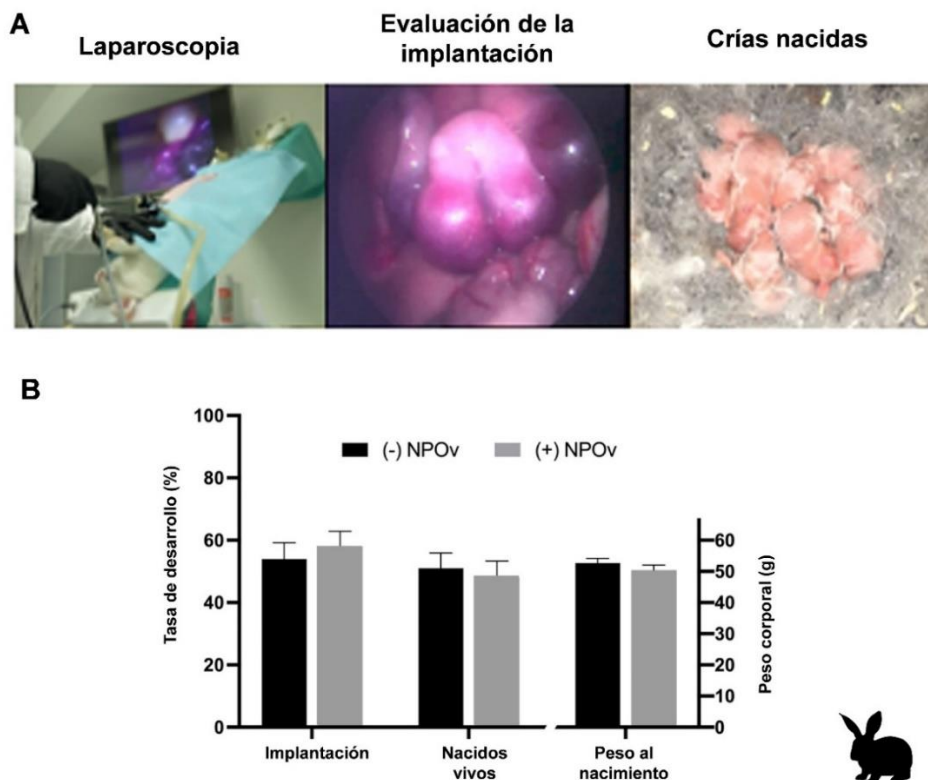
**Figura 24:** Estudio *in vitro* del desarrollo embrionario en conejo hasta etapa de blastocisto eclosionado a partir de cigotos/mórulas tardías incubados con NPOv. (A) Imágenes que muestran los embriones (cigotos, blastocistos, mórulas tardías/blastocistos tempranos y blastocistos tardíos) obtenidos de cada grupo analizado [(+) NPOv vs (-) NPOv]. (B) Blastocistos eclosionados (%) tras el desarrollo embrionario *in vitro* (%) desde la etapa de cigotos (2 células) y desde la etapa de mórulas tardías/embriones temprano. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). (cigotos de 2 células= 56 (+) NPOv, 55 (-) NPOv; mórulas tardías= 84 (+) NPOv, 80 (-) NPOv, en 3 replicados).

### 6.3.2.2. Estudios *in vivo*: tasa de implantación, tasa de nacidos vivos y peso corporal al nacimiento

En este estudio, se analizó la progresión del desarrollo embrionario en condiciones *in vivo*, tras la transferencia por laparoscopia a hembras receptoras de cigotos incubados con NPOv o sin la adición de éstas (Figura 25-A). No se encontraron diferencias en cuanto a la tasa de implantación ((+) NPOv= 54,29% y (-) NPOv= 57,78%), y de nacidos vivos ((+)

## RESULTADOS

NPOv= 51,43% y (-) NPOv= 47,78%) ( $P>0,05$ ) (Figura 25-B). Además, el peso corporal al nacimiento de los gazapos fue similar entre los grupos analizados ( $P>0,05$ ) (Figura 25-B).

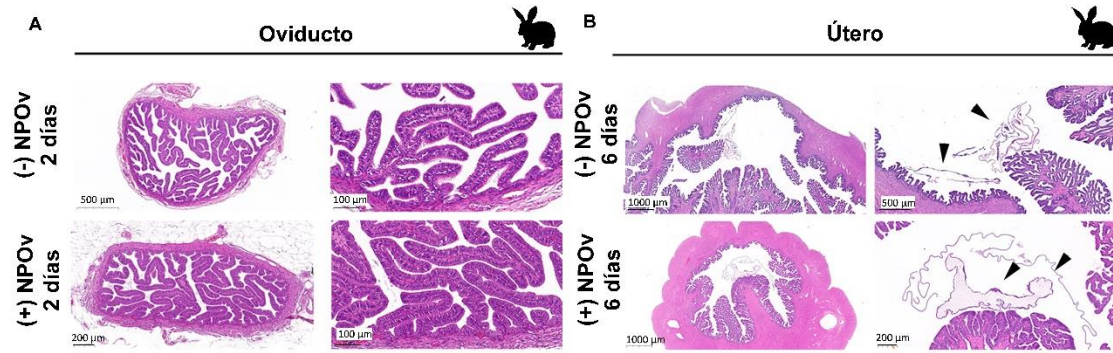


**Figura 25:** Estudio *in vivo* del desarrollo embrionario hasta nacimiento tras la transferencia de cigotos-NPOv. (A) Imágenes mostrando el procedimiento laparoscópico de transferencia de embriones, la evaluación de la implantación y la camada. (B) Gráfico donde se muestran los resultados obtenidos del desarrollo embrionario *in vivo*: tasa de implantación (%), tasa de nacidos vivos (%) y peso al nacimiento de gazapos (g). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados ( $P>0,05$ ) ( $n= 105$  cigotos (+) NPOv y 90 cigotos (-) NPOv, en 10 hembras transferidas (5 por grupo)).

### 6.3.2.3. Respuesta del tejido oviductal y uterino de conejas a la presencia de embriones-NPOv

Para comprobar la seguridad de NPOv se recolectaron embriones en estadio pronuclear a las 14 h tras la inseminación. Posteriormente, algunos se incubaron con NPOv y otros se mantuvieron como grupo control sin NPOv, y se transfirieron a oviductos ipsilaterales de una misma madre receptora ( $n= 6$  madres receptoras totales). En el día 2 y 6 tras la transferencia se recolectaron los oviductos y cuernos uterinos respectivamente, para la evaluación de los tejidos. No se encontraron anomalías histológicas en ninguno de los tejidos estudiados, oviductal (Figura 26-A) y uterino (Figura 26-B).

## RESULTADOS

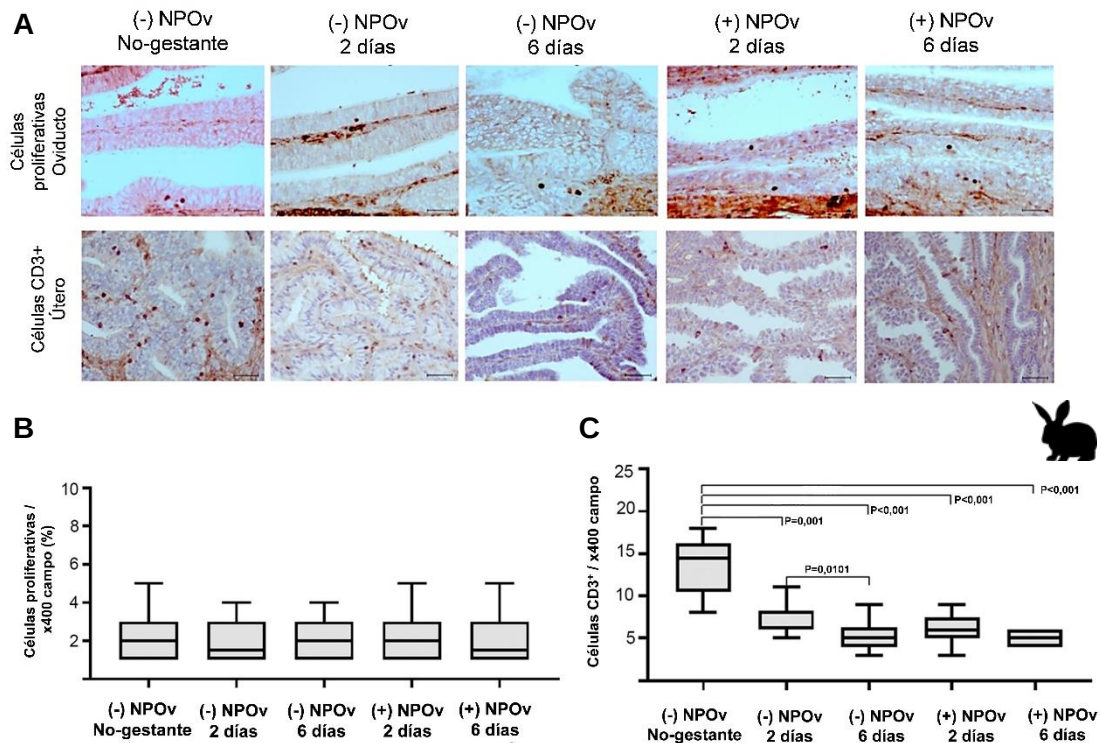


**Figura 26:** Tejidos oviductal y uterino tras la transferencia de embriones con ((+)NPOv) y sin NPOv ((-)NPOv). Se muestran microfotografías histológicas (hematoxilina y eosina) de oviducto (A) (2 días tras la transferencia de embriones) y útero (B) (6 días tras la transferencia de embriones). Las flechas negras indican tejido embrionario.

Además, se evaluó la proliferación celular (Ki-67) (García-Palencia et al., 2007) entre los diferentes grupos experimentales en el tejido oviductal, siendo estadísticamente similar entre ellos ( $P > 0,05$ ) (Figura 27-A (panel superior) y B). Por otro lado, la respuesta inflamatoria analizada mediante la expresión de CD3 (He et al., 2021) del tejido uterino, no se vio afectada por la presencia de NPOv ( $P > 0,05$ ) (Figura 27-A (panel inferior) y C). Aunque, el tejido uterino sin la presencia de embriones (no-gestante) mostró un aumento significativo de células CD3 positivas en comparación con el resto de los grupos ( $P \leq 0,0001$ ), y el tejido uterino de hembras gestantes de 2 días, con embriones sin NPOv mostró un mayor número de células CD3 positivas respecto al mismo grupo en día 6 de gestación ( $P = 0,01$ ) (Figura 27-C).



## RESULTADOS



**Figura 27:** Efecto de la presencia de embriones-NPOv de conejo sobre el tejido oviductal y uterino, analizado a los días 2 y 6 respectivamente tras la transferencia de embriones. (A) Imágenes representativas de inmunohistoquímica utilizando un marcador de proliferación celular, Ki-67 (panel superior) y mediante un marcador de inflamación, CD3 (panel inferior). (B) Diagrama de cajas y bigotes donde se observa la tasa (%) de células proliferativas a 10 campos (x400) (mediante marcador ki67) en tejido oviductal. (C) Diagrama de cajas y bigotes que muestra los resultados del análisis de la reacción inflamatoria (media de células CD3 positivas en 10 campos estudiados (x400) en tejido uterino). Se observaron diferencias estadísticas entre hembras no gestantes y los grupos gestantes con o sin NPOv, así como entre hembras con gestaciones de embriones sin NPOv en ambos días estudiados (2 y 6 días) ( $P < 0,05$ ) ( $n = 10$  cigotos (+) NPOv/hembra, 10 cigotos (-) NPOv/hembra, en 3 replicados por cada día analizado (6 hembras transferidas totales: 3 sacrificadas a día 2 y 3 sacrificadas a día 6,  $n$  cigotos totales = 60 (+) NPOv, 60 (-) NPOv).

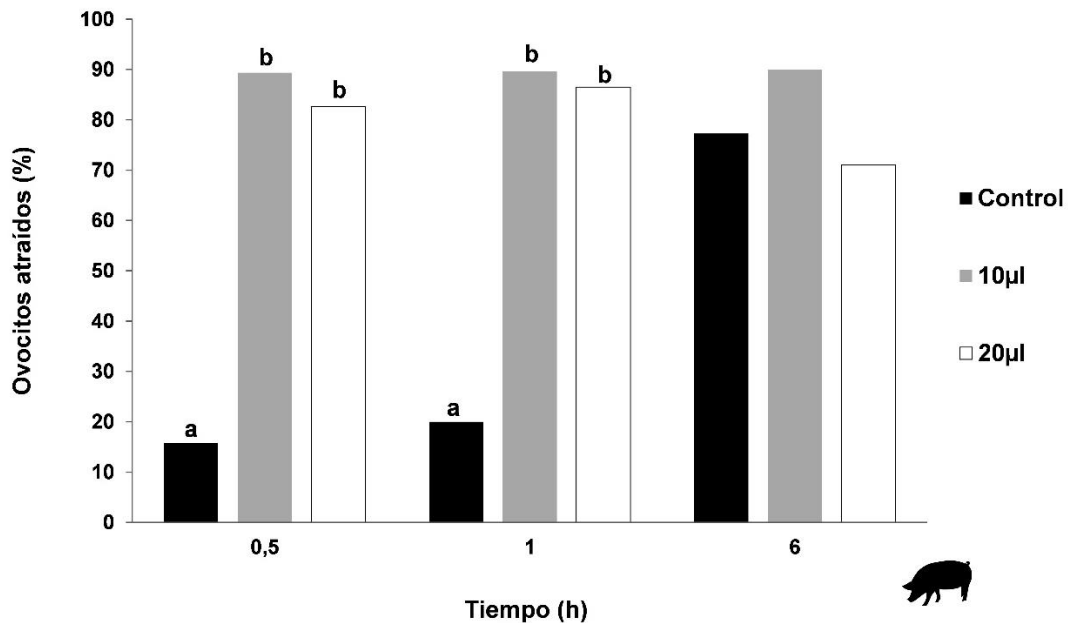
### 6.4. Estudio de la capacidad de atracción de ovocitos y embriones unidos a NPOv cuando se someten a un campo magnético

En este experimento se evaluó la capacidad de atracción de ovocitos y embriones unidos a NPOv a un campo magnético externo. Los resultados mostraron que entre un 70-90% de los ovocitos-NPOv fueron atraídos por el campo magnético en los diferentes tiempos evaluados (0,5, 1 y 6 h) (Figura 28) en comparación al grupo control incubados con NP sin pOVGP1t que tanto para el tiempo 0,5 h como para 1 h ( $P < 0,05$ ) fueron menos del 15%. Sin embargo, se observó un incremento en la atracción de ovocitos control al



## RESULTADOS

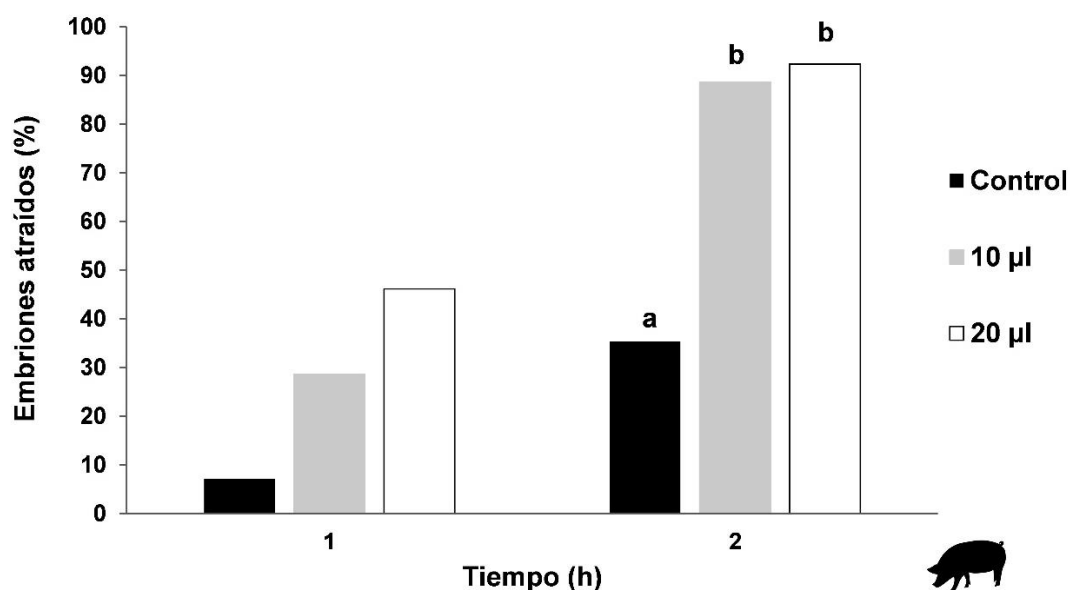
campo magnético cuando el tiempo de incubación fue de 6 h (77,2%), debido a la unión inespecífica de las NP a la ZP en periodos de incubación extensos (Figura 16-B), no observándose en este tiempo diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $P < 0,05$ ) (Figura 28).



**Figura 28:** Respuesta de la atracción de ovocitos-NPOv a una fuerza magnética. Se consideraron ovocitos atraídos cuando estos se mantuvieron unidos al imán detrás la exposición al campo magnético. Letras diferentes (a, b) entre columnas en un mismo tiempo (0,5, 1 o 6 h) indican diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) ( $n = 322$  ovocitos ( $n = 100$  control,  $n = 115$  10 µl NPOv,  $n = 107$  20 µl NPOv), distribuidos en 5 replicados).

Por otro lado, fueron necesarias 2 h de co-incubación de embriones con NPOv para lograr que la mayoría de los embriones (más del 80%) fueran atraídos por el campo magnético (Figura 29). En este caso, tras 2 h de incubación, los embriones del grupo control fueron significativamente menos atraídos por el campo magnético en comparación con los embriones-NPOv ( $P < 0,05$ ). Mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales cuando el tiempo de incubación fue de 1 h ( $P > 0,05$ ), observándose menos de 50% de embriones atraídos por el campo magnético.

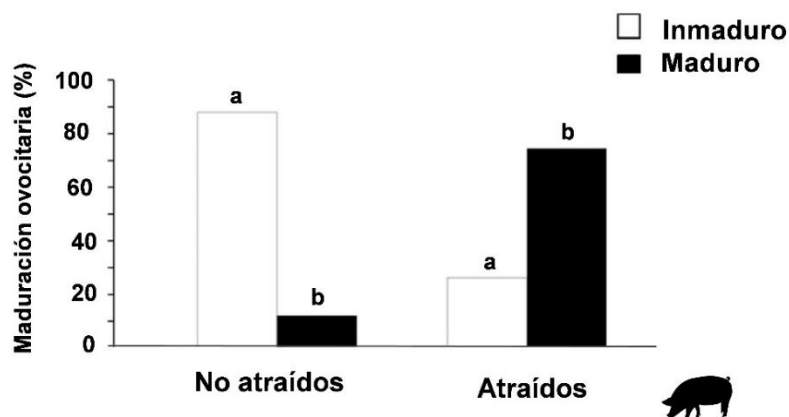
## RESULTADOS



**Figura 29:** Respuesta de embriones-NPOv a una fuerza magnética. Diferentes letras (a, b) entre barras en un mismo tiempo de co-incubación (1 o 2h) indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,001$ ) ( $n = 120$  embriones ( $n = 39$  control,  $n = 41$  10 µl NPOv,  $n = 40$  20 µl NPOv), en 4 replicados).

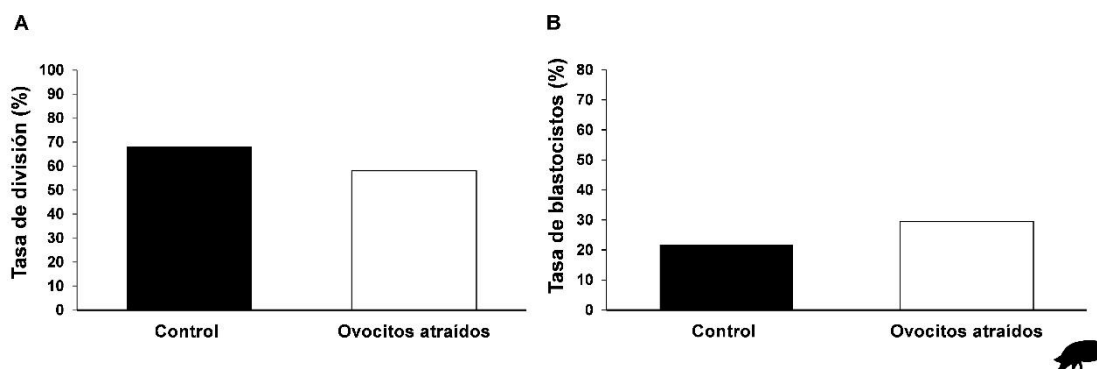
Para evaluar si el estado de maduración ovocitaria estaba relacionado con su capacidad de unión a las NPOv y por tanto su capacidad de atracción magnética, los ovocitos (tanto los atraídos por un campo magnético como los que no lo fueron) se fijaron y tiñeron (Hoechst 33342) con el fin de analizar su estadio nuclear. Los resultados mostraron que más del 85% de los ovocitos que no fueron atraídos por campos magnéticos externos correspondieron a ovocitos inmaduros ( $P < 0,001$ ). Por su parte, más del 70% de los ovocitos atraídos por el campo magnético correspondieron efectivamente a ovocitos maduros ( $P < 0,001$ ) (Figura 30).

## RESULTADOS



**Figura 30:** Estado de maduración de ovocitos atraídos y no atraídos por un campo magnético. Diferentes letras (a, b) entre barras en un mismo grupo indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,001$ ) ( $n = 203$  ovocitos, en 4 replicados).

Adicionalmente, los ovocitos atraídos por campos magnéticos se sometieron posteriormente a un protocolo de FIV y cultivo de embriones. Los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativamente estadísticas en la tasa de división embrionaria (%) (Figura 31-A) ni en la tasa de blastocistos (%) (Figura 31-B), entre el grupo de ovocitos-NPOv atraídos previamente por campos magnéticos y los ovocitos control (ovocitos no sometidos a ningún campo magnético) ( $P > 0,05$ ).



