



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

**LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR EMBRIONES
BOVINOS DURANTE LA ETAPA DE BLASTULACIÓN Y ECLOSIÓN
REFLEJAN SU COMPETENCIA DE DESARROLLO *IN VITRO*.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

MIGUEL ANGEL GUTIÉRREZ REINOSO

CHILLÁN-CHILE

2023

Profesor Guía: Lleretny Rodríguez Álvarez
Dpto. de Ciencia Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

© Miguel Angel Gutiérrez Reinoso,2023

Se autoriza la reproducción con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos durante la etapa de blastulación y eclosión reflejan su competencia de desarrollo *In vitro*.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dra. Lleretny Rodríguez Álvarez
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Daniel Sandoval Silva
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. José Cox Ureta
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Marcelo Ratto Fuster
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Austral de Chile

Director de Programa

Dr. Fidel Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutora Lleretny Rodríguez Álvarez por haberme acogido en su grupo de investigación; por toda su guía y apoyo recibido durante todo el proceso de formación doctoral.

A mi familia entera, por creer en mí siempre, por estar en el momento indicado, por apoyarme.

A mis amigos, profesores, compañeros con quienes compartí momentos inolvidables.

A Manuel García Herreros un amigo especial absoluto.

A la Universidad de Concepción y becas UCO por la extraordinaria acogida y guía.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.

Al programa de becas ANID, Chile

Al Dr. Fidel O. Castro, por su predisposición de ayuda constante.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis tres hermosas
acompañantes incondicionales:

Mikela, Avelina, y Mayte.

A mi madre María, Padre Miguel †

A mis hermanos Vladimir y Andrea

A Don Germánico y Doña Teresa

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis fue Financiada por:

Beca ANID 21201280 (Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo)

Proyecto FONDEF ID18i10082

Proyecto FONDECYT 1170310, 1210334

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| DEDICATORIA | v |
| FINANCIAMIENTO | vi |
| TABLA DE CONTENIDOS..... | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | x |
| INDICE DE FIGURAS..... | xi |
| INDICE DE ANEXOS..... | xiii |
| RESUMEN..... | xiv |
| ABSTRACT | xvii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| I. REVISION BIBLIOGRÁFICA..... | 8 |
| 1. Vesículas Extracelulares (EVs) | 8 |
| 2. Vesículas extracelulares en el sistema embrionario | 13 |
| 3. Desarrollo Embrionario..... | 16 |
| 3.1. <i>Etapa pre y peri – implantatoria</i> | 16 |
| 3.2. <i>Control genético</i> | 21 |
| 4. Comunicación embrio-materna | 26 |
| 4.1. <i>En el oviducto</i> | 26 |
| 4.2. <i>Modelos in vitro en la interacción embrión-oviducto</i> | 27 |
| 4.3. <i>En el útero</i> | 30 |
| 5. Producción de embriones <i>In vitro</i> | 33 |
| 5.1. <i>Sistemas de producción de embriones</i> | 35 |
| 5.2. <i>Efecto del sistema de cultivo sobre el desarrollo embrionario</i> | 36 |
| 5.3. <i>La competencia del embrión de PIV</i> | 40 |
| 6. Selección embrionaria..... | 46 |
| 6.1. <i>Morfología y cinética embrionaria</i> | 47 |
| 6.2. <i>Análisis moleculares</i> | 51 |

| | | |
|------|--|-----|
| 6.3. | <i>Análisis basado en medios de cultivo</i> | 53 |
| 7. | El Rol de los miARNs embrionarios..... | 55 |
| 7.1. | <i>miARNs y endometrio</i> | 57 |
| 7.2. | <i>miARNs y la interacción embrio-materna</i> | 58 |
| 7.3. | <i>miARNs circulantes</i> | 59 |
| 8. | Aspecto general del problema identificado | 60 |
| II. | PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA..... | 64 |
| III. | HIPOTESIS Y OBJETIVOS..... | 66 |
| IV. | MATERIALES Y MÉTODOS | 68 |
| 1. | <i>Diseño experimental</i> | 68 |
| 2. | <i>Metodologías de investigación y desarrollo</i> | 75 |
| 2.1. | <i>Lugar</i> | 75 |
| 2.2. | <i>Producción de embriones In vivo</i> | 75 |
| 2.3. | <i>Producción de embriones In vitro</i> | 78 |
| 2.4. | <i>Clasificación embrionaria</i> | 81 |
| 2.5. | <i>Aislamiento de EVs y caracterización de nanopartículas</i> | 84 |
| 2.6. | <i>Análisis del contenido de miARN en EVs aislados de medio de cultivo embrionario</i> | 87 |
| 2.7. | <i>Análisis Estadístico</i> | 89 |
| V. | RESULTADOS..... | 91 |
| 1. | Desarrollo embrionario y determinación de grupos experimentales..... | 91 |
| 2. | Aislamiento y Caracterización de Vesículas extracelulares, EVs (nanopartículas) procedentes de embriones producidos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> en etapa de blastulación (Día 5-7) y eclosión (Día 7-9). | 94 |
| 3. | (Objetivo 1). Determinar el efecto del desarrollo embrionario <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> en las características de las poblaciones de vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación y eclosión en embriones bovinos..... | 98 |
| 4. | (Objetivo 2). Evaluación de las características poblacionales de las EVs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> y su capacidad de desarrollo <i>In vitro</i> hasta la etapa ovoide (Día 11). 100 | |
| 5. | (Objetivo 3). Determinar el efecto del desarrollo embrionario <i>In vitro</i> respecto al contenido de miARNs en vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación y eclosión en embriones bovinos..... | 101 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 6. | (Objetivo 4) Evaluación de la expresión diferencial de miARNs contenidos en las EVs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> | 107 |
| 7. | Análisis de Ontología Génica (OG): Análisis de enriquecimiento génico. ... | 114 |
| VI. | DISCUSIÓN | 125 |
| VII. | CONCLUSIONES | 146 |
| VIII. | BIBLIOGRAFÍA | 147 |
| IX. | ANEXOS. TABLAS SUPLEMENTARIAS | 208 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1 Pérdidas embrionarias tempranas y tardías observadas después de la transferencia de embriones bovinos producidos <i>In vitro</i> (Perry et al., 2017). | 42 |
| Tabla 2 Diferencias en la mantención de la gestación después de la transferencia de embriones bovinos producidos <i>In vitro</i> vs producidos <i>In vivo</i> (Perry, 2017) | 43 |
| Tabla 3 Criterios de clasificación morfológica de embriones bovinos para transferencia de embriones (Stringfellow et al., 1998; Bó and Mapletoft, 2013). | 49 |
| Tabla 4 Diseño experimental: distribución de grupos, muestras y replicas de los experimentos 1 y 2 respectivamente. | 74 |
| Tabla 5 Características del desarrollo embrionario (datos de producción de embriones) PIV e IVV: No. Réplicas, No. Ovocitos, No. Cigotos / embriones No. Mórulas, No. Blastocistos, % blastocistos D7, No. Blastocistos D11, %, Blastocistos viables D11..... | 92 |
| Tabla 6 Caracterización de la presencia de marcadores específicos de vesículas extracelulares (tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD40) en nanopartículas secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios.... | 95 |
| Tabla 7 Parámetros de concentración y tamaño de la población de Vesículas extracelulares Evs secretadas por embriones bovinos durante las etapas de blastulación y eclosión producidos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> | 98 |
| Tabla 8 Cuantificación y calidad del ARN obtenido de las réplicas experimentales IVV 5-7,7-9 e PIV 5-7,7-9. | 102 |
| Tabla 9 Información general de la secuenciación de miARNs en Evs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> | 103 |
| Tabla 10 Ontología Génica considerando miARNs secretados por embriones bovinos producidos <i>In vivo</i> durante la etapa de desarrollo de blastulación..... | 116 |
| Tabla 11 Ontología Génica de miARNs secretados por embriones producidos <i>In vitro</i> durante la etapa de desarrollo de blastulación. Objetivos genéticos validados de los miARNs más significativos..... | 118 |
| Tabla 12 Ontología Génica de miARNs secretados por embriones producidos <i>In vitro</i> durante la etapa de desarrollo de eclosión Objetivos genéticos validados de los miARNs más significativos..... | 120 |
| Tabla 13 Ontología génica de miARNs secretados por embriones producidos <i>In vivo</i> durante la etapa de desarrollo de eclosión. Objetivos genéticos validados de los miARNs más abundantes. | 123 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 Esquema del diseño del Experimento 1..... | 70 |
| Figura 2 Esquema del diseño del Experimento 2..... | 73 |
| Figura 3 Esquemas del protocolo de producción <i>In vivo</i> de embriones..... | 77 |
| Figura 4 Esquema de tratamientos superestimulatorios basados en FSH para: donantes de aptitud cárnica- Bos taurus, Experimento 1 (Bó and Mapletoft, 2014). | 77 |
| Figura 5 Esquema de tratamientos superestimulatorios basados en FSH para: donantes de aptitud cárnica- Bos taurus. Experimento 2 I (Bó and Mapletoft, 2014). | 78 |
| Figura 6 Cronología del desarrollo embrionario. Morfología de diferentes estadios de desarrollo. Manual IETS, 2010 (Bó and Mapletoft, 2013; Rocha et al., 2016). | 83 |
| Figura 7 Desarrollo de blastocistos cultivados <i>In vitro</i> individualmente desde el día 7 hasta el día 11 post fecundación <i>In vitro</i> y post fecundación <i>In vivo</i> *p<0.05..... | 94 |
| Figura 8 Imágenes representativas de la Microscopia Electrónica de Transmisión de Vesículas Extracelulares (EVs) secretadas por embriones bovinos producidos <i>In vivo</i> (IVV) o <i>In vitro</i> (PIV) en estadio de desarrollo de blastulación (Día 5-7) y eclosión (Día 7-9). | 96 |
| Figura 9 Concentración y tamaño de EVs por NTA (NANOSIGHT®). Etapas de blastulación (IVV/PIV 5-7) y de eclosión (IVV/PIV 7-9). Dilución 1/20 (30 µl de pellets EVs en 570 µl PBS). | 97 |
| Figura 10 Concentración y tamaño de Vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> durante las ventanas de desarrollo embrionario de blastulación 5-7 y de eclosión 7-9. | 99 |
| Figura 11 Concentración y tamaño de la población de Vesículas extracelulares EVs secretadas por embriones bovinos competentes producidos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> (PIV e IVV) durante las ventanas de desarrollo embrionario de blastulación y de eclosión..... | 100 |
| Figura 12 Desarrollo de blastocistos producidos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> y cultivados individualmente <i>In vitro</i> desde el día 5 y 7 hasta el día 11 post PIV / SOV | 101 |
| Figura 13 Normalización de datos. Lecturas de miARNs expresadas en Log2 conteos por millón en (CPM)> 5. | 104 |
| Figura 14 Análisis de componentes principales (ACP) de la distribución dimensional de los grupos experimentales | 105 |
| Figura 15 Diagrama de Venn representando los miARNs presentes en EVs secretadas de embriones funcionalmente competentes producidos <i>In vitro</i> (PIV) vs <i>In vivo</i> (IVV) comparando con los demás estadios de desarrollo de Blastulación vs Eclosión..... | 106 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16 Diagrama “HeatMap” para la agrupación jerárquica de los 25 miARNs con mayor variabilidad entre los grupos experimentales..... | 107 |
| Figura 17 Análisis de presencia diferencial de miARNs en las EVs secretadas durante la blastulación o eclosión considerando el origen embrionario (PIV: <i>In vitro</i> ; IVV: <i>In vivo</i>). | 108 |
| Figura 18 “Volcano Plot”. Expresión diferencial de miARNs secretados por embriones bovinos <i>In vitro</i> (izquierda) e <i>In vivo</i> (derecha) durante la etapa de blastulación. | 109 |
| Figura 19 “Volcano Plot”. Expresión diferencial de miARNs secretados por embriones bovinos <i>In vitro</i> (izquierda) e <i>In vivo</i> (derecha) durante la etapa de eclosión | 110 |
| Figura 20 Análisis de presencia diferencial de miARNs en las EVs secretadas por embriones PIV: <i>In vitro</i> e IVV: <i>In vivo</i> considerando el efecto del estadio de desarrollo embrionario (blastulación y eclosión). | 111 |
| Figura 21 “Volcano Plot”. Expresión diferencial de miARNs secretados por embriones bovinos producidos <i>In vitro</i> durante la etapa de blastulación (derecha) y de eclosión (izquierda) | 112 |
| Figura 22 “Volcano Plot”. Expresión diferencial de miARNs secretados por embriones bovinos producidos <i>In vivo</i> durante la etapa de blastulación (derecha) y de eclosión (izquierda) | 113 |
| Figura 23 Diagrama de Venn representando los miARNs sobreexpresados o representados en EVs secretadas por embriones producidos <i>In vivo</i> (IVV) o <i>In vitro</i> (PIV) comparando la etapa de desarrollo: Blastulación vs eclosión.. Gráfico elaborado con programa Venn 2.1 https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/ | 114 |
| Figura 24 Diagrama de Venn representando la interacción de los procesos biológicos afectados por los miARNs sobreexpresados en EVs secretadas durante la blastulación o eclosión por embriones bovinos producidos <i>In vitro</i> (PIV) o <i>In vivo</i> (IVV) | 115 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo Tabla 1 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de blastulación por embriones <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> | 208 |
| Anexo Tabla 2 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de eclosión por embriones <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> | 209 |
| Anexo Tabla 3 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de blastulación y eclosión por embriones <i>In vitro</i> | 210 |
| Anexo Tabla 4 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de blastulación y eclosión por embriones <i>In vivo</i> | 211 |
| Anexo Tabla 5 CPM. miARNs secretados durante la etapa de blastulación y eclosión por embriones <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> | 212 |

Las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos durante la etapa de blastulación y eclosión reflejan su competencia de desarrollo *In vitro*.

RESUMEN

Este trabajo se basó en el hecho de que los embriones producidos *In vitro* son menos competentes que los embriones generados *In vivo*. El objetivo de nuestra investigación fue determinar las características poblacionales y el perfil de miRNAs de EVs secretadas por embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* durante la etapa de blastulación y eclosión, y su relación con la calidad embrionaria. Para abordar este objetivo se planteó una pregunta biológica: ¿Las características (morfológicas y contenido de miARN) de las EVs son diferentes cuando los embriones morfológicamente competentes son producidos *In vitro* - *In vivo* o en estadios pre-implantatorios (blastulación vs eclosión)? Para resolver esta pregunta se propusieron dos experimentos que se enfocaron en la caracterización poblacional de EVs y contenido de miARN contenidos en EVs secretadas por embriones *In vitro* e *In vivo* durante la blastulación (Exp 1) y la eclosión (Exp 2) por embriones calificados como competentes respecto a los criterios de competencia (Grados 1,2 IETS, para el día 7 y el diámetro o eclosión, para el día 11). Se produjeron mediante *PIV* e *IVV* embriones bovinos pre-implantatorios, y se distribuyeron en dos grupos de blastulación y eclosión (*PIV*5-7, *IVV*5-7; *PIV*7-9, *IVV*7-9). Se seleccionaron morfológicamente según los criterios de la IETS, (2010) las mórulas (Exp1: día 5) y blastocistos (Exp 2: día 7) colectados *in vivo* al día 5 y día 7 respectivamente; los embriones *in vitro* de día 5 y 7 del cultivo grupal fueron cultivadas individualmente en medio SOFaa depletado hasta el día 7 y 9 respectivamente. En general los embriones *IVV* e *PIV* se cultivaron hasta el día 11 en medio extendido desde sus estadios de 5-7 días y 7-9 días. El 88,3 % y el 43,05% de los embriones *PIV* e *IVV* alcanzaron el estadio de blastocisto a día 7. El desarrollo a día 11 fue significativamente mayor en los embriones producidos *IVV* (d7-9) ($P < 0.05$) respecto a los *PIV*. Los embriones *IVV* en general tuvieron una mayor tasa de eclosión, siendo $> 50\%$ respecto a los *PIV*. La cinética del desarrollo embrionario presentó diferencias significativas entre los grupos de embriones asociadas tanto por el origen (*In vitro*-*In vivo*) como por la ventana de estudio (blastulación-eclosión). Al día 11 los embriones de la ventana 7-9 *IVV* fueron los de mayor diámetro (*PIV* 5-7: $381,93 \pm 97,48$; *IVV* 5-7: $345,68 \pm 107,26$; *PIV* 7-9: $471,72 \pm 77,24$; y *IVV* 7-9: $508,69 \pm 90,56 \mu\text{m}$). Luego de este análisis se seleccionaron 133 medios de cultivos colectados de embriones calificados como competentes y se caracterizaron las poblaciones

de Vesículas Extracelulares (EVs), definidas acorde a los tres criterios básicos recomendados por la Sociedad Internacional de Vesículas extracelulares (ISEV) para definir EVs: 1) presencia de marcadores de superficie específicos (Citometría), 2) morfología (Microscopia Electrónica de Transmisión-TEM), y 3) tamaño y concentración (Nano Tracking Analysis, NTA). Las EVs de medios de cultivo de embriones y del control positivo (EVs de suero fetal bovino) fueron positivas para los cuatro marcadores proteicos específicos de superficie de EVs analizados (CD9, CD63, CD81 y CD40). Mediante TEM se identificaron estructuras con morfología clásica de EVs, con un diámetro entre 100 y 500 nm, con forma redondeada o de copa y presencia de una bicapa; además no se observaron diferencias morfológicas entre las EVs de los embriones de los diferentes grupos experimentales. Se caracterizó la población de EVs de acuerdo con su tamaño (pequeñas (<120 nm y grandes (>120 nm) y concentración. (NTA): al tamaño y concentración de EVs. Las variables de morfología del blastocisto y características morfológicas de las EVs fueron sometidas a análisis de componentes principales (ACP) para discriminar los grupos de embriones. El análisis estadístico se realizó con el programa SAS versión del sistema ocho para Windows y programa IBM SPSS Statistics versión 19. Se detectaron poblaciones de EVs en el rango de 25-620 nm, pero con mayor concentración en el rango de pequeñas vesículas (menor de 200 nm). Se observaron dos poblaciones de EVs: vesículas grandes (>120 nm) y vesículas pequeñas (≤ 120 nm). Para el análisis del contenido de microARNs las muestras se obtuvieron aleatoriamente de cada réplica experimental que contenía EVs de 10 embriones: 6 réplicas del grupo *PIV5-7*, 3 réplicas *IVV5-7*, 3 réplicas *PIV7-9* y 3 réplicas *IVV7-9*. Se realizó la extracción y análisis de calidad del ARN total por réplica. El RIN (“RNA Integrity Number”) fue mayor a 7, considerado aceptable para el análisis de secuenciación. El programa Fastp detectó lecturas de 75 ± 1 pares de bases (Paired End) y con un inserto de 149 pares de bases las cuales fueron mapeadas contra el genoma disponible en Mirbase versión 21. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para determinar la variabilidad de los conteos entre las réplicas de cada grupo experimental: Se observó mayor separación inter-grupal entre los grupos *IVV* e *PIV* (blastulación) y menor separación inter-grupal entre los grupos *IVV* e *PIV* (eclosión). Se identificaron 122 miARNs con un CPM (conteos por millón) sobre 5; y se detectaron 74 miARNs comunes que están presentes en todos grupos experimentales. El análisis de expresión diferencial de miRNAs en las EVs en función del origen embrionario muestra 32 y 65 miARNs mayormente representados en las EVs secretadas durante la blastulación de embriones *IVV* e *PIV* respectivamente y 5 miARNs diferencialmente representados en las EVs de embriones *IVV*. Respecto al contenido de miARNs en las EVs, hubo una disminución en el

contenido de miARNs mayormente representados a medida que avanza el desarrollo embrionario, tanto para los *in vitro* como *In vivo*. En el estadio de eclosión se identificó un miARN exclusivo de las EVs de los embriones *IVV* y 18 exclusivos en las EVs de los embriones *PIV*, mientras que 2 miARNs están igualmente representados en las EVs de los embriones de ambos orígenes. Finalmente se realizó un análisis de ontología para caracterizar la función molecular. Los miARNs sobreexpresados de las EVs secretadas durante la eclosión por embriones *PIV* afectan un mayor número de funciones biológicas que los sobreexpresados en EVs de embriones *IVV*, incluyendo 9 funciones exclusivamente afectadas. En conclusión, en este trabajo se demostró que el origen embrionario (*In vivo* vs *In vitro*) y su etapa de desarrollo (blastulación y eclosión) tienen un efecto sobre las características poblacionales (tamaño promedio, concentración y contenido de miARNs) de vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos. Por tanto, una mayor secreción de EVs y un mayor número de microARNs diferencialmente expresados podrían estar relacionados con la competencia embrionaria.