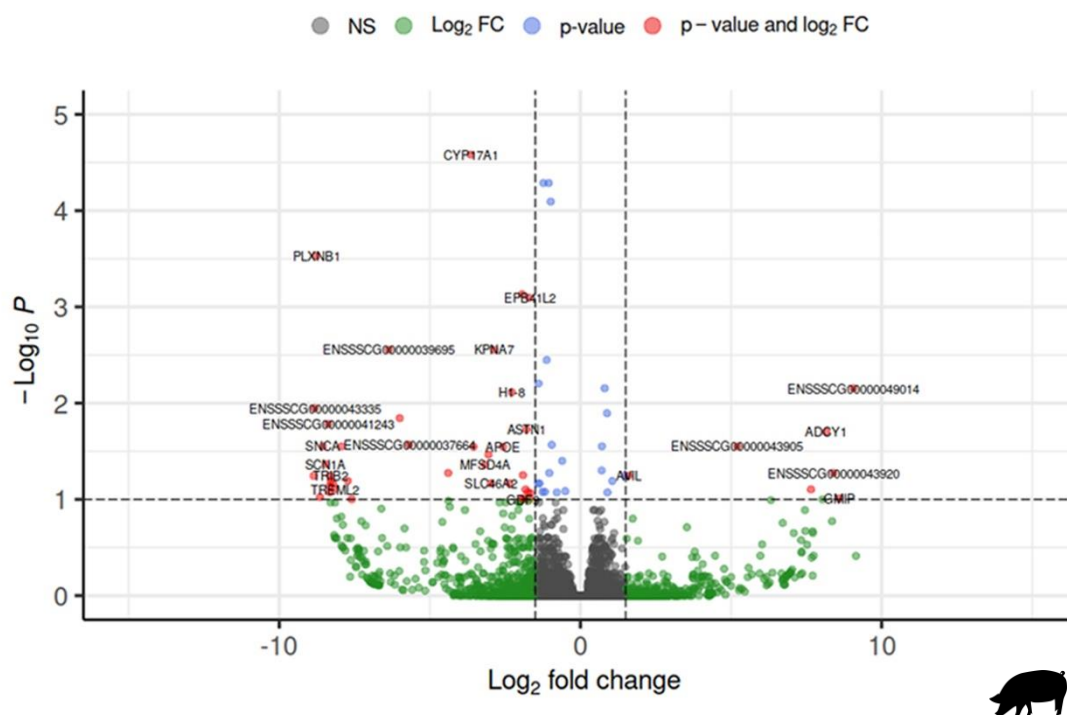
**Figura 31:** Desarrollo embrionario *in vitro* a partir de ovocitos-NPOv previamente atraídos por un campo magnético. Se analizó la (A) tasa de división embrionaria (%) y (B) tasa de blastocistos (%) ( $n = 655$  ovocitos ( $n = 386$  ovocitos-NPOv atraídos,  $n = 269$  control)).

### 6.5. Secuenciación del ARN (ARN-seq) de embriones porcinos

A través de ARN-seq se analizó la expresión génica de los blastocistos obtenidos tras la FIV de ovocitos expuestos a NPOv y atraídos por campos magnéticos en comparación

## RESULTADOS

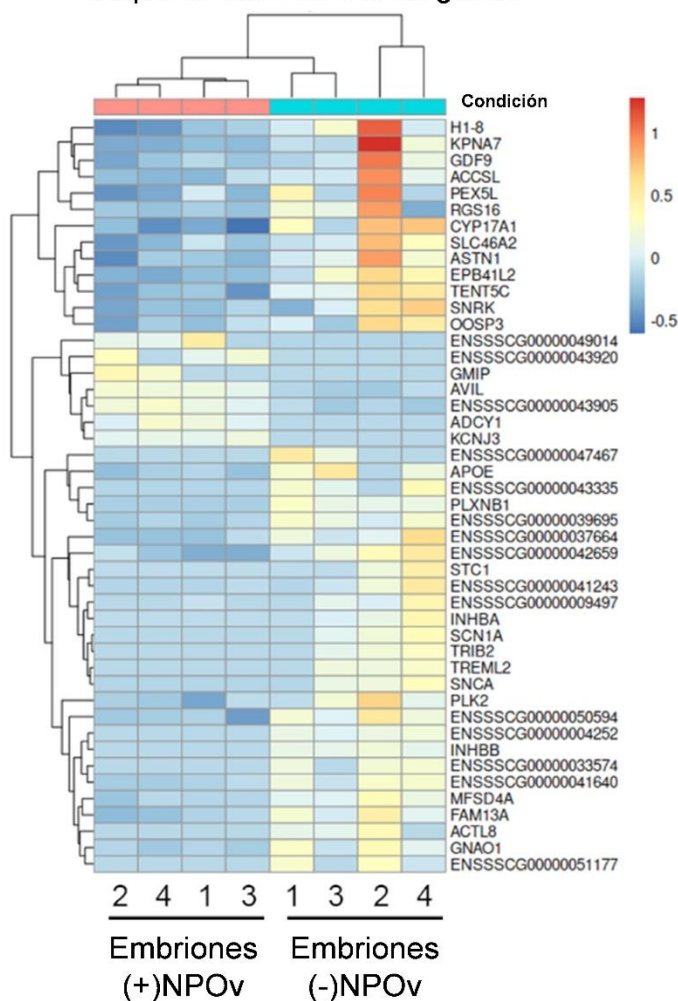
con blastocistos controles obtenidos de ovocitos no expuestos a ninguno de estos factores. Se detectaron un total de 15.957 transcritos mediante secuencias de ARN específicas de cadena, de los cuales solo 46 genes (7 regulados en alza, 39 regulados en baja) se expresaron diferencialmente (expresado en logaritmo base 2 de la magnitud del cambio o  $\log_2FC \leq 1,5$ ) (Figura 32). Los resultados obtenidos se presentan también organizados en un mapa de calor de genes expresados diferencialmente (Figura 33). Según estas observaciones, la unión de NPOv a la ZP de ovocitos y su posterior exposición a campos magnéticos no tuvo efectos perjudiciales en el desarrollo embrionario ni en el transcriptoma, observándose menos del 0,3% de los genes estudiados con una expresión diferencial al comparar embriones del grupo control ((-) NPOv) y del grupo (+) NPOv).



**Figura 32:** Gráfico de volcán (diagrama de dispersión) que muestra la significancia estadística (p-valor, eje Y) frente a la magnitud del cambio de expresión ( $\log_2FC$ , eje x) de los genes estudiados en embriones de los grupos (+) NPOv y (-) NPOv. Los puntos rojos indican los genes diferencialmente expresados ( $P \leq 0,05$  y  $\log_2FC \geq 1$ ) entre ambos grupos experimentales los cuales representaron menos del 0,3% del transcriptoma estudiado.

## RESULTADOS

Mapa de calor de ED de genes



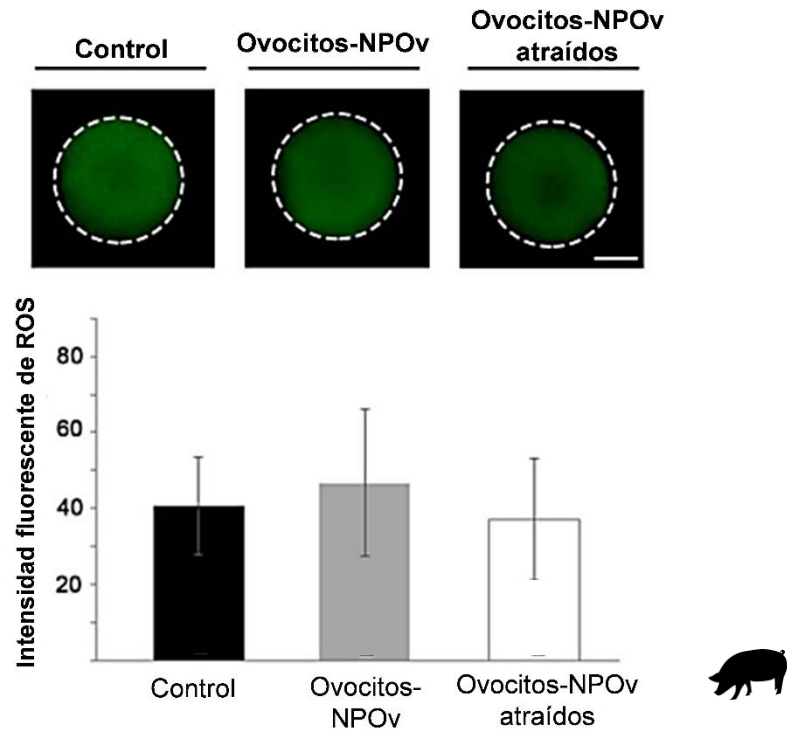
**Figura 33:** Resultados del Mapa de calor de genes expresados diferencialmente tras el estudio de secuenciación del ARN de embriones porcinos expuestos a las NPOv y a un campo magnético ((+) NPOv) y embriones control ((-) NPOv). La expresión normalizada se representó en escalas de mayor a menor expresión (rojo-blanco-azul) (n=40 embriones (+) NPOv y 40 embriones (-) NPOv, en 4 replicados).

### 6.6. Análisis del estado oxidativo de ovocitos porcinos incubados con NPOv y sometidos a la atracción por un campo magnético

Para evaluar el efecto sobre el estrés oxidativo de la atracción por un campo magnético de ovocitos con NPOv, se estudió la presencia de ROS en ovocitos-NPOv expuestos en comparación a grupos controles sin NPOv y con NPOv sin atracción magnética. Para este fin, se realizó la tinción de ovocitos de los tres grupos en estudio con el KIT DCFDA/H2DCFDA-Celular ROS, y se analizó la intensidad de la fluorescencia emitida por ROS mediante microscopio de fluorescencia.

## RESULTADOS

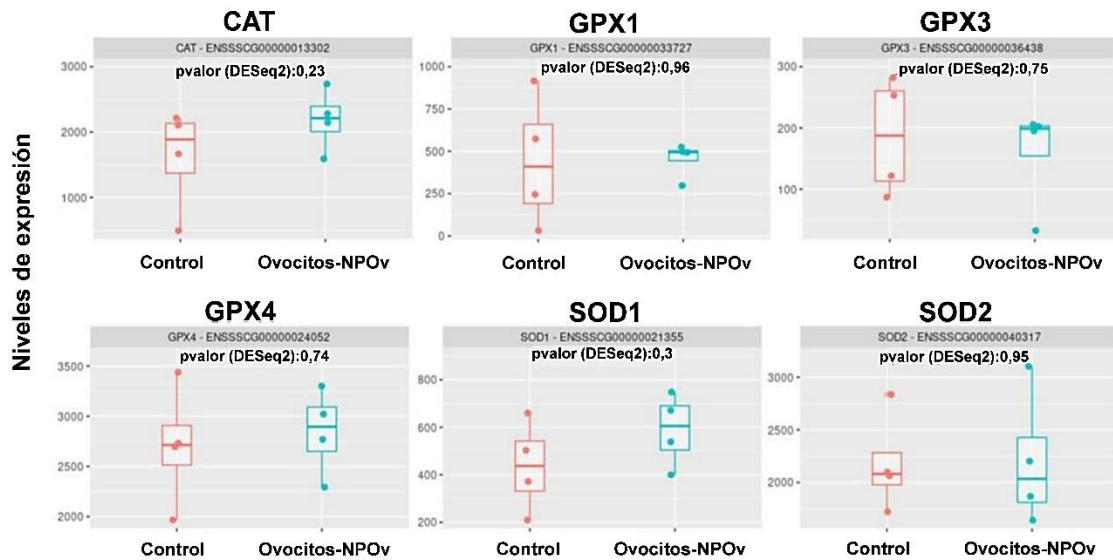
Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la intensidad de la fluorescencia de ROS entre los grupos de ovocitos en estudio ( $P>0,05$ ) (Figura 34).



**Figura 34:** Estudio de estrés oxidativo en ovocitos unidos a NPOv y atraídos por un campo magnético. Imagen de la fluorescencia emitida por ROS en ovocitos (panel superior). Comparativa de la intensidad de fluorescencia emitida por ROS en cada grupo experimental (panel inferior). No se observaron diferencias significativas en la intensidad de ROS entre los grupos analizados ( $P>0,05$ ). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  replicados, en un total de 104 ovocitos).

Por otro lado, se estudió el efecto de la exposición de los ovocitos con NPOv a un campo magnético sobre la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo en embriones. Para esto, ovocitos con NPOv expuestos a un campo magnético fueron sometidos a un protocolo de FIV y CE. Los niveles de expresión de genes de los embriones obtenidos se compararon con los niveles de embriones controles, obtenidos a partir de ovocitos sin NPOv no expuestos a campo magnético. Los resultados observados (Figura 35) demostraron que no hubo diferencias en la expresión de genes relacionados al estrés oxidativo. Los niveles de expresión de CAT, GPX1, GPX3, GPX4, SOD1 y SOD2 fueron similares en embriones desarrollados a partir de ovocitos de ambos grupos experimentales ( $P>0,05$ ).

## RESULTADOS

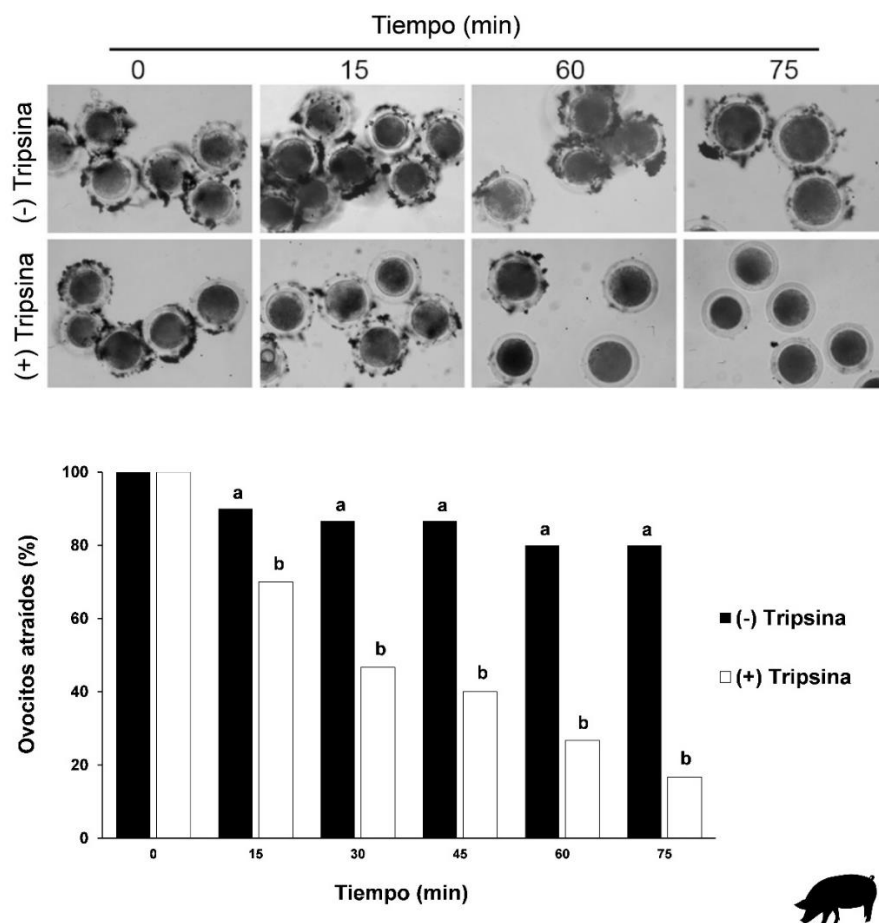


**Figura 35:** Niveles de expresión de genes relacionados con estrés oxidativo en embriones derivados de ovocitos-NPOv atraídos por un campo magnético y ovocitos controles. Los gráficos de caja muestran que no hay diferencias entre los grupos analizados ( $P > 0,05$ ) ( $n = 4$  replicados, cada replicado compuesto por 10 blastocitos de cada grupo experimental).

### 6.7. Estudio de la reversibilidad de la unión de ovocitos a NPOv

Aunque se ha demostrado que la presencia de NPOv adheridas a la ZP no afecta a la fecundación ni al desarrollo embrionario temprano *in vitro* ni a la implantación y camada, el siguiente paso fue evaluar la reversibilidad de la unión ovocito-NPOv. Los resultados indican que dicha unión es reversible tras la aplicación de un tratamiento químico (tripsina) y/o mecánico (pipeteo suave). La presencia de tripsina elimina las NPOv reduciendo la atracción de los ovocitos hacia el campo magnético del 100% a menos del 20% tras 75 min de co-incubación con la encima (Figura 36).

## RESULTADOS

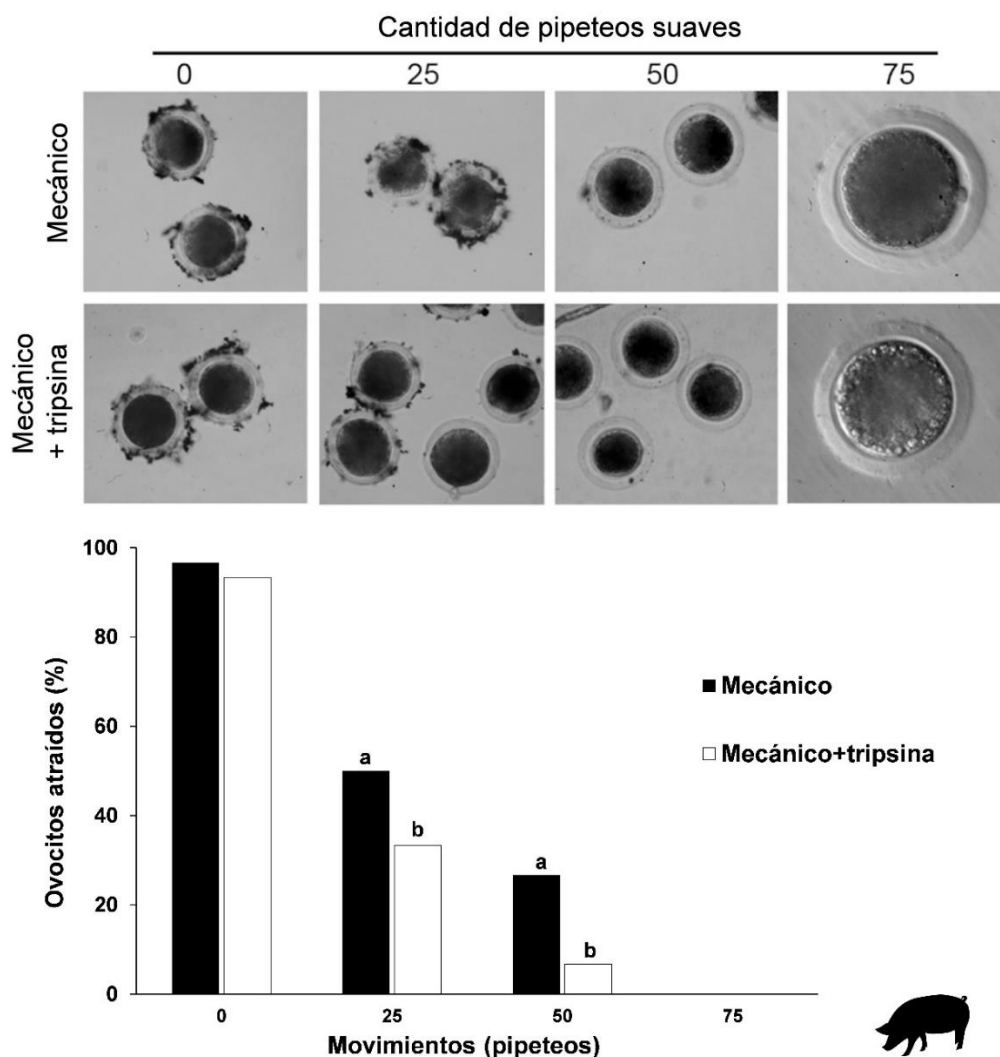


**Figura 36:** Estudio de la reversibilidad de la unión de ovocitos y NPOv a través de método químico. La imagen (panel superior) muestra ovocitos unidos a NPOv tras ser sometidos a un tratamiento con tripsina a diferentes tiempos (comparado con un grupo control sin tripsina, (-) Tripsina). La gráfica (panel inferior) muestra el porcentaje de ovocitos unidos a NPOv atraídos a un campo magnético tras ser sometidos o no a un tratamiento con tripsina a distintos tiempos. Diferentes letras (a, b) entre barras de un mismo tiempo indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) ( $n = 120$  ovocitos ( $n = 62$  (-) tripsina,  $n = 58$  (+) tripsina), en 3 replicados).

Por otro lado, el tratamiento mecánico (combinado o no con tripsina) redujo paulatinamente la capacidad de los ovocitos de ser atraídos por un campo magnético a medida que se aumentó el número de pipeteos, hasta el 0% de los ovocitos atraídos tras someterlos a un pipeteo mecánico de 75 movimientos (Figura 37). Además, la combinación del pipeteo suave más la adición de tripsina resultó más efectiva para lograr la separación de las NPOv de los ovocitos cuando el número de pipeteos fue menor (25 y 50 movimientos) (Figura 37).



## RESULTADOS



**Figura 37:** Estudio de la reversibilidad de la unión de ovocitos y NPOv a través de método mecánico (pipeteo) en combinación con un método químico (tripsina). Las imágenes (panel superior) muestran ovocitos-NPOv sometidos a un tratamiento mecánico (pipeteo: 0, 25, 50 o 75 movimientos), con o sin la adición del método químico (tripsina). La gráfica (panel inferior) muestra el porcentaje de ovocitos-NPOv atraídos a un campo magnético tras ser sometidos a movimientos mecánicos suaves con micropipeta, con o sin tripsina. Letras diferentes (a, b) entre barras para una misma cantidad de pipeteos indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) ( $n=90$  ovocitos ( $n=50$  mecánico,  $n=40$  mecánico+tripsina), en 3 replicados).

### 6.8. Evaluación de la dinámica de desplazamiento (velocidad-aceleración) del complejo ovocito-NPOv cuando se someten a campos magnéticos de diferente intensidad

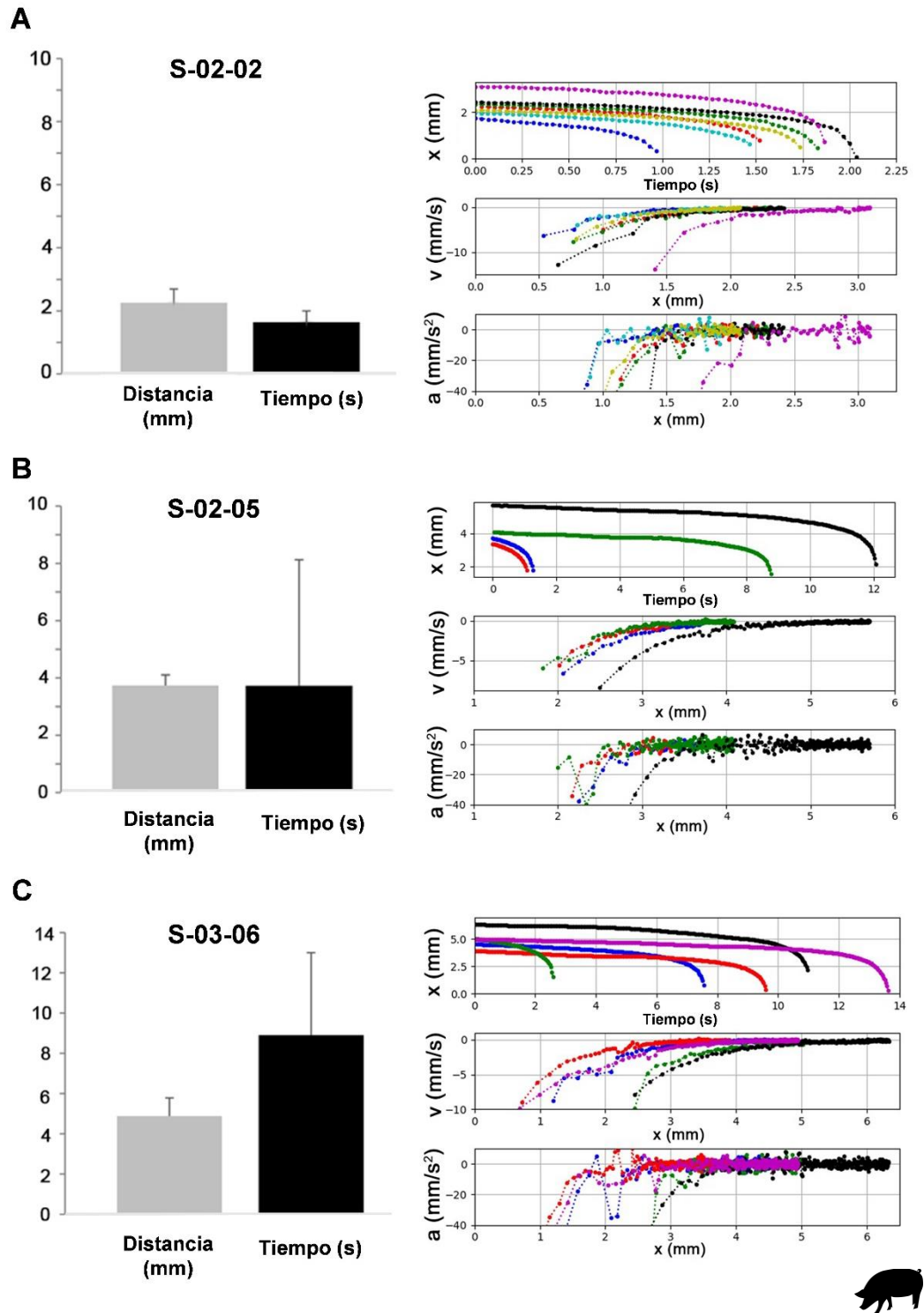
Tras definir la eficiencia de la unión de ovocitos/embriones a NPOv y su atracción por imanes, se realizó el estudio del comportamiento cinético de los ovocitos-NPOv sometidos a diferentes fuerzas magnéticas. Para este análisis se registró el tiempo

## RESULTADOS

necesario para que los ovocitos-NPOv alcanzaran cada uno de los diferentes imanes de neodimio utilizados: S-02-02 (2 mm  $\varnothing$  x 2 mm altura; fuerza de sujeción de 150 g) (Figura 38-A); S-02-05 (2 mm  $\varnothing$  x 5 mm altura; fuerza de sujeción de 170 g) (Figura 38-B) y S-03-06 (3 mm  $\varnothing$  x 6 mm altura; fuerza de sujeción de 400 g) (Figura 38-C) (Supermagnete<sup>TM</sup>, Gottmadingen, Alemania).

La Figura 38 muestra la distancia recorrida (en mm) y el tiempo (en segundos) de los complejos ovocito-NPOv hasta la unión al imán (para cada uno de los imanes utilizados en el estudio). Ambos parámetros se vieron aumentados con la fuerza de sujeción del imán. Los gráficos de trayectoria (Figura 38, gráficos de la derecha) muestran la dinámica del movimiento (posición en función del tiempo, velocidad y aceleración) de los ovocitos-NPOv desde sus puntos de partida hasta la unión a los imanes. Los ovocitos-NPOv inicialmente se movieron a una velocidad lenta y una aceleración casi nula (es decir, la fuerza neta sobre la partícula es casi cero) independientemente del imán utilizado. Cuando la distancia entre el imán y el ovocito-NPOv disminuye, la fuerza magnética aumenta. La respuesta ferromagnética del ovocito-NPOv es lineal para una fuerza magnética baja y se vuelve no lineal para fuerza magnética alta debido a la fuerza magnética producida por la propia partícula. Debido a esta respuesta no lineal, se observó un cambio abrupto en la aceleración de la partícula. La distancia a la que se produce este cambio drástico de aceleración depende del campo magnético externo.

## RESULTADOS

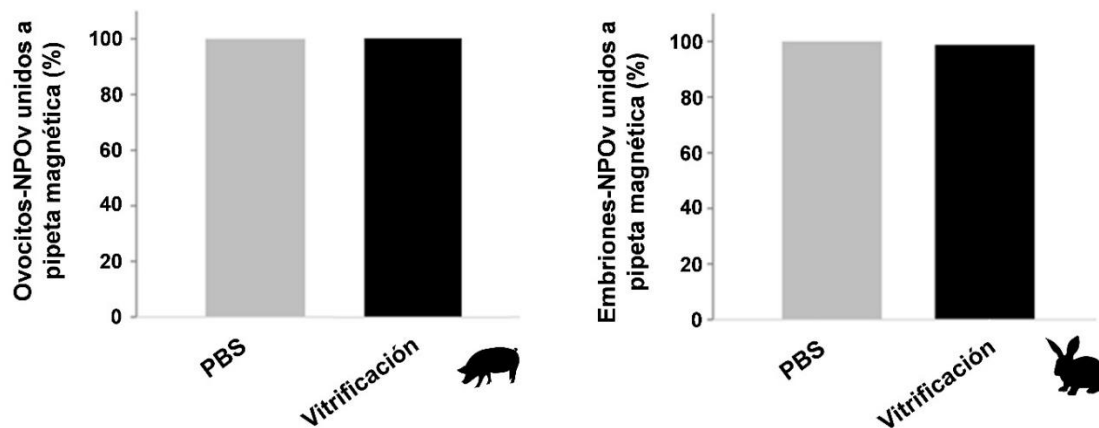


## RESULTADOS

ovocitos totales; 7 para el imán S-02-02, 4 para el imán S-02-05 y 5 para el imán S-03-06).

### 6.9. Determinación de la eficacia de un dispositivo magnético sobre el manejo de los complejos ovocitos/embriones-NPOv

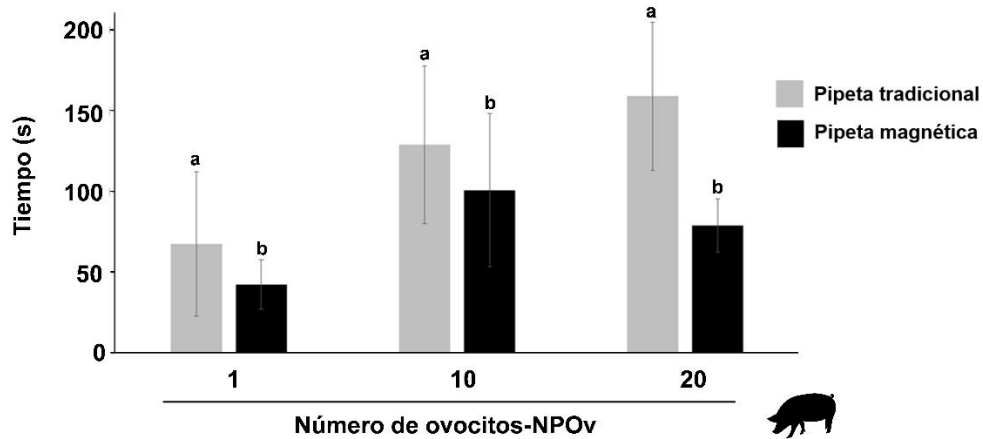
Tras la evaluación de la capacidad de atracción de NPOv unidos a la ZP de ser atraídos por imanes, se planteó la posibilidad de utilizar una pipeta magnética para la manipulación de ovocitos/embriones-NPOv. En este sentido, se comprobó que los ovocitos/embriones-NPOv fueron atraídos de manera efectiva por la pipeta magnética (Figura 39), independientemente del medio utilizado (PBS o medio de vitrificación) y de la especie (porcina o conejo).



**Figura 39:** Porcentaje (%) de ovocitos-NPOv porcinos (n=96) y embriones-NPOv de conejo (n=85) atraídos por una pipeta magnética utilizando dos medios diferentes, PBS y medio de vitrificación.

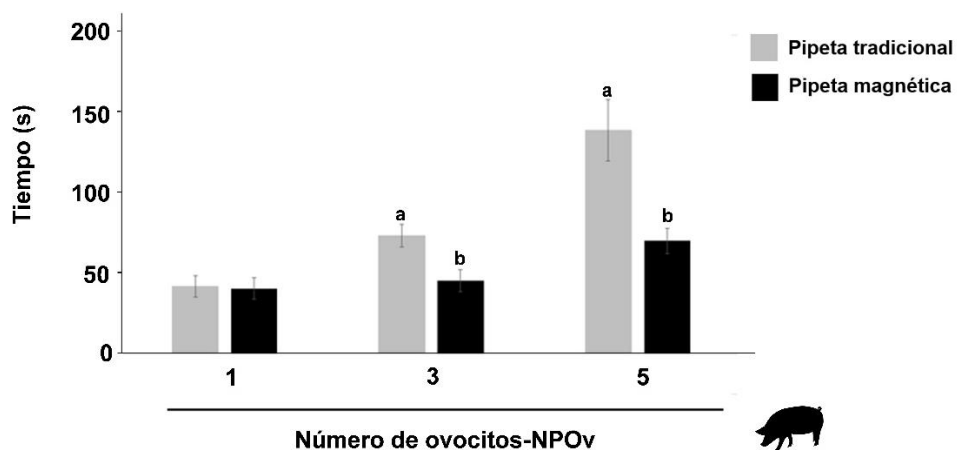
Adicionalmente, el tiempo necesario para mover ovocitos-NPOv porcinos dentro de los 4 pocillos de una placa en medio PBS se redujo significativamente con el uso de la pipeta magnética en comparación con la pipeta tradicional de aspiración (Stripper®), independientemente del número de ovocitos movilizados (grupos de 1, 10 y 20 ovocitos-NPOv) ( $P < 0,05$ ) (Figura 40).

## RESULTADOS



**Figura 40:** Tiempo empleado para la movilización de ovocitos-NPOv entre pocillos de una placa de Petri (3 pasajes) en medio PBS utilizando pipeta magnética o pipeta tradicional de aspiración (Stripper®). Letras diferentes (a, b) entre barras de un mismo grupo (1, 10 o 20) indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ) ( $n=416$  ovocitos en 4 replicados).

Por otro lado, el tiempo necesario para realizar un protocolo de vitrificación utilizando la pipeta magnética fue significativamente menor al empleado con una pipeta tradicional (Stripper®) cuando se trabajó con grupos de 3 y 5 ovocitos-NPOv ( $P < 0,05$ ), no habiéndose observado diferencias cuando el protocolo se realizó con un solo ovocito-NPOv (Figura 41).



**Figura 41:** Tiempo empleado para realizar un protocolo de vitrificación de ovocitos-NPOv en grupos de 1, 3 y 5, comparando el uso de una pipeta magnética con una pipeta tradicional (Stripper®). Letras diferentes (a, b) entre barras de un mismo grupo indican diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ) ( $n=45$  ovocitos en 5 replicados).

# DISCUSIÓN

## 7. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, las TRA experimentaron un crecimiento sustancial en todo el mundo, para su aplicación tanto en reproducción humana como animal (Bolton et al., 2022; Chambers et al., 2021; Hansen, 2020; Llamas-López, López-Úbeda, López, Antinoja, & García-Vázquez, 2019). La implementación de estas tecnologías requiere de la manipulación de gametos (espermatozoides, ovocitos) y embriones de una manera minuciosa y precisa con el fin de mantener su capacidad fecundante (gametos) y de desarrollo (embriones). En este sentido, a pesar de que las TRA aumentaron su eficiencia a lo largo de los años, las tasas de desarrollo de embriones producidos *in vitro* aún permanecen subóptimas (Kawwass & Badell, 2018; Luke, 2017), por lo que todavía queda un gran margen de mejora, y por ello, los protocolos de FIV y producción de embriones *in vitro* (PIV) son modificados constantemente de acuerdo con los avances en estudios de estas tecnologías.

La posibilidad de manipular y/o cultivar en laboratorio ovocitos y embriones a través de novedosas tecnologías de automatización o dispositivos del tipo microfluídicos (Laboratorio en chip) representa una importante oportunidad gracias a que el tamaño y la morfología particular de los gametos y embriones de mamíferos lo permiten (Azizipour, Avazpour, Rosenzweig, Sawan, & Ajji, 2020; Barbaresco, Cocuzza, Pirri, & Marasso, 2020; Temiz, Lovchik, Kaigala, & Delamarche, 2015). Con el propósito de facilitar el manejo *in vitro* de gametos y embriones se han desarrollado tecnologías basadas en campos acústicos, eléctricos y magnéticos. De este modo, con el uso de campos acústicos se logró la rotación 3D de ovocitos (Feng, Di, & Arai, 2016), con la aplicación de campos eléctricos se obtuvieron avances en sistemas de cultivo microfluídicos de gametos y embriones (Karcz et al., 2022), y con la utilización de campos magnéticos, se lograron importantes avances con respecto a la movilización de espermatozoides (Chang et al., 2019; Dai et al., 2022; Gil et al., 2013; Magdanz et al., 2020, 2021). En este sentido, los campos magnéticos son utilizados comúnmente en espermatozoides, incluso comercialmente, para su clasificación (Bisla et al., 2021; Gil et al., 2013; Yousef et al., 2020), sexado del semen (Domínguez et al., 2018), así como, en técnicas de manipulación genética animal (Wang et al., 2018). Por el contrario, el desarrollo de tecnologías basadas en campos magnéticos para la manipulación de

## DISCUSIÓN

ovocitos es escasa (Feng et al., 2016; Hagiwara et al., 2011; J. Hong, Purwar, Cha, & Lee, 2015) o nula en el caso de embriones.

El empleo de NP ha sido foco de considerable interés en las últimas décadas por su aplicación en diferentes áreas incluyendo la biomedicina para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades (Selmani, Kovačević, & Bohinc, 2022). En el caso de la reproducción, se han utilizado una gran variedad de nanomateriales principalmente en el gameto masculino para su purificación (Feugang et al., 2019), selección (Bisla et al., 2021; Gil et al., 2013; Yousef et al., 2020), conservación (Falchi et al., 2018; Isaac et al., 2017; Khodaei-Motlagh, Masoudi, Karimi-Sabet, & Hatefi, 2022) o como transportadores (Kim et al., 2018). Por el contrario, en el caso de ovocitos y embriones se cuenta con escasos estudios sobre la interacción con NP. Los trabajos disponibles se centraron principalmente en el etiquetado de ovocitos/embriones (Fynnewever et al., 2007; Jo et al., 2021; Novo et al., 2014; Novo et al., 2013) y en la liberación dirigida de fármacos al interior de estos (Kim et al., 2021; Y. Kim et al., 2018; Remião et al., 2016), no existiendo antecedentes de estudios de aplicaciones de nanotecnologías destinadas a la manipulación de ovocitos/embriones durante las TRA.

Aunque las nanotecnologías son una herramienta prometedora para su aplicación en la biomedicina, todavía existe una gran controversia sobre su uso en esta área, principalmente relacionada con la potencial citotoxicidad o incompatibilidad biológica de las NP. Algunos trabajos demostraron que la incorporación de NP en las TRA podría ser beneficioso para obtener mejoras en la capacidad de desarrollo de los ovocitos usando dosis bajas de NP (Ariu et al., 2017; Roy et al., 2021) o al aumentar las tasas de supervivencia de los ovocitos tras la vitrificación (Abbasi et al., 2021; Li et al., 2016; Zhou et al., 2015), sin embargo, aún existen interrogantes sobre la mejor manera de obtener una interacción segura entre las NP y las células reproductivas (espermatozoides, ovocitos o embriones) con el objetivo de obtener mejoras en la eficiencia de las TRA. Las vías y el tiempo de exposición, así como la dosis, tamaño, forma, carga, composición o recubrimiento superficial de las NP son algunos de los factores claves a considerar para determinar su posible impacto sobre las células (Silva et al., 2021). La nanotecnología tiene entonces, un gran potencial en el campo de la reproducción, tanto en clínicas humanas como en producción animal (Arvizo et al., 2012), sin embargo, el principal



## DISCUSIÓN

desafío es comprender de qué forma podría ser útil su implementación (Silva et al., 2021). En este trabajo de tesis se presenta el desarrollo de una metodología innovadora, sencilla y práctica de unión de NP magnéticas a la matriz proteica que rodea los ovocitos y embriones, la ZP, a través de la proteína OVGP1 y el análisis de la seguridad biológica de su implementación. En esta tesis se demostró, en primer lugar, que esta novedosa herramienta consigue de forma única una unión altamente eficiente y específica entre NP y ZP de ovocitos y embriones, permitiendo su manipulación sin necesidad de contacto físico a través de campos magnéticos externos y, en segundo lugar, que su aplicación sobre gametos y embriones es segura, sin efectos negativos sobre su calidad y capacidad de desarrollo. Además, en este trabajo brindamos información sobre la aplicación de este sistema en las TRA, incluida la vitrificación y el posicionamiento de ovocitos y embriones.

La ZP es una matriz extracelular única que rodea a los ovocitos y embriones (Yanagimachi, 2022) durante su tránsito a través del oviducto hacia el útero. Una vez allí y dependiendo de un entorno hormonal adecuado, los embriones eclosionan a través de la ZP para implantarse en el endometrio (Sathananthan, Menezes, & Gunasheela, 2003). Mientras que el contenido subcelular del ovocito sufre una espectacular transformación para convertirse en un embrión, la ZP actúa como un escudo estable que lo protege del entorno oviductal previo a su implantación, para luego perderse tras la eclosión. La presencia de la ZP resguardando al embrión durante todo el desarrollo, y su pérdida total previo a la implantación, la convierte en un sitio adecuado hacia dónde dirigir estrategias de marcado y anclaje para el aislamiento y la manipulación de ovocitos/embriones (Penon et al., 2012), evitando efectos directos sobre las células durante la fecundación, el desarrollo embrionario y la implantación.

La OVGP1 es la proteína más abundante en el oviducto y el útero que se une a la ZP en una amplia gama de mamíferos (Buhi, 2002). El dominio N-terminal está altamente conservado entre especies y es responsable de la unión a la ZP. El dominio C-terminal varía entre los mamíferos y dicta su función específica de orden, incluida la capacidad de penetrar a través de la ZP (Algarra et al., 2016). En este trabajo se emplearon proteínas OVGP1 recombinantes y troncada de porcino (pOVGP1t, 481 aa) y recombinante de conejo (rOVGP1, 475 aa) las cuales se conjugaron exitosamente a NP

## DISCUSIÓN

férricas superparamagnéticas, utilizando medios específicamente diseñados para este fin. La unión se demostró mediante Western Blot que confirmaron la presencia de la proteína pOVGP1t (80kDa (Algarra et al., 2016)) y de la proteína rOVGP1 (70 kDa (Algarra et al., 2016)) con jugadas a las NP. Este trabajo demostró, además, que esta unión NP-OVGP1 (NPOv) fue estable durante al menos 31 días.

Se evaluó la afinidad de las NP funcionalizadas con OVGP1 (NPOv) a la ZP de ovocitos madurados *in vitro* y embriones producidos *in vitro*. El mayor porcentaje de área de la parte externa de la ZP cubierta por NPOv fue del 40% y se observó tras 1 h de co-incubación con el volumen máximo de NPOv (20 µl), pero se demostró que una co-incubación a corto plazo (30 min) utilizando el menor volumen de NPOv (10 µl) de ovocitos con NPOv ya es suficiente para lograr una unión específica de estas con la parte exterior de la ZP. Previamente, Novo et al., 2013 (Novo et al., 2013) obtuvieron resultados similares, demostrando que tras 30 min de co-incubación de ovocitos y embriones con NP de oro conjugadas a lectinas (WGA y PHA-L) fue suficiente para lograr la adhesión de las NP a la ZP, con el objetivo de marcar o etiquetar ovocitos y embriones. Lograr una unión estable en cortos periodos resulta especialmente importante considerando que tiempos de incubación más prolongados podrían suponer mayor tiempo de exposición de ovocitos a las condiciones de cultivo *in vitro*, las cuales representan *per se* un estrés para ovocitos que puede tener consecuencias perjudiciales (Silva et al., 2021). Además, los resultados de este trabajo indican que con tiempos más largos de co-incubación (6 h) la unión de las NP a la ZP de ovocitos se hacía inespecífica, observando menores diferencias en el porcentaje de superficie de la ZP con NP funcionalizadas (NPOv) y NP controles sin OVGP1.