ABSTRACT

This work was based on the fact that embryos produced *In vitro* are less competent than embryos generated *In vivo*. The objective of our research was to determine the population characteristics and miRNA profile of EVs secreted by bovine embryos produced *In vitro* and *In vivo* during the blastulation and hatching stages, and their relationship with embryo quality. To address this objective, a biological question was posed: Are the characteristics (morphological and miRNA content) of EVs different when morphologically competent embryos are produced in vitro - in vivo or in pre-implantation stages (blastulation vs hatching)? To resolve this question, two experiments were proposed that focused on the population characterization of EVs and miRNA content contained in EVs secreted by embryos in vitro and in vivo during blastulation (Exp 1) and hatching (Exp 2) by embryos qualified as competent regarding the competition criteria (Grades 1.2 IETS, for day 7 and diameter or hatching, for day 11). Pre-implantation bovine embryos were produced by *PIV* and *IVV*, and distributed into two blastulation and hatching groups (*PIV*5-7, *IVV*5-7; *PIV*7-9, *IVV*7-9). Morulas (Exp1: day 5) and blastocysts (Exp 2: day 7) collected in vivo on day 5 and day 7, respectively, were selected morphologically according to the IETS criteria (2010); In vitro embryos from day 5 and 7 of the group culture were cultured individually in SOFaa-depleted medium until day 7 and 9, respectively. In general, *IVV* and *PIV* embryos were cultured until day 11 in extended medium from their stages of 5-7 days and 7-9 days. 88.3% and 43.05% of the *PIV* and *IVV* embryos reached the blastocyst stage on day 7. Development on day 11 was significantly higher in embryos produced *IVV* (d7-9) ($P < 0.05$) compared to to the *PIV* vs. *IVV* embryos in general had a higher hatching rate, being $>50\%$ compared to *PIV*. The kinetics of embryonic development presented significant differences between the groups of embryos associated both by the origin (*In vitro-In vivo*) and by the study window (blastulation-hatching). On day 11, the embryos from window 7-9 *IVV* had the largest diameter (*PIV* 5-7: 381.93 ± 97.48 ; *IVV* 5-7: 345.68 ± 107.26 ; *PIV* 7-9: 471.07 ± 77.24 , and *IVV* 7-9: $508.69 \pm 90.56 \mu\text{m}$). After this analysis, 133 culture media collected from embryos qualified as competent were selected and the populations of Extracellular Vesicles (EVs) were characterized, defined according to the three basic criteria recommended by the International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) to define EVs: 1) presence of specific surface markers (cytometry), 2) morphology (Transmission Electron Microscopy-TEM), and 3) size and concentration (Nano Tracking Analysis, NTA). Embryo culture media EVs and positive control (fetal calf serum EVs) were positive for all four EV surface-specific protein markers tested (CD9, CD63, CD81, and CD40). Using TEM, structures

with classic EVs morphology were identified, with a diameter between 100 and 500 nm, with a rounded or cup shape and the presence of a bilayer; Furthermore, no morphological differences were observed between the EVs of the embryos of the different experimental groups. The population of EVs was characterized according to their size (small (<120 nm) and large (>120 nm) and concentration. (NTA): the size and concentration of EVs. The variables of blastocyst morphology and morphological characteristics of the EVs they were submitted to principal component analysis (PCA) to discriminate the groups of embryos. The statistical analysis was performed with the SAS program, version eight for Windows and the IBM SPSS Statistics version 19 program. Populations of EVs were detected in the range of 25-620 nm, but with a higher concentration in the range of small vesicles (less than 200nm). Two populations of EVs were observed: large vesicles (>120 nm) and small vesicles (\leq 120 nm). For the analysis of the microRNA content, the samples were randomly obtained from each experimental replicate containing EVs of 10 embryos: 6 replicates from the *PIV* 5-7 group, 3 replicates *IVV*5-7, 3 replicates *PIV* 7-9 and 3 replicates *IVV* 7-9. Extraction and quality analysis of total RNA per replicate was performed. The RIN ("RNA Integrity Number") was greater than 7, considered acceptable for sequencing analysis. The Fastp program detected reads of 75 ± 1 base pairs (Paired End) and with an insert of 149 base pairs, which were mapped against the genome available in Mirbase version 21. Principal component analysis (PCA) was performed to determine the variability of the counts between the replicates of each experimental group: greater inter-group separation was observed between the *IVV* and *PIV* groups (blastulation) and less inter-group separation between the *IVV* and *PIV* groups (hatching). 122 miRNAs with a CPM (counts per million) over 5 were identified; and 74 common miRNAs that are present in all experimental groups were detected. Analysis of differential expression of miRNAs in EVs based on embryonic origin shows 32 and 65 miRNAs mostly represented in EVs secreted during blastulation of *IVV* and *PIV* embryos, respectively, and 5 miRNAs differentially represented in EVs of *IVV* embryos. Regarding the content of miRNAs in the EVs, there was a decrease in the content of miRNAs mostly represented as embryonic development progressed, both for in vitro and in vivo tests. At the hatching stage, one exclusive miRNA was identified in the EVs of *IVV* embryos and 18 exclusives in the EVs of *PIV* embryos, while 2 miRNAs are equally represented in the EVs of embryos of both origins. Finally, an ontology analysis was performed to characterize the molecular function. Overexpressed miRNAs from EVs secreted during hatching by *PIV* embryos affect a greater number of biological functions than those overexpressed in EVs from *IVV* embryos, including 9 exclusively affected functions. In conclusion, in this work it was shown that the

embryonic origin (*In vivo* vs *In vitro*) and its stage of development (blastulation and hatching) have an effect on the population characteristics (average size, concentration and content of miRNAs) of secreted extracellular vesicles. by bovine embryos. Therefore, a greater secretion of EVS and a greater number of differentially expressed microRNAs could be related to embryonic competence.

INTRODUCCIÓN

La producción *In vitro* (*PIV*) de embriones bovinos ha ganado interés mundial en los últimos años, siendo una de las principales alternativas para acelerar la reproducción de hembras de interés zootécnico. En 2020, se realizaron aproximadamente 797.190 transferencias de embriones bovinos *PIV*, con 763,093 embriones transferidos en América del Norte, 678,917 en América del Sur, 42,410 en Europa, 17,681 en Oceanía y 5,421 en África, IETS Data Retrieval Committee Report, December 2022 (Viana, 2022). De acuerdo con estos autores, la *PIV* ha tenido un incremento exponencial del 1000% en los últimos 20 años IETS (Viana, 2022). Aproximadamente el 27% de las receptoras que reciben embriones *PIV* producen un ternero vivo, y el 60% de estas preñeces fracasan durante las 6 semanas de gestación (Ealy et al., 2019) con pérdidas embrionarias tempranas del 20% (Hasler, 2014; Hansen, 2014; Perry, 2017; Tríbulo et al., 2018; Hansen and Tríbulo, 2019). Varios estudios describen que la eficiencia reproductiva post transferencia de embriones *PIV* no es alta (Rizos et al., 2008) con tasas de implantación <50%, y baja y variables tasas de preñez entre el 10 al 41% (Wilson et al., 2005; Wheeler et al., 2006; Morotti et al., 2014). Se ha descrito también que las tasas de gestación a los 60 días varían entre el 12 al 50% en dependencia de las condiciones del cultivo *In vitro* (Pat Lonergan et al., 2016; Moore and Hasler, 2017). Por tanto, los embriones *PIV* podrían ser menos competentes que los producidos *In vivo*, debido a la exposición a condiciones artificiales durante el desarrollo pre-implantatorio.

Cada procedimiento asociado a los sistemas *In vitro*, incluyendo la calidad de los gametos, puede ejercer un impacto en todos en el potencial del desarrollo embrionario. La maduración *In vitro* de ovocitos conlleva a una reducción en las tasas de maduración y de la competencia funcional ovocitaria, lo que se refleja en menor capacidad de desarrollo embrionario (Rizos et al., 2002,

2003; Lonergan et al., 2003; Lonergan and Fair, 2008; Nagano, 2019). En bovinos, no solo se evidencia una reducción de la tasa de desarrollo al estadio de blastocistos, también se ha observado cambios en la morfología del conceptus, menor elongación y reducción o ausencia del disco embrionario (Rodríguez-Alvarez et al., 2010a; Cánepa et al., 2014; L. Jiang et al., 2017b). Estos efectos de los sistemas *In vitro* también se evidencian durante el desarrollo post-implantatorio; en bovinos se presenta con más frecuencia un desarrollo anormal de células binucleadas marginales, bajo número de cotiledones, vascularización placentaria alterada (Miles et al., 2004), fetos y terneros gigantes (Van Wagtendonk-De Leeuw et al., 1998; Miles et al., 2005), malformaciones musculo esqueléticas y mayor crecimiento de órganos como: corazón, cerebro, médula espinal y músculo esquelético (Behboodi et al., 1995; Van Wagtendonk-De Leeuw et al., 1998; Breukelman et al., 2005; Farin et al., 2006; Zaborski et al., 2009).

Existe consenso en que la baja eficiencia de las tecnologías reproductivas se debe a los cambios en el control génico del desarrollo embrionario, en respuesta a las condiciones *In vitro* (Rodríguez-Alvarez et al., 2010a; Rodríguez-Alvarez et al., 2013; Cerny et al., 2015; Velasquez et al., 2016). Las condiciones subóptimas *In vitro* a las cuales se exponen los gametos y embriones provocan cambios epigenéticos, que afectan el potencial de desarrollo a término de los embriones *In vitro* (Cerny et al., 2015). Hasta ahora, solo ha sido posible dimensionar la magnitud de estos cambios a través de los resultados observados en cada etapa crítica del desarrollo embrionario pre y post-implantatorio. Los investigadores han centrado sus esfuerzos en optimizar las condiciones de producción de embriones *In vitro*, sin embargo, aún no se han observado aumentos relevantes en las tasas de *PIV* y en la eficiencia reproductiva siguientes (Lonergan and Fair, 2008; Cerny et al., 2015; Lopera-Vasquez et al., 2016; Lonergan et al., 2016; Almiñana and Bauersachs, 2019).

Pese a los reducidos rendimientos de la *PIV*, esta tecnología continúa siendo una opción relevante para multiplicar bovinos de alto merito genético y comercial. En Humanos, la *PIV* sigue siendo la alternativa más aplicada para el tratamiento de infertilidad asociada a incapacidad de ovular, maduración incompleta del ovocito, impermeabilidad de las trompas, entre otras. Se ha considerado que, en lugar de incrementar el número de embriones competentes o viables, es decir, con el potencial de soportar el desarrollo embrionario y fetal normal, se seleccionen solo aquellos embriones clasificados como competentes (Qu et al., 2019). De esta forma, los números actuales de porcentajes de gestación y nacimientos vivos mejorarían si se transfirieran solo embriones identificados objetivamente como funcionalmente competentes (Mellisho et al., 2017).

En bovinos la selección embrionaria para la transferencia se realiza en estadio de blastocisto (día 7 post fecundación). A la fecha, describir las características de un blastocisto competente es un tema controversial. Los métodos actuales de selección tienen bajo o medio poder para determinar la competencia funcional o competencia embrionaria para desarrollo a término. El desarrollo de métodos de selección embrionaria con mayor poder de predicción es un tema a resolver para ampliar el uso de la tecnología de embriones. La selección embrionaria se basa en métodos invasivos y no-invasivos. La primeras técnicas (invasiva) pese a que puede producir daños al embrión, tiene un alto poder predictivo respecto a los resultados de preñez, y se basa en una evaluación molecular o de cariotipo de una porción de las células del embrión (De Assín et al., 2009).

Dentro de los métodos no invasivos, la clasificación morfológica es el método más utilizado por su practicidad y simpleza. Sin embargo, tiene limitaciones por la subjetividad y variabilidad en la estimación y clasificación de embriones competentes (Ziebe, 2013). Adicionalmente, la morfología del embrión no necesariamente se correlaciona con sus características

moleculares y, por tanto, no refleja su competencia (Mellisho et al., 2017). Varios estudios han demostrado que embriones con una morfología adecuada (según los criterios de la IETS), no expresan correctamente genes cruciales para el desarrollo (Niwa et al., 2000; Wrenzycki et al., 2005; Badr et al., 2007; Rodríguez-Alvarez et al., 2010a; Rodríguez-Alvarez et al., 2013).

Por consiguiente, embriones con características morfológicas similares no son capaces de implantarse o mantener una gestación normal a término (Shapiro et al., 2008; Bó and Mapletoft, 2014; Motato et al., 2016; Rocha et al., 2016; Velasquez et al., 2016). Así, los sistemas de selección invasivos y no invasivos tienen desventajas significativas. Otros métodos como la morfocinética, basada en el monitoreo del desarrollo embrionario temprano (*time-lapse*) no ha conseguido desarrollar un algoritmo universal para la selección de embriones con alta capacidad de desarrollo (Kovacs, 2014).

Existe una información creciente que recoge una gran cantidad de información referida al desarrollo de sistemas de clasificación embrionaria, basados en la secretómica embrionaria asociada a su metabolismo en el medio de cultivo. Los cambios que ocurren en el medio reflejarían la actividad y características funcionales del embrión, brindando información molecular sin necesidad de tomar una muestra celular. El desarrollo embrionario pre-implantatorio está sujeto a una influencia ambiental multifactorial, que asegura un correcto desarrollo *In vivo*. El embrión *In vitro* utiliza los sustratos del medio de cultivo y secreta moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, esteroides, PGs, metabolitos, etc.), modificando el medio. Varios investigadores han empleado esta información para fundamentar el desarrollo de sistemas no invasivos de selección embrionaria, basado en la identificación de biomarcadores en el medio de cultivo (Abreu et al., 2020).

La identificación de las variaciones en la composición del medio de cultivo (secretómica y metabolómica) demanda de tecnología sensible y precisa

como cromatografía, resonancia magnética nuclear (RMN), Espectrometría de Masas (MS) y Espectroscopia Raman e Infrarrojo Cercano (Katz-Jaffe & McReynolds, 2013). Sin embargo, muchos de los resultados reportados son contradictorios y aun no hay consenso sobre los marcadores con mayor capacidad predictiva de la competencia embrionaria (Hernández-Vargas et al., 2020).

Los embriones son sistemas biológicos complejos; el desarrollo temprano es extremadamente dinámico donde ocurren cambios en las vías de señalización molecular y metabólica que reflejan cambios morfológicos e interacción con el ambiente (van Loendersloot et al., 2014; Rizos et al., 2017). En tal sentido, es poco probable que solo una molécula sea capaz de predecir su competencia embrionaria (Gardner et al., 2013; Katz-Jaffe and McReynolds, 2013; Cordova et al., 2014; van Loendersloot et al., 2014). Adicionalmente, los embriones son estructuras con un número reducido de células, alcanzando entre 60-120 células en estadio de blastocisto dependiendo de la especie (Degrelle et al., 2005). Los cambios constantes en los marcadores moleculares expresados y secretados, así como la baja concentración de moléculas producidas representan un verdadero desafío para los sistemas de diagnóstico.

Recientemente, nuestro grupo ha desarrollado un sistema de selección embrionaria no invasivo que vincula las variables morfológicas clásicas (calidad y estadio del blastocisto) y las características poblacionales (media del tamaño y concentración) de las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por los embriones durante la etapa de blastulación (Mellisho et al., 2019). Este método fue validado con un sistema de cultivo *In vitro* extendido, que permitía definir la capacidad de desarrollo embrionario hasta la etapa pre-implantatoria post eclosión (día 11 de desarrollo). Este sistema de selección embrionaria desarrollado tiene un poder de predicción del 77.6% con un ROC-AUC de 0.853 (95% CI, 0.806-0.900; P <0.001) (Mellisho et al., 2019).

Durante los últimos años, las EVs se han descrito como un mecanismo de comunicación entre células, regulando importantes funciones fisiológicas y patológicas (Tannetta et al., 2014; Saadeldin et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Homer et al., 2017; Simon et al., 2018). Las EVs, pueden ser secretas por todos los tipos celulares tanto *In vivo* como *In vitro*. Son capaces de modificar las funciones celulares ya que transportan moléculas como ARNm, miARNs, proteínas y lípidos las cuales pueden modificar el patrón de expresión génica de las células receptoras (Almiñana and Bauersachs, 2019). Los embriones pre-implantatorios, así como las células del oviducto y endometrio también secretan EVs, por lo que se ha propuesto que estas vesículas serian un mecanismo temprano de comunicación embrio-maternal (Saadeldin et al., 2014; Lopera-Vasquez et al., 2017; Almiñana et al., 2017; Mellisho et al., 2017; Qu et al., 2017; Bauersachs and Almiñana, 2020). Adicionalmente, tanto en embriones de humana, porcinos como en bovino, se ha demostrado que las características poblacionales (media del tamaño y concentración) de las EVs así como su contenido, varían dependiendo del estadio de desarrollo y calidad de cada embrión (Ferreira et al., 2013; Saadeldin et al., 2014; Mellisho et al., 2017; Simon et al., 2018). Basado en estos antecedentes se planteó la hipótesis que conllevó al diseño del sistema de diagnóstico desarrollado por Mellisho y colaboradores (2019).

A pesar de que los resultados obtenidos por Mellisho y colaboradores (2017; 2019) son interesantes y atractivos para proponer un sistema de selección embrionaria, para predecir la competencia embrionaria. Esto solo es posible determinando los porcentajes de predicción de implantación y desarrollo embrionario a término. Consideramos importante profundizar la información generada mediante el estudio de dos diferentes estadios del desarrollo embrionario y diferente origen *In vitro* e *In vivo*. Para lo cual nuestro estudio postuló que “Las características de la población de vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios durante la etapa de blastulación y eclosión reflejan su competencia de desarrollo *In vitro*”.