En relación con los embriones, se observó la unión de NPOv a la parte externa de la ZP de en diversos estadios (embriones de 4 células, mórulas, y blastocistos). Las NPOv adoptaron una disposición regular por toda la superficie externa de la ZP de embriones. Estos resultados permiten confirmar que la unión específica de NPOv con la ZP es posible tanto en ovocitos como en embriones en diversas etapas de desarrollo *in vitro*. Similarmente, otros autores observaron que fue posible marcar o identificar cigotos y embriones mediante la unión de micropartículas de polisilicona a la ZP (Novo et al., 2014) observando además su permanencia hasta la etapa de blastocisto en día 8

## DISCUSIÓN

adheridas a la ZP. La posibilidad de individualizar de manera práctica ovocitos y embriones, que habilite, por ejemplo, el cultivo en conjunto de estas estructuras provenientes de diversos animales sin perder su trazabilidad significa un importante aporte a las TRA (Fynewever et al., 2007; Novo et al., 2011; Novo et al., 2014). Por otro lado, la unión de las NP específicamente en la parte exterior de la ZP resulta importante dado que de esta manera se limitan posibles efectos negativos sobre ovocitos y embriones que podrían producirse al penetrar NP al interior o alterar la ZP al penetrar en su grosor (Camaioni et al., 2021; Fynewever et al., 2007) y, además, como ha sido mencionado, garantiza su separación al momento de la eclosión previo a la implantación. En este sentido, inicialmente Novo et al., 2013 (Novo et al., 2013) estudiaron la posibilidad de marcar la ZP mediante NP funcionalizadas con diferentes biomoléculas. Estos resultados indicaron que según la molécula de funcionalización utilizada la capacidad de penetrar la ZP difería, pudiendo representar un limitante para la capacidad de desarrollo de ovocitos. En este caso, NP funcionalizadas con la lectina PHA-L se unieron a la parte interna de la ZP y NP con anticuerpos anti ZP2 se adherían en la totalidad del espesor de la ZP. Únicamente las NP funcionalizadas con lectina WGA se distribuyeron de la manera esperada, en la superficie externa en la ZP (Novo et al., 2013). En nuestro trabajo, se priorizó garantizar la unión de las NP a la parte externa de dos maneras: en primer lugar, se utilizaron NP de un tamaño alto (0,365  $\mu\text{m}$ ) (Camaioni et al., 2021; Mosquera, García, & Liz-Marzán, 2018) y, en segundo lugar, la proteína recombinantes OVGP1 empleada para la funcionalización de las NP se encuentra truncada en su extremo C-terminal, responsable otorgar a la proteína la capacidad de penetrar a través de la matriz de la ZP (Algarra et al., 2016), logrando de esta manera que las NPOv no sean internalizadas.

A continuación, se analizó la inocuidad del uso de esta tecnología sobre gametos y embriones con el fin de garantizar la seguridad de su implementación en TRA. Como ha sido mencionado anteriormente, existe gran preocupación al respecto de la implementación de desarrollos tecnológicos basados en NP para usos biomédicos, principalmente por los potenciales efectos tóxicos sobre las células que entran en contacto de manera directa o indirecta con las NP (Falchi et al., 2018). En este trabajo, en una primera etapa, se realizó un completo estudio de la seguridad de la

## DISCUSIÓN

implementación de esta tecnología en las TRA analizando posibles efectos sobre gametos y embriones utilizando el biomodelo porcino.

Los gametos producen ROS como metabolismo celular, que en condiciones normales son contrarrestados por mecanismos enzimáticos antioxidantes (Cetica et al., 2001). Someter ovocitos a condiciones de estrés por cultivo *in vitro*, puede conducir a un exceso de ROS, causando que entren en estrés oxidativo lo cual afecta al metabolismo celular, con efectos perjudiciales sobre la competencia ovocitaria y la supervivencia celular (Soto-Heras & Paramio, 2020). En cuanto al gameto masculino, el estado metabólico de espermatozoides está altamente relacionado con su funcionalidad (Amaral, 2022; Freitas-Martins, Sousa, Cristo, Ramalho-Santos, & Amaral, 2024; Miki, 2007). El análisis de la condición metabólica de gametos y sus alteraciones ante diversos factores del medio que podrían resultar perjudiciales se presenta como una herramienta de diagnóstico de calidad celular muy prometedora (Freitas-Martins et al., 2024). Por otro lado, se ha demostrado que la exposición a NP induce a toxicidad en células debido al aumento en los niveles de ROS y el agotamiento de enzimas antioxidantes, conduciendo a estrés oxidativo, daño en el ADN y apoptosis (Khanna, Ong, Bay, & Baeg, 2015; Mahmoudi, Hofmann, Rothen-Rutishauser, & Petri-Fink, 2012; Manke, Wang, & Rojanasakul, 2013). La presencia de las NP en medios de cultivo y en contacto con los gametos, podría ejercer un efecto nocivo, aumentando su producción de ROS, resultando en un metabolismo celular alterado, comprometiendo la supervivencia y la actividad celular (Hong et al., 2015; Hou & Zhu, 2017).

En este trabajo se estudiaron los efectos de las NPOv sobre el metabolismo de los gametos expuestos, mediante el analizador de flujo extracelular Seahorse<sup>®</sup>. Dicha tecnología permite estudiar el metabolismo energético, midiendo el entorno inmediato de las células en tiempo real (Freitas-Martins et al., 2024). Esta tecnología ha sido recientemente validada para su aplicación en gametos por varios autores en diversas especies: en espermatozoides de ratones (Tourmente, Villar-Moya, Rial, & Roldan, 2015) y de humanos (Freitas-Martins et al., 2024), en células del cumulus (Hayashi et al., 2017) y ovocitos de yegua (Catandi et al., 2022) y en células germinales primordiales en ratón (Hayashi et al., 2017). El análisis realizado en este trabajo posibilitó establecer un perfil del estado metabólico de gametos sometidos a la presencia de NPOv y controles (sin

## DISCUSIÓN

NPOv) a través de la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y de la tasa de acidificación extracelular (ECAR).

Los resultados obtenidos para los parámetros de fosforilación oxidativa y tasas glucolíticas en ovocitos fueron similares en gametos expuestos y no expuestos a NPOv, indicando la ausencia de efectos sobre el metabolismo de estas células de la presencia de las NPOv unidas a ovocitos. En este sentido, la determinación del metabolismo basal de ovocitos por este método en otras especies ha sido analizado, únicamente observando el valor de OCR. Estudios anteriores han mostrado que diferentes respuestas metabólicas especie-específicas fueron descritas, así como en los protocolos de maduración utilizados (Muller et al., 2019). La OCR basal en ovocitos maduros desprovistos de células del cumulus de ratón fue menor (1 pmol/min) en comparación a la obtenida en ovocitos humanos cercana a 4 pmol/min (Muller et al., 2019). Los resultados de nuestro trabajo mostraron valores de OCR media de ovocitos maduros sin células del cumulus porcinos de 8 pmol/min. Cuando los ovocitos porcinos fueron sometidos a una co-incubación previa con NPOv los resultados de OCR se mantuvieron dentro de los mismos niveles, al igual que los de ECAR, indicando que no habría efectos de la presencia de NPOv sobre el metabolismo de estas células. Este trabajo analizó por primera vez el efecto de NP sobre el metabolismo de ovocitos mediante un analizador de flujo extracelular.

En cuanto a los efectos sobre espermatozoides, en nuestro trabajo no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros analizados (OCR-ECAR) cuando los espermatozoides se incubaron en presencia de NPOv en comparación a espermatozoides control sin NP. Previamente, otros autores (Makhuf et al., 2006), observaron de forma similar a nuestros resultados, que la exposición de espermatozoides bovinos a NP de óxido de hierro recubiertas con alcohol polivinílico no presentaba efectos sobre la funcionalidad espermática. Merece ser destacado que, en el trabajo mencionado, las NP eran capaces de atravesar la membrana espermática observando acúmulos dentro de las mitocondrias de la cola espermática, a diferencia de las NP utilizadas en nuestro trabajo de un tamaño mayor que impidió su internalización. Contrariamente, un trabajo reciente analizó el efecto de las NP de óxido de cobre (CuONP) sobre espermatozoides humanos (Shaoyong et al., 2022) y observó que la

## DISCUSIÓN

exposición a CuONP alteró la homeostasis del metabolismo de los espermatozoides humanos. En este caso la OCR de los espermatozoides tratados con CuONP fue sustancialmente menor, y la ECAR media de los espermatozoides expuestos a CuONP fue notablemente superior, en comparación con la de espermatozoides controles, indicando una alteración en el metabolismo espermático debido a la presencia de estas NP (Shaoyong et al., 2022). Además, en este estudio se demostró que la alteración en el metabolismo espermático está directamente relacionada con la alteración en la funcionalidad espermática, llegando a ser perjudicial. En otro estudio anterior, se detalló la disfunción en el metabolismo de espermatozoides de ratones sometidos a la presencia de NP de sílice debido al daño en la estructura de las mitocondrias producido por el estrés oxidativo generado (Xu et al., 2014). Otros autores observaron que la presencia de NP de  $\text{CeO}_2$  produjo una alteración del equilibrio antioxidante/oxidante del espermatozoide y se redujeron la motilidad y el recuento de los espermatozoides en ratones debido a sus efectos sobre el testículo cuando se administraron por vía parenteral (Adebayo, Akinloye, & Adaramoye, 2018). Estos resultados indican una diferencia en los efectos producidos por diversos nanomateriales, siendo las NP de óxido de hierro las que demostraron ser inocuas para el metabolismo espermático, independiente de la vía de administración empleada, mientras que otros nanomateriales analizados presentaron toxicidad sobre el metabolismo de espermatozoides afectando su funcionalidad.

Posteriormente, de manera complementaria al estudio del metabolismo espermático, se analizaron los posibles efectos nocivos de la exposición de NP y NPOv sobre los espermatozoides porcinos en los medios más comúnmente utilizados en TRA. Este estudio se realizó mediante la evaluación de los parámetros de calidad seminal a través de la evaluación de los parámetros cinéticos y de la viabilidad. La composición de los medios donde se lleva a cabo la co-incubación podrían representar un factor determinante para la interacción entre los espermatozoides y las NP (Yue et al., 2015), por ello, en este trabajo se estudiaron dos medios diferentes: el medio de dilución y conservación seminal más utilizado de manera rutinaria en la especie porcina, BTS y el medio tradicional de FIV porcina, el medio TALP. No se encontraron alteraciones en la viabilidad, y los parámetros cinéticos PMOT y MOT de los espermatozoides tras su

## DISCUSIÓN

incubación con NP o NPOv en ninguno de los medios utilizados tras una hora de co-incubación. Previamente, otros autores han observado resultados similares sin variaciones en los parámetros MOT o PMOT cuando los espermatozoides bovinos se incubaron con NP recubiertas con alcohol polivinílico (Makhluf et al., 2006) o NP-DMSA (Caldeira et al., 2017) en tiempos de co-incubación de hasta 4 h (Caldeira et al., 2017).

Como ha sido mencionado, se ha observado que los efectos adversos de las NP estarían relacionados tanto con la dosis como con la duración de la exposición (Hou & Zhu, 2017; Moretti et al., 2013). Por lo tanto, la ausencia de efectos negativos observados en este estudio puede atribuirse a las dosis relativamente bajas de NP/NPOv utilizadas y al corto período de co-incubación. Sin embargo, en la segunda fase de esta investigación, cuando el período de incubación durante la FIV se extendió a 18-20 h, no se observaron efectos perjudiciales sobre el normal desarrollo de la fecundación. Además, el tamaño de las NP es otro de los factores clave que determinan su potencial riesgo para las células (Yang et al., 2015). En este sentido, como se mencionó previamente, el tamaño de las NP utilizadas en este estudio impide su internalización en la membrana del espermatozoide, lo que limita los posibles efectos citotóxicos.

Entre una gran variedad de nanomateriales, las NP superparamagnéticas de óxido de hierro, más conocidas como SPION por sus siglas en inglés, son las preferidas para aplicaciones biológicas, dado que en general son bien toleradas por las células, debido a que este tipo de hierro es endógeno del cuerpo (Laurent et al., 2014; Mahmoudi, Simchi, Imani, Milani, & Stroeve, 2009). Asimismo, los recubrimientos de las SPION están fabricados principalmente de materiales biocompatibles y pueden funcionalizarse fácilmente con diferentes biomoléculas (Neuberger et al., 2005). A pesar de estas ventajas, se ha propuesto que las NP funcionalizadas con diferentes moléculas podrían presentar ciertos efectos nocivos sobre las células (Truong, Saili, Miller, Hutchison, & Tanguay, 2012; Truong et al., 2013). Las NP seleccionadas para este trabajo son de este nanomaterial, y fueron funcionalizadas con la proteína oviductina recombinante (rOVGP1) obtenida en nuestros laboratorios para dos especies (porcina y de coneja). Para estudiar la causa de posibles efectos negativos, evaluamos el impacto de las NPOv, considerando los medios de conjugación y la inclusión de las rOVGP1. De acuerdo con estos resultados, ni las NP ni la proteína recombinante utilizada para su funcionalización,

## DISCUSIÓN

así como tampoco los tampones utilizados en el proceso de conjugación presentaron efectos negativos sobre los espermatozoides tras su co-incubación. De manera similar, en otros trabajos, no se documentaron efectos adversos sobre la funcionalidad de los espermatozoides después de la exposición a NP magnéticas funcionalizadas con una variedad de moléculas (Feugang et al., 2015; Odhiambo et al., 2014; Yousef et al., 2020).

Resulta importante destacar que se observaron diferencias en ciertos parámetros cinéticos de los espermatozoides entre los grupos control y NP/NPOv cuando se utilizó el medio BTS. Los parámetros afectados incluyeron aquellos relacionados con la velocidad (VSL, VCL y VAP). Es posible especular que la reducción de estos parámetros en los grupos con NP podría deberse a la aglutinación de espermatozoides alrededor de las NP, que actúan como un impedimento al libre movimiento de los espermatozoides (Ibănescu et al., 2016; Pérez-Duran et al., 2020). Estos agregados también podrían explicar la disminución observada en la ALH en los grupos que contienen NP, ya que la presencia de estos agregados probablemente impide el movimiento lateral de la cabeza de los espermatozoides. Conjuntamente, el parámetro LIN, que se calcula como  $VSL/VAP \times 100$ , se vio afectado debido a su dependencia de los parámetros de velocidad mencionados anteriormente. Estas diferencias se detectaron cuando se utilizó BTS, pero no se observaron diferencias cuando se utilizó TALP, siendo este un medio más complejo. Además, para contrarrestar el efecto de la agregación de espermatozoides, se incorporó al TALP un 1,5 % adicional de BSA (Caldeira et al., 2017). Con esta modificación eliminamos las diferencias en los parámetros de velocidad entre los grupos control y experimentales con NP, debido a que la aglutinación se redujo de manera comparable en todos los grupos. Por último, cabe destacar que, aunque se observaron ciertos efectos en los parámetros cinéticos de los espermatozoides en presencia de NP en el medio BTS, esto no representa una limitación para la aplicación de esta tecnología en las TRA. Esto se debe a que el contacto de los espermatozoides con las NPOv ocurriría exclusivamente en medios de FIV, como el TALP, donde no se han observado efectos negativos.

En el estudio anterior hemos descartado la existencia de alteraciones al metabolismo del ovocito tras su unión con NPOv, demostrando la ausencia de diferencias en la tasa de consumo de oxígeno y tasa de acidificación celular al comparar ovocitos controles y



## DISCUSIÓN

ovocitos NPOv, indicativo de una demanda energética normal. Sin embargo, incluso en un ovocito metabólicamente competente, la presencia de las NPOv adheridas a la ZP podrían representar un riesgo para su estructura y/o función, lo que podría alterar el desarrollo normal de la fecundación y el posterior desarrollo embrionario. Se ha observado que la OVGP1 es la molécula involucrada en el endurecimiento de la ZP de ovocitos (Coy et al., 2008) y, en consecuencia, la presencia de NPOv podría tener un efecto sobre la ZP, ya que podría impedir la penetración de los espermatozoides durante la fecundación. El endurecimiento de la ZP es generalmente determinado mediante el tiempo necesario para su digestión al ser sometidos a una proteasa (Coy et al., 2008; Iwamoto et al., 1999; Schiewe, Araujo, Asch, & Balmaceda, 1995). Para conocer si este efecto ocurre *in vitro* con el uso de las NPOv unidas a ovocitos, y si tiene algún efecto sobre el endurecimiento de la ZP se realizó un estudio donde se evaluó el tiempo de digestión de la ZP de ovocitos incubados con NPOv. Los resultados demostraron no que no hubo diferencias en el tiempo de digestión de la ZP al comparar ovocitos unidos a NPOv y ovocitos sin NP sometidos a digestión de ZP en pronasa. El tiempo de digestión de ZP para los ovocitos control fue de  $45,76 \pm 18,5$  s mientras que el tiempo requerido para la digestión de la ZP en ovocitos previamente incubados con NPOv fue de  $43,22 \pm 15,77$  s. Resultando similar a los tiempos observados por otros autores (Coy et al., 2008), aproximadamente 1 min ( $65,3 \pm 9,5$  s) cuando la digestión de la ZP se evaluó *in vitro* en ovocitos no expuestos a fluido oviductal. A diferencia del tiempo de digestión necesario para la eliminación de la ZP en ovocitos sometidos a la presencia de fluido oviductal proveniente de hembras adultas cercanas a la ovulación (mayor presencia de OVGP1), que fue de aproximadamente 48 min ( $2.866,83 \pm 94,4$  s). La proteína pOVGP1 utilizada en este trabajo, es una versión recombinante y truncada con una delección de la región C-terminal (Algarra et al., 2016). Esta delección disminuye la capacidad de la glicoproteína para penetrar la ZP, y generar endurecimiento de la ZP, además de prevenir, en consecuencia, la endocitosis de las NPOv (Algarra et al., 2016). Estos resultados indican que la oviductina recombinante utilizada en este trabajo es una candidata ideal ya que no presenta efectos negativos sobre la estructura de la ZP.

Una vez confirmado que no existe un efecto negativo de la presencia de NP sobre los gametos, tanto femenino como masculino, el siguiente paso fue evaluar el efecto de las

## DISCUSIÓN

NP/NPOv sobre ovocitos mediante el análisis de su capacidad para continuar su desarrollo en procesos de FIV y CE. Este estudio demostró que la unión de ovocitos a NPOv no tuvo efectos sobre los resultados de FIV (penetración, monospermia y eficiencia) ni sobre el desarrollo embrionario posterior. Incluso tras la separación de las NPOv previo a la FIV, los ovocitos mantuvieron su capacidad fecundante de manera eficiente y su capacidad de desarrollarse a estadio de blastocistos cuando eran sometidos a protocolos de CE, así como en la calidad de estos, analizada mediante medición del diámetro de los blastocistos y número de células por blastocitos. Similarmente, otros trabajos demostraron que la incubación de NP con ovocitos y/o embriones *in vitro* no presentó efectos nocivos sobre su desarrollo posterior (Kim et al., 2018).

Una vez comprobada la eficiencia de la técnica desarrollada, así como su inocuidad sobre los gametos y embriones en el biomodelo porcino, se continuó con una segunda etapa del trabajo, donde hemos empleado el biomodelo conejo. Este modelo nos permite acceder a estudios *in vivo* de una manera práctica debido a sus particularidades fisiológicas (corto periodo de gestación, gran número de crías por parto, posibilidad de transferencia de embriones, presencia de doble útero y cérvix lo que permite realizar transferencias con diferentes grupos experimentales en una misma hembra). En mamíferos el desarrollo fetal depende de eventos moleculares secuenciales específicamente orquestados que son sensibles a alterarse fácilmente por factores externos durante las primeras etapas del desarrollo gestacional (Vesterinen, Morello-Frosch, Sen, Zeise, & Woodruff, 2017). En este sentido, se ha demostrado que la exposición a ciertos nanomateriales por encima de un nivel umbral durante los períodos de desarrollo embrionario y fetal pueden ser causantes de diversas malformaciones del desarrollo (Kim et al., 2018). En este trabajo se analizó el efecto de la exposición de cigotos y embriones tempranos de conejo (mórulas tardías/blastocistos) a NPOv mediante el estudio del desarrollo embrionario tras la exposición en condiciones *in vitro*. Para este fin, se obtuvieron cigotos/embriones tempranos *in vivo*, a partir de hembras previamente sincronizadas e inseminadas, y luego se co-incubaron con NPOv para posteriormente continuar con su cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados en porcino, donde no hubo diferencias en el desarrollo

## DISCUSIÓN

comparando cigotos/embriones tempranos unidos a NPOv con los controles sin estas. De esta manera, se demostró que el desarrollo de embriones de conejo no se vio afectado por la presencia de NPOv.

A continuación, se evaluó el efecto de la presencia de NPOv unidas a cigotos en estadio pronuclear obtenidos *in vivo*, tras ser transferidos a hembras receptoras, mediante el estudio de la tasa de implantación embrionaria a través de laparoscopia., tasa de nacidos vivos y el peso corporal al nacimiento de gazapos obtenidos a partir de la transferencia de cigotos unidos a NPOv en comparación a un grupo control sin NP. Los resultados demostraron que no hubo diferencias en ninguno de los parámetros analizados, indicando que la presencia de NPOv unidas a cigotos no tuvo efectos sobre la viabilidad de estos embriones, logrando un desarrollo normal hasta el nacimiento de crías saludables.

Resultados similares se obtuvieron en estudios previos en ratones, donde se demostró la ausencia de efectos negativos por la exposición de ovocitos y cigotos a diferentes NP. Taylor et al. (2014), observaron que la inyección de una dosis baja de NP de oro o plata dentro de una blastómera en un embrión de ratón de dos células no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo embrionario posterior (Taylor et al., 2014). Por otro lado, también se ha analizado el efecto de la exposición de ovocitos de ratón a PLGA-NP funcionalizadas con un colorante fluorescente (tetrametilrodamina-TRITC), sobre el desarrollo embrionario pre-implantacional y posterior desarrollo fetal *in vivo* detrás la transferencia embrionaria. En este caso, las NP utilizadas fueron diseñadas para permitir su paso a través de la ZP, con el objetivo de ser utilizadas como transportadores de fármacos al interior del ovocito (Kim et al., 2018). Similar a nuestros resultados, en este trabajo se obtuvieron crías nacidas vivas saludables, demostrando la ausencia de efectos de estas NP (Kim et al., 2018).

En otros trabajos, de manera contraria, se observaron diversos efectos perjudiciales sobre el desarrollo embrionario y fetal tras la exposición a NP. Fynewever et al. (2007), estudiaron los efectos de la inyección de dos tipos de NP (poliestireno y poliacrilonitrilo) para el marcado de embriones de ratón de 1 célula sobre el desarrollo embrionario posterior. En este trabajo, se observaron los porcentajes de desarrollo a día 2 y 6 notablemente disminuidos en los grupos tratados con poliacrilonitrilo NP en

## DISCUSIÓN

comparación con los grupos control y los tratados con poliestireno NP. Se observó un efecto notable en la eclosión de blastocisto derivados de cualquiera de los dos grupos tratados con NP (Fynewever et al., 2007).

Previamente se ha sugerido una potencial toxicidad de varios tipos de NP en el desarrollo fetal con efectos deletéreos (Brohi et al., 2017). En este sentido, Yamashita et al. (2011) observaron que el uso de NP de sílice y de dióxido de titanio en hembras preñadas causo complicaciones en las preñeces, observando fetos de menores tamaños, y acumulo de NP en riñón y cerebro fetal (Yamashita et al., 2011). Los efectos observados en fetos tras la exposición a NP en hembras preñadas demostraron ser dependiente de su tamaño. De este modo, NP menores a 240 nm presentaron efectos negativos sobre los fetos, mientras que las de mayor tamaño no tuvieron efectos sobre estos, posiblemente debido a la incapacidad de estas para atravesar la barrera placentaria (Wick et al., 2010).

Las diferencias en las vías de administración o exposición de las NP y las dosis utilizadas en las células y tejidos reproductivos hacen difícil la comparación entre diversos estudios (Brohi et al., 2017). En nuestro caso, la administración de NPOv *in vivo* se realizó al ser incorporadas a través de la transferencia de cigotos donde las NP se encuentran unidas a la ZP, la cual se desprende tras la eclosión del blastocisto. Además de comprobar en nuestro estudio la ausencia de cualquier efecto adverso de la presencia de NPOv adheridas a la ZP sobre el desarrollo fetal hasta el nacimiento de las crías, se ha estudiado si la presencia de las NPOv en el tracto genital de la hembra afecta a la estructura morfológica del oviducto y útero tras la transferencia de cigotos con NPOv mediante laparoscopia. Para garantizar la seguridad del uso de NPOv *in vivo*, se realizaron determinaciones mediante inmunohistoquímica de marcadores de proliferación celular e inflamación en tejido oviductal y uterino sometidos a la presencia de embriones unidos a NPOv. Los resultados demostraron que embriones de conejo unidos a NPOv transferidos *in vivo* a úteros de conejas no tuvieron ningún efecto morfológico adverso sobre el endometrio en el momento de la implantación.

Como ha sido mencionado, NP de tamaños mayores a 240nm no tendría la posibilidad de atravesar barreras fisiológicas como la placentaria, este sería el caso de las NP empleadas en nuestro trabajo, las cuales rondan un tamaño alto de 365 nm. Las SPION

## DISCUSIÓN

generalmente se metabolizan y excretan del cuerpo a través de la vía metabólica del hierro endógeno (Laurent et al., 2014; Sakhtianchi et al., 2013). Resulta lógico indicar que una vez que los embriones salen de la ZP tras la eclosión, las NPOv sufren el metabolismo normal del hierro del organismo, mientras que la ZP y la oviductina se degradan por la vía normal de proteólisis. Posiblemente, por estas razones no se ha evidenciado ningún efecto adverso sobre los fetos ni en tejidos uterino/oviductal.

Los resultados de este trabajo hasta aquí prueban que la aplicación de esta tecnología no ha afectado el desarrollo embrionario ni fetal en ninguna de sus etapas y, por consiguiente, podría aplicarse en cualquiera de las TRA sin efectos negativos. En este sentido, parece lógico indicar que las NPOv adheridas a las ZP se eliminan junto con la ZP una vez que ocurre la eclosión, sin presentar efecto alguno sobre el endometrio y la implantación subsiguiente, y por tal, sugerimos que no sería necesario eliminar las NPOv previamente a la transferencia de los embriones, evitando de esta manera un factor más de estrés en los procedimientos de reproducción asistida (Ramos-Ibeas et al., 2019). Sin embargo, a pesar de que en este trabajo se demostró que la presencia de NPOv adheridas a la superficie de la ZP de ovocitos no altera los resultados de la FIV ni el desarrollo de embriones posterior, se diseñó un estudio con el fin de analizar la posibilidad de separar NPOv de los ovocitos, especulando un posible requerimiento para su aplicación en TRA de alguna especie. Los resultados demostraron que con un simple pipeteo y/o con un tratamiento ligero con tripsina, los ovocitos eran liberados de las NPOv y perdían su capacidad de ser atraídos por el campo magnético. Estos resultados confirman que la propiedad de atracción magnética adquirida por la presencia de las NP en la parte exterior de la ZP es reversible. Remarcamos nuevamente que las NP utilizadas en este trabajo pertenecen al grupo de NP superparamagnéticas (SPION), las cuales entre sus cualidades destaca la capacidad de perder totalmente la interacción magnética tras eliminar el campo magnético (Olsvik et al., 1994), a pesar de haberse demostrado que la magnetización superparamagnética es, comparada con la de los materiales paramagnéticos normales, mucho mayor, pudiendo alcanzar casi la saturación de magnetización del óxido de hierro ferromagnético (Neuberger et al., 2005).

Una vez confirmada la inocuidad de la utilización de este sistema (NPOv) sobre gametos, embriones, feto y el tejido uterino, se continuó con un análisis descriptivo de la

## DISCUSIÓN

aplicación de este sistema basado en campos magnéticos y sus posibles efectos. La manipulación de células sin contacto físico utilizando una fuerza externa ha motivado una gran variedad de sistemas y aplicaciones, tanto para selección de células de interés como para movilización de células a través de sistemas de cultivo, principalmente basados en microfluidos (Yaman, Anil-Inevi, Ozcivici, & Tekin, 2018). La posible aplicación en las TRA de estos avances en tecnología de manipulación celular resulta sumamente interesante y ambicioso, considerando que podría facilitar en gran medida la manipulación de gametos y embriones, una de las tareas más complejas de estas tecnologías. La tecnología desarrollada en este trabajo se propone como un sistema para su aplicación a las TRA, que permita la manipulación de ovocitos y embriones basado en la fuerza de atracción magnética a través del uso de NP superparamagnéticas funcionalizadas específicamente para unirse a la ZP. Otra de las propiedades remarcables del tipo de NP utilizadas en este trabajo, es que confieren a sus células blanco la habilidad de ser guiadas hacia un sitio específico mediante el uso de un campo magnético externo (Singh et al., 2010). En este trabajo se estudió la eficiencia de esta herramienta para generar la atracción de ovocitos y embriones hacia un campo magnético de fuerza magnética conocida. Tras un período muy corto de incubación (30min) de ovocitos con las NPOv se logró que la mayoría de los ovocitos maduros adquieran la capacidad de ser atraídos por un campo magnético, demostrando su efectividad. Por su parte, los embriones también respondieron satisfactoriamente a la atracción por el campo magnético, pero en este caso fue necesaria una incubación de 2 horas de embriones con NPOv para obtener una respuesta significativa. De manera complementaria, en este estudio se observó que la mayoría de los ovocitos atraídos correspondía a ovocitos maduros tras el protocolo de MIV, mientras que los que no resultaron atraídos por el campo magnético (no unidos a NPOv) correspondían mayoritariamente a ovocitos inmaduros o degenerados. Ha sido descrito que la OVGP1 está implicada en la maduración de la ZP dentro del oviducto (Algarra et al., 2016), estos resultados son indicativos de que el uso de esta proteína como nexo de unión de las NP a la ZP de ovocitos podría funcionar además como un método de selección de ovocitos que están efectivamente maduros.

## DISCUSIÓN

Estos resultados remarcan la importancia de una efectiva incubación a tiempo corto de ovocitos con NPOv, dado que, como se ha mencionado anteriormente, a mayores tiempos de incubación la especificidad de unión se perdió, siendo similar la unión de ovocitos a NP con o sin la OVGP1, con lo cual se podría ver reducida la capacidad de diferenciación entre ovocitos maduros e inmaduros. Esta posibilidad supone una gran ventaja para la selección de ovocitos maduros con una técnica sencilla y no invasiva. Sin embargo, a pesar de que, numerosas técnicas basadas en la aplicación de campos magnéticos se utilizan actualmente para la manipulación celular sin inconvenientes (Yaman et al., 2018), previo a la implementación de esta tecnología resulta indispensable un análisis exhaustivo de posibles efectos del uso de estos campos magnéticos sobre las células objetivo.

El impacto de la exposición a un campo magnético sobre células parece depender, entre otros factores, principalmente de su intensidad (Zhang, Ding, & Shang, 2014; Zhang et al., 2016), del tipo de célula y de la densidad celular expuesta (Zhang, Ji, Yang, & Zhang, 2017). La intensidad del campo magnético utilizada para la manipulación celular suele ser baja, pero, de igual manera resulta fundamental el estudio de su aplicación sobre ovocitos y embriones. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que al someter ovocitos recuperados a través de este sistema de manipulación basado en la fuerza magnética a un protocolo de FIV no existen diferencias en las tasas de división embrionaria y de blastocistos, confirmando que la producción de embriones y el desarrollo embrionario temprano se mantiene inalterados por la presencia de las NPOv y la exposición al campo magnético. Además de centrarse en la citotoxicidad, el determinante de toxicidad más comúnmente utilizado como resultado de la exposición a SPION, ha sido recalcada la importancia de estudiar las alteraciones celulares sutiles en forma de daño al ADN y estrés oxidativo (Singh et al., 2010). En este sentido, en este trabajo de tesis se continuo con el análisis del transcriptoma de los blastocistos obtenidos tras someter ovocitos unidos a NPOv y expuestos a un campo magnético a un protocolo de FIV y CE. Los resultados alcanzados no evidenciaron diferencias en los patrones de expresión de genes al comparar blastocistos obtenidos a partir de ovocitos-NPOv expuestos al campo magnético con embriones controles producidos a partir de ovocitos control que no fueron sometidos a ningún factor externo. Además, de manera

## DISCUSIÓN

específica a partir de estos resultados, se analizaron los niveles de expresión de genes relacionados al estrés oxidativos (CAT, GPX1, GPX2, GPX4, SOD1 y SOD2). Los resultados nuevamente no evidenciaron diferencias en la expresión de ninguno de los genes estudiados cuando se compararon con la expresión en embriones obtenidos a partir de ovocitos no expuestos a NPOv ni al campo magnético, indicando la ausencia de efectos de ambos factores. Por tanto, la expresión de genes en general y específicamente los relacionados a estrés oxidativo, no se vio alterada por la manipulación de ovocitos a través de la fuerza magnética. Similarmente, se ha observado que el tratamiento con NP unidas a TRICT utilizadas como transportadoras de fármacos al interior de ovocitos no comprometió el desarrollo del embrión hasta blastocisto, ni afectó el contenido de mRNA de blastocistos obtenidos (Kim et al., 2018). En otro estudio desarrollaron un modelo de cultivo de ovocitos en tres dimensiones por levitación (Antonino et al., 2019), donde se analizó el efecto de unión de NP de óxido de hierro y de oro combinadas a la parte externa de folículos secundarios conteniendo ovocitos en su interior y sometiendo a un campo magnético externo. En este caso ni la presencia de NP ni el someterlo a un campo magnético ha sido perjudicial para el ovocito, mejorando incluso la proporción de ovocitos viables reduciendo su degeneración (Antonino et al., 2019).

Un estudio adicional se realizó a fin de evaluar los efectos de las NPOv sobre el metabolismo de ovocitos a través de la valoración del estrés oxidativo mediante el análisis de los niveles intracelulares de ROS tras la exposición a NPOv. Los niveles de intensidad fluorescente de ROS obtenidos se compararon con los de un grupo control sin NPOv y un grupo de ovocitos-NPOv expuestos a su atracción por un campo magnético. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la intensidad de ROS entre los grupos estudiados, indicando que la ausencia de efectos sobre el estrés oxidativo de ovocitos por la presencia de las NPOv ni de la exposición al campo magnético. Similarmente, un estudio previo observó que los niveles de ROS en ovocitos de hembras ovinas prepúberes expuestos a NP de CeO<sub>2</sub>NP durante su maduración *in vitro* permanecieron inalterados, indicando la ausencia de efectos de estas NP en el metabolismo ovocitario (Ariu et al., 2017). Por otro lado, un trabajo reciente de Roy et al., (2021), analizó el efecto de la incorporación de NP de quitosano (chitosán) en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos maduros. Los resultados demostraron que a



## DISCUSIÓN

una dosis de 25  $\mu\text{g/ml}$ , los niveles de ROS se reducían significativamente en comparación con el grupo control sin NP. Sin embargo, una dosis mayor de NP, de 50  $\mu\text{g/ml}$ , afectó negativamente la tasa de maduración, con un aumento en la producción de ROS intracelular en este grupo. Estos resultados indican un efecto dosis-dependiente sobre el metabolismo de los ovocitos, pasando de protector a dosis bajas a uno tóxico cuando se duplicaba la concentración (Roy et al., 2021).

Se han realizado múltiples esfuerzos orientados a generar mejoras en las condiciones de producción *in vitro* de embriones de mamíferos, centrándose principalmente en la optimización del entorno que rodea al embrión, como la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación (Swain et al., 2016). Sin embargo, a pesar de todos estos intentos, las tasas de desarrollo de embriones producidos *in vitro* aún son subóptimas y existe un amplio margen de mejora en los resultados de las TRA (Kawwass & Badell, 2018; Luke, 2017). Por ello, se han propuesto nuevos enfoques para mejorar las metodologías utilizadas en TRA, con el objetivo claro de simular *in vitro* las condiciones más cercanas a las experimentadas *in vivo*. De todo ello, surge un nuevo concepto para el cultivo *in vitro*, donde se persigue mimetizar las condiciones naturales, tales como cultivos microfluídicos o el uso de diversos dispositivos a micro/nano-escala (Karcz et al., 2022). Aún con estas mejoras propuestas para las TRA, se mantiene presente una de las principales limitaciones de estas tecnologías, que es la manipulación precisa y cuidadosa de ovocitos y embriones. Esto es de gran importancia, ya sea para movilizarlos a través de diferentes estructuras, o para fijarlos en un sitio favoreciendo el cultivo de estas células en un entorno que promueva flujos celulares adecuados. La manipulación de ovocitos y embriones basada en la aplicación de una fuerza magnética externa descrita en este trabajo emerge como una nueva metodología asociada a las TRA que permite manipular de manera segura y efectiva ovocitos y embriones.

Tras confirmar que la atracción mediante un campo magnético de ovocitos y embriones tras su unión a NPOv es efectiva, se continuó con el estudio descriptivo de la dinámica de ese desplazamiento. Para este fin, se emplearon tres imanes de neodimio diferentes, cada uno capaz de producir una intensidad de campo magnético diferencial. Se expusieron los ovocitos-NPOv a cada uno de estos tres imanes y se caracterizó la trayectoria y la velocidad de movimiento de los ovocitos en cada caso. Se observó que

## DISCUSIÓN

el movimiento inicial del complejo ovocito-NPOv fue lento, con aceleración cercana a cero, lo cual cambió conforme se fue acercando al imán, donde al aumentar la intensidad del campo magnético, se incrementó la velocidad y aceleración. De acuerdo con el protocolo descrito en este estudio, todos los ovocitos se comportaron de una manera similar y con una cinética de movimiento homóloga, lo que permite sugerir que sería posible emplear de manera fiable esta técnica de manipulación resultando una herramienta prometedora para su aplicación en guiar a estas células hacia estructuras prediseñadas de cultivos celulares 2D y/o 3D.

La selección de células mediante la funcionalización de NP magnéticas con moléculas de interés y la aplicación de un campo magnético externo ofrece una alta selectividad y tasas de recuperación, a la vez, brinda una gran oportunidad para la manipulación precisa de células (Yaman et al., 2018). Procesos como la MIV, FIV, CE, y la vitrificación requieren de una minuciosa manipulación de ovocitos y embriones para movilizarlos entre los diferentes medios específicos para cada tarea o etapa de desarrollo. Los avances en tecnologías de vitrificación han marcado una gran diferencia con las técnicas de congelación tradicional, logrando una importante mejora en la eficiencia de la conservación de ovocitos, así como tasas de preñez y animales nacidos vivos (Cobo & Diaz, 2011; De Munck & Vajta, 2017). A pesar de ello, aún existen posibilidades de mejoras, siendo uno de los desafíos pendientes en este aspecto el desarrollo de un dispositivo de vitrificación seguro y práctico que permita lograr que la vitrificación se considere un procedimiento de laboratorio clínico estándar, desvinculado del factor humano (Chian, Wang, & Li, 2014).

Por ello, en este trabajo se realizó un estudio de la factibilidad y eficiencia en la manipulación de ovocitos y embriones, empleando un sistema basado en una pipeta magnética diseñada para tal fin. Los resultados demostraron que la manipulación mediante esta pipeta magnética fue más efectiva en comparación con el método tradicional de pipeta de aspiración, reduciendo el tiempo requerido para tareas rutinarias de manipulación de ovocitos y embriones en dos tipos de medios, el medio de trabajo habitual y de vitrificación. Resulta de sumo interés remarcar la importancia de respetar los tiempos reducidos indicados para los procesos de vitrificación donde exponemos células sensibles a medios altamente concentrados para inducir su

## DISCUSIÓN

deshidratación (Chian et al., 2014). Esta tarea es generalmente realizada por personal altamente capacitado, dado que requiere de habilidades especializadas. Con esta tecnología, se demostró que los tiempos empleados para trasladar ovocitos entre pocillos se redujeron considerablemente al trabajar con grupos de 3 o 5 ovocitos, mientras que no se observaron diferencias cuando se realizó individualmente con un sólo ovocito. Además, cabe destacar la facilidad y practicidad de este sistema, ya que no requiere de una precisión elevada ni personal especialmente cualificado. Esto supone una gran ventaja para las clínicas de reproducción humana, donde se maneja el procesamiento de grupos de ovocitos y embriones recuperados de cada donante. Sin embargo, para su aplicación en humanos y otras especies, serán necesarios estudios adicionales para garantizar la seguridad del uso de esta tecnología.

# CONCLUSIONS

## 8. CONCLUSIONS

1. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles efficiently conjugate to recombinant porcine and rabbit OVGP1 proteins, and this binding is stable over time.
2. Nanoparticle-OVGP1 complexes bind specifically to the external part of the zona pellucida of mature oocytes and embryos at various stages of development
3. The presence of nanoparticle-OVGP1 complexes adhered to the zona pellucida of oocytes, as well as in the medium with sperm, does not affect the cellular metabolism of gametes, their fertilizing capacity, or the development of oocytes subjected to *in vitro* fertilization and embryo culture protocols.
4. The presence of nanoparticle-OVGP1 complexes attached to the zona pellucida of embryos transferred to recipient females *in vivo* does not affect the implantation rate, the rate of live births or their birth weight. The presence of embryos attached to nanoparticle-OVGP1 complexes in the oviduct and uterus has no effect on these organs.
5. The binding of nanoparticle-OVGP1 complexes to the zona pellucida of oocytes and embryos allows their attraction after their exposure to an external magnetic field, making it possible to reverse this attraction by separating nanoparticle-OVGP1 complexes from the zona pellucida.
6. Exposure to a magnetic field of oocytes bound to nanoparticle-OVGP1 complexes does not affect the transcriptome of *in vitro* produced embryos.
7. The dynamics of movement generated in oocytes bound to the nanoparticle-OVGP1 complex exposed to external magnetic fields is similar for all of them. It is linear for a low magnetic force and becomes non-linear for a high magnetic force due to the magnetic force produced by the particle itself.
8. Applying a magnetic device to manipulate oocytes-embryos bound to the nanoparticle-OVGP1 complex is effective and allows for reduced work times.