Creemos que la secreción de EVs de embriones competentes *In vitro* difieren de los embriones generados *In vivo*, y su capacidad de desarrollo se relaciona con embriones funcionalmente competentes. Por tanto, el objetivo fundamental de nuestra investigación fue determinar las características poblacionales (tamaño, morfología, concentración y perfiles de miARNs) de vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* durante la etapa de blastulación y eclosión, y su relación con la calidad embrionaria. Para mejorar la comprensión y sentar una referencia de qué las poblaciones de EVs y contenido de microARNs de embriones *In vivo* deberían tener los embriones *PIV* para ser considerados como competentes.

I. REVISION BIBLIOGRÁFICA

1. Vesículas Extracelulares (EVs)

Las vesículas extracelulares por definición son estructuras rodeadas por membranas, liberadas por la mayoría de los tipos celulares (Stoorvogel, 2015). El origen y fuente de las EVs es diverso por tanto su denominación se basa en varios tópicos como 1) el tamaño: micropartículas, microvesículas, nanovesículas, nanopartículas; 2) la fuente, por ejemplo a) células cancerígenas: oncosomas; b) tracto reproductivo masculino: epididimiosomas y prostasomas (Fabiani et al., 1994; Sullivan et al., 2005) d) tracto femenino: uterosomas (Martin-DeLeon, 2016), fluido oviductal: oviductosomas (Al-Dossary et al., 2013); 3) la función :vesícula de matriz calcificante, argosomas, tolerosomas; 4) y finalmente cuando salen fuera de la célula de origen en: ectosomas, exosomas, exovesículas, exosome-like vesicles) (Raposo & Stoorvogel, 2013). Sin embargo, para homogenizar la clasificación de las Evs se ha definido una terminología consensuada y que ha sido recomendada por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV- por su siglas en inglés) que las denomina como: microvesículas (MV), cuerpos apoptóticos (AB) y exosomas (EXs) que exhiben características morfológicas y funciones diferentes (Théry et al., 2018). Estos tres grupos de EVs se identifican por su tamaño y forma así: las MV son las vesículas más grandes, seguidas de AB y los EXs las más pequeñas. La ISEV definió que para identificar, clasificar y caracterizar las EVs se requiere determinar su distribución de tamaño y concentración, morfología y la presencia de marcadores moleculares de membrana y citosólicos específicos (Théry et al., 2018)lo cual se describirá posteriormente en este documento.

Las EVs del tipo MV/EXs son consideradas como mecanismos de comunicación inter-celular (Y. Chen et al., 2021). Las EVs (MV/EXs) portan diferentes tipos de moléculas bioactivas de señalización, como proteínas, ARN mensajeros (ARNm), miARN y ARN no codificantes (ARNip) (Théry et al., 2018) y lípidos (Raposo & Stoorvogel, 2013). La presencia de una membrana lipídica, protege estos cargos contra la degradación o inactivación en el entorno extracelular, conservando su estructura tridimensional y su actividad biológica (Colombo et al., 2014). Las EVs pueden alcanzar las células diana, las cuales pueden ubicarse en la vecindad o distantes, y su contenido puede modificar la función de las células receptoras mediante cambios en los patrones de expresión génica (O'Brien et al., 2020).

Las EVs se han identificado *In vivo* en todos los fluidos corporales, en el líquido amniótico, la orina y la sangre e *In vitro* en cultivos celulares (Tannetta et al., 2014; Abels and Breakefield, 2016; Simon et al., 2018; Van Niel et al., 2018). Con respecto al campo reproductivo, las Evs también se han identificado en el fluido folicular (Hengqin Wang et al., 2020), fluido oviductal (Lopera-Vasquez et al., 2017), fluido uterino (Hamdi et al., 2021) en el entorno endometrial (Nguyen et al., 2016), plasma seminal (Machtinger et al., 2016; Baskaran et al., 2020) y embriones pre-implantatorios bovinos, humano, porcinos y murinos (Saadeldin et al., 2015; Mellisho et al., 2017; Giacomini et al., 2017; Mellisho et al., 2019).

Los tres tipos de EVs difieren en sus características morfológicas y composición lo cual está determinado por su biogénesis. Las microvesículas se forman a partir de la membrana plasmática (Raposo & Stoorvogel, 2013). Los exosomas se forman en endosomas tempranos los que más tarde formarán los cuerpos multivesiculares (CM) que se unen a la membrana plasmática, y se liberan o forman el sistema endosomal-lisosomal (Colombo et al., 2014). No queda claro qué mecanismo selecciona un destino u otro de los CM, pero la inhibición de una vía aumentaría la otra (Alvarez-Erviti et

al., 2011). El camino intracelular de las CM hacia la membrana plasmática es regulado por varias proteínas SNARE y Rab (Rab2b, Rab5a, Rab9a, Rab27a, Rab27b) que regulan el tamaño y la localización intracelular (Ostrowski et al., 2010). Otras regulan la fusión de lisosomas con los CMV dando origen a los autofagosomas: Rab7 y Rab11 - SNARE VAMP7, VAMP3, VAMP8, syntaxina 11, syntaxina 8, HOPS, NSF y VTI1b (Luzio et al., 2014).

Los AB se generan y liberan de células en proceso de apoptosis o muerte celular en condiciones fisiológicas o patológicas (Poon et al., 2014). Los AB contienen moléculas propias de la célula que ha sufrido apoptosis (ADN, miARN, proteínas y lípidos) y por tanto se pueden diferenciar de las otras vesículas (Hauser et al., 2017). Este proceso está controlado por un desensamblaje de células apoptóticas, que implican factores moleculares distintos: ROCK1 y PANX1 (L. Jiang et al., 2017a).

Los tres tipos de EVs difieren en su tamaño y morfología; las MVs y AB son muy heterogéneas en forma, mientras que los EXs tienen una forma redonda con una hendidura o forma de copa (Théry et al., 2006; Kastelowitz and Yin, 2014). El tamaño de las EVs tiene un rango de 30 a 1000 nm. Las MVs son las de mayor rango (100-1000 nm), seguida por los AB (50-500 nm) y los exosomas las más pequeñas (30 a 120 nm) (Dragovic et al., 2011). Para medir las características físicas de EVs, como el tamaño y distribución, concentración y morfología, se emplean métodos y técnicas de microscopía electrónica (EM) o microscopía de fuerza atómica (AFM) de alta resolución. La densidad de los distintos tipos de EVs van desde 1.13 a 1.19 g/ml (Théry et al., 2009), con capacidad de flotar en gradientes de densidad (Colombo et al., 2014). La dispersión de luz se correlaciona con el tamaño, forma y composición de las EVs, que pueden ser medidos por citometría de flujo. Esta técnica no distingue correctamente entre partículas de otro origen, y EVs de tamaños inferiores a 300 nm (Latifkar et al., 2019). El análisis de citometría de flujo de alta sensibilidad detecta vesículas individuales

menores a 100 nm (Colombo et al., 2014).

Entre las técnicas analíticas más populares utilizadas en los estudios de vesículas extracelulares con énfasis en la caracterización de exosomas y microvesículas para determinar tamaño y concentración de las poblaciones de EVs está el análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA) (Szatanek et al., 2017). Su reproductibilidad aún no es óptima y no distingue una vesícula de un agregado proteico de tamaño similar (Colombo et al., 2014). La incorporación de microesferas de sílice minimiza la variabilidad de las fuentes de error (Gardiner et al., 2013). El método de NTA es rápido, sencillo y analiza grandes concentraciones de partículas de manera simultánea (Bachurski et al., 2019).

Las EVs en su cargo contienen paquetes integrados de moléculas que varían de acuerdo con el tipo de estructura celular. Transmiten mensajes simples a complejos desde el donante hasta las células diana (Lo Cicero et al., 2015). Participan tanto en procesos fisiológicos como de regulación de la respuesta inmune, células madre, morfogénesis de tejidos y función de gametos, así, como patológicos, que van desde aspectos como la progresión del cáncer, tumorigénesis y metástasis, hasta procesos neurodegenerativos (Jankovičová et al., 2020; Bebelman et al., 2018; Pegtel and Gould, 2019; Jankovičová et al., 2020; Hade et al., 2021).

El cargo de las EVs varía dependiendo de su origen y funcionalidad celular. En este contenido generalmente predominan los ARN no codificantes tales como tRNA, lncRNA (Long non-coding RNAs), miRNA, piwi- interacting RNA (piRNA) y nucleolar pequeños RNAs (snoRNA) y RNAm fragmentados (J. Zhang et al., 2015; Wang et al., 2016; Kang et al., 2021). Las EVs protegen a los miARNs de la degradación viajando largas distancias para modificar el fenotipo de una célula distante (Turchinovich et al., 2018; Hu et al., 2020). Los miARNs regulan la traducción del ARNm-blanco en las células

receptoras y la expresión génica (Abels and Breakefield, 2016). Las EVs también contienen ARN de mayor tamaño (<200 nucleótidos hasta 5 kb) siendo los ARNm los más abundantes (Karagkouni et al., 2021). Los ARNm se transfieren y se mantiene funcionales en las células receptoras donde son traducidos a proteínas.

La presencia o no de ADN en las EVs es contradictoria, varios grupos de investigación contraponen la razón biológica. Se sugiere que solo los AB contienen ADN fragmentado debido a los eventos típicos de la apoptosis celular. Sin embargo, otros autores han identificado ADN en poblaciones aisladas de MV/EXs (Kalluri, 2016). En los embriones (humanos) se ha identificado ADN genómico y mitocondrial (ADNg y ADNmt) en el medio de cultivo (X. Zhang et al., 2019), pero no está claro si se encuentra dentro de EVs (Pohler et al., 2017). Tampoco se conoce por qué los embriones u otros tipos celulares “empaquetarían” ADNg en EXs o EVs.

Las proteínas de EVs derivan principalmente de la membrana plasmática celular y citosol (D. Choi et al., 2020). Estas incluyen proteínas transmembrana y proteínas citosólicas. Esta constitución proteica es indicativa de su biogénesis y clasificación de cargo (Teng & Fussenegger, 2020). Las microvesículas las han asociado a proteínas transmembrana y los lípidos unidos a proteínas extracelulares (Stahl & Raposo, 2019). Los exosomas están enriquecidos con tetraspaninas como CD9, CD63, CD81 (Van Niel et al., 2018), y las microvesículas están enriquecidos con integrinas, selectinas y ligando CD40. Además, existen receptores de proteína transmembrana específicos como EGFRs y proteínas de adhesión EpCAM. Las proteínas intravesiculares participan en el tráfico de vesículas que están asociadas a EVs que incluyen proteínas citosólicas (TSG101, ALIX, anexinas y Rabs), proteínas citoesqueléticas (Actinas, miosinas y tubulinas), chaperonas moleculares (Proteínas de choque térmico / HSP), enzimas metabólicas (ejemplo: Enolasas, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa /

GAPDH) y proteínas ribosómicas (Théry et al., 2018; Van Niel et al., 2018).

2. Vesículas extracelulares en el sistema embrionario

Durante los últimos años se ha descrito, cada vez con mayor evidencia, el papel de las EVs en los eventos reproductivos, incluyendo el desarrollo de gametos y de embriones tempranos y mediando la interacción embrio-materna antes y durante la implantación (bovinos, porcinos y humana) (Fazeli, 2011; Saadeldin et al., 2014; Saadeldin et al., 2015; Almiñana and Bauersachs, 2019). Las EVs se han identificado como componentes de las secreciones oviductales (OF), como mediadores de las interacciones embrio-maternas a través de la transferencia de biomoléculas (Almiñana et al., 2017; Almiñana and Bauersachs, 2019). Las EVs obtenidas del OF de segmentos/cultivos de istmo añadidos al cultivo embrionario, tienen un efecto positivo en la tasa de blastocisto y los patrones de expresión de genes (AQP3, DNMT3A y SNRPNT) relacionados con el desarrollo del embrión, número de células, criotolerancia, y tasas de eclosión en bovino (Lopera-Vasquez et al., 2016).

Se ha reportado similares efectos de las EVs oviductales (OEVs) en ratones; estas alteran la expresión de genes BAX, BCL2, OCT4 relacionados con la apoptosis y la proliferación celular, teniendo un efecto positivo en la tasa de crías nacidas (Qu et al., 2018). En embriones bovinos de *PIV* cultivados con OEVs los patrones de expresión de IFNT y PLAC8 fueron similares a los *in vivo* (Lopera-Vasquez et al., 2017).

Mellisho et al., (2017) analizó por NTA los medios de cultivo de blastocistos individuales de día 7 y 9 e identificó que la distribución del tamaño de los EVs varió aproximadamente de 17 a 300 nm de diámetro, con descriptores de tamaño similares en embriones partenogénéticos. En humanos, los análisis por NTA de EVs del tracto reproductivo materno muestran que son

heterogéneos. Las EVs del líquido folicular humano es polidisperso, incluyen MVs y EXs, con un promedio de 220 nm y una concentración media de 72.7×10^6 EV / mL (Tannetta et al., 2014). En fluido folicular bovino las EVs presentan un tamaño inferior a 350 nm, con una gran población en el rango de tamaño de 50 a 250 nm en 3×10^{10} EV / mL (Hasan et al., 2021).

Se han identificado 272 miARNs y 184 miARNs contenidos en EVs en murinos y bovinos respectivamente (Almiñana and Bauersachs, 2019). En bovinos y murinos se sobreexpresaron miR-30b y miR-375. En bovino, (miR-30b, miR-375 y miR-503) se encontraron en EVs de líquido folicular (da Silveira et al., 2017), donde tiene lugar la maduración de los ovocitos (Sohel et al., 2013), mientras que solo se encontraron miR-30b y miR-375 en OEVs (Fereshteh et al., 2018; Almiñana et al., 2018). miR-375 se ha asociado con la modulación del metabolismo glucolítico y diferenciación celular en el embrión bovino temprano (Almiñana et al., 2017; Hinton et al., 2010). En canino, tres miARNs (miR-30b, miR-375 y miR-503) parece tener funciones en el crecimiento folicular y maduración de ovocitos (Lange-Consiglio et al., 2017). En el bovino 11 de 13 miARNs contenidos vesículas extracelulares oviductales están asociados a genes diana involucrados en el desarrollo embrionario pre y peri-implantatorio e implantacional (Almiñana and Bauersachs, 2019) y, 3 genes de miARN parecen tener un efecto mayor en el desarrollo de embriones, (*BCL2*, *CDK6* y *c-MYC*) (Liu et al., 2012a; Wang et al., 2017; Fereshteh et al., 2018).

Algunos estudios se han centrado en las EVs del medio de cultivo embrionario y líquido folicular para predecir la calidad de los ovocitos (McRae et al., 2013; Bracewell-Milnes et al., 2017). En el bovino los exosomas derivados de células inmunes y de otras células contienen lípidos bioactivos como prostaglandinas, leucotrienos y lisofosfolípidos que al igual que los miARNs pueden ser transferidos al embrión temprano, o desde el embrión a las células epiteliales

del oviducto a células diana específicas (Skotland et al., 2017; Sagini et al., 2018).

Existen una carga diferencial del contenido de las OEVs en etapa pre-ovulatoria (día 18 a 20) y postovulatoria (Día 1 a 17) en el ciclo estral bovino influenciado por eventos hormonales (Almiñana et al., 2018). Se identificaron 4 miARNs diferencialmente expresados (bta-miR-24-3p, bta-miR-10b-5p, bta-miR-429 y bta-miR-449a (Acuña et al., 2017; Almiñana and Bauersachs, 2019). El miR-423-3p es el único identificado para las EVs de las ovejas gestantes del día 14 (Burns et al., 2014; Burns et al., 2018), y miRNAs miR-7e, miR-7f y miR-451 identificado en líneas celulares endometriales epiteliales humanas (Greening et al., 2016).

Los miARNs secretados por embriones bovinos con diferentes patrones de división y desarrollo son: miR-30c (lenta), miR-10b (lenta e intermedia); miR-10b, miR-novel-113, miR-novel-44, miR-novel-45 y miR-novel-139 (blastocisto normal y degenerado) (Xiaoyuan Lin et al., 2019). miR-30c regula a la baja la expresión de *CDK12* y *MDBK* en embriones bovinos. *CDK12* es esencial para el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la estabilidad genómica (Juan et al., 2016; Chen et al., 2017). miR-30c se convierte en un posible candidato biomarcador para predecir la capacidad de desarrollo de los embriones tempranos bovinos (Xiaoyuan Lin et al., 2019).

Finalmente, la secreción de EVs secretadas por embriones y por células del tracto reproductivo asociados a gametos y embriones siguen siendo un campo relativamente reciente. Los microARNs se secretan de manera selectiva y emergen como importantes moduladores del desarrollo embrionario temprano, con capacidad de regular la traducción de ARNm y regulación de expresión génica de procesos fisiológicos y patológicos. El avance tecnológico ha sido importante y los desafíos que el sistema de estudio impone (aislar, identificar y caracterizar EVs), incluyendo el número

limitado de células de un embrión pre-implantatorio (100 a 150 células aprox. en estado de blastocisto) hacen que la comprensión de su regulación y función siga siendo insuficiente, Así mismo, las EVs de los medios de cultivo generan una contaminación que complica la evaluación de las EVs propias del embrión. Pese a las limitaciones descritas, las investigaciones de las EVs de embriones bovinos, porcinos y humanos (Ferreira et al., 2013; Saadeldin et al., 2014; Mellisho et al., 2017; Marin and Scott, 2018; Machtinger et al., 2021).

3. Desarrollo Embrionario

Posterior a la ovulación, la fecundación del ovocito se produce en el oviducto (ámpula). La fecundación induce la activación ovocitaria, desencadenando eventos importantes que permiten el inicio del desarrollo embrionario. La finalización de la meiosis en el ovocito conlleva a la liberación del segundo cuerpo polar, siendo este la primera manifestación morfológica de la fecundación. Posteriormente se forman dos pronúcleos haploides, uno materno y otro paterno, la principal evidencia de fecundación normal (Sin polispermia). Sin embargo, los pronúcleos solo se observan en aquellos ovocitos de citoplasma claro como en humanos, ratones y conejos (Balaban et al., 2001; Ogushi and Saitou, 2010; Kyogoku et al., 2018). La fusión de los pronúcleos da lugar a la formación del cigoto diploide (Sulovsky & Schatten, 2000), que precede a la primera división mitótica en el embrión. En mamíferos, el desarrollo embrionario puede dividirse en dos etapas trascendentales, la etapa pre-implantatoria y la etapa post-implantatoria y es seguido por la etapa de desarrollo fetal.

3.1. Etapa pre y peri – implantatoria

La etapa pre-implantatoria abarca el periodo desde la fecundación hasta la implantación, y la duración y características de esta etapa dependen de la

especie. Durante la etapa pre-implantatoria temprana el embrión sufre eventos críticos donde el control molecular así como el momento en que ocurre, se ajustan al programa de desarrollo de cada especie (Veronica Maillou et al., 2016). Después de la fecundación, el cigoto experimenta la primera división celular, más tarde la activación del genoma embrionario, compactación y la primera diferenciación celular que conlleva a la formación del blastocisto. Más tarde, el blastocisto eclosiona de la zona pelúcida y dará origen al concepto (embrión más membranas extraembrionarias) que se elongará en el lumen uterino precediendo a la implantación (Spencer, 2013). En ratones y humanos, esta etapa culmina con la formación del blastocisto. Sin embargo, en rumiantes, cerdos y caballos, la etapa pre-implantatoria abarca un periodo más largo, la etapa peri-implantatoria, donde el embrión sufre cambios morfológicos y moleculares relacionados con el mecanismo de reconocimiento de la gestación e implantación (Vejlsted et al., 2006). La receptividad uterina para el alargamiento e implantación del concepto se desarrolla en respuesta a P4 y se modifica en respuesta a los productos del concepto como las prostaglandinas (PG) e interferones (IFN) (Spencer, 2013). El interferón tau (IFNT), secretada por las células del trofoectodermo de embriones de rumiantes, anula el mecanismo luteolítico uterino para mantener los cuerpos lúteos funcionales para la producción de progesterona (P4). El IFNT, junto con P4, inducen la expresión de genes en el epitelio luminal uterino (ELU) y epitelio glandular superficial (EGS) para el transporte y/o secreción de histótrofos en la luz uterina para apoyar el crecimiento y desarrollo del concepto (Bazer et al., 2020).

Las primeras divisiones embrionarias conllevan a la formación de células totipotentes, las blastómeras (Milewski et al., 2018). Después de la fecundación, el genoma de ambos padres experimenta una remodelación epigenética extensa. En esta etapa las modificaciones epigenéticas constituyen un mecanismo pre-transcripcional de regulación de la expresión génica que cambian la estructura de la cromatina por la acción conjunta y

sinérgica de tres procesos: variaciones en los patrones de condensación de la cromatina, grado de metilación del ADN y modificaciones covalentes de las histonas (Eckersley-Maslin et al., 2018; R. Xu et al., 2021). La cromatina derivada de ambos gametos se desmetila casi completamente, para garantizar la totipotencia de las células embrionarias (Zhu et al., 2021). La totipotencia de estas células asegura que una célula simple pueda generar un individuo completo.

Las primeras divisiones celulares están bajo el control citoplasmático materno. Durante la ovogénesis se acumulan transcritos (ARNm y miARNs; 13.000 genes aproximadamente) y una gran cantidad de proteínas necesarias para las funciones celulares hasta la activación del genoma embrionario (Mineno et al., 2006; Tang et al., 2007; Graf et al., 2014); sin embargo, la expresión de los genes del cigoto está guiada por una fuerte transcripción y traducción del nuevo genoma (Viswanathan et al., 2009; Goossens et al., 2013). La primera división celular puede ser usada como un indicador de calidad ovocitaria, éxito de la fecundación y puede estar asociada a la calidad embrionaria siguiente (Terriou et al., 2007; Isom et al., 2012; Milewski and Ajduk, 2017). Embriones cuya primera división celular se ajuste al programa de desarrollo exhiben mayor potencial de desarrollo (Velker et al., 2012; Gutierrez-Adan et al., 2015). En humanos, divisiones celulares prematuras se correlaciona con una mayor incidencia de aberraciones cromosómicas, daño al ADN, y baja calidad embrionaria (Vandaele et al., 2007; Milewski and Ajduk, 2017; Milewski et al., 2018).

El segundo evento crítico del desarrollo temprano es la activación del genoma embrionario, lo cual está dado por la transición gradual del control materno al embrión, llamada también transición materno-embionaria (Graf et al., 2014). La activación principal del genoma embrionario se produce en un momento de desarrollo dependiente de la especie, se produce en el estadio de dos células en el ratón (Braude et al., 1979), en el estadio de cuatro a ocho células en el

humano (Braude et al., 1988) y en la tapa de ocho células en el bovino (Graf et al., 2014). Durante este periodo, las proteínas almacenadas en el citoplasma del ovocito son degradadas y se activa la transcripción del genoma embrionario. Errores en la activación del genoma provocan bloqueo del desarrollo embrionario (Meirelles et al., 2004; Ottolini et al., 2017). En el bovino durante la etapa de 8 células se activan 3.965 genes que codifican las funciones que incluyen la transcripción de ADN, procesamiento metabólico de las purinas, ubiquitinación proteica, traslación y procesamiento metabólico de ARN (Kaňka et al., 2009; Halstead et al., 2020). El estadio embrionario en que se produce la activación máxima de genes embrionarios (>actividad transcripcional) es entre 8 y 16 células (Kaňka et al., 2009; Graf et al., 2014). Posteriormente, en el estadio de 16 a 32 células ocurre la compactación de las blastómeras formándose la mórula compacta en bovinos. En esta etapa se produce la especificación celular donde la posición de las células dentro de la mórula define su destino, generando cambios en los patrones de interacción celular (Graf et al., 2014). En esta etapa que incluyen eventos como la redistribución de las microvellosidades, cambios en las uniones celulares, proliferación mitótica y polarización citoplásmica que más adelante contribuyen a la formación del blastocisto.

Hasta el estadio de mórula, se han producido eventos de divisiones celulares que conllevan a un estado de organización, orientación espacial y comunicación celular que inducen o facilitan la diferenciación celular para formar linajes de células molecularmente y espacialmente diferenciadas; el macizo celular interno-MCI que se convierte en células de linaje embrionario y extraembrionarios trofoectodermo-TE que da origen a la formación de la placenta (Viswanathan et al., 2009; Graf et al., 2014).

La primera diferenciación celular da lugar a cambios en los patrones de expresión génica que conlleva a cambios morfológicos que se evidencian con la formación de una cavidad llena de líquido, el blastocele. La aparición del

blastocelo define el inicio de la blastulación y la formación del blastocisto (Graf et al., 2014). Hasta este momento el embrión sigue su procesos de segmentación con aumento en los números celulares sin aumento de tamaño; no se evidencia aumento del diámetro embrionario (150 μm) (Holm et al., 2002). Sin embargo, a medida que aumenta el tamaño del blastocelo, el blastocisto se expande y comienza a aumentar su diámetro. En esta etapa, los embriones con una blastulación temprana se asocian con menor contenido de ADN mitocondrial (Ho et al., 2018), mayor calidad y capacidad implantatoria (Franasiak et al., 2018; Fryc et al., 2021), y mayor viabilidad de embriones criopreservados (L. Yu et al., 2017).

En este estadio (blastocisto) el embrión tiene alrededor de 120 células de las cuales, aproximadamente el 25 % pertenecen al MCI y el 75 % al TE (Morris et al., 2001). Además, los blastocistos permanecen dentro de la zona pelúcida y continúan expandiéndose o aumentando de tamaño a un diámetro de 200 μm y aproximadamente 160 células (Morris et al., 2001). Al día, 8 los blastocistos bovinos son eclosionan de la zona pelúcida y continúan expandiéndose hasta el día 13 donde adquieren una forma ovoide (Degrelle et al., 2005). En embriones bovinos las células del trofoblasto polar que rodean el MCI, desaparecen posterior a la expansión y protrusión del blastocisto (Degrelle et al., 2005). El segundo suceso de diferenciación (post eclosión del embrión), segrega los linajes celulares asociados al MCI en epiblasto e hipoblasto o endodermo primitivo (Maddox-Hyttel et al., 2003). El epiblasto formará todos los tejidos embrionarios así como ectodermo y mesodermo extraembrionarios, mientras que el endodermo primitivo formará parte del saco vitelino (Van Leeuwen et al., 2015).

Después de la eclosión, se inicia la etapa peri-implantatoria caracterizada por dos fases reconocidas como elongación temprana (entre los días 12-14 post fecundación; estadio ovoide) y elongación tardía (A partir del día 15 hasta la implantación; fase filamentosa) (Ramos-Ibeas et al., 2020). En el día 14 se

inicia la gastrulación donde las células del epiblasto del MCI dan origen al ectodermo, mesodermo y endodermo. Dos días más tarde, la capa celular del hipoblasto completa el revestimiento de la superficie interna del TE y juntos el epiblasto e hipoblasto forman el disco embrionario. Posteriormente los embriones se elongan hasta el momento de la implantación que se inicia al día 21 post fecundación, alcanzando aproximadamente 300 mm de longitud (Hue et al., 2001; Maddox-Hyttel et al., 2003). Durante el inicio de la elongación la proliferación celular es dinámica y activa siendo mayor las interacciones célula-célula y célula-matriz al final de la elongación (Ushizawa et al., 2004).

En esta etapa las células del trofoblasto se diferencian a células mononucleares y binucleares (Células gigantes del trofoblasto-CGT). Las células mononucleares contribuyen en el pase de una única mitosis acitocinética de células de trofoblasto a la formación de la placenta y a la producción mayor de interferón tau-IFNT, para el reconocimiento de la preñez, desarrollo embrionario, implantación y modulación de la placentación posterior a la implantación (Mathew et al., 2022). Las células gigantes pueden alcanzar un contenido de ADN superior y representan el 20% de las células del trofoblasto, estas migran a través de las uniones feto-maternas y se funden con las células del epitelio uterino (Klisch et al., 1999). Las células gigantes producen proteínas de gestación como: glicoproteínas, lactógeno placentario y proteínas relacionadas con la prolactina (Spencer and Bazer, 2002; Nakano et al., 2001).

3.2. Control genético

La regulación de la expresión génica del embrión pre y peri-implantatorio es fundamental para asegurar el correcto desarrollo, permitiendo la transición de un genoma (de los gametos) extremadamente diferenciado a uno totipotente y posteriormente los eventos paulatinos de diferenciación celular. La

regulación de la expresión génica en el embrión está mayormente controlada por mecanismos epigenéticos que incluyen el remodelamiento de la cromatina, cambios en los patrones de acetilación de histonas y metilación del ADN (Niemmnn y Wrenzcki., 2000; Eckersley-Maslin et al., 2018; R. Xu et al., 2021). Luego de la fertilización, el genoma embrionario sufre una desmetilación pasiva del ADN que continua hasta la formación de la mórula y más tarde comienza la metilación de novo en estadio de blastocisto (Graf et al., 2014).

Hay dos fases cinéticas de control genético del desarrollo embrionario pre-implantatorio a) una primera fase de síntesis de proteínas controlada por el ARNm acumulado en la maduración ovocitaria, y b) una fase subsiguiente cuando el genoma embrionario es activado y hay una traducción de ARN controlado por el nuevo genoma (Q. Xu & Xie, 2018). Durante la transición materno-cigótica se presentan algunos eventos demandados en la etapa pre-implantatoria del embrión como a) degradación de los transcriptos maternos del ovocito, b) reemplazo de los transcriptos maternos en el ovocito por nuevos transcriptos y c) reprogramación del patrón de expresión génica en el embrión (Wrenzycki, 2018). Se han identificado genes involucrados en la activación transcripcional como: KDM3A (Lysine Demethylase 3A), SMARCA4(Mitotic Growth And Transcription Activator), PRDM9 (Histone-Lysine N-Methyltransferase), KDM6A (Lysine-Specific Demethylase 6A), y en la represión transcripcional: HELLS (Lymphoid-specific helicase), EED (Embryonic Ectoderm Development), KDM^B (Histone lysine demethylase), MBD4 (Methyl-CpG Binding Domain 4), HDAC (Histone deacetylases), KDM5A (Lysine Demethylase 5^a), HDAC2 (Histone deacetylase 2) (Hosseini et al., 2015).

En ratones, bovinos y conejos, la principal activación del genoma es precedida por una menor transcripción embrionaria en un entorno transcripcionalmente represivo (Haaf, 2006). En el bovino esta ocurre en el estadio de dos células

(Graf et al., 2014). Los embriones sufren un estado de represión para dar inicio a la activación transcripcional del genoma, por tanto una falla en la regulación puede detener el desarrollo embrionario (Latham, Keith, 2001). En esta etapa se produce una programación epigenética sin alterar la secuencia del gen que va coordinando el crecimiento y desarrollo progresivo y futuro del embrión (E. Li, 2002). Estas modificaciones epigenéticas remodelan la cromatina y dan acceso a los factores reguladores de la transcripción para el control de la expresión génica (Fulka et al., 2008). En el bovino, por ejemplo, la transcripción primero ocurre para 390 genes en la etapa de cuatro células, 3.965 genes en la etapa de ocho células, 628 genes en la etapa de 16 células y 1.865 genes en la etapa de blastocisto (Graf et al., 2014).

En el bovino la activación del genoma embrionario implica una degradación masiva de los ARNm maternos que se almacenaron durante el evento de la ovogénesis por la acción de miRNAs. DICER, que es la ribonucleasa encargada de procesar miRNAs para que sean capaces de reconocer el 3'UTR del ARNm y bloquear su traducción. La expresión del gen DICER en el bovino promueve su propia regulación, tiene un patrón de expresión correspondiente a un ARNm materno que es regulado inhibitormente por el bta-miR-19a, que es él mismo DICER que lo generó (Burrola-Barraza et al., 2011). El gen DICER se expresa desde el ovocito inmaduro, maduro y en el embrión de 2-4 células, coincidiendo con la activación del genoma embrionario, luego decae en el embrión de 8-16 células y vuelve a expresarse en la etapa de mórula (Pennetier et al., 2006). Asimismo en el bovino se ha demostrado que los ARNm maternos como Nobox y Nmp2 se regulan inhibitoriamente vía los miARNs-196a y 181a, respectivamente (Lingenfelter et al., 2011; Tripurani et al., 2011).

Las totipotencia en las células embrionarias se mantiene por la acción de los factores de transcripción como OCT4/POU5F1 y SOX2 (Li, 2002; Wu et al., 2013). En la mayoría de los mamíferos la expresión de OCT4 es necesaria

para la correcta formación y supervivencia embrionaria (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000; Wu et al., 2003; Wuensch et al., 2007; Wu et al., 2013). El rol de OCT4 es el mantenimiento de la pluripotencia y del estado no diferenciado de las células madre bovina, humana, porcina y murina (Niwa et al., 2000; Wuensch et al., 2007; Graf et al., 2014).

En bovinos, los transcritos de OCT4 maternos están presentes en el ovocito bovino y disminuyen en abundancia hasta el estadio de 8 a 16 células, cuando se produce la activación del genoma embrionario (Graf et al., 2014; Wuensch et al., 2007), aumentando nuevamente en el estadio de mórula de día 5 (Wuensch et al., 2007; Kurosaka et al., 2004). A diferencia de lo que ocurre en murinos, en los embriones bovinos OCT4 se expresa tanto en el MCI como en el TE. En bovinos, OCT4 no es necesario para inducir la represión de CDX2 en el MCI en el momento de la formación del blastocisto bovino (Ralston & Rossant, 2008) y se co-expresa con CDX2 en el TE hasta la etapa filamentosa de la elongación (Kurosaka et al., 2004; Degrelle et al., 2005; Keefer et al., 2007).

OCT4 y SOX2 forman un complejo que induce la expresión de NANOG en el MCI, y juntos mantienen el estado de pluripotencia de las células embrionarias y de las células madre (Kurosaka et al., 2004; Degrelle et al., 2005). Luego, la segunda diferenciación del MCI para que se forme el epiblasto e hipoblasto sucede en el periodo de elongación del conceptus y está regido por los factores de pluripotencia. Las células del epiblasto al comienzo de la diferenciación del segundo linaje fallan en ausencia de OCT4 (Bolmberg et al., 2008; Simmet et al., 2018).

Estudios de Rodríguez, (2010) describen que la expresión de NANOG en embriones por *PIV* aumentan significativamente desde el día 7 al día 17 de desarrollo. Este factor de transcripción no es silenciado y participaría en eventos del periodo peri-implantatorio durante la fase más tardía de la

implantación a diferencia de OCT4 cuya expresión disminuye al final de la elongación (Rodríguez-Alvarez et al., 2010b). La expresión de OCT4 por las células del trofoblasto median la expresión de FGF4 y de NANOG, que evitan una diferenciación prematura del trofoblasto sin llegar a interferir los primeros episodios de la elongación (Degrelle et al., 2005).

En el bovino CDX2 cumple la función de especificación del trofoblasto respecto a las células del ICM; CDX2 se expresa en las células de TE y no en el MCI, y no es capaz de inhibir la expresión de OCT4 en el trofoblasto (Kuijk et al., 2008). Hand1 o Ets2 en el bovino son factores de transcripción que se expresan en tejidos extraembrionario en etapas posteriores a la elongación (Degrelle et al., 2005; Simmet et al., 2018).

En embriones de bovino en la etapa pre-implantatoria y posterior a la gastrulación, se presenta una expresión génica espacio-temporal para BMP4; BRACHYURY; CERBERUS1, CRIPTO, OMESDERMIN, FURIN Y NODAL (Van Leeuwen et al., 2015). En bovinos MASH2 es expresado mayormente en el trofoectodermo (proliferación) antes de la implantación y en la placenta (Arnold et al., 2006). HAND1 no se detecta sino hasta el estadio ovoide en el día 12 (Diferenciación del trofoectodermo) (Degrelle et al., 2005).

Otras proteínas secretadas por el embrión cuya expresión aumenta a medida que el embrión se elonga son: prostaglandina sintetasa (PGHS-2) e inhibidores de proteasas de la familia TKDP (Macleay et al., 2003; Rodríguez-Alvarez et al., 2009). Para la implantación es necesaria una apropiada comunicación y regulación recíproca entre el embrión y el endometrio/epitelio uterino/útero; varias proteínas secretadas por el trofoblasto son proteínas asociadas a la preñez (PAG), las cuales son expresadas en las células gigantes del trofoblasto (CGT) alrededor de los días de la implantación (Arnold et al., 2006).

4. Comunicación embrio-materna

4.1. En el oviducto

Durante el desarrollo temprano, el embrión transita a través del oviducto y llega al útero donde ocurre la implantación. El embrión bovino transita por el oviducto durante los primeros 4 días de desarrollo, alcanzando el útero en estadio de 16 células (Wolf et al., 2003). Por tanto, el oviducto es el primer entorno al que se expone el embrión durante el desarrollo temprano, por lo que se considera relevante identificar señales tempranas del intercambio entre el embrión y la madre (Veronica Maillo et al., 2015).

El oviducto tiene la capacidad de soportar el desarrollo embrionario, incluso entre especies (D. Rizos et al., 2010). En bovinos, ovinos y ratones se ha visto que el oviducto genera un efecto positivo sobre la calidad de los embriones producidos *In vitro*, en términos de morfología, expresión génica, criotolerancia y tasa de preñez post transferencia (Rizos et al., 2002, 2008; Maillo et al., 2016).

En el pasado se asumió la idea que el embrión durante su tránsito por el oviducto no transmite señales que puedan modificar el ambiente materno, definiendo que la comunicación materno-embriónica y el entorno de uterino están controlados principalmente por el sistema endocrino y por tanto durante esta etapa la comunicación sería unidireccional (madre a embrión) (A. Fazeli, 2011). Sin embargo, hoy se ha demostrado que esta comunicación es bidireccional, y que los mecanismos involucrados en esta comunicación embrión-materna aún son en gran parte desconocidos (Almiñana et al., 2018; Almiñana and Bauersachs, 2019; Fazeli and Pewsey, 2008; Lonergan et al., 2016; Maillo et al., 2015, 2016).

El oviducto está espacialmente y temporalmente regulado por hormonas y

por factores paracrinos (Factores de crecimiento, etc) liberados tanto por la madre, como por gametos y embriones. En otras especies como en la equina, el transporte oviductal es selectivo, los ovocitos no fertilizados se retienen en el oviducto (Klein, 2015). El embrión fertilizado produce prostaglandina E2 que favorece su transporte hacia el útero. En humanos, el factor activador de plaquetas derivado del embrión está involucrado en el control del transporte del oviducto al útero (Velasquez et al., 2001).