# ABREVIATURAS

## 9. ABREVIATURAS

|                       |                                            |
|-----------------------|--------------------------------------------|
| <b>°C</b>             | Grados Celsius                             |
| <b>ALH</b>            | Amplitud lateral media de la cabeza        |
| <b>ARN</b>            | Ácido ribonucleico                         |
| <b>ARN-seq</b>        | Secuenciación del ARN                      |
| <b>BSA</b>            | Albumina sérica bovina                     |
| <b>BTS</b>            | Beltsville Thawing Solution                |
| <b>CASA</b>           | Sistema de análisis de semen computarizado |
| <b>CC</b>             | Células del cumulus                        |
| <b>CE</b>             | Cultivo embrionario <i>in vitro</i>        |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | Dióxido de carbono                         |
| <b>COCs</b>           | Complejos cumulus-ovocitos                 |
| <b>DE</b>             | Expresión diferencial                      |
| <b>DPBS</b>           | Tampón fosfato salino Dulbecco             |
| <b>dpi</b>            | Días post inseminación                     |
| <b>ECAR</b>           | Tasa de acidificación extracelular         |
| <b>FIV</b>            | Fecundación <i>in vitro</i>                |
| <b>FSH</b>            | Hormona folículo estimulante               |
| <b>GLM</b>            | Modelo lineal generalizado                 |
| <b>hCG</b>            | Gonadotropina coriónica humana             |
| <b>hpi</b>            | Horas post inseminación                    |
| <b>i.m.</b>           | Intramuscular                              |



## A B R E V I A T U R A S

|                      |                                                       |
|----------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>i.v.</b>          | Intravenoso                                           |
| <b>IETS</b>          | Sociedad Internacional de Tecnología de Embriones     |
| <b>IHC</b>           | Inmunohistoquímica                                    |
| <b>LIN</b>           | Coeficiente de linealidad                             |
| <b>MIV</b>           | Maduración <i>in vitro</i>                            |
| <b>MOT</b>           | Motilidad total                                       |
| <b>NCSU</b>          | Universidad de Carolina del Norte                     |
| <b>NP</b>            | Nanopartículas                                        |
| <b>NPOv</b>          | Nanopartículas conjugadas a OVGP1                     |
| <b>O<sub>2</sub></b> | Oxígeno                                               |
| <b>OCR</b>           | Tasa de consumo de oxígeno                            |
| <b>Ov</b>            | Proteína recombinante oviductina                      |
| <b>OVGP1</b>         | Oviductina                                            |
| <b>PBS</b>           | Tampón fosfato salino                                 |
| <b>PCR</b>           | Reacción de cadena polimerasa                         |
| <b>PIV</b>           | Producción <i>in vitro</i> de embriones               |
| <b>PMOT</b>          | Motilidad progresiva                                  |
| <b>pOVGP1t</b>       | Oviductina porcina recombinante truncada              |
| <b>PVA</b>           | Alcohol polivinílico                                  |
| <b>ROS</b>           | Especies reactivas de oxígeno                         |
| <b>rOVGP1</b>        | Oviductina recombinante de conejo                     |
| <b>SPION</b>         | Nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas |
| <b>STR</b>           | Coeficiente de rectitud                               |

## ABREVIATURAS

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| <b>TALP</b> | Tiroides-albúmina-lactato-piruvato   |
| <b>TRA</b>  | Tecnologías de reproducción asistida |
| <b>VAP</b>  | Velocidad media                      |
| <b>VCL</b>  | Velocidad curvilínea                 |
| <b>VSL</b>  | Velocidad lineal                     |
| <b>WOB</b>  | Coeficiente de oscilación            |
| <b>ZP</b>   | Zona pelúcida                        |

# ABBREVIATIONS

## 10. ABBREVIATIONS

|                                    |                                           |
|------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>ART</b>                         | <b>Assisted reproductive technologies</b> |
| <b>Ag</b>                          | Silver                                    |
| <b>Al</b>                          | Aluminum                                  |
| <b>CB</b>                          | Carbon black                              |
| <b>CeO<sub>2</sub></b>             | Cerium oxide                              |
| <b>Cu</b>                          | Copper                                    |
| <b>3D</b>                          | Three-dimensional                         |
| <b>DNA</b>                         | Deoxyribonucleic acid                     |
| <b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b> | Iron oxide                                |
| <b>GSH</b>                         | Glutathione                               |
| <b>GV</b>                          | Germinal vesicle                          |
| <b>HA</b>                          | Hydroxyapatite                            |
| <b>ICSI</b>                        | Intracytoplasmic sperm injection          |
| <b>IVF</b>                         | <i>In vitro</i> fertilization             |
| <b>IVM</b>                         | <i>In vitro</i> maturation                |
| <b>MDA</b>                         | Malondialdehyde                           |
| <b>MNP</b>                         | Magnetic nanoparticles                    |
| <b>MoO<sub>3</sub></b>             | Molybdenum trioxide                       |
| <b>mRNA</b>                        | Messenger ribonucleic acid                |
| <b>Ni</b>                          | Nickel                                    |
| <b>NP</b>                          | Nanoparticles                             |

## ABBREVIATIONS

|                        |                                           |
|------------------------|-------------------------------------------|
| <b>PLGA</b>            | Polylactic-co-glycolic acid               |
| <b>ROS</b>             | Reactive oxygen species                   |
| <b>Se</b>              | Selenium                                  |
| <b>SEM</b>             | Scanning electron microscopy              |
| <b>SMGT</b>            | Sperm mediated gene transfer              |
| <b>SPION</b>           | Superparamagnetic iron oxide nanoparticle |
| <b>TiO<sub>2</sub></b> | Titanium dioxide                          |
| <b>TRNP</b>            | Tetramethylrhodamine                      |
| <b>WGA</b>             | Wheat germ agglutinin                     |
| <b>ZnO</b>             | Zinc oxide                                |
| <b>ZP</b>              | Zona pellucida                            |

PUBLICACIONES

## 11. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral fueron incluidos en las siguientes publicaciones:

### 1. Artículos publicados en revistas indexadas

- Garrappa, G., Jiménez-Movilla, M., Martínez-López, C.R., García-Vázquez, F.A. (2024). *In vitro* exposure of porcine sperm to functionalized Superparamagnetic nanoparticles. Short Communication. *Reproduction in domestic Animals*. En prensa.
- García-Vázquez, F.A., Garrappa, G., Luongo, C., Hamze, J. G., Caballero, M., Marco-Jiménez, F., Vicente-Antón, S., Molina-Cuberos, G.J., & Jiménez-Movilla, M. (2024). Magnetic-Assisted Control of Eggs and Embryos via Zona Pellucida-Linked Nanoparticles. *Advanced Science*, 2306901.

### 2. Resúmenes presentados a congresos

- Garrappa G., Martínez-López C.R., Jiménez-Movilla M., García-Vázquez F.A. (2024). In vitro Exposure of porcine sperm to functionalized superparamagnetic nanoparticles. Short comunicación aceptada para su presentación oral en el 17º Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA). Madrid, España. 17-19 octubre.
- Jiménez-Movilla, M., Garrappa G., Luongo C., García-Vázquez F.A. (2024). Safe magnetic force-based technique to select pig mature eggs. Resumen presentado en la reunión anual de la SSR (Society for Study of Reproduction) seleccionado para comunicación oral., Dublin, Irlanda. 15-19 julio.
- Garrappa G., Yarza Muñoz, G., Luongo C., García-Vázquez F.A., Jiménez-Movilla, M. (2023). Development of a new method to label pig oocytes with nanoparticles to be applied in assisted reproductive techniques. Trabajo seleccionado para ser presentado en la competencia estudiantil doctoral (Student Competition) del 49º meeting anual de la IETS (International Embryo Technologies Society). Lima, Perú del 16-19 de enero.
- Garrappa G., Jiménez-Movilla M., García-Vázquez F.A. (2021). Estudio del efecto de la exposición de espermatozoides porcinos a nanopartículas magnéticas conjugadas a oviductina porcina recombinante. Resumen presentado como comunicación oral

## PUBLICACIONES

en las XIX Jornadas Sobre Producción Animal-AIDA-ITEA. Zaragoza, España. 1-2 de junio.

- Garrappa G., García-Vázquez F.A., Jiménez-Movilla M. (2021). Trypsin treatment of porcine oocytes impairs *in vitro* fertilization output. Resumen presentado como poster y comunicación oral corta en la 36ª Reunión Científica- Asociación Europea de Transferencia de Embriones-AETE-Lite (online), 10-11 de septiembre.

### **3. Capítulos de libro**

- Garrappa, G., Jiménez-Movilla, M., García-Vázquez, F.A. (2024). Capítulo: “Nanoparticles applied to assisted reproductive technologies: development, applications, and concerns”, Editorial Springer Nature. En prensa.

### **4. Presentaciones en conferencias internacionales**

- Conferencia magistral “Nanobiotecnología en la reproducción asistida: pequeñas partículas con un gran futuro” en las 5tas Jornadas de Reproducción (presencial) organizadas por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Huatulco, Oaxaca, México. 07-12 de mayo 2022.
- Conferencia magistral “Nanobiotecnología en la reproducción asistida” en las 4tas Jornadas de Reproducción (online) organizadas por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. 15 de octubre 2020.



# REFERENCIAS

## 12. REFERENCIAS

- Abbasi, Y., Baniasadi, F., Hajiaghalou, S., Ghalamboran, M. R., & Fathi, R. (2018). Vitricification of mouse GV-oocytes by the means of nanoparticles. *Reproductive BioMedicine Online*, 37, e17–e18. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.04.035>
- Abbasi, Y., Hajiaghalou, S., Baniasadi, F., Mahabadi, V. P., Ghalamboran, M. R., & Fathi, R. (2021). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles improve the vitrification of mouse immature oocytes and modulate the pluripotent genes expression in derived pronuclear-stage embryos. *Cryobiology*, 100, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.03.006>
- Abdel-Halim, B. R., & Helmy, N. A. (2017). Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during *in vitro* maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Animal Production Science*, 50(11), 2021–2028. <https://doi.org/10.1071/AN17057>
- Abdel-Halim, B., Moselhy, W., & Helmy, N. (2018). Developmental competence of bovine oocytes with increasing concentrations of nano-copper and nano-zinc particles during *in vitro* maturation. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 7(4), 161–166. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.237053>
- Abdullah, K. A. L., Atazhanova, T., Chavez-Badiola, A., & Shivhare, S. B. (2022). Automation in ART: Paving the Way for the Future of Infertility Treatment. *Reproductive Sciences*, 30(4), 1006–1016. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-00941-y>
- Adamson, G. D., de Mouzon, J., Lancaster, P., Nygren, K. G., Sullivan, E., & Zegers-Hochschild, F. (2006). World collaborative report on *in vitro* fertilization, 2000. *Fertility and Sterility*, 85(6), 1586–1622. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.01.011>
- Adebayo, O. A., Akinloye, O., & Adaramoye, O. A. (2018). Cerium oxide nanoparticle elicits oxidative stress, endocrine imbalance and lowers sperm characteristics in testes of balb/c mice. *Andrologia*, 50(3), 1–11. <https://doi.org/10.1111/and.12920>
- Afifi, M., Almaghrabi, O. A., & Kadasa, N. M. (2015). Ameliorative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Antioxidants and Sperm Characteristics in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Testes. *BioMed Research International*, 2015(153573), 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/153573>
- Algarra, B., Han, L., Soriano-Úbeda, C., Avilés, M., Coy, P., Jovine, L., & Jiménez-Movilla, M. (2016). The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pellucida and modifies fertility parameters. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep32556>
- Ali Bilgili, & M. Haydar Uysal. (2019). Use Areas of Nanotechnology in Veterinary Medicine. *Journal of Food Science and Engineering*, 9(6). <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2019.06.003>
- Amaral, A. (2022). Energy metabolism in mammalian sperm motility. *WIREs Mechanisms of Disease*, 14(5), e1569. <https://doi.org/10.1002/WSBM.1569>

## REFERÊNCIAS

- Amir, A., & Roth, Z. (2008). Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 282(1–2), 150–152. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.026>
- Angelakeris, M. (2017). Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern theranostics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(6), 1642–1651. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.022>
- Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2016). Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1(1), 10–29. <https://doi.org/10.1002/btm2.10003>
- Antonino, D. de C. (2017). Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos associado á nanopartículas e levitação magnética. Master Thesis-Sistema de Bibliotecas Da UFU, MG, Brasil, 72.
- Antonino, D. de C., Soares, M. M., Júnior, J. de M., de Alvarenga, P. B., Mohallem, R. de F. F., Rocha, C. D., Viera, L.A., De Souza, A.G., Beletti, M.E., Alves, B.G., Jacomini, J.O., Goulart, L.R., & Alves, K. A. (2019). Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. *Reproductive BioMedicine Online*, 38(3), 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.013>
- Ariu, F. A., Bogliolo, L. A., Pinna, A. B., Malfatti, L. B., Innocenzi, P. B., Falchi, L. A., Bebbere, D., Ledda, S. (2017). Cerium oxide nanoparticles (CeO<sub>2</sub> NPs) improve the developmental competence of in vitro -matured prepubertal ovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(5), 1046–1056. <https://doi.org/10.1071/RD15521>
- Arvizo, R. R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Giri, K., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2943–2970. <https://doi.org/10.1039/C2CS15355F>
- Azizipour, N., Avazpour, R., Rosenzweig, D. H., Sawan, M., & Ajji, A. (2020). Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip. *Micromachines*, 11(599), 1–33. <https://doi.org/10.3390/mi11060599>
- Barbaresco, F., Cocuzza, M., Pirri, C. F., & Marasso, S. L. (2020). Application of a micro free-flow electrophoresis 3d printed lab-on-a-chip for micro-nanoparticles analysis. *Nanomaterials*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/nano10071277>
- Barkalina, N., Jones, C., & Coward, K. (2016). Nanomedicine and mammalian sperm: Lessons from the porcine model. *Theriogenology*, 85(1), 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.025>
- Baruselli, P. S., Batista, E. O. S., Vieira, L. M., Ferreira, R. M., Guerreiro, B. G., Bayeux, B. M., & Sales, J. N. S. (2016). Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Animal Reproduction*, 13(3), 264–272. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR861>

## R E F E R E N C I A S

- Bernard, A., & Fuller, B. J. (1996). Cryopreservation of human oocytes: A review of current problems and perspectives. *Human Reproduction Update*, 2(3), 193–207. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.3.193>
- Berry, C.C. & Curtis, A. S. G. (2003). Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine Magnetic nanoparticle-based cancer therapy Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), 198–206. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/13/203>
- Bilgili, A., & Uysal, M. H. (2019). Use Areas of Nanotechnology in Veterinary Medicine. *Journal of Food Science and Engineering*, 9(6). <https://doi.org/10.17265/2159-5828/2019.06.003>
- Bisla, A., Rautela, R., Yadav, V., Alex Ngou, A., Kumar, A., Ghosh, S.K., Bag, S., & Srinivastava, N. (2021). Effect of Cryopreservation on Semen Quality parameters in Relation to Lipid Peroxidation and Antioxidant Profile in Indian Buffalo. *Cryoletters*, 42 (1), 33-38.
- Bisla, A., Rautela, R., Yadav, V., Saini, G., Singh, P., Ngou, A. A., Kumar, A., Ghosh, S., Kumar, A., Bag, S., Mahajan, S., & Srivastava, N. (2020a). Synthesis of iron oxide nanoparticles–antiubiquitin antibodies conjugates for depletion of dead/damaged spermatozoa from buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(6), 1453–1468. <https://doi.org/10.1002/BAB.2066>
- Bisla, A., Rautela, R., Yadav, V., Singh, P., Kumar, A., Ghosh, S., Kumar, A., Bag, S., Kumar, B., & Srivastava, N. (2020b). Nano-purification of raw semen minimises oxidative stress with improvement in post-thaw quality of buffalo spermatozoa. *Andrologia*, 52(9), 1–17. <https://doi.org/10.1111/and.13709>
- Bleil, J. D., & Wassarman, P. M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology*, 76(1), 185–202. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(80\)90371-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(80)90371-1)
- Blighe, K., Rana, S., & Lewis, M. (2022). EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version 1.13.2. Retrieved from <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcan>
- Bolton, R. L., Mooney, A., Pettit, M. T., Bolton, A. E., Morgan, L., Drake, G. J., Appeltant, R., Walker, S.L., Gillis, J.D., & Hvilsom, C. (2022). Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reproduction and Fertility*, 3(3), R121–R146. <https://doi.org/10.1530/RAF-22-0005>
- Boukallel, M., Gauthier, M., Dauge, M., Piat, E., & Abadie, J. (2007). Smart microrobots for mechanical cell characterization and cell conveying. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 54(8), 1536–1540. <https://doi.org/10.1109/TBME.2007.891171>

## R E F E R E N C I A S

- Brackett, B. G., Baranska, W., Sawicki, W., & Koprowski, H. (1971). Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(2), 353–357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.68.2.353>
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J., & Hofmann, M. C. (2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88(2), 412–419. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi256>
- Brohi, R. D., Wang, L., Talpur, H. S., Wu, D., Khan, F. A., Bhattarai, D., Farmanullah, F., & Huo, L. J. (2017). Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 8(9), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00606>
- Buhi, W. C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction*, 123(3), 355–362. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230355>
- Caldeira, D. F., Paulini, F., Silva, R. C., Azevedo, R. B. de, & Lucci, C. M. (2017). In vitro exposure of bull sperm cells to DMSA-coated maghemite nanoparticles does not affect cell functionality or structure. *International Journal of Hyperthermia*, 34(4), 415–422. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1341646>
- Camaioni, A., Massimiani, M., Lacconi, V., Magrini, A., Salustri, A., Sotiriou, G. A., Singh, D., Bitounis, D., Bocca, B., Pino, A., Barone, F., Prota, V., Iavicoli, I., Scimeca, M., Bonanno, E., Cassee, F. E., Demokritou, P., Pietroiusti, A., & Campagnolo, L. (2021). Silica encapsulation of ZnO nanoparticles reduces their toxicity for cumulus cell-oocyte-complex expansion. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12989-021-00424-Z/FIGURES/8>
- Campos, V. F., Komninou, E. R., Urtiaga, G., de Leon, P. M., Seixas, F. K., Dellagostin, O. A., Deschamps, J.C., & Collares, T. (2011). NanoSMGT: Transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology*, 75(8), 1476–1481. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.009>
- Canovas, S., Ivanova, E., Romar, R., García-Martínez, S., Soriano-Beda, C., García-Vázquez, F. A., Saadeh, H., Andrews, S., Kelsey, G., & Coy, P. (2017). DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *Elife*, 6, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.23670.001>
- Cardoso, V. F., Francesko, A., Ribeiro, C., Bañobre-López, M., Martins, P., & Lanceros-Mendez, S. (2017). Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 7(5), 1700845. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700845>
- Catandi, G. D., LiPuma, L., Obeidat, Y. M., Maclellan, L. J., Broeckling, C. D., Chen, T., Chicco, A. J., Carnevale, E. M. (2022). Oocyte metabolic function, lipid composition, and

## REFERENCIAS

- developmental potential are altered by diet in older mares. *Reproduction*, 163(4), 183–198. <https://doi.org/10.1530/REP-21-0351>
- Cetica, P. D., Pintos, L. N., Dalvit, G. C., & Beconi, M. T. (2001). Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *IUBMB Life*, 51(1), 57–64. <https://doi.org/10.1080/15216540119253>
- Chambers, G. M., Dyer, S., Zegers-Hochschild, F., de Mouzon, J., Ishihara, O., Banker, M., Mansour, R., Kupka, M.S., & Adamson, G. D. (2021). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology. *Human Reproduction*, 36(11), 2921–2934. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab198>
- Chang, H., Chen, H., Zhang, L., Wang, Y., Xie, X., Zhang, Y., & Quan, F. (2019). Effect of oocyte vitrification on DNA damage in metaphase II oocytes and the resulting preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 86(11), 1603–1614. <https://doi.org/10.1002/mrd.23247>
- Chang, M., Chang, Y.-J., Wang, T.-Y., & Yu, Q. (2019). Sperm Movement Control Utilizing Surface Charged Magnetic Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 19(9), 5713–5722. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16551>
- Chian, R. C., Wang, Y., & Li, Y. R. (2014). Oocyte vitrification: Advances, progress and future goals. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(4), 411–420. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0180-9>
- Christian, P., Von Der Kammer, F., Baalousha, M., & Hofmann, T. (2008). Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 17(5), 326–343. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0213-1>
- Cobo, A., & Diaz, C. (2011). Clinical application of oocyte vitrification: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility*, 96(2), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.030>
- Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M. D., Romar, R., Grullón, L., Matás, C., & Avilés, M. (2008). Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15809–15814. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804422105>
- Coy, P., Grullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C., & Aviles, M. (2008). Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, 135(1), 19–27. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0280>
- Cristea, C., Tertis, M., & Galatus, R. (2017). Magnetic nanoparticles for antibiotics detection. *Nanomaterials*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/nano7060119>
- Dai, Y., Jia, L., Wang, L., Sun, H., Ji, Y., Wang, C., Song, L., Liang, S., Chen, D., Feng, Y., Bai, X., Zhang, D., Arai, F., Chen, H., & Feng, L. (2022). Magnetically Actuated Cell-Robot

## R E F E R E N C I A S

- System: Precise Control, Manipulation, and Multimode Conversion. *Small*, 18(15), 2105414. <https://doi.org/10.1002/SMLL.202105414>
- Dalvit, G. C., Cetica, P.D., Pintos, L. N., & Beconi, M. T. (2005). Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell*, 29(2), 209–212.
- de Loos, F., Van Vliet, C., Van Maurik, P., & Kruip, Th. A. M. (1989). Morphology of Immature Bovine Oocytes. *Gamete Research*, 204(24), 197–204. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120240207>
- De Munck, N., & Vajta, G. (2017). Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology*, 78, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.07.009>
- De Vos, M., Smits, J., & Woodruff, T. K. (2014). Fertility preservation in women with cancer. *The Lancet*, Vol. 384, pp. 1302–1310. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60834-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60834-5)
- Dirican, E. K., Özgün, O. D., Akarsu, S., Akin, K. O., Ercan, Ö., Uğurlu, M., Camsari, C., Kanyilmaz, O., Kaya, A., & Ünsal, A. (2008). Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(8), 375–381. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9250-1>
- Domínguez, E., Moreno-Irusta, A., Castex, H. R., Bragulat, A. F., Ugaz, C., Clemente, H., Giojalas, L., & Losinno, L. (2018). Sperm Sexing Mediated by Magnetic Nanoparticles in Donkeys, a Preliminary In Vitro Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.04.005>
- Durfey, C. L., Swistek, S. E., Liao, S. F., Crenshaw, M. A., Clemente, H. J., Rooban, V.K., Thirumalai, G., Steadman, C.S., Ryan, P.L., Willard, S.T., & Feugang, J. M. (2019). Nanotechnology-based approach for safer enrichment of semen with best spermatozoa. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0307-4>
- Ealias, A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*, 263(3). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2020). Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 19073–19086. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3913-y>
- El-Toukhy, T. (2019). Reproductive medicine in 2020 and beyond. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynecology*, 126(2), 133–134. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15352>