En porcino, el embrión durante el período de pre-implantación genera un efecto sobre las células de oviducto incidiendo en la expresión génica (Almiñana et al., 2012; Almiñana and Bauersachs, 2019), e induciendo respuestas metabólicas y transcriptómicas (Hamdi et al., 2018; Hamdi et al., 2019), concordando con el efecto localizado de los embriones bovinos sobre las células oviductales (Córdova et al., 2014; Maillo et al., 2015, 2016). Se describieron 35 genes diferencialmente expresados en el oviducto ipsilateral/contralateral de vaquillas cíclicas de día 3.5 y en estro/diestro (Día 12) (Bauersachs et al., 2004). En cerdos los genes relacionados con el sistema inmunológico contribuyen a la tolerancia materno-embionaria durante su paso a través del oviducto hacia el útero. Muchos de los genes expresados en el cuerno uterino en respuesta al embrión están relacionados con el sistema inmunológico. Por tanto, la presencia del embrión en el tracto materno regula las respuestas inmunitarias locales del sistema inmunitario innato del tracto materno preparándolo para la implantación (Carmen Almiñana et al., 2012).

4.2. Modelos in vitro en la interacción embrión-oviducto

El líquido oviductal contiene hidratos de carbono simples y complejos, iones, lípidos, fosfolípidos y proteínas etc. (Hamdi et al., 2018). Algunos son sustratos metabólicos como el lactato, piruvato, aminoácidos y glucosa, cuyas

concentraciones difieren de las del líquido uterino y del suero sanguíneo (Maillo et al., 2016). En este sentido, se ha evidenciado un efecto positivo del fluido oviductal (OF) sobre las tasas del rendimiento de blastocistos bovinos producidos *in vitro* (Cebrian-Serrano et al., 2013; Lopera-Vasquez et al., 2017) y en cerdos (Lloyd et al., 2009).

El uso de modelos *In vitro* proporciona evidencia de las interacciones fisiológicas embrión-maternas y mecanismos que son difíciles de estudiar *in vivo*. El intercambio de señales entre el embrión y el oviducto es notable, aunque los mecanismos moleculares involucrados en esta comunicación en la actualidad son en su mayoría desconocidos (Alireza Fazeli & Pewsey, 2008). Con el objetivo de imitar el entorno uterino y estudiar las interacciones tempranas oviducto-embrión se han descrito varios sistemas de cultivo de embriones *In vitro* (IVC) (Almiñana and Bauersachs, 2019), mediante el uso de concentraciones de fluido oviductal (FO) y/o fluido uterino (FU), suero fetal bovino SFB y suero albumina bovina (SAB) (Hamdi et al., 2018). Estos sistemas han mejorado el desarrollo de los embriones, mejorado el control de la metilación y regulación de la actividad antioxidante. Los blastocistos mostraron una regulación positiva de genes epigenéticos (ADN metiltransferasa 3 alfa) y del receptor del factor de crecimiento tipo insulina 2, y disminución de la expresión de los genes del estrés oxidativo (Glutation peroxidasa GPX1 y del canal intracelular del cloruro CLIC1) (Hamdi et al., 2018).

También el sistema de cultivo en células epiteliales oviductales (BOEC) (van der Weijden et al., 2017) fluido oviductal bovino y EVs (Istmo) en sistema BOEC (Lopera-Vasquez et al., 2016, 2017) han ayudado a determinar efecto en el desarrollo y la calidad de los embriones (Número de células y criosobrevivencia). Los patrones de expresión génica variaron para PAG1 (Proteína relacionada con la implantación) para los embriones cultivados con EVs en presencia de FCS y para Interferon - tau (IFNT), PLAC8, PAG1, CX43,

GAPDH, G6PD en ausencia de FCS. Por tanto, las Evs de FCS tienen un efecto perjudicial sobre la calidad del embrión. La función biológica de los niveles de expresión de estos genes está asociada a gestación tardía, gestación media, TE funcional, desarrollo fetal exitoso, desarrollo placentario, interacción feto-materna, compactación y la adhesión de célula a célula, mayor criotolerancia, metabolismo energético, proliferación celular y desarrollo más rápido de embriones masculinos en comparación con las hembras (Wrenzycki et al., 2003; Gutiérrez-Adán et al., 2004; Wrenzycki et al., 2005; El-Sayed et al., 2006; Hashizume et al., 2007; López-Gatius et al., 2007; Nicholls et al., 2012; Machado et al., 2013). Los embriones bovinos en etapa de desarrollo de 2 a 8 células afectan localmente por contacto directo y a través de sus secreciones el transcriptoma de BOEC, alteran su expresión y la de NFE2L2, GPX4, SMAD6, IGFBP3, ROCK2 y SCN9A, siendo la respuesta de BOEC específica de la etapa del embrión presentando diferencias entre los embriones de 2 y 8 células (Lopera-Vasquez et al., 2016; Almiñana and Bauersachs, 2019).

Son escasos los reportes de EVs en el tracto reproductivo de las hembras, y a la fecha se ha identificado EVs oviductales (OEVs) en el fluido oviductal de diferentes especies como ratón (Al-Dossary et al., 2013; Fereshteh et al., 2018), vaca (Lopera-Vasquez et al., 2016; Almiñana et al., 2017), mujer (Almiñana et al., 2017; Harris et al., 2020), gallina (Huang et al., 2017), perra (Lange-Consiglio et al., 2017) y tortuga (Waqas et al., 2017). Sin embargo, poco se sabe sobre el contenido molecular de la OEVs y de las funciones asociadas en comparación con otras EVs como las uterinas o de líquido folicular. Pocos estudios han demostrado que los OEVs pueden ejercer un efecto funcional sobre el desarrollo del embrión y la criotolerancia (Lopera-Vasquez et al., 2016; Almiñana et al., 2017). y de aumentar la tasa de gestación y de natalidad (Qu et al., 2019) Solo tres estudios han aportado información respecto a la carga molecular de la OEVs (Fereshteh et al., 2018; Almiñana et al., 2018). La escasa información sobre los OEVs enfatiza la

necesidad de un análisis más profundo de su composición molecular y efectos funcionales. Las EVs podrían actuar como mediadores en el sistema de comunicación bidireccional en oviducto y útero regido por su contenido (miARNs, Proteínas y ARNm). En bovinos se sugiere que las EVs embrionarias podrían participar en mecanismos moleculares que median interacciones embrio-maternales y de la competencia embrionaria (Kropp and Khatib, 2015; Saadeldin et al., 2015; Mellisho et al., 2017). Sin embargo, aún son pocos los trabajos sobre la secreción de las EVs embrionarias en la especie bovina que mejoren su comprensión y el rol que estas desempeñan en el área reproductiva; además se desconoce en gran parte los mecanismos por los cuales estas secreciones (EVs) y sus cargos podrían modular (positiva o negativamente) los eventos pre y peri-implantatorios/materno-embrionaria y su relación con las tasas de implantación.

4.3. En el útero

En el establecimiento de la preñez la comunicación es fundamental (Embrión-útero y membranas extraembrionarias asociadas). Los mecanismos de señalización embrio-maternal, permiten la prolongación funcional del cuerpo lúteo, la transición epitelio mesenquimal y la diferenciación endometrial antes de la implantación (Spencer et al., 2013). La expresión diferencial de miARN y sus ARNm objetivo en el endometrio antes del reconocimiento materno se asocia con la receptividad endometrial que es requisito previo para la implantación y preñez exitosa del embrión. En el bovino se ha identificado microARNs expresados diferencialmente entre los días 3 y 7 del ciclo estral (miR-1290, mir-3437, miR-1290, miR-3437, miR-1246, miR-486, miR-3107 y miR-382), que difirió con receptividad endometrial alta o baja (miR-3902-3p, miR-1825, miRH14-3p, miR-885-3p, miR-504-30 y mir-183) o que difería con pre y post transferencia del embrión: (miR-449a/b/c, miR-138, miR-138, miR-874, miR-4342, miR-2231 y miR-2751) (Ponsuksili et al., 2014).

La Progesterona (P4) e INTT incide en los cambios en la expresión de genes en el tejido endometrial (TE) que están asociados a los eventos del ciclo estral, de gestación y del embrión. En el bovino la expresión de ARSA, MUC13, NXPH3 y PENK aumenta con las etapas de avance del ciclo estral y de la gestación temprana. De manera similar la expresión de LCAT, NCDN, NMN, PLIN2 y TINAGL1 aumenta durante la fase luteal tardía, y con la presencia del concepto aumenta significativamente su expresión. En contraste disminuye la expresión de APOA1, DCN y NPNT en gestantes (Forde and Lonergan, 2012; Forde et al., 2013).

El ambiente uterino es rico en moléculas de señalización celular denominadas embriocinas, que regulan el desarrollo del embrión bovino, promueven la transición de la mórula a blastocisto y programan su desarrollo posterior (Tríbulo et al., 2018; Hansen and Tríbulo, 2019). Las embriocinas incluyen el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1, el factor 2 estimulante de colonias (CSF2) y el inhibidor de la vía de señalización WNT. Las respuestas de los embriones a CSF2 exhiben un dimorfismo sexual de la función postnatal causada por señales maternas que regulan a los embriones masculinos de manera diferente que a los embriones femeninos. Algunas causas de infertilidad también tienen implicancia con la secreción aberrante de embriocinas (Hansen and Tríbulo, 2019).

Por su parte, el embrión debe inducir las señales necesarias para mantener las condiciones maternas que garantizan la implantación. Estas señales incluyen interacciones físicas y moleculares cuya función es inhibir la lisis del cuerpo lúteo y mantener la secreción de progesterona. Entre esas señales está el interferón tau (IFNT), que tiene propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras al igual que otros interferones de tipo 1 como el IFN alfa; sin embargo, IFNT es la señal de reconocimiento de preñez antiluteolítica exclusiva de los rumiantes. P4 e IFNT actúan de manera cooperativa para estimular la expresión de genes para el crecimiento y

desarrollo del conceptus (Spencer, 2013; Bazer et al., 2020). Se ha descrito que los miARN presentes en el fluido uterino en varias especies como humanos, ovinos, porcinos y bovinos, modulan la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la diferenciación celular, modulación inmune y el reconocimiento materno de la preñez (Wolf et al., 2003; Burns et al., 2014; Burns et al., 2018).

En especies de implantación tardía como equinos, porcinos y rumiantes, la señalización molecular es fundamental para mantener la receptividad endometrial, no obstante, los mecanismos de reconocimiento de la gestación varían entre especies. En equinos, la formación y disolución de la cápsula del blastocisto más la migración prolongada en el útero es esencial en la comunicación embrio-materna, para el reconocimiento de la gestación y supervivencia embrionaria (Klein, 2015). En rumiantes la elongación del trofoblasto garantiza mayor número de células secretoras de moléculas de señalización (IFNT) y mayor superficie de contacto para la implantación (Ealy & Wooldridge, 2017).

En rumiantes la secreción de IFNT es la principal señal molecular en el reconocimiento materno de la preñez (Shirasuna et al., 2015; Estepa et al., 2020). Este evita la secreción de PGF2 α inducida por los pulsos de oxitocina en el endometrio, impidiendo la luteólisis. IFNT se une a los receptores de IFN tipo I endometriales que activan los transductores de la señal Janus tirosina quinasas (JAK) y la vía de transcripción (STAT) (Imakawa et al., 2017). Este evento regula a la baja los receptores de oxitocina y estradiol 1 α (RE α) en el epitelio glandular y luminal del útero. Paralelamente al INFT la IL-1 β suprime la respuesta inmune materna en la vaca, que incluyen la reducción de la expresión de las principales proteínas de histocompatibilidad por parte del trofoblasto; reclutamiento de macrófagos al endometrio gestante, y la modulación de genes relacionados con el sistema inmunitario en respuesta a la presencia del producto de la concepción (Bolmberg et al., 2008; Oliveira et

al., 2012). Las citocinas tipo IL-1 β controlan el estado pro-inflamatorio en respuesta a la lesión tisular, por lo tanto, durante la gestación, el control de las reacciones inflamatorias es crucial para una correcta implantación y placentación (Ealy & Wooldridge, 2017). *In vitro* el IFNT inhibe la proliferación de linfocitos en bovinos - (Skopets et al., 1992) y en ovejas (Tekin et al., 2000), lo que podría contribuir al desarrollo de la tolerancia materna hacia el concepto en el embarazo temprano.

La placentación en bovinos es no invasiva; la placenta es un órgano fetal único (aloinjerto completo) que mantiene contacto esencial y constante con el sistema inmune y vascular de la madre (Haeger et al., 2016). El sistema vascular materno sufre de las necesidades nutricionales al feto que paralelamente progresa en su desarrollo junto con el sistema inmune materno (Ott, 2019). Se ha indicado que las EVs placentarias modulan mecanismos de adaptación materna para mantener una gestación (Salomon et al., 2014). Estas EVs secretadas por células maternas pueden cruzar la barrera placentaria para infiltrarse a los tejidos embrionarios. Las EVs embrionarias también atraviesan la barrera placentaria, pudiendo ser consideradas como parte del sistema inmune del feto. Una gestación normal se caracteriza por una alta circulación de EVs positivas a FasL (Ligando del receptor de muerte celular) (Tong et al., 2018). Las células trofoblásticas secretan EVs que exponen FasL, que neutraliza el sistema inmune e induce la muerte de células T activas (Gardner et al., 2013). En humanos las EVs del sincitiotrofoblasto inducen la producción de citoquinas pro - inflamatorias en concordancia con la respuesta inflamatoria durante una gestación normal (Yang et al., 2019).

5. Producción de embriones *In vitro*

La producción *In vitro* (PIV) de embriones es una tecnología muy útil para estudiar el desarrollo embrionario temprano desde una perspectiva aplicada

para mejorar la eficiencia de programas genéticos y reproductivos de los rebaños comerciales (Pontes et al., 2009; Pontes et al., 2011; Rasmussen et al., 2013). El problema sustancial que enfrenta esta tecnología es su baja eficiencia. Los reportes indican una eficiencia no mayor del 40% en la tasa de producción de blastocistos a partir de ovocitos inmaduros, y tasas de preñez inferiores al 45% post transferencia de embriones *PIV* (Peter W. Farin et al., 2006; Do et al., 2018).

La *PIV* en bovinos considera tres pasos para su desarrollo, la maduración *In vitro* (MIV), fecundación *In vitro* (FIV) y cultivo de embriones *In vitro* (CIV). Su eficiencia ha sido evaluada por varios parámetros, sin embargo, el número y calidad de los blastocistos producidos al día 7 después de la fecundación/maduración es un marcador determinante de la eficiencia de los sistemas. La *PIV* de embriones se desarrolló como un perfeccionamiento de la producción *In vivo* de embriones a partir de hembras superovuladas e inseminadas (*IVV*), sin embargo, los embriones *PIV* muestran un potencial de desarrollo y supervivencia post transferencia inferior a la exhibida por los embriones *IVV*. La mayor sobrevivencia y capacidad del desarrollo embrionario se atribuye a los embriones producidos in vivo (Rizos et al., 2017). En bovinos, se estima que la eficiencia de maduración *In vitro* (profase I a metafase II) es aproximadamente del 90%, la tasa de fecundación de los ovocitos maduros se estima en un 80% en términos de segmentación a dos células, y de éstos, un 30-40% de los embriones alcanzan un estadio de blastocisto transferible (Rizos et al., 2002; Sirard, 2011; Do et al., 2018). Aunque la eficiencia de la producción de embriones *In vitro* está en función de las crías nacidas, esta es muy variable porque además del proceso mismo, es afectada por factores que incluyen la edad, condición corporal, nutrición, fisiología y raza (Cebrian-Serrano et al., 2013).

Las oportunidades creadas por la tecnología *In vitro* de embriones no se han aprovechado completamente. El embrión de *PIV* es considerado diferente en

ciertos aspectos comparado con los generados *In vivo*. Los embriones *PIV* presentan diferencias moleculares a nivel de las blastómeras, alteraciones en la metilación del ADN (Malpotra et al., 2022; Uysal et al., 2022), el transcriptoma y el lipidoma (Driver et al., 2012), comparado con los embriones *IVV*, lo que puede reducir su competencia funcional, ya que estos eventos tienen el potencial de reducir las tasas de implantación y de gestación en los embriones transferidos a las receptoras (Peter W. Farin et al., 2006).

5.1. Sistemas de producción de embriones

Las tecnologías de reproducción asistida (TRA) incluyen factores tecnológicos y biológicos específicos. Los sistemas de producción de embriones *In vitro* para la maduración de ovocitos, la fertilización y el cultivo de embriones tienen el potencial para un uso más generalizado en programas de reproducción bovina. Los embriones *PIV* pueden diferir significativamente en morfología y capacidad de desarrollo en comparación con los embriones producidos *In vivo*.

Los sistemas *PIV* mantienen particularidades inherentes, clasificados de acuerdo con el uso de la técnica y a los objetivos que se persigan. En las dos últimas décadas, la transferencia de embriones *PIV* de bovinos ha tenido un avance vertiginoso pese de la variabilidad y poca eficiencia de sus resultados (Havlicek et al., 2010), respecto a los embriones *IVV* en los sistemas productivos y en el comercio global de la genética.

El potencial de los ovarios de vacas (*Bos taurus*) constituyen una fuente abundante y poco explotada de germoplasma (Silva-Santos et al., 2011). En estado natural, menos del 0,1% de los folículos de hembras bovinas llegan a ovular (Silva-Santos et al., 2014). En consecuencia, una de las formas de intensificar el uso del germoplasma de una hembra valiosa (alto merito genético) es recuperar los ovocitos en forma más intensiva, a través de

aspiración folicular (Ovum Pick-Up; OPU) para producir embriones *PIV*. Actualmente la *PIV* es la más empleada en los programas reproductivos en bovinos. De hecho, cada año se producen globalmente 1,521.018 de embriones en el mundo (Viana, 2022).

Los embriones *In vitro* vs. *In vivo* presentan diferencias morfológicas incluyendo el color del citoplasma (Abe et al., 1999), composición de las gotas de lípidos (Fair et al., 2001), contenido mitocondrial (Noguchi et al., 2020), menor cobertura de microvellosidades y diferencias en la proporción entre MCI/TE (Rizos et al., 2002). Los blastocistos de *PIV* muestran mayor incidencia de apoptosis en las células del MCI (Poon et al., 2014). Además, presentan alteraciones del metabolismo de lípidos (Heras et al., 2016), baja tasa de supervivencia después de la crio-preservación (Leibo & Loskutoff, 1993), mayor incidencia de anomalías cromosómicas y expresión génica (Driver et al., 2012; Duan et al., 2019).

Se ha demostrado también que los sistemas de cultivo *In vitro* alteran la expresión génica del embrión en desarrollo (Wrenzycki et al., 2005; Rodríguez-Alvarez et al., 2009; Rodríguez-Alvarez et al., 2010a,b; Velasquez et al., 2016), y el transcriptoma embrionario (Corcoran et al., 2006; Côté et al., 2011; Driver et al., 2012; Heras et al., 2016). En consecuencia, los embriones *PIV* están más expuestos a modificaciones en los controles de su desarrollo que los embriones *IVV* producto de la influencia de factores asociados al medio de cultivo y de los procesos asociados (Rizos et al., 2002; Gardner and Lane, 2005).

5.2. Efecto del sistema de cultivo sobre el desarrollo embrionario

Una gran cantidad de estudios refieren a diferentes sistemas de cultivo embrionario que en dependencia de la especie, laboratorios y equipo humano reflejan diferentes tasas de éxito. El uso de sistemas como el co-cultivo se

han empleado frecuentemente para aportar al embrión de los requerimientos que él requiere para su desarrollo (Goovaerts et al., 2009; Cordova et al., 2014). Para dilucidar los mecanismos que intervienen en el desarrollo embrionario y los efectos de los factores embriotróficos adicionados a los medios de cultivo *In vitro* se ha desarrollado el uso de células somáticas y células epiteliales oviductales (OEC) para co-cultivo de embriones bovinos. El objetivo fue mejorar las tasas de eficiencia de producción de blastocistos e interacciones materno-embriónicas (Cordova et al., 2014). Esto advierte efectos positivos y adversos como a) las células secretan factores embriotróficos, como factores de crecimiento que favorecen el desarrollo y, otro negativo b) las células consumen elementos necesarios y liberan sustancias de desecho potencialmente dañinas para el desarrollo del embrión (Penitente-Filho, 2015). Otros autores describen que el sistema de co-cultivo podría enmascarar la identidad de los compuestos liberados por el embrión en la interacción entre el medio y las células (Lopera-Vasquez et al., 2016).

Teniendo en cuenta su importancia, se han desarrollado muchos ensayos para formular el medio de cultivo óptimo para la *PIV*, sin embargo, no ha habido un progreso significativo en las tasas de desarrollo a blastocistos (Santos et al., 2021). Varios suplementos han sido incorporados al CIV entre ellos el suero fetal bovino (SFB), el cual aumenta las tasas de eclosión y protege a los embriones contra el estrés oxidativo (Hamdi et al., 2018). Otro suplemento usado es la albumina sérica bovina (ASB) que incrementa las tasas de blastocistos sin alterar la calidad del embrión en términos de apoptosis, acumulación de lípidos y gestación (Heras et al., 2016). Se describe que los embriones *In vitro* producidos en un medio suplementado con SFB presentan cinco veces el número de genes expresados (metabolismo de lípidos) diferencialmente que los producidos con ASB (Heras et al., 2016). El SFB se ha asociado con el síndrome de descendencia grande (LOS) y el desarrollo embrionario se deteriora entre el 12% al 35% (Cebrian-Serrano et al., 2013; Wydooghe et al., 2014).

Asimismo, se han propuesto nuevas técnicas como la automatización y miniaturización del proceso de *PIV*, los sistemas de cultivo de interfase aire-líquido (IAL) y modelos 3D de oviducto en un chip. Sin embargo, el éxito de un laboratorio de *PIV* no solo es producto de las mejoras de la CIV per se, sino de la interacción de todo el sistema que involucra la *PIV* (Milewski & Ajduk, 2017).

Según Thompson, (1996) el medio de cultivo "definido" consiste en el microambiente en que los embriones se desarrollan. Por tanto, la tendencia actual es seguir utilizando sistemas de cultivo definidos, que precisan de los componentes que requiere el embrión para su desarrollo. Varias investigaciones demuestran el uso exitoso de medios de cultivo definido, añadiendo sustancias como alcohol polivinílico, glucosa, lactato, piruvato, aminoácidos y el uso de SAB o SFB (J. H. Kim et al., 1993). La suplementación con suero sintético definido (SSD) al medio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) en sustitución de SFB aumentó la tasa de blastómeras en estado de apoptosis. El medio CIV sin SFB, con factor de crecimiento insulínico (IGF- I) y factores de células madre fue tan eficaz como el medio CIV + SFB en el desarrollo de blastocistos (Sagirkaya et al., 2007). En consecuencia, la eliminación de SFB del medio de cultivo y reemplazar por BSA es una ventaja tecnológica importante que mejoro la eficacia de la *PIV*. El adicionar BMP-5, BMP-15 al CIV aumenta la tasa de blastocistos y genera un cambio en la abundancia relativa de ARNm (Sudiman et al., 2014; García et al., 2015). BMP15 y/o AMH hormona anti-mulleriana en la maduración ovocitaria podría aumentar la competencia modulando la expresión de OCT4, SOX2, CDX2, GATA6 y TP1 en los blastocistos resultantes y SLC38A3 en los complejos cumulo ovocitos (Velásquez et al., 2019).

La *PIV* en porcino y bovino ha demostrado que el fluido oviductal (FO) y las células epiteliales de oviducto ejercen un efecto positivo (CEO) en la modulación de la zona pelucida del ovocito para el control de la poliespermia

y la tasa de penetración (Cebrian-Serrano et al., 2013) (Coy & Yanagimachi, 2015), así como en la competencia y desarrollo de los cigotos (Lopera-Vasquez et al., 2017; Batista et al., 2021) hasta la etapa de blastocisto (Rizos et al., 2010; Almiñana et al., 2018). Diversos factores como los productivos y metabólicos que se presentan en la vaca lechera, novillas o vacas secas tienen una influencia directa (positiva y/o negativa) sobre los sistemas *PIV* respecto a las tasas de blastocistos (Leroy et al., 2005; Maillo et al., 2012; Leroy et al., 2015).

Con relación a la conveniencia de cultivar embriones en forma individual y grupal, la información disponible parece sugerir variaciones entre especies. Así, en humanos, parece ser que los cultivos individuales generan mejores resultados que el cultivo grupal (Reed et al., 2011) (Rebollar-Lazaro and Matson, 2010; Tao et al., 2013). En otras especies, se han reportado múltiples estudios que muestran que el cultivo grupal presenta beneficios sobre el cultivo individual (Donnay et al., 1997; Goovaerts et al., 2009) como en el caso del bovino (Wydooghe et al., 2014) , ratones (Lane & Gardner, 1997), cerdos (Stokes et al., 2005) y gatos (Spindler & Wildt, 2002). Se ha descrito que el cultivo individual de los embriones bovinos presentan una mayor incidencia de apoptosis y una reducción en el número total de células embrionarias (Wydooghe et al., 2014). Los primeros estudios en bovinos ya evidenciaban lo expuesto sobre el beneficio del cultivo grupal (Donnay et al., 1997; Keefer et al., 2007) donde se atribuye que la secreción de factores autocrinos o paracrinos embrionarios actuarían sobre el propio embrión o sobre embriones vecinos (O'Neill, 2008).

Para mejorar los rendimientos de la *PIV* en los cultivos grupales e individuales, en diferentes especies animales se han incorporado recientemente a los cultivos nuevos componentes como, las vesículas extracelulares (EVs), que podrían mejorar los sistemas de *PIV*. Por ejemplo, se ha visto que la adición de exosomas aislados de embriones partenogénicos aumenta la capacidad

de desarrollo de los embriones clonados (Saadeldin et al., 2014), y las tasas de blastocistos y de crio-tolerancia de embriones bovinos (Lopera-Vasquez et al., 2016).

5.3. La competencia del embrión de PIV

La capacidad de un embrión bovino para desarrollarse hasta la etapa de blastocisto, implantarse y generar una descendencia sana se correlaciona con la calidad y competencia embrionaria (Sirard et al., 2006). La morfología del embrión es un criterio canónico de evaluación de la capacidad de desarrollo de embriones bovinos tempranos que sigue siendo insuficiente. Por lo tanto, se considera que los análisis molecular del embrión reflejarían su calidad y su capacidad de desarrollo posterior con mayor precisión (Hoelker et al., 2014).

Hay presencia de anomalías en el desarrollo de embriones de *PIV* y expresión génica diferencial. Los esquemas de cultivo no son idénticos a los eventos de maduración de ovocitos en el folículo pre-ovulatorio. Por tanto, se producen cambios en la maduración de ovocitos cuando estos se extraen del folículo y se colocan en cultivo para la maduración final, en comparación con la maduración *In vivo* donde la meiosis se reanuda por eventos que requieren del pick preovulatorio de LH (Rizos et al., 2002).

En el bovino cerca de 100 genes se regulan en ovocitos madurados *In vivo* respecto los madurados *In vitro*, y 9 genes se expresan diferencialmente entre los ovocitos madurados *In vivo* e *In vitro* como el EZR, EPN1, PSEN2, FST, IGFBP3, RBBP4, STAT3, FDPS e IRS1 (Adona et al., 2016). Varios de estos genes representan factores de competencia de ovocitos, por ejemplo: acuaporina-3, folistatina, epsina, proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 3, histona desacetilasa 2 (Sawai, 2009; Bonnet et al., 2011). La ontología genética de perfiles de la expresión de genes, ADN, establece

cambios en varios genes implicados con el metabolismo celular que fueron alterados por la maduración *In vitro* (Adona et al., 2016). Así como los patrones de metilación respecto a la maduración *In vivo* (Z. Jiang et al., 2018). En consecuencia, uno de los factores que contribuyen a mejorar la competencia de un ovocito bovino para generar embriones transferibles, incluyen el desarrollo del ovocito dentro del folículo *In vivo*, empleando técnicas de obtención como la aspiración folicular (Ovium Pick Up; OPU) (Camargo et al., 2019).

El desarrollo de embriones *In vitro* es distinto del desarrollo *In vivo* en varios aspectos. Por ejemplo, a), la sincronización de la división y la blastulación del embrión se retrasa durante la *PIV*, y alcanzan las etapas de la mórula y de blastocisto de 12 a 24 h más temprano que sus contrapartes *In vivo*; (b) se observan diferencias en la actividad metabólica (De Souza et al., 2015); c) se reducen los números de blastómeros respecto a los *In vivo* (Evsikov et al., 1996; van der Valk et al., 2018; Noguchi et al., 2020).

Asimismo aproximadamente el 20% de las blastómeras de embriones *PIV* contienen recuentos de cromosomas anormales (P. Lonergan et al., 2003), aneuploidía y mixoploidía (García-Herreros et al., 2010) y errores de las divisiones celulares (P. Lonergan et al., 2003); e) los embriones *PIV* tienen patrones epigenéticos y de expresión génica diferentes a sus contrapartes producidos *In vivo* (Corcoran et al., 2006; Heras et al., 2016). La expresión génica muestra que entre 207 y 793 genes son expresados diferencialmente en blastocistos *PIV* vs *IVV* (Heras et al., 2016). La persistencia de la señalización WNT está asociada con la incompetencia del embrión en bovinos, cerdos y ratones (Xie et al., 2008; Lim et al., 2013; Tribulo et al., 2017). Estos errores conllevan a una menor competencia y capacidad de desarrollo de los embriones producidos *In vitro*, lo cual puede estar asociado a una menor tasa de implantación y desarrollo a término.

La ocurrencia de las pérdidas gestacionales de embriones *PIV* (tabla 1), transferidos a receptoras sincronizadas reportados en los últimos 25 años en bovinos es alta. Pese a los avances en la comprensión del control del desarrollo de embriones *PIV*, las tasas de implantación y desarrollo a término no han mostrado progreso. Las tasas de gestación de embriones *PIV* transferidos que no llegaron a término van del 59 al 85% y tasas fallidas post IA van del 45 al 65% en las vacas lecheras lactantes compradas con las pérdidas del 10 al 30% en las vacas de carne (Perry, 2017).

Tabla 1 Pérdidas embrionarias tempranas y tardías observadas después de la transferencia de embriones bovinos producidos In vitro (Perry et al., 2017).

| % Gestación d 18/21 | % Gestación d 30/40 | % Gestación d 45/90 | % Parto | Referencias |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-------------------------------|
| 58 | 50.0 | 44.0 | 40.5 | (Reichenbach et al., 1992) |
| 61 | 42.0 | 42.0 | --- | (McMillan et al., 2000) |
| --- | --- | 17.7 | 15.2 | (Block et al., 2003) |
| 64.3 | 32.5 | 24.4 | 22.7 | (Block & Hansen et al., 2007) |
| --- | 37.2 | --- | 30.2 | (Laureiro et al., 2009) |
| --- | 37.4 | 33.5 | --- | Pontes et al., 2009) |
| --- | 56.3 | 52.6 | --- | (Block et al., 2010) |
| --- | 45.5 | 39.4 | 33.9 | (Stewart et al., 2011) |
| --- | 24.1 | 20.6 | 17.1 | (Rasmussen et al., 2013a) |
| --- | 29.8 | --- | 20.2 | (Rasmussen et al., 2013b) |
| --- | 54.9 | 44.1 | 36.7 | (Bonilla et al., 2014) |
| --- | 37.4 | 29.2 | 27.2 | (Denicol et al., 2014) |
| 58.0 a | 24.1 a | 17.7 a | 15.2 a | Rango Promedio |
| 64.3 | 56.3 | 52.6 | 40.5 | |
| 61.1 | 40.6 | 34.8 | 27.1 | |

En la tabla 2 se comparan las gestaciones por *PIV* con gestaciones que utilizan embriones *IVV* generados en programas MOET, se evidencia mayor magnitud de las pérdidas gestacionales después de la transferencia de embriones *PIV* (reducción del 10-40%). Las tasas de gestación son de 25%

más bajas que en los *In vivo*, similar a los estudios de McMillan (1998); y Ferré et al (2020). La supervivencia de los embriones *PIV* en gestación fue del 10 a 15% menor respecto a los *In vivo*.

Tabla 2 Diferencias en la mantención de la gestación después de la transferencia de embriones bovinos producidos In vitro vs producidos In vivo (Perry, 2017).

| Día detección gestación | %Gestaciones embriones <i>PIV</i> | %Gestaciones embriones <i>IVV</i> | Referencias |
|--|--|--|-----------------------------|
| 53 | 37,9 | 79,0 | (Farin & farin., 1995) |
| 60/70 | 42,9 | 63,5 | (Numabe et al., 2000) |
| 43/53 | 52,0 | 70,5 | (Farin et al., 1999) |
| 42 | 54,3 | 90,0 | (Papadopoulos et al., 2002) |
| Term | 29,5 | 45,5 | (McMilan.,1998) |
| 60 | 33,5 | 41,5 | (Pontes et al., 2009) |
| 30 | 31,0 | 58,8 | (Siqueira et al., 2009) |
| Rango Promedio | 29,5 a 54,3 40,1 | 41,5 a 90 64,1 | |

En la totalidad de los estudios reportados usando embriones *PIV* comunicados se han observado pérdidas al inicio de la gestación, y aproximadamente el 27,1% mantienen la gestación a término. Estos resultados son similares a las pérdidas gestacionales observadas en vacas lecheras usando IA. La falla de fecundación es del 10 a 20% en vacas inseminadas, y el 50 a 60% de los cigotos fertilizados son viables desarrollándose hasta el día 7. Entre los días 8 y 27 las perdidas varían de 10 a 20% en el ganado de carne y 20 a 40% en el ganado lechero. Perdidas adicionales del 15% ocurren después del día 28 (Spell et al., 2001; Vasconcelos et al., 2011; Perry, 2017). Las pérdidas gestacionales hasta el día 40 constituyen el 80% de todas las fallas de la gestación.

Existen múltiples factores involucrados con altas tasas de pérdida de la

gestación observadas con embriones *PIV*, que se relacionan con diferencias en el desarrollo embrionario, fetal y placentario después de la TE. Sin embargo, muchos de estos factores no dependen únicamente del embrión. Estos factores incluyen la sincronía embrionaria con el útero, las concentraciones de progesterona luteal temprana y media, y el grado de desarrollo del embrión traducido en competente o no (Rizos et al., 2002; Farin et al., 2001; Forde and Lonergan, 2012). Además se han observado variaciones en la expresión de genes asociados con la pluripotencia como resultado de la clonación y la producción de embriones *PIV* (Rodríguez-Alvarez et al., 2010a), que asocian varios problemas conceptuales, placentarios y fetales que lo exponen a fallas en la gestación.

En el ganado bovino los cambios de la expresión génica durante la transición de embrión a conceptus es otra área de pérdida de competencia de los embriones *PIV* y no están bien dilucidados. (Rodríguez-Alvarez et al., 2010a) en blastocistos clonados y de *PIV* de día 7 y 17 días encontraron diferencias de la expresión de los genes asociados con la pluripotencia y con la expresión de IFNT, evidenciando cambios en los niveles de expresión para las transcripciones entre blastogénesis y elongación. OCT4 se sobreexpresó en los blastocistos clonados respecto los *PIV*. Sin embargo, OCT4 se redujo drásticamente en los embriones elongados clonados, pero no en los de *PIV*. Para EOMES, NANOG y FGF4 no hubo diferencias en etapa de blastocisto entre clonados y *PIV*. Finalmente, en la transición o etapa de elongación de los embriones (*PIV*) EOMES, NANOG y FGF4 fueron regulados al alza. IFNT y OCT4 se expresaron en niveles similares. NANOG, IFNT y EOMES fueron sobreexpresados en todos los embriones elongados y el FGF4 fue subexpresado en clonados y *PIV*.

Por tanto, los diversos orígenes de producción de embriones como la clonación, ICSI, *PIV* podrían determinar diferentes niveles de expresión génica vinculando procesos de transición blastocisto-conceptus. Estas

diferencias en la expresión de genes modulan la elongación y podrían generar diferencias moleculares en el desarrollo de las especies. Rodríguez-Alvarez et al., (2009) describió diferencias en el patrón de expresión génica de embriones clonados de bovino y de embriones elongados (Día 17) en receptoras ovina y caprina. SOX2, NANOG y FGF-4 estaban marcadamente desregulados. Sin embargo, los conceptus bovinos elongados en la misma especie presentaron diferencias en patrones de expresión de NANOG, OCT4, EOMES, CDX2, IFN-TAU, DICER, FGF-4 Y SOX2. Castro et al., (2010) evidenció diferencias en los perfiles de expresión de miARN de embriones bovinos clonados elongados al día 17. Por lo mismo, la clonación somática en el ganado bovino se asociaría con un desarrollo embrionario deficiente, y una reprogramación epigenética incompleta durante la embriogénesis que genera una expresión génica aberrante que afecta etapas críticas de elongación y peri-implantación (Rodríguez-Alvarez et al., 2010a).

Otros errores anexos a los sistemas *PIV* se refieren al alargamiento del conceptus. Estos son probablemente causados por anomalías en el trofoectodermo que dan origen a la placenta. Existen diferencias en el potencial secretor entre el conceptus de *PIV* y los embriones *IVV*. Se han identificado 83 genes expresados diferencialmente en el conceptus (Mathew et al., 2019) y 118 genes en las regiones carunculares del endometrio en el día 20 de gestación en relación a gestaciones de embriones *IVV* bovinos (Mansouri-Attia et al., 2009).

El INFT secretado por el concepto podría estar involucrado en la expresión diferencial de genes endometriales (Forde and Lonergan, 2012; Spencer et al., 2013; Ealy and Wooldridge, 2017). No está claro si el ARNm de IFNT y la abundancia de proteínas difieren entre los conceptus de *PVI* e *IVV* (Arnold et al., 2006). Sin embargo, las prostaglandinas y cortisol estarían involucradas con la expresión diferencial de genes endometriales (Forde et al., 2013).