## R E F E R E N C I A S

- Ema, M., Kobayashi, N., Naya, M., Hanai, S., & Nakanishi, J. (2010). Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reproductive Toxicology*, 30(3), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.06.002>
- Falchi, L., Khalil, W. A., Hassan, M., & Marei, W. F. A. (2018). Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, Vol. 6, pp. 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.09.001>
- Feng, L., Bai, X., Jia, L., Zhang, C., Chen, Y., & Chen, H. (2021). Field-controlled micro-nano manipulations and micro-nano robots. In *Micro and Nano Systems for Biophysical Studies of Cells and Small Organisms* (pp. 201–225). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823990-2.00009->
- Feng, L., Di, P., & Arai, F. (2016). High-precision motion of magnetic microrobot with ultrasonic levitation for 3-D rotation of single oocyte. *International Journal of Robotics Research*, 35(12), 1445–1458. <https://doi.org/10.1177/0278364916631414>
- Ferris, J., Mahboubi, K., MacLusky, N., King, W. A., & Favetta, L. A. (2016). BPA exposure during in vitro oocyte maturation results in dose-dependent alterations to embryo development rates, apoptosis rate, sex ratio and gene expression. *Reproductive Toxicology*, 59, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.12.002>
- Feugang, J. M. (2017). Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. *Molecular Reproduction and Development*, 84(9), 832–841. <https://doi.org/10.1002/mrd.22831>
- Feugang, J. M., Liao, S. F., Crenshaw, M. A., Clemente, H., Willard, S. T., & Ryan, P. L. (2015). Lectin-Functionalized Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Reproductive Improvement. *Journal of Fertilization: In Vitro - IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics and Stem Cell*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2375-4508.1000145>
- Feugang, J. M., Rhoads, C. E., Mustapha, P. A., Tardif, S., Parrish, J. J., Willard, S. T., & Ryan, P. L. (2019). Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility. *Theriogenology*, 137, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.040>
- Freitas-Martins, A., Sousa, M. I., Cristo, M. I., Ramalho-Santos, J., & Amaral, S. (2024). Metabolic characterization of human sperm cells using the Seahorse metabolic flux analyzer. *Andrología*, 12(2), 410–421. <https://doi.org/10.1111/andr.13486>
- Funahashi, H., Cantley, T. C., & Day, B. N. (1997). Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, 57(1), 49–53. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.1.49>
- Fynewever, T. L., Agcaoili, E. S., Jacobson, J. D., Patton, W. C., & Chan, P. J. (2007). In vitro tagging of embryos with nanoparticles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(2–3), 61–65. <https://doi.org/10.1007/s10815-006-9084-7>



## R E F E R E N C I A S

- Gadea, J., Garcia-Vázquez, F. A., Canovas, S., & Parrington, J. (2012). Chapter 8. Sperm-mediated Gene Transfer in Agricultural Species. *In Sperm-mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies* (pp. 76–101).
- García-Dominguez, X., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2019). Minimally Invasive Embryo Transfer and Embryo Vitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2019(147), e58055. <https://doi.org/10.3791/58055>
- García-Palencia, P., Sánchez, M. A., Nieto, A., Vilar, M. P., González, M., Veiga-Lopez, A., González-Bulnes, A., & Flores, J. M. (2007). Sex steroid receptor expression in the oviduct and uterus of sheep with estrus synchronized with progestagen or prostaglandin analogues. *Animal Reproduction Science*, 97(1–2), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.01.001>
- García-Vázquez, F. A., García-Roselló, E., Gutiérrez-Adán, A., & Gadea, J. (2009). Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology*, 72(4), 506–518. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.04.006>
- García-Vázquez, F. A., Luongo, C., Garrappa, G., & Rodríguez Tobón, E. (2020). Reproductive Biotechnologies Applied to Artificial Insemination in Swine. *Biotechnologies Applied to Animal Reproduction*, 283–323. <https://doi.org/10.1201/9780367817527-12>
- García-Vázquez, F.A., Mellagi, A. P. G., Ulguim, R. R., Hernández-Caravaca, I., Llamas-López, P. J., & Bortolozzo, F. P. (2019). Post-cervical artificial insemination in porcine: The technique that came to stay. *Theriogenology*, 129, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.004>
- García-Vázquez, Francisco Alberto, Ruiz, S., Grullón, L. A., Ondiz, A. de, Gutiérrez-Adán, A., & Gadea, J. (2011). Factors affecting porcine sperm mediated gene transfer. *Research in Veterinary Science*, 91(3), 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.015>
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>
- Gil, M., Sar-Shalom, V., Melendez Sivira, Y., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(4), 479–485. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-9962-8>
- Giltinan, J., Sridhar, V., Bozuyuk, U., Sheehan, D., & Sitti, M. (2021). 3D Microprinting of Iron Platinum Nanoparticle-Based Magnetic Mobile Microrobots. *Advanced Intelligent Systems*, 3(1), 2000204. <https://doi.org/10.1002/aisy.202000204>

## R E F E R E N C I A S

- Graham, J. K., Kunze, E., & Hammerstedt, R. H. (1990). Analysis of Sperm Acrosomal Flow Mitochondrial Function Using Flow Cytometry. *Biology of Reproduction*, 43, 55–64. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55>
- Green, L. J., & Shikanov, A. (2016). In vitro culture methods of preantral follicles. *Theriogenology*, Vol. 86, pp. 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>
- Hagiwara, M., Kawahara, T., Yamanishi, Y., Masuda, T., Feng, L., & Arai, F. (2011). On-chip magnetically actuated robot with ultrasonic vibration for single cell manipulations. *Lab on a Chip*, 11(12), 2049–2054. <https://doi.org/10.1039/C1LC20164F>
- Hansen, P. J. (2020). Implications of Assisted Reproductive Technologies for Pregnancy Outcomes in Mammals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 8, 395–413. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-084010>
- Hayashi, Y., Otsuka, K., Ebina, M., Igarashi, K., Takehara, A., Matsumoto, M., Kanai, A., Igarashi, K., Soga, T., & Matsui, Y. (2017). Distinct requirements for energy metabolism in mouse primordial germ cells and their reprogramming to embryonic germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(31), 8289–8294. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1620915114>
- He, S., Wang, X., Liu, Z., Zhang, W., Fang, J., Xue, J., & Bao, H. (2021). Hydroxysafflor Yellow A Inhibits Staphylococcus aureus-Induced Mouse Endometrial Inflammation via TLR2-Mediated NF- $\kappa$ B and MAPK Pathway. *Inflammation*, 44(3), 835–845. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01297-8>
- Hill, E. K., & Li, J. (2017). Current and future prospects for nanotechnology in animal production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0157-5>
- Hong, F., Si, W., Zhao, X., Wang, L., Zhou, Y., Chen, M., Ge, Y., Zhang, Q., Wang, Y., & Zhang, J. (2015). TiO<sub>2</sub> Nanoparticle Exposure Decreases Spermatogenesis via Biochemical Dysfunctions in the Testis of Male Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 7084–7092. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02652>
- Hong, J., Purwar, P., Cha, M., & Lee, J. (2015). Spatial control of chromosomal location in a live cell with functionalized magnetic particles. *Nanoscale*, 7(45), 19110–19117. <https://doi.org/10.1039/C5NR04905A>
- Hosseinmardi, M., Siadat, F., Sharafi, M., Roodbari, N. H., & Hezavehei, M. (2022). Protective Effect of Cerium Oxide Nanoparticles on Human Sperm Function During Cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, 20(1), 24–30. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0020>
- Hou, C. C., & Zhu, J. Q. (2017). Nanoparticles and female reproductive system: How do nanoparticles affect oogenesis and embryonic development. *Oncotarget*, 8(65), 109799–109817. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19087>

## R E F E R E N C I A S

- Hu, S., & Sun, D. (2011). Automatic transportation of biological cells with a robot-tweezer manipulation system. *International Journal of Robotics Research*, 30(14), 1681–1694. <https://doi.org/10.1177/0278364911413479>
- Huang, C. H., Yeh, J. M., & Chan, W. H. (2018). Hazardous impacts of silver nanoparticles on mouse oocyte maturation and fertilization and fetal development through induction of apoptotic processes. *Environmental Toxicology*, 33(10), 1039–1049. <https://doi.org/10.1002/tox.22590>
- Huang, S. H., & Juang, R. S. (2011). Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: A review. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(10), 4411–4430. <https://doi.org/10.1007/s11051-011-0551-4>
- Hussain, S. M., Braydich-Stolle, L. K., Schrand, A. M., Murdock, R. C., Yu, K. O., Mattie, D. M., & Schlager, J. J. (2009). Toxicity evaluation for safe use of nanomaterials: Recent achievements and technical challenges. *Advanced Materials*, 21(16), 1549–1559. <https://doi.org/10.1002/adma.200801395>
- Hwang, K., Yatsenko, A. N., Jorgez, C. J., Mukherjee, S., Nalam, R. L., Matzuk, M. M., & Lamb, D. J. (2010). Mendelian genetics of male infertility. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1214, 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05917.x>
- Ibănescu, I., Leiding, C., Ciornei, Ș. G., Roșca, P., Sfartz, I., & Drugociu, D. (2016). Differences in CASA output according to the chamber type when analyzing frozen-thawed bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 166, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.005>
- Isaac, A. V, Kumari, S., Nair, R., Raj, D., Raj, S., Kalthur, G., Adiga., S.K., Manikkath, J., Mutalik, S., Sachdev, D., & Pasricha, R. (2017). Biochemical and Biophysical Research Communications Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(3–4), 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.112>
- Iwamoto, K., Ikeda, K., Yonezawa, N., Noguchi, S., Kudo, K., Hamano, S., Kuwayama, M., & Nakano, M. (1999). Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization: Evidence for the involvement of cystine cross-linkages in hardening of the zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117(2), 395–402. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170395>
- Jahanbin, R., Yazdanshenas, P., Amin Afshar, M., Mohammadi Sangcheshmeh, A., Varnaseri, H., Chamani, M., Nazaran, M. H., & Bakhtiyarizadeh, M. R. (2015). Effect of zinc nano-complex on bull semen quality after freeze-thawing process. *Animal Production*, 17(2), 371–380. <https://doi.org/10.22059/JAP.2015.54040>
- Jahanbin, R., Yazdanshenas, P., Rahimi, M., Hajarizadeh, A., Tvrdá, E., Nazari, S. A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., & Ghanem, N. (2021). In Vivo and In Vitro Evaluation

## R E F E R E N C I A S

- of Bull Semen Processed with Zinc (Zn) Nanoparticles. *Biological Trace Element Research*, 199(1), 126–135. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02153-4>
- Jeruss, J. S., & Woodruff, T. K. (2009). Preservation of Fertility in Patients with Cancer. *New England Journal of Medicine*, 360(9), 902–911. <https://doi.org/10.1056/nejmra0801454>
- Jiang, Z., Shan, K., Song, J., Liu, J., Rajendran, S., Pugazhendhi, A., Jacob, J. A., & Chen, B. (2019). Toxic effects of magnetic nanoparticles on normal cells and organs. *Life Sciences*, 220, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.056>
- Jo, S.-Y., Hwangbo, Y., Lee, S.-H., Cheong, H.-T., Kim, D.-K., & Park, C.-K. (2021). Effect of antibodies binding to Y chromosome-bearing sperm conjugated with magnetic nanoparticles on bull sperm characteristics. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 36(4), 239–246. <https://doi.org/10.12750/jarb.36.4.239>
- Kang, J. H., & Park, J. (2005). Cell separation technology. *Asia-Pacific Biotech News*, 9(21), 1135–1146. [https://doi.org/10.1016/0923-1137\(94\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0923-1137(94)90034-5)
- Karcz, A., Van Soom, A., Smits, K., Verplancke, R., Van Vlierberghe, S., & Vanfleteren, J. (2022). Electrically-driven handling of gametes and embryos: taking a step towards the future of ARTs. *Lab on a Chip*, 22(10), 1852–1875. <https://doi.org/10.1039/d1lc01160j>
- Katebi, S., Esmaili, A., & Ghaedi, K. (2016). Static magnetic field reduced exogenous oligonucleotide uptake by spermatozoa using magnetic nanoparticle gene delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 402, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.immm.2015.11.057>
- Kawwass, J. F., & Badell, M. L. (2018). Maternal and fetal risk associated with assisted reproductive technology. *Obstetrics and Gynecology*, 132(3), 763–772. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000002786>
- Khalid, S. N., & Qureshi, I. Z. (2011). Pregnancy rate improves in couples with unexplained infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperms. *Fertility and Sterility*, 96(3), S25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.104>
- Khalil, I. S. M., Dijkslag, H. C., Abelman, L., & Sarthak, M. (2014). MagnetoSperm: A microrobot that navigates using weak magnetic fields. *Applied Physics Letters*, 104(223701), 1–4. <https://doi.org/10.1063/1.4880035>
- Khalil, I. S. M., Magdanz, V., Simmchen, J., Klingner, A., & Sarthak, M. (2020). Resemblance between motile and magnetically actuated sperm cells. *Applied Physics Letters*, 116(063702), 1–5. <https://doi.org/10.1063/1.5142470>
- Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). Nanotoxicity: An interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials*, 5(3), 1163–1180. <https://doi.org/10.3390/nano5031163>

## R E F E R E N C I A S

- Khodaei-Motlagh, M., Masoudi, R., Karimi-Sabet, M. J., & Hatefi, A. (2022). Supplementation of sperm cooling medium with Zinc and Zinc oxide nanoparticles preserves rooster sperm quality and fertility potential. *Theriogenology*, 183, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.02.015>
- Kim, H. J., Lee, S., Lee, J. H., Park, J. M., Hong, S. J., Lee, O. H., Park, J. S., Choi, Y., & Park, K. H. (2021). TRITC-Loaded PLGA Nanoparticles as Drug Delivery Carriers in Mouse Oocytes and Embryos. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 13(5), 5975–5988. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c19792>
- Kim, J. E., Shin, J. Y., & Cho, M. H. (2012). Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of Toxicology*, 86(5), 685–700. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0773-3>
- Kim, M., Shen, M., Ngoy, S., Karamanlidis, G., Liao, R., & Tian, R. (2012). Journal of Molecular and Cellular Cardiology Original article AMPK isoform expression in the normal and failing hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5), 1066–1073. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.01.016>
- Kim, T.S., Lee, S.H., Gang, G.T., Lee, Y.S., Kim, S.U., Koo, D.B., Shin, M.Y., Parck, C.K., & Lee, D.S. (2009). Exogenous DNA Uptake of Boar Spermatozoa by a Magnetic Nanoparticle Vector System. *Reproduction in Domestic Animals*, 206, 201–206. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01516.x>
- Kim, Y. S., Park, J. S., Park, M., Ko, M. Y., Yi, S. W., Yoon, J. A., Yang, S. C., Shim, S.H., Park, K.H., & Song, H. (2018). PLGA nanoparticles with multiple modes are a biologically safe nanocarrier for mammalian development and their offspring. *Biomaterials*, 183(May), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.042>
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., & Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825–1851. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Kolde, R. (2019). Pheatmap: Pretty Heatmaps. R package. Version 1.0.12. Retrieved April 20, 2022, from <https://cran.r-project.org/package=pheatmap>
- Komatsu, T., Tabata, M., Kubo-Irie, M., Shimizu, T., Suzuki, K., Nihei, Y., & Takeda, K. (2008). The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 22(8), 1825–1831. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.08.009>
- Kong, L., Tang, M., Zhang, T., Wang, D., Hu, K., Lu, W., Wei, C., Liang, G., & Pu, Y. (2014). Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 21253–21269. <https://doi.org/10.3390/ijms151121253>
- Kozissnik, B., Bohorquez, A. C., Dobson, J., & Rinaldi, C. (2013). Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 706–714. <https://doi.org/10.3109/02656736.2013.837200>

## R E F E R E N C I A S

- Kreuter, J. (1996). Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. *Journal of Anatomy*, 189 (Pt) 3(li), 503–505. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Kumar, A., Ghosh, S. K., Katiyar, R., Gameda, A. E., Rautela, R., Bisla, A., Srivastava, N., Bhure, S. K., Devi, H.L., & Chandra, V. (2022). Supplementation of Mito TEMPO and acetovanillone in semen extender improves freezability of buffalo spermatozoa. *Andrology*, 10(4), 775–788. <https://doi.org/10.1111/andr.13158>
- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (2019). Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 17(6), 603–612. <https://doi.org/10.1089/BIO.2019.0037>
- Lan, Z., & Yang, W. X. (2012). Nanoparticles and spermatogenesis: How do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine*, 7(4), 579–596. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.20>
- Laurent, S., Saei, A. A., Behzadi, S., Panahifar, A., & Mahmoudi, M. (2014). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: Opportunities and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(9), 1449–1470. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.924501>
- Lavitrano, M., French, D., Zani, M., Frati, L., & Spadafora, C. (1992). The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Molecular Reproduction and Development*, 31(3), 161–169. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080310302>
- Lavitrano, Marialuisa, Busnelli, M., Cerrito, M. G., Giovannoni, R., Manzini, S., & Vargiolu, A. (2006). Sperm-mediated gene transfer. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(1–2), 19–23. <https://doi.org/10.1071/RD05124>
- Lavitrano, Marialuisa, Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., & Spadafora, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. *Cell*, 57(5), 717–723. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90787-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90787-3)
- Lei, R., Bai, X., Chang, Y., Li, J., Qin, Y., Chen, K., Gu, W., Xia, S., Zhang, J., Wang, z., & Xing, G. (2018). Effects of fullerene nanoparticles on rat oocyte meiosis resumption. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030699>
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., & Brown, G. E. (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. *Environmental Science and Technology*, 46(13), 6900–6914. <https://doi.org/10.1021/es2037405>
- Li, W., Zhou, X., Liu, B., Dai, J., Song, P., & Teng, Y. (2016). Effect of nanoparticles on the survival and development of vitrified porcine GV oocytes. *Cryo-Letters*, 37(6), 401–405.
- Llamas-López, P. J., López-Úbeda, R., López, G., Antinoja, E., & García-Vázquez, F. A. (2019). A new device for deep cervical artificial insemination in gilts reduces the number



## REFERENCIAS

of sperm per dose without impairing final reproductive performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0313-1>

Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Pintado, B., De la fuente, J., & Boland, M. P. (2003). Relative Messenger RNA Abundance in Bovine Oocytes Collected In Vitro or In Vivo Before and 20 hr After the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge. *Molecular Reproduction and Development*, 305, 297–305. <https://doi.org/10.1002/mrd.10357>

López-Úbeda, R., García-Vázquez, F., Gadea, J., & Matás, C. (2017). Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. *Asian Journal of Andrology*, 19(4), 396. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.173936>

Lu, A. H., Salabas, E. L., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8), 1222–1244. <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>

Luke, B. (2017). Pregnancy and birth outcomes in couples with infertility with and without assisted reproductive technology: with an emphasis on US population-based studies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(3), 270–281. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.03.012>

Ma, H., Quan, F., Chen, D., Zheng, Y., Zhang, B., Wang, Y., & Zhang, Y. (2011). Protective function of alpha-lipoic acid on sperm motility and mitochondrial function during goat sperm-mediated gene transfer. *Small Ruminant Research*, 99(2–3), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.04.006>

Macháty, Z., Day, B. N., & Prather, R. S. (1998). Development of Early Porcine Embryos In Vitro and In Vivo. *Biology of Reproduction*, 59(2), 451–455. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD59.2.451>

Magdanz, V., Khalil, I. S. M., Simmchen, J., Furtado, G. P., Mohanty, S., Gebauer, J., Xu, H., Klingner, A., Aziz, A., Medina-Sánchez, M., Schmidt, O.G., & Misra, S. (2020). IRONSperm: Sperm-Templated soft magnetic microrobots. *Science Advances*, 6(28), 1–15. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5855>

Magdanz, V., Vivaldi, J., Mohanty, S., Klingner, A., Vendittelli, M., Simmchen, J., Misra, S., & Khalil, I. S. M. (2021). Impact of Segmented Magnetization on the Flagellar Propulsion of Sperm-Templated Microrobots. *Advanced Science*, 8(8). <https://doi.org/10.1002/ADVS.202004037>

Mahmoudi, M., Hofmann, H., Rothen-Rutishauser, B., & Petri-Fink, A. (2012). Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemical Reviews*, 112(4), 2323–2338. <https://doi.org/10.1021/cr2002596>

Mahmoudi, M., Simchi, A., Imani, M., Milani, A. S., & Stroeve, P. (2009). An in vitro study of bare and poly (ethylene glycol)-co-fumarate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A new toxicity identification procedure. *Nanotechnology*, 20(22). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/22/225104>

## R E F E R E N C I A S

- Makhluf, S. B. D., Qasem, R., Rubinstein, S., Gedanken, A., & Breitbart, H. (2006). Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. *Langmuir*, 22(23), 9480–9482. <https://doi.org/10.1021/la061988z>
- Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/942916>
- Markides, H., Rotherham, M., & El Haj, A. J. (2012). Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 13–15. <https://doi.org/10.1155/2012/614094>
- McAuliffe, M. E., & Perry, M. J. (2007). Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review. *Nanotoxicology*, 1(3), 204–210. <https://doi.org/10.1080/17435390701675914>
- Mehta, R. V. (2017). Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology. *Materials Science and Engineering*, 79, 901–916. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.135>
- Miki, K. (2007). Energy metabolism and sperm function. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, 309–325. Retrieved from <https://europepmc.org/article/med/17644971/1000>
- Mishra, P. K., & Lohiya, N. K. (2016). Prioritizing reproductive health: Can it be the real game changer for India? *Journal of Reproductive Health and Medicine*, 2(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.irhm.2015.08.001>
- Mohammed, L., Gomaa, H. G., Ragab, D., & Zhu, J. (2017). Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology*, 30, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>
- Moretti, E., Terzuoli, G., Renieri, T., Iacoponi, F., Castellini, C., Giordano, C., & Collodel, G. (2013). In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. *Andrology*, 45(6), 392–396. <https://doi.org/10.1111/and.12028>
- Moridi, H., Hosseini, S. A., Shateri, H., Kheiripour, N., Kaki, A., Hatami, M., & Ranjbar, A. (2018). Protective effect of cerium oxide nanoparticle on sperm quality and oxidative damage in malathioninduced testicular toxicity in rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 16(4), 261–266. <https://doi.org/10.29252/ijrm.16.4.261>
- Morii, T., Nishikawa, K., Saito, S., Enomoto, M., Ito, A., Kurai, N., Shimoyama, T., Ichijo, M., & Narita, N. (1993). T-Cell Receptors Are Expressed but Down-Regulated on Intradecidual T Lymphocytes. *American Journal of Reproductive Immunology*, 29(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1993.tb00830.x>