El disco embrionario (ED) de embriones de *PIV* también se altera (Fischer-Brown et al., 2004). Hay reducción del diámetro siendo más pronunciadas en los conceptos femeninos y otros ED eran indetectables (Bertolini et al., 2002), o estaban ausentes entre un 25 a 65% (Fischer-Brown et al., 2004).

6. Selección embrionaria

La producción *In vitro* de embriones combinando técnicas de OPU, *PIV* y ET ha crecido rápidamente desde la década del 2000 (Hasler, 2014). Pese a las mejoras en las tecnologías de embriones, la selección embrionaria aun es subjetiva e ineficiente (Lonergan & Fair, 2008). Las deficiencias en la selección se reflejan en tasas de gestación más bajas las obtenidas con embriones *PIV* que las *IVV* (Pontes et al., 2009).

El éxito del uso de embriones *PIV*, que depende del número de crías nacidas vivas, está directamente relacionada con la selección de embriones producidos mediante esta tecnología (Mellisho et al., 2017; Wrenzycki, 2018). La calidad de un embrión define su competencia y su potencial de desarrollo a término una vez transferido a receptoras finales. Esta depende de factores biológicos intrínsecos, y de factores técnicos involucrados que interactúan directa o indirectamente sobre la competencia embrionaria, como el origen de los gametos, protocolos de estimulación del desarrollo folicular, OPU, técnica de maduración y fecundación, cultivo embrionario *In vitro*, manipulación embrionaria y ausencia de señales materno-embriónicas durante el periodo *In vitro* (Veronica Maillo et al., 2016).

Varios grupos de investigación han integrado esfuerzos para optimizar, tanto, los componentes biológicos como los técnicos, inherentes en la calidad embrionaria. Sin embargo, no ha habido un impacto significativo en el éxito final de las tecnologías reproductivas. En humanos como en animales, las tasas de nacimiento se han mantenido constantes durante los últimos años

(Kushnir et al., 2017). En consecuencia, depende de la capacidad de seleccionar embriones más competentes y una mejor sincronía embrión - receptoras.

6.1. Morfología y cinética embrionaria

Con el progreso de las técnicas de reproducción asistida la evaluación de gametos y embriones ha cobrado mayor importancia en la selección de embriones clasificados como competentes. La evaluación de la morfología es una buena herramienta de pronóstico de desarrollo futuro y del potencial de implantación embrionaria (Anagnostopoulou et al., 2022). Existen varios métodos invasivos o no invasivos para la selección de embriones, como pruebas genéticas preimplantacionales, morfocinéticas, proteómicas, metabolómicas, consumo de oxígeno y medición del estrés oxidativo en medio de cultivo (Anagnostopoulou et al., 2022).

Las metodologías de selección de embriones se aplican en varias etapas del desarrollo desde el ovocito, primeras divisiones hasta blastocisto. La morfología y la proporción de embriones en la etapa de blastocisto son criterios importantes para evaluar la competencia del desarrollo. Este sigue siendo el método de elección con un enfoque práctico y útil para seleccionar embriones viables antes de la transferencia en bovino (Pat Lonergan et al., 2016), se sigue aplicando actualmente de manera amplia y rutinaria con modificaciones menores en los sistemas de producción *In vitro* - IETS., 2010 (G. A. Bó & Mapletoft, 2013). Sin embargo, es importante considerar que la morfología del embrión no es lo suficientemente precisa como para ser el único criterio para la predicción del potencial de desarrollo y competencia del embrión *In vitro*.

La mejora de la precisión en la selección de la clasificación de embriones bovinos es fundamental para el éxito en la aplicación de las TRA. La

evaluación morfológica y morfocinética son las técnicas de clasificación embrionaria presentes. La morfología es un método de evaluación visual no invasiva, simple, rápida y de bajo costo (Pontes et al., 2009; Pontes et al., 2011; Rodríguez-Alvarez et al., 2013; Mellisho et al., 2017; Anagnostopoulou et al., 2022). La morfocinética combina el valor de los parámetros morfológicos y cinéticos de los embriones (Velocidad de desarrollo). Hay otras técnicas como time-lapse que realiza el seguimiento individual del desarrollo embrionario utilizando un sistema de grabación de video a intervalos programados de tiempo (Sallam et al., 2016). Este método reduce el factor de manipulación y aumenta la fidelidad de la medición de la cinética embrionaria y es empleado de forma rutinaria en la producción de embriones *PIV* en humanos (Minasi et al., 2020). Debido a sus altos costos no se ha integrado en el campo veterinario científico y comercial.

En bovinos, la clasificación se la realiza de acuerdo con las características morfológicas recomendadas por la IETS para embriones *In vivo* extrapolándolas a los embriones *PIV*. La evaluación está basada en dos criterios: a) estados de desarrollo, y, b) calidad embrionaria (Tabla 3) (Stringfellow et al., 1998) . La clasificación morfológica se le realiza al día 7 post- fecundación, evaluando estadios de mórula compacta y blastocistos. La calidad embrionaria se fundamenta en características subjetivas como: tamaño, forma, color, homogeneidad de citoplasma, forma e integridad de la zona pelúcida, tamaño, presencia de células y de vacuolas en el espacio perivitelino (Bó & Mapletoft, 2013). La calidad de los embriones producidos *in vivo* clasificados por el método morfológico no afectó significativamente la tasa de preñez (59% en calidad 1 versus 45% en calidad 2) (Hasler et al., 1995, 2002). Sin embargo, el tamaño del blastocisto (>150µm) mostró mayor sobrevivencia a la crio-preservación 77 vs 54% (Andra´ et al., 1999).

Tabla 3 Criterios de clasificación morfológica de embriones bovinos para transferencia de embriones (Stringfellow et al., 1998; Bó and Mapletoft, 2013).

| Día | Estadio de desarrollo |
|--------------|-------------------------------------|
| 4 | Mórula |
| 5 | Blastocisto temprano |
| 6 | Blastocisto |
| 7 | Blastocisto expandido |
| 8 | Blastocisto en eclosión |
| 9 | Blastocisto eclosionado y expandido |
| Grado | Calidad de embriones |
| 1 | Excelente o bueno |
| 2 | Bueno aceptable |
| 3 | Pobre |
| 4 | Muerto o degenerado |

En humanos, diseñó un sistema de evaluación morfológica de blastocistos que combina los criterios: estado de desarrollo y calidad de MCI y TE (Alpha Executive) y (Special Interest Group of Embryology-ESHRE, 2011). Los modelos predictivos afirmados en parámetros morfológicos aún presentan reducida eficiencia (ROC-AUC de 0.55) para predecir una gestación exitosa (Seli et al., 2007). El análisis morfológico y la evaluación embrionaria se basa en el análisis visual del embrión (Rocha et al., 2016). Diferentes evaluadores, clasifican los embriones con valores de calidad diferentes (Farin et al., 2001; Bó and Mapletoft, 2013; Mellisho et al., 2017). En embriones humanos hay mayor discrepancia y baja eficiencia de la evaluación morfológica entre los diferentes evaluadores y una variabilidad inter - laboratorio (Arce et al., 2006; Castilla et al., 2010). Una mayor estandarización en los criterios de clasificación de embriones incrementaría la eficiencia de evaluación y la tasa de establecimiento de la gestación post transferencia (De Assín et al., 2009; De Los Santos et al., 2016).

La cinética del desarrollo embrionario mejorar la predicción de la competencia del embrión sobre la base de los cambios morfocinéticos durante las primeras etapas del desarrollo desde la primera división hasta la compactación, blastulación y eclosión (Van Soom et al., 1997; Sallam et al., 2016). Un parámetro de medición fácil que no afecta al desarrollo futuro del embrión es la primera división temprana (Gutiérrez-Adán et al., 2004). Los embriones con distinta velocidad de desarrollo presentan diferentes alteraciones (Baumann et al., 2007; dos Santos et al., 2016; Silva et al., 2016; Ispada et al., 2018). Sin embargo en bovinos, varios estudios que investigaron el valor predictivo del uso de información en morfología y del momento de la primera división en resultados de establecimiento de la gestación post transferencia, mostraron que ésta presenta mucha variación y baja confiabilidad (Van Soom et al., 1997; Holm et al., 1999; Isom et al., 2012; Kaith et al., 2015).

La evaluación de embriones *In vitro* durante el desarrollo embrionario es estresante para los embriones e impone interrupciones exponiéndolos a condiciones de cultivo subóptimas y fluctuaciones de temperatura, pH, gases etc, (Heras et al., 2016). En humanos la tecnología *time-lapse* selecciona embriones viables de acuerdo a parámetros morfocinéticos, tiempo, sincronía y patrones de ciclo de divisiones uniformes con intervalos (Wong et al., 2010; Meseguer et al., 2011). Es decir, observa el progreso del desarrollo embrionario, desde el cigoto hasta el blastocisto (Kirstine Kirkegaard et al., 2015). Rutinariamente en humana se utilizan modelos predictivos morfocinéticos para seleccionar embriones para la transferencia (Meseguer et al., 2011), los resultados son aún controversiales (Wong et al., 2010; Kirkegaard et al., 2014). El monitoreo en tiempo real detecta anomalías cromosómicas, y la sensibilidad de la predicción de preñez es aún menor a 0,7 (AUC- área bajo la curva) (Gomez et al., 2022). En bovinos el sistema *time-lapse* selecciona embriones *PIV* entre 2 a 16 células con una probabilidad de ser competente del 63 a 80% , El sistema puede identificar los factores pronósticos que reflejan la viabilidad después de la transferencia

mediante la evaluación de combinación de factores pronósticos identificados como momento de la primera escisión; número de blastómeros al final de la primera escisión; y número de blastómeros al inicio de la fase de latencia durante el cuarto o quinto ciclo celular (Sugimura et al., 2017).

6.2. Análisis moleculares

Aunque los análisis moleculares con enfoques no invasivos están mejorando, los análisis invasivos siguen siendo prioritarios para encontrar genes candidatos que determinen la calidad del embrión (Rizos et al., 2008; Graf et al., 2014; Wrenzycki et al., 2005). Pese a que los marcadores genéticos como método de selección de embriones de *PIV* aún no han mejorado los resultados predictivos (Wang et al., 2017), en el campo de la investigación se busca mejorar su comprensión.

Se ha descrito que una sola alteración en la expresión génica, incluso un gen único durante el desarrollo embrionario podría ser crítica en el desarrollo posterior (Copp, 1995; Farin et al., 2001). Varios genes identificados como el *COX2*, *CDX2*, *ALOX15*, *BMP15*, *PLAC8*, *KRT8*, *OCLN*, *PGK1* y *AKR1B1* se regulan positivamente con la preñez y el nacimiento exitoso (El-Sayed et al., 2006). Los genes *BMP15*, *KRT8*, *RGS2*, *PLAC8* está regulados positivamente en los blastocistos *IVV* que producen nacimientos; y se expresan los genes *FL405* y *HSPD1* en aquellos blastocistos incapaces de establecer una gestación (Ghanem et al., 2011).

Para definir el diagnóstico genético pre-implantacional (DGP), este se basa en el análisis del genoma del embrión. En humanos, el DGP en embriones *PIV* identifica alteraciones genéticas hereditarias previas a la transferencia. En animales su uso está en función de objetivos zootécnicos para identificar desórdenes genéticos, el sexo y caracterizar los rasgos genéticos productivamente relevantes (Índices reproductivos, producción, salud, etc.),

pre transferencia (Kimura & Matsuyama, 2014). Sin embargo, el DGP no es de uso frecuentemente para seleccionar embriones competentes en la especie animal.

Las técnicas de análisis de patrones de expresión de ARN son herramientas poderosas que determinan la abundancia de transcripciones relacionadas con la calidad de ovocitos y/o embriones. Se han empleado muchas estrategias para identificar las bases moleculares y genes candidatos vinculados a la competencia ovocitaria y de embriones (Mellisho et al., 2017). En los años “90 en bovino se detectaron mediante PCR y análisis semicuantitativo diferencias entre mórulas y blastocistos *In vitro* e *In vivo* (Wrenzycki et al., 2005).

Pese a las ventajas del análisis genético (marcadores de expresión ARNm o ADN), no deja de ser un método invasivo (biopsia embrionaria) que podría lesionar al embrión, perjudicar la implantación y el progreso de la gestación (Hasler, 2014). Este tipo de análisis reduce la integridad del embrión y el desarrollo posterior (Ugajin et al., 2010). Aproximadamente el 20% de los embriones bovinos biopsiados (blastocistos de excelente calidad) mueren o degeneran a las pocas horas de aplicada la técnica (A. E. Velasquez et al., 2016). Se han ido desarrollando tecnologías como la hibridación-secuenciación para deducir y cuantificar el transcriptoma completo (Z. Wang et al., 2009).

En la industria equina se ha incorporado la técnica de biopsia y el diagnóstico genético pre-implantacional. Este diagnóstica aproximadamente 40 enfermedades y 20 genotipos, también se usa para determinar el sexo (Choi et al., 2010; Guignot et al., 2012). Hay una alta correlación negativa entre una alta eficiencia en el diagnóstico de sexo con una baja tasa de preñez (Herrera et al., 2014).

6.3. Análisis basado en medios de cultivo

Los embriones pre-implantatorios están en interacción constante con el medio que lo rodea, nutrientes, concentración de gases oxígeno, CO₂, moléculas de señalización, sustratos, etc (Gardner et al., 2013). Los cambios en los medios de cultivo reflejan la actividad del embrión y por tanto podrían reflejar eventualmente su competencia funcional. Mellisho et al., (2017) propuso un nuevo método de diagnóstico embrionario no invasivo basado en el análisis del medio de cultivo (EVs) y las características morfológicas del embrión; con el objeto de identificar embriones de buena y mala calidad (competentes). Este es un método no invasivo que no causa daño al embrión y podría tener un mayor valor predictivo respecto a los métodos morfológicos.

La metabolómica implica el análisis de los medios de cultivo que representa un aproximado de 3.000 moléculas, que incluyen metabolitos intermediarios (aminoácidos, lípidos y nucleótidos), hormonas, moléculas de señalización, metabolitos secundarios etc, (Scaruffi, 2015). Los perfiles metabolómicos no han mostrado mejorar la eficiencia de los sistemas de selección morfológica de embriones competentes (Vergouw et al., 2014; Kirkegaard et al., 2014). Su uso requiere equipos de alto costo y tecnología como la resonancia magnética nuclear, espectrometría de masa, espectroscopia Raman y espectroscopia infra-rojo cercano (K. Kirkegaard et al., 2014).

En humanos y bovinos, marcadores metabolómicos correlacionados con la morfología embrionaria e implantación exitosa han mostrado ser el consumo de oxígeno (Scott et al., 2008), y las concentraciones de novo derivadas del metabolismo embrionarios como la glucosa (Gardner et al., 2011), piruvato (Turner et al., 1994), asparagina, glicina y leucina (Brison et al., 2004), ácidos grasos (Haggarty et al., 2006), antígeno leucocitario soluble G (sHLA-G) (Jurisicova et al., 1996), factor activador de plaquetas (FAP) (O'Neill, 2005; O'Neill, 2008), factor de pre-implantación (FPI) (Barnea, 2004) y ubiquitina (H.

M. Wang et al., 2004). Estos metabolitos varían debido a los medios de cultivo empleados por los laboratorios *PiV*, y a las técnicas analíticas aplicadas (Botros et al., 2008; Gardner et al., 2013; Mellisho et al., 2017).

El análisis secretómico del medio de cultivo exhibe resultados interesantes con alto valor predictivo de la calidad embrionaria (Vergouw et al., 2012). El análisis transcriptómico no necesariamente predice los cambios fenotípicos (procesos biológicos y funciones celulares) del embrión. Las proteínas secretadas por el embrión podrían correlacionarse con la epigenética y la expresión génica (Cervero et al., 2005). Los sistemas *in vitro* generan cambios fenotípicos como resultado de cambios en numerosas proteínas. Estas median la comunicación con el ambiente materno. Las proteínas como APOA1, leptina e INFT tiene una alta correlación con la competencia de embriones humanos y animales *IVV* (Mains et al., 2011). Estudios recientes, demuestran que esta comunicación embrio-materna es mucho más temprana y amplia. Esta no se limita a una sola señal por parte del embrión, esta señal es bidireccional (Veronica Maillo et al., 2015).

El embrión temprano secreta señales paracrinas que tienen un efecto sobre el desarrollo posterior. Los embriones bovinos y humanos pre-implantatorios en estadio de mórula y blastocisto, secretan moléculas como miARN contenidas en EVs que podrían modular el ambiente materno (Rosenbluth et al., 2014; Mellisho et al., 2017). También se ha identificado ADNg y ADNmt (Stigliani et al., 2013; Stigliani et al., 2014; Kropp et al., 2014; Capalbo et al., 2016). Varios estudios han relacionado el patrón de expresión de estos miARN, secretados al medio de cultivo durante el desarrollo embrionario *In vitro* con la calidad embrionaria (Kropp and Khatib, 2015; Mellisho et al., 2017, 2019). Estos descubrimientos abren una nueva oportunidad para el diagnóstico genético no invasivo de embriones producidos *In vitro*. Por lo mismo, es necesario investigar si el ADN y los miARN se encuentran en estado libre y/o protegidos por las EVs.

7. El Rol de los miARNs embrionarios

En los últimos años varios grupos de investigación han analizado la posibilidad de que los miARNs intracelulares influyen sobre la viabilidad del propio embrión y su interacción con el medio ambiente uterino.

Varios estudios han descrito a la viabilidad del embrión como uno de los factores clave que determina el desarrollo embrionario y consecuentemente la implantación (Liang et al., 2017). Durante su desarrollo de cigotos a blastocistos, los embriones presentan múltiples eventos que van desde la división celular, la proliferación, el establecimiento de la polaridad celular, la compactación, blastulación, eclosión, elongación y la diferenciación de linajes en los embriones de mamíferos (Haibin Wang & Dey, 2006). Los embriones de primates y roedores se adhieren casi inmediatamente al endometrio post eclosión; y en equinos el embrión se moviliza, creciendo como un concepto de forma ovoide sin una elongación morfológica obvia (Klein, 2015). Sin embargo, en los rumiantes y cerdos hay cambios morfológicos del conceptus que van de estado ovoide a elongación antes de la implantación (Bazer et al., 2011; Liang et al., 2017).

Los cambios embrionarios están relacionados con la actividad del genoma (Prather & First, 1988). En ratones la información genómica del embrión previo a la implantación experimenta cambios (Yanhong Yang et al., 2008). Los estudios han demostrado que la expresión de miARN generalmente se suprime en ovocitos y embriones preimplantatorios tempranos (Suh et al., 2010), y la expresión se reactiva post activación del genoma (Yang et al., 2016). Lo que sugiere un papel importante de miARN en el desarrollo embrionario temprano (Pernaute et al., 2011) aun por comprender. El análisis de embriones en diferentes etapas del desarrollo (pre y peri-implantatorio) ha revelado

tendencias variables en la expresión de miARN, y se ha estudiado el papel de miARN específicos en el desarrollo embrionario en múltiples especies (Suh et al., 2010; Pernaute et al., 2011; Yang et al., 2016; Mellisho et al., 2017, 2019; Melo-Baez et al., 2020). Los miARN también están implicados en la regulación de la elongación embrionaria. En embriones porcinos las anotaciones funcionales en estadios pre y peri-implantatorios revelaron que los miARN expresados de manera diferente eran asociado con el ciclo celular, el desarrollo celular, la morfología de los tejidos, la respuesta inflamatoria y el desarrollo del organismo (Krawczynski et al., 2015a,b).