## R E F E R E N C I A S

- Mosquera, J., García, I., & Liz-Marzán, L. M. (2018). Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Accounts of Chemical Research*, 51(9), 2305–2313. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00292>
- Muller, B., Lewis, N., Adeniyi, T., Leese, H. J., Brison, D. R., & Sturmey, R. G. (2019). Application of extracellular flux analysis for determining mitochondrial function in mammalian oocytes and early embryos. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53066-9>
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., & Gadella, B. M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1828–1835. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011445>
- Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & Von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064>
- Novo, S., Ibáñez, E., Barrios, L., Castell, O., & Nogués, C. (2013). Biomolecule screening for efficient attachment of biofunctionalized microparticles to the zona pellucida of mammalian oocytes and embryos. *Biomedical Microdevices*, 15(5), 801–809. <https://doi.org/10.1007/s10544-013-9766-8>
- Novo, S., Morató, R., Penon, O., Duran, S., Barrios, L., Nogués, C., Plaza, J.A., Pérez-García, L., Mogas, T., & Ibáñez, E. (2014). Identification of bovine embryos cultured in groups by attachment of barcodes to the zona pellucida. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(5), 645–652. <https://doi.org/10.1071/RD13066>
- Novo, S., Nogués, C., Penon, O., Barrios, L., Santaló, J., Gómez-Martínez, R., Esteve, J., Errachid, A., Plaza, J.A., Pérez-García, L., & Ibáñez, E. (2014). Barcode tagging of human oocytes and embryos to prevent mix-ups in assisted reproduction technologies. *Human Reproduction*, 29(1), 18–28.
- Novo, S., Barrios, L., Santal, J., Gmez-Martnez, R., Duch, M., Esteve, J., Plaza, J.A., Nogués, C., & Ibáñez, E. (2011). A novel embryo identification system by direct tagging of mouse embryos using silicon-based barcodes. *Human Reproduction*, 26(1), 96–105. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq309>
- Odhiambo, J. F., DeJarnette, J. M., Geary, T. W., Kennedy, C. E., Suarez, S. S., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2014). Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. *Biology of Reproduction*, 91(4), 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121897>
- Olsvik, Ø., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K. S., Hornes, E., Ugelstad, J., & Uhlén, M. (1994). Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(1), 43–54. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.1.43>

## REFERENCIAS

- Ozkavukcu, S., Erdemli, E., & Isik, A. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. 403–411. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3>
- Penon, O., Novo, S., Durán, S., Ibañez, E., Nogués, C., Samitier, J., Duch, M., Plaza, J.A., & Pérez-García, L. (2012). Efficient biofunctionalization of polysilicon barcodes for adhesion to the zona pellucida of mouse embryos. *Bioconjugate Chemistry*, 23(12), 2392–2402. <https://doi.org/10.1021/bc3004205>
- Pérez-Duran, F., Acosta-Torres, L. S., Serrano-Díaz, P. N., Toscano-Torres, I. A., Olivo-Zepeda, I. B., García-Caxin, E., & Nuñez-Anita, R. E. (2020). Toxicity and antimicrobial effect of silver nanoparticles in swine sperms. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 66(4), 281-289. <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1754962>
- Petters, R. M., & Wells, K. D. (1993). Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 48, 61–73. PMID: 8145215.
- Preaubert, L., Courbiere, B., Achard, V., Tassistro, V., Greco, F., Orsiere, T., Bottero, J. Y., Rose, J., Auffan, M., & Perrin, J. (2015). Cerium dioxide nanoparticles affect in vitro fertilization in mice. *Nanotoxicology*, 10(1), 111–117. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1030792>
- Ramos-Ibeas, P., Heras, S., Gómez-Redondo, I., Planells, B., Fernández-González, R., Pericuesta, E., Laguna-Barraza, R., Pérez-Cerezales, Serafín, & Gutiérrez-Adán, A. (2019). Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction and Development*, 86(10), 1292–1306. <https://doi.org/10.1002/mrd.23119>
- Rateb, S. A. (2021). Purification of cryopreserved camel spermatozoa following protease-based semen liquefaction by lectin-functionalized DNA-defrag magnetic nanoparticles. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(1), 183–192. <https://doi.org/10.1111/rda.13863>
- Rath, D., Barcikowski, S., de Graaf, S., Garrels, W., Grossfeld, R., Klein, S., Knabe, W., Knorr, C., Kues, W., Meyer, H., Michl, J., Moench-Tegeder, G., Rehbock, C., Taylor, U., & Washausen, S. (2013). Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. *Reproduction*, 145(1), R15–R30. <https://doi.org/10.1530/rep-12-0151>
- Rath, D., Johnson, L. A., Dobrinsky, J. R., Welch, G. R., & Niemann, H. (1997). Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology*, 47(4), 795-800. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00035-6)
- Rath, D., Long, C. R., Dobrinsky, J. R., Welch, G. R., Schreier, L. L., & Johnson, L. A. (1999). In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *Journal of Animal Science*, 77(12), 3346–3352. <https://doi.org/10.2527/1999.77123346X>

## REFERENCIAS

- Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2012). Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Reviews*, 112(11), 5818–5878. <https://doi.org/10.1021/cr300068p>
- Remião, M.H., Lucas, C. G., Domingues, W. B., Silveira, T., Barther, N. N., Komninou, E. R., Basso, A.C., Jornada, D.S., Beck, R.C.R., Pohlmann, A.R., Varela, A.S.Jr, Seixas, F. K., Farias Campos, V., Guterres, S.S., Collares, T. (2016). Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive Toxicology*, 63, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.016>
- Remião, M.H., Segatto, N. V., Pohlmann, A., Guterres, S. S., Seixas, F. K., & Collares, T. (2018). The potential of nanotechnology in medically assisted reproduction. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00994>
- Romany, L., Meseguer, M., Garcia-Herrero, S., Pellicer, A., & Garrido, N. (2010). Magnetic activated sorting selection (MACS) of non-apoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). preliminary data. *Fertility and Sterility*, 94(4), S14. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.055>
- Rossi, G., Di Nisio, V., Macchiarelli, G., Nottola, S. A., Halvaei, I., De Santis, L., & Cecconi, S. (2019). Technologies for the production of fertilizable mammalian oocytes. *Applied Sciences*, 9(1536), 1–17. <https://doi.org/10.3390/app9081536>
- Roth, Z., Inbar, G., & Arav, A. (2008). Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. *Theriogenology*, 69(8), 932–939. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.02.001>
- Roy, P. K., Qamar, A. Y., Fang, X., Kim, G., Bang, S., De Zoysa, M., Shin, S.T., Cho, J. (2021). Chitosan nanoparticles enhance developmental competence of in vitro-matured porcine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(2), 342–350. <https://doi.org/10.1111/rda.13871>
- Said, T. M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander, H. J., & Paasch, U. (2008). Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *Journal of Andrology*, 29(2), 134–142. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003632>
- Sakhtianchi, R., Minchin, R. F., Lee, K. B., Alkilany, A. M., Serpooshan, V., & Mahmoudi, M. (2013). Exocytosis of nanoparticles from cells: Role in cellular retention and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 201–202, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.013>
- Sánchez-Rubio, F., Soria-Meneses, P. J., Jurado-Campos, A., Bartolomé-García, J., Gómez-Rubio, V., Soler, A. J., Arroyo-Jimenez, M.M., Santander-Ortega, M.J., Plaza-Oliver, M., Lozanod, M.V., Gardea, J.J., Fernández-Santos, M. R. (2020). Nanotechnology in reproduction: Vitamin E nanoemulsions for reducing oxidative stress in sperm cells.

## R E F E R E N C I A S

- Free Radical Biology and Medicine*, 160(June), 47–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.024>
- Santaló Pedro, J., Barrios Sanromà, L., Ibáñez De Sans, E., Nogués Sanmiguel, C., Esteve Tinto, J., & Plaza Plaza, J. A. (2010). *EUROPEAN PATENT APPLICATION*: Encoded microparticles. Retrieved from  
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Designated+Extension+States+:#0>
- Santo, M. Di, Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human Sperm Cryopreservation : Update on Techniques , Effect on DNA Integrity , and Implications for ART. *Advances in Urology*. <https://doi.org/10.1155/2012/854837>
- Santos, R. R., Amorim, C., Cecconi, S., Fassbender, M., Imhof, M., Lornage, J., Paris, M., Schoenfeldt, V., Martinez-madrid, B. (2010). Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science*, 122(3–4), 151–163.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.010>
- Sathananthan, H., Menezes, J., & Gunasheela, S. (2003). Mechanics of human blastocyst hatching in vitro. *Reproductive BioMedicine Online*, 7(2), 228–234.  
[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61757-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61757-9)
- Schiewe, M. C., Araujo, E., Asch, R. H., & Balmaceda, J. P. (1995). Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12(1), 2–7.  
<https://doi.org/10.1007/BF02214120/METRICS>
- Selmani, A., Kovačević, D., & Bohinc, K. (2022). Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. *Advances in Colloid and Interface Science*, 303, 102640.  
<https://doi.org/10.1016/J.CIS.2022.102640>
- Semmler-Behnke, M., Lipka, J., Wenk, A., Hirn, S., Schäffler, M., Tian, F., Schmid, G., Oberdörster, G., Kreyling, W. G. (2014). Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0033-9>
- Shabanowitz, R. B., & O’Rand, M. G. (1988). Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(1), 151–161. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820151>
- Shandilya, R., Mishra, P. K., Pathak, N., Lohiya, N. K., & Sharma, R. S. (2020). Nanotechnology in reproductive medicine: Opportunities for clinical translation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 47(4), 245–262.  
<https://doi.org/10.5653/cerm.2020.03650>
- Shaoyong, W., Xu, B., Liu, Y., Pan, B., Wang, Y., & Jin, M. (2022). Exposure to Copper Oxide Nanoparticles Causes Human Infertility Risk and Damages the Quality of the

## REFERENCIAS

- Human Sperm Via the 5'Amp-Activated Protein Kinase-Mediated Signaling Pathway in Vitro. *SSRN Electronic Journal*, 4052477. (866). <https://doi.org/10.2139/ssrn.4052477>
- Shea, L. D., Woodruff, T. K., & Shikanov, A. (2014). Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. *Annual Review of Biomedical Engineering*, Vol. 16, pp. 29–52. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105131>
- Shen, H., Cai, S., Wang, Z., Ge, Z., & Yang, W. (2023). Materials & Design Magnetically driven microrobots: Recent progress and future development. *Materials & Design*, 227(111735). <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2023.111735>
- Silva, J. R. V., Barroso, P. A. A., Nascimento, D. R., Figueira, C. S., Azevedo, V. A. N., Silva, B. R., & Santos, R. P. dos. (2021). Benefits and challenges of nanomaterials in assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction and Development*, 88(11), 707–717. <https://doi.org/10.1002/mrd.23536>
- Singh, A. V., Hasan, M., Ansari, D., & Mahajan, M. (2020). Sperm Cell Driven Microrobots — Emerging Opportunities and Challenges for Biologically Inspired Robotic Design. *Micromachines*, 11(448), 2-17. <https://doi.org/10.3390/mi11040448>
- Singh, N., Jenkins, G. J. S., Asadi, R., & Doak, S. H. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1(1), 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>
- Sitti, M., & Wiersma, D. S. (2020). Pros and Cons: Magnetic versus Optical Microrobots. *Advanced Materials*, 32, 1906766, 1-9. <https://doi.org/10.1002/adma.201906766>
- Soriano-Úbeda, C., Matás, C., & García-Vázquez, F. A. (2013). An overview of swine artificial insemination: Retrospective, current and prospective aspects. *Journal of Experimental and Applied Animal Sciences*, 1(1), 67. <https://doi.org/10.20454/jeaas.2013.709>
- Soto-Heras, S., & Paramio, M. T. (2020). Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, 132, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>
- Spadafora, C. (2007). Sperm-mediated gene transfer: mechanisms and implications. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, 459–467. PMID: 17644984.
- Sutcliffe, A. G., & Ludwig, M. (2007). Outcome of assisted reproduction. *Lancet*, 370(9584), 351–359. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60456-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60456-5)
- Swain, J. E., Carrell, D., Cobo, A., Meseguer, M., Rubio, C., & Smith, G. D. (2016). Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertility and Sterility*, 105(3), 571–587. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.01.035>
- Syed, R., Suriadi, S., Adams, M., Bandara, W., Leemans, S. J. J., Ouyang, C., Ter Hofstede, A.H.M., Van de Weerd, I., Wynn, M.T., & Reijers, H. A. (2020). Robotic Process

## R E F E R E N C I A S

- Automation: Contemporary themes and challenges. *Computers in Industry*, 115, 103162. <https://doi.org/10.1016/j.compind.2019.103162>
- Takeda, K., Suzuki, K. I., Ishihara, A., Kubo-Irie, M., Fujimoto, R., Tabata, M., Oshio, S., Nihei, Y., Ihara, T., & Sugamata, M. (2009). Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science*, 55(1), 95–102. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.95>
- Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Matsuoka<sup>1</sup>, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter R.J., & Sugino, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 280–287. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x>
- Taylor, U., Garrels, W., Barchanski, A., Peterson, S., Sajti, L., Lucas-Hahn, A., Gamrad, L., Baulain, U., Klein, S., Kues, W.A., Barcikowski, S., & Rath, D. (2014). Injection of ligand-free gold and silver nanoparticles into murine embryos does not impact pre-implantation development. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5(1), 677–688. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.80>
- Taylor, U., Tiedemann, D., Rehbock, C., Kues, W. A., Barcikowski, S., & Rath, D. (2015). Influence of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles on germ cell function and embryo development. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 651–664. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.66>
- Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. V., & Delamarche, E. (2015). Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?. *Microelectronic Engineering*, 132, 156–175. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2014.10.013>
- Tiedemann, D., Taylor, U., Rehbock, C., Jakobi, J., Klein, S., Kues, W. A., Barcikowski, S., & Rath, D. (2014). Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *Analyst*, 139(5), 931–942. <https://doi.org/10.1039/c3an01463k>
- Tourmente, M., Villar-Moya, P., Rial, E., & Roldan, E. R. S. (2015). Differences in ATP Generation Via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species. *Journal of Biological Chemistry*, 290(33), 20613–20626. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.664813>
- Trundley, A., & Moffett, A. (2004). Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*, 63(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00170.x>
- Truong, L., Saili, K. S., Miller, J. M., Hutchison, J. E., & Tanguay, R. L. (2012). Persistent adult zebrafish behavioral deficits results from acute embryonic exposure to gold nanoparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 155(2), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.09.006>
- Truong, L., Tilton, S. C., Zaikova, T., Richman, E., Waters, K. M., Hutchison, J. E., & Tanguay, R. L. (2013). Surface functionalities of gold nanoparticles impact embryonic



## R E F E R E N C I A S

- gene expression responses. *Nanotoxicology*, 7(2), 192–201. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.648225>
- Vasquez, E. S., Feugang, J. M., Willard, S. T., Ryan, P. L., & Walters, K. B. (2016). Bioluminescent magnetic nanoparticles as potential imaging agents for mammalian spermatozoa. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0168-y>
- Vesterinen, H. M., Morello-Frosch, R., Sen, S., Zeise, L., & Woodruff, T. J. (2017). Cumulative effects of prenatal-exposure to exogenous chemicals and psychosocial stress on fetal growth: Systematic-review of the human and animal evidence. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176331>
- Viudes-de-Castro, M. P., Marco-Jiménez, F., Cedano-Castro, J. I., & Vicente, J. S. (2017). Effect of corifollitropin alfa supplemented with or without LH on ovarian stimulation and embryo viability in rabbit. *Theriogenology*, 98, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.005>
- Wang, F., Tian, X., Zhang, L., Gao, C., He, C., Fu, Y., Ji, P., Li, Y., Li, N., & Liu, G. (2014). Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. *Journal of Pineal Research*, 56(3), 333–342. <https://doi.org/10.1111/jpi.12126>
- Wang, J., Chen, Y., Chen, B., Ding, J., Xia, G., Gao, C., Cheng, J., Jin, N., Zhou, Y., Li, X., Tang, M., & Wang, X. M. (2010). Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in mice. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), 861–866. <https://doi.org/10.2147/IJN.S13662>
- Wang, R., Song, B., Wu, J., Zhang, Y., Chen, A., & Shao, L. (2018). Potential adverse effects of nanoparticles on the reproductive system. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 8487–8506. <https://doi.org/10.2147/IJN.S170723>
- Wang, Y., Zhao, X., Du, W., Liu, J., Chen, W., Sun, C., Cui, B., Zeng, Z., Shen, Y., Gao, F., Wang, A., Liu, G., & Cui, H. (2017). Production of transgenic mice through sperm-mediated gene transfer using magnetic nano-carriers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 13(12), 1673–1681. <https://doi.org/10.1166/jbn.2017.2456>
- Warnes, G., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., ... Venables, B. (2020). Venables gplots: Various R Programming Tools for Plotting data. R package. Version 3.1.1. Retrieved April 20, 2022, from <https://cran.r-project.org/package=gplots>
- Wassarman, P. M. (2008). Zona pellucida glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24285–24289. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800027200>
- Wells, M. E., & Awa, O. A. (1970). New Technique for Assessing Acrosomal Characteristics of Spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 53(2), 227–232. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86184-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86184-7)

## R E F E R E N C I A S

- Wick, P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Maeder-Althaus, X., Diener, L., Diener, P.A., Zisch, A., Krug, H.F., & Von Mandach, U. (2010). Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), 432–436. <https://doi.org/10.1289/>
- Wiwanitkit, V., Sereemasapun, A., & Rojanathanes, R. (2009). Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. *Fertility and Sterility*, 91(1), e7. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.08.021>
- Xiao, Y., & Du, J. (2020). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 8(3), 354–367. <https://doi.org/10.1039/c9tb01955c>
- Xu, Y., Wang, N., Yu, Y., Li, Y., Li, Y. B., Yu, Y. B., Zhou, X. Q., & Sun, Z. W. (2014). Exposure to Silica Nanoparticles Causes Reversible Damage of the Spermatogenic Process in Mice. *PLoS ONE*, 9(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101572>
- Yaman, S., Anil-Inevi, M., Ozcivici, E., & Tekin, H. C. (2018). Magnetic force-based microfluidic techniques for cellular and tissue bioengineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00192>
- Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., ... Tsutsumi, Y. (2011). Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature Nanotechnology*, 6(5), 321–328. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.41>
- Yanagimachi, R. (2022). Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biology of Reproduction*, 106(4), 644–675. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAC037>
- Yang, L., Kuang, H., Zhang, W., Aguilar, Z. P., Xiong, Y., Lai, W., Xu, H., & Wei, H. (2015). Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. *Nanoscale*, 7(2), 625–636. <https://doi.org/10.1039/c4nr05061d>
- Yazdanshenas, P., Jahanbin, R., Mohammadi Sangcheshmeh, A., Aminafshar, M., Vaseghi Dodaran, H., Varnaseri, H., Chamani, M., & Nazaran, M. H. (2016). Effect of zinc nano-complex on bull semen quality and pregnancy outcome. *Animal Production*, 18(1), 173–181. <https://doi.org/10.22059/JAP.2016.54598>
- Yoshida, S., Hiyoshi, K., Ichinose, T., Takano, H., Oshio, S., Sugawara, I., Takeda, K., & Shibamoto, T. (2009). Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology*, 32(4), 337–342. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00865.x>
- Yousef, M. S., López-Lorente, A. I., Diaz-Jimenez, M., Consuegra, C., Dorado, J., Pereira, B., Ortiz, I., Cárdenas, S., & Hidalgo, M. (2020). Nano-depletion of acrosome-damaged donkey sperm by using lectin peanut agglutinin (PNA)-magnetic nanoparticles. *Theriogenology*, 151, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.011>



## R E F E R E N C I A S

- Yue, Y., Behra, R., Sigg, L., Fernández Freire, P., Pillai, S., & Schirmer, K. (2015). Toxicity of silver nanoparticles to a fish gill cell line: Role of medium composition. *Nanotoxicology*, 9(1), 54–63. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.889236>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I.D., Simpson, J.L., & Van Der Poel, S. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human Reproduction*, 32(9), 1786–1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>
- Zhang, C., Qin, X., Guo, L., Zhang, G. L., Zhang, J. X., & Ren, Y. S. (2015). Effect of Different Nano-Zinc Levels in Dietary on Semen Quality, Activities of Antioxidant Enzyme and Expression of Copper Zinc Superoxide in Epididymis of Ram Lambs. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(1), 154–164. <https://doi.org/10.3864/J.ISSN.0578-1752.2015.01.15>
- Zhang, H., Xuan, X., Yang, S., Li, X., Xu, C., & Gao, X. (2018). Selection of viable human spermatozoa with low levels of DNA fragmentation from an immotile population using density gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting. *Andrologia*, 50(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.12821>
- Zhang, J., Ding, C., & Shang, P. (2014). Alterations of Mineral Elements in Osteoblast During Differentiation Under Hypo, Moderate and High Static Magnetic Fields. *Biological Trace Element Research*, 162(1–3), 153–157. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0157-7>
- Zhang, L., Ji, X., Yang, X., & Zhang, X. (2017). Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation. *Oncotarget*, 8(8), 13126–13141. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14480>
- Zhang, L., Wang, J., Wang, H., Wang, W., Li, Z., Liu, J., Yang, X., Ji, X., Luo, Y., Hu, C., Hou, Y., He, Q., Fang, J., Wang, J., Liu, Q., Li, G., Lu, Q., & Zhang, X. (2016). Moderate and strong static magnetic fields directly affect EGFR kinase domain orientation to inhibit cancer cell proliferation. *Oncotarget*, 7(27), 41527–41539. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9479>
- Zhang, X. P., Leung, C., Lu, Z., Esfandiari, N., Casper, R. F., & Sun, Y. (2012). Controlled aspiration and positioning of biological cells in a micropipette. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 59(4), 1032–1040. <https://doi.org/10.1109/TBME.2012.21822673>
- Zhou, X., Li, W., Fang, L., Zhang, D., & Dai, J. (2015). Hydroxyapatite nanoparticles improved survival rate of vitrified porcine oocytes and its mechanism. *Cryo-Letters*, 36(1), 45–50.