Los factores ambientales pueden regular la viabilidad del embrión al alterar la expresión de los miARN. El embrión de ratón, en un ambiente uterino con niveles elevados de progesterona, se vuelve metabólicamente inactivo y la implantación se retrasa. Sin embargo, con un ligero estímulo de estradiol, los embriones latentes pueden activarse rápidamente y recuperar su capacidad de implantación (Liu et al., 2012; Wang et al., 2013). Se ha descrito en murino que la expresión en aumento de miR-let-7a reduce el número de sitios de implantación embrionaria, en parte al dirigirse a la integrina beta 3 e inhibir la expresión de Dicer (Cheong et al., 2014). Aunque no hay evidencia de que exista un retraso en la implantación en humanos y animales domésticos, los estudios en ratones sugieren que las señales ambientales *In vivo* podrían alterar los patrones de expresión de miARN y eventualmente influir en el estado activo del embrión antes de la implantación (Liang et al., 2017). Las tecnologías avanzadas como el sistema de lapso de tiempo han permitido realizar un seguimiento de los pasos de desarrollo de un embrión con una variación mínima del entorno de cultivo (Aparicio et al., 2013). Se ha descrito que las anomalías cromosómicas que contribuyen al fracaso repetido de la implantación ocupan el 44,9 % de la normalidad morfológica determinada (Z. Yang et al., 2012). Por tanto, una mejor comprensión del rol de los miARNs en las diferentes etapas del desarrollo embrionario nos permitiría ampliar y profundizar la comprensión de los mecanismos de comunicación embrio-

maternal y su impacto sobre los procesos de producción de embriones *In vitro*.

7.1. *miARNs y endometrio*

¿Los miARNs contenidos en EVs secretados por embriones pre-implantatorios participan en el desarrollo posterior embrionario y modulan las funciones del endometrio durante la etapa peri-implantatoria?. Durante el período de implantación se producen tres fases: fase pre-receptiva, fase receptiva y fase refractaria (Haibin Wang & Dey, 2006). Durante la etapa receptiva, el epitelio endometrial exhibe características de transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), se vuelve menos polarizado y muestra una remodelación de las uniones celulares para facilitar la interacción con el trofotodermo (Carson et al., 2000). La progesterona induce la expresión de miR-125b en células endometriales en mujeres. Sin embargo la sobreexpresión de miR-125b inhibió el movimiento celular e impidió la implantación al suprimir la expresión de metaloproteinasas (MMP26) de matriz (Chen et al., 2016). Por tanto, la implantación solo puede ocurrir en la fase receptiva, acompañada de cambios morfológicos y funcionales en el epitelio y el estroma (Wang et al., 2013). Varias investigaciones de genes relacionados con la síntesis y el transporte de miARN ha revelado el papel regulador/modulador de los miARN en la receptividad endometrial (Bauersachs, et al., 2015). Por ejemplo se encontró que Hsa-miR-30b y hsa-miR-30d están significativamente regulados al alza en el endometrio receptivo de mujeres sanas y fértiles (Liang et al., 2017), y en ratones (Chu et al., 2015; Dong et al., 2016). En primates y roedores con implantación invasiva, la penetración del trofoblasto desencadena una serie de respuestas del estroma denominada decidualización, que implica una proliferación masiva, diferenciación y apoptosis de las células del estroma (Bazer et al., 2011). Algunos miARNs se potencian durante la decidualización (Yang et al., 2017; Zhang et al., 2015), y otros miARNs son reprimidos durante este período (Shen et al., 2013; Liu et al., 2013).

Existe hace varios años un interés en establecer si el endometrio es capaz de secretar miARN (Campoy et al., 2016), en ovejas (Burns et al., 2014), cerdos (Najmula, et al., 2015) y humana (Vilella et al., 2015). Experimentos *In vitro* han determinado que varios miARN secretados por el endometrio al fluido uterino estarían involucrados en varias vías de señalización asociadas con la implantación (Ng et al., 2013). Por ejemplo bta-miR-423, se detectó únicamente en ovejas preñadas, y se cree se dirige a genes asociados con el metabolismo, el sistema inmunitario, el ciclo celular y la apoptosis (Burns et al., 2014).

7.2. miARNs y la interacción embrio-materna

El desarrollo sincronizado entre el embrión y el endometrio es esencial para una implantación exitosa, y la asincronía embrio-endometrial conduce a una disminución de la tasa de implantación (Teh et al., 2016). En este microentorno tiene lugar la comunicación bidireccional esencial para el desarrollo y la implantación del embrión (Salamon et al., 2016; Berlanga et al., 2011). Por tanto, se ha hipotetizado que los perfiles de secreción del fluido uterino podrían reflejar el estado receptivo del endometrio, por lo que el fluido uterino se podría utilizar en un futuro mediano como fuente de biomarcadores (miARNs) (Liang et al., 2017). Se han identificado miARNs, contenidos dentro de exosomas/microvesículas que podrían tener un papel en las interacciones embrionarias-maternas durante la implantación (Vilella et al., 2015), y que estarían relacionados con la adhesión celular, las vías de señalización mediadas por integrinas y desarrollo embrionario (Liang et al., 2017).

Asimismo se han detectado miARNs, contenidos dentro de exosomas/microvesículas que podrían tener un papel en las interacciones embrionarias-maternas durante la implantación (Vilella et al., 2015). Mediante el uso de un modelo de ratón *In vitro*, se demostró que varios miARNs y en

forma particular el miR-30d se internaliza en los blastocistos de ratón y modifica el fenotipo y el transcriptoma embrionario y la sobreexpresión de diez genes (como *ITGB3*, *ITGA7* y *CDH5*) que estarían relacionados con la adhesión celular, las vías de señalización mediadas por integrinas y desarrollo embrionario (Liang et al., 2017).

En otro estudio, se proporcionó evidencia de que el miARN secretados por el embrión participan en la modulación de las funciones uterinas (Cuman et al., 2015). Por tanto, se ha descrito que tanto el embrión como el útero pueden secretar miARN específicos de acuerdo con sus propias condiciones, y es probable que exista intercambio y absorción de miARNs para modificar los transcriptomas en ellos y facilitar la implantación (Imakawa et al., 2022).

7.3. miARNs circulantes

Se han identificado algunos miARNs circulantes con funciones asociadas al proceso de la gestación. Existen miARNs circulando asociado a células y hay otros libres en la sangre periférica (Ortiz-Quintero, 2016). Por ejemplo, se ha identificado en mujeres embarazadas miARNs específicos de placenta vinculados al grupo de miARN del cromosoma 19 que se expresan ampliamente en el plasma sanguíneo (Luo et al., 2009; Donker et al., 2012). Estos miARNs probablemente son liberados por la célula trofoblástica al sistema circulatorio y su presencia desaparece después del parto (Miura et al., 2010). Sin embargo, otros estudios destacan que los miARNs son posibles indicadores de fallas y complicaciones del embarazo (Zhao et al., 2012).

Varios autores han investigado la correlación entre los miRNAs circulantes y la implantación de embriones (Kresowik et al., 2014; Imakawa et al., 2022). Analizaron miARNs en plasma de vaquillas preñadas y no preñadas y descubrieron que la concentración de miR-26 podría ser un biomarcador candidato para el embarazo muy temprano en las vacas (Ioannidis &

Donadeu, 2016). Otro estudio en vacas reveló que los miARNs circulantes, aislados de EVs no solo son capaces de identificar el embarazo, sino que también son capaces de distinguir entre la implantación exitosa y la mortalidad embrionaria en la etapa temprana del embarazo (Pohler et al., 2017). La expresión de miR-25, miR-16a/b en el día 17 fue mayor en el grupo de mortalidad embrionaria en comparación con los grupos de gestantes lo que sugiere su potencial para diferenciar el estado de embarazo (Klohonatz et al., 2016).

8. Aspecto general del problema identificado

La comunicación embrio-maternal es vital para el establecimiento y mantenimiento exitoso de la gestación. Sin embargo, existe relativamente poca información sobre los diferentes mecanismos y la naturaleza de las señales embrionarias responsables de esta comunicación cruzada. Las etapas del desarrollo embrionario correspondientes a la blastulación y eclosión podrían incidir en la elongación del blastocisto; y consecuentemente en la producción regulada de interferón-tau (IFNT), reconocimiento de la gestación y receptividad uterina (Spencer et al., 2008). Por tanto, una comunicación deficiente entre el embrión y el entorno materno durante el periodo de elongación podría contribuir a un fracaso reproductivo en el ganado bovino (Sánchez et al., 2018).

El origen del embrión puede tener un impacto significativo en la mortalidad embrionaria temprana (Clemente et al., 2011; Mamo et al., 2012). Por lo mismo, es necesario profundizar/generar información adicional en un estudio detallado de los mecanismos que participan en el desarrollo temprano del embrión durante el período pre y peri-implantacional (Día 5-7 y Día 7-9) para comprender los factores que modulan las etapas de blastulación y de eclosión. Aun cuando se ha generado información en el rol de las EVs, aun no existe un conocimiento suficiente de la función de los miARNs contenidos en EVs

secretadas por embriones generados *In vitro* e *In vivo* durante las etapas del desarrollo embrionario temprano en el ganado bovino. Varios estudios en diferentes rumiantes han orientado su estudio en la etapa peri-implantatoria de día 13 al 21 días (Burns et al., 2016; Kusama et al., 2018; Nakamura et al., 2016, 2019). Se pensaba que los estadios de desarrollo embrionario pre-implantatorio antes de la eclosión son relativamente autónomos y que controlan su propio desarrollo. Sin embargo, durante los períodos de peri-implantación blastulación y peri-eclosión los embriones pasan por numerosos cambios fisiológicos, por tanto, estos estadios de desarrollo embrionario podrían modular la competencia y el desarrollo embrionario posterior como la elongación, reconocimiento de la gestación e implantación. Por tanto, los estadios de desarrollo embrionario de blastulación de eclosión son importantes para el desarrollo futuro del embrión y del conceptus. Recientemente se han acumulado datos de que las EVs, derivadas tanto del embrión-trofoectodermo como del endometrio, desempeñan un papel en la comunicación bilateral entre el embrión y el endometrio (O'Neil et al., 2020).

Las pérdidas reproductivas se centran en las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Varios estudios en ganado bovino han estimado que las tasas de fecundación óptimas son alrededor del 90%, con una tasa de parto promedio del 55% aproximadamente, lo que sugiere una mortalidad embrionaria/fetal entorno al 35%. Por lo tanto, el 70-80% de la pérdida embrionaria total en el bovino ocurre entre los días 8 y 16 después de la fecundación del ovocito (Diskin et al., 2006; Moore and Thatcher, 2006, 2017). En consecuencia, la información emitida por el embrión durante la etapa pre-implantatoria es importante porque determinan su potencial de desarrollo y elongación que permitirán el establecimiento de la gestación.

La clasificación y selección de embriones bovinos en base al modelo morfológico es un criterio subjetivo que no refleja sus características moleculares (Epigenéticas, ploidía y expresión génica). Y por lo mismo, su

potencial de interactuar con el ambiente materno en la etapa crítica del establecimiento de la gestación.

Existe un consenso respecto a la clasificación y selección convencional de embriones bovinos en base al modelo morfológico, sin embargo, dicha clasificación no refleja de manera fiable la viabilidad de los embriones, y por lo tanto no permite predecir con fiabilidad el potencial del embrión para establecer una gestación tras ser transferido. Las tasas de implantación < 50 %, y con pérdidas de la gestación del 20 % en el primer trimestre podrían ser mejoradas si se transfieren únicamente los embriones clasificados como potencialmente viables. En humanos y bovinos el tamaño y concentración de las vesículas extracelulares (EVs) secretadas al medio de cultivo están relacionadas con la competencia embrionaria (Mellisho et al., 2017; Simon et al., 2018). En consecuencia, recientemente las EVs han adquirido interés de la investigación debido a su potencial rol como mecanismo de comunicación y señalización extracelular entre el embrión y el entorno donde se desarrolla. Debido a ello, su estudio y comprensión podría ayudar a mejorar la tasa de éxito de técnicas de producción de embriones *In vitro* y del diagnóstico de su competencia funcional. Mellisho et al. (2017) aportan información valiosa que permite avanzar en el conocimiento y la comprensión de la función de las EVs secretadas por embriones en relación con la competencia embrionaria (blastocistos) en bovinos. De igual manera, existen estudios en otras especies, incluido la humanos, respecto a la función de las EVs en embriones clonados y partenogénéticos (Ferreira et al., 2013; Saadeldin et al., 2014).

Estos trabajos confirman el papel potencial de las EVs en la comunicación bidireccional entre el embrión y el ambiente materno. Se sugiere que las características de estas EVs secretadas por el embrión reflejan su calidad, estadio de desarrollo y competencia para generar una implantación exitosa. Sin embargo, el origen y/o fuente de los embriones generados *In vitro* e *In vivo* podrían presentar diferencias en la calidad y competencia embrionaria, así como en la secreción de EVs y su carga. Por tanto, la eliminación de EVs de

los medios de cultivo embrionarios antes de iniciar el trabajo experimental ha sido fundamental para reducir el efecto contaminante que estas podrían generar en los análisis moleculares.

También fue conveniente la implementación de sistemas que permitieron la producción de embriones *In vitro* e *In vivo* mediante técnicas previamente estandarizadas; 1) Superovulación SOV; 2) cultivo individual de embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo*; 3) cultivos que permiten prolongar la etapa de desarrollo embrionario *In vitro* para determinar la competencia posteriormente a la formación del blastocisto, eclosión hasta la etapa ovoide de desarrollo embrionario; y 4) análisis de la expresión génica diferencial de miARNs contenidos en las EVS secretadas.

El análisis de las características poblacionales de las EVs y del perfil de expresión de miARNs durante el período de desarrollo correspondiente a la blastulación y eclosión de los embriones bovinos *In vitro* respecto los *In vivo* podrían ser utilizados como posibles biomarcadores de viabilidad y competencia embrionaria. Por tanto, en nuestra investigación consideramos que es importante estudiar y obtener más conocimientos acerca de los mecanismos de comunicación embrio-materna, así como de la viabilidad, desarrollo y competencia embrionaria asociados a las EVs (miARNs) del entorno.

II. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA

Las técnicas establecidas que implican multiovulación y transferencia de embriones (MOET), Producción de embriones *In vitro* (*PIV*) y crio-preservación de embriones bovinos se utilizan ampliamente de forma comercial asociados a programas productivos. A diferencia del MOET, la producción la producción y transferencia de embriones bovinos *PIV* se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Sin embargo, las tasas de implantación y desarrollo a término de estos embriones aún son inferiores a las obtenidas con embriones producido *In vivo*. La menor competencia de los embriones *PIV* se debe principalmente a las subóptimas condiciones a las que se exponen fuera del ambiente materno. Además, el ambiente *In vitro* provoca cambios en el programa de desarrollo que pueden manifestarse fenotípicamente durante cualquier etapa del desarrollo, pero que no necesariamente se identifican morfológicamente durante la etapa pre-implantatoria. Estos cambios se deben por ejemplo a modificaciones epigenéticas que controlan los eventos moleculares del proceso de desarrollo y diferenciación, lo cual puede afectar la viabilidad embrionaria y además pueden provocar una desincronización en la comunicación embrio-materna.

La desincronización del “diálogo” que se produce entre el embrión y el ambiente materno conlleva a problemas en el reconocimiento de la gestación y en la implantación. Estos son eventos diferentes en el cual el reconocimiento materno en bovinos se debe a la supresión por IFNT de la secreción pulsátil de PGF; la implantación depende del desarrollo y diferenciación del conceptus, en que el IFNT es crítico, pero también lo son otros reguladores. Puede haber reconocimiento, pero no implantación.

La comunicación embrio-materna es un proceso complejo que involucra mecanismos de interacción física y molecular. En bovinos la progesterona, la

PGF y el cortisol son moléculas esenciales que controlan la elongación, la producción de IFNT, la diferenciación del conceptus y la implantación. Recientemente se ha identificado que las EVs del tipo exosomas y microvesículas, también intervienen en la comunicación embrio-materna. Las características de las EVs varían de acuerdo con las características de las células secretoras, por lo que nuestro grupo planteó la idea que las características de estas poblaciones de EVs podrían variar de acuerdo con la competencia embrionaria. Está en línea con esta hipótesis la demostración de que la correlación entre las características de estas vesículas (tamaño, concentración y contenido de miARN) con la capacidad de desarrollo de embriones bovinos *PIV*. Sin embargo, no se ha evaluado la correlación con el potencial de desarrollo y eclosión que exhiben en cultivos *in vitro*/ o *in vitro*.

Además, tampoco se dispone de información sobre el efecto de los sistemas de producción de embriones *In vitro* vs. *In vivo* sobre las características de las EVs secretadas por embriones en estadio de blastulación y de eclosión. Por lo mismo, los resultados obtenidos en la caracterización de las EVs secretadas por embriones *PIV* e *IVV* y su asociación con el potencial de desarrollo *in vitro*, podría brindar información relevante en la identificación de marcadores de competencia funcional de los embriones *PIV*, usando protocolos no invasivos, y en los mecanismos involucrados en el control de la competencia funcional de los embriones. Así, esta información puede ser usada para mejorar la eficiencia tanto de los protocolos de producción de embriones *PIV*, como del establecimiento y mantención de las gestaciones post transferencia.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Para la validación de la pregunta biológica planteada este trabajo se dividió en dos experimentos que responden a la hipótesis planteada.

Pregunta Biológica: ¿Las características (morfológicas y contenido de miARNs) de las EVs son diferentes cuando los embriones morfológicamente competentes son producidos *In vitro* o *In vivo*?

Hipótesis: Los embriones bovinos producidos *In vitro* secretan durante la etapa de blastulación y eclosión poblaciones de vesículas extracelulares cuyas características (morfológicas y contenido de miARN) difieren de las secretadas por embriones producidos *In vivo*.

Las características (morfología y contenido) de las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos variarán según el origen del embrión y la etapa de desarrollo.

Objetivo general

Determinar las características poblacionales y el perfil de miARN de vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* durante la etapa de blastulación y eclosión, y su relación con la calidad embrionaria.

Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto del desarrollo embrionario *In vitro* sobre las características de las poblaciones de vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos cultivados de manera individual.
2. Evaluar las características poblacionales de las EVs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* y su capacidad de desarrollo *in vitro* hasta la etapa ovoide (Día 11).

3. Determinar el efecto del desarrollo embrionario *In vitro* sobre el contenido de miARNs en vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos *PIV* e *IVV*.
4. Evaluar la expresión diferencial de miARNs contenidos en las EVs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* con su capacidad de desarrollo *In vitro exhibida* hasta la etapa ovoide de desarrollo (Día 11).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Diseño experimental*

Se produjeron embriones *In vitro* e *In vivo* para el experimento 1 y 2. En el experimento 1. se generó 30 embriones *In vivo* y 60 embriones *In vitro* correspondiente al estadio de blastulación; en el experimento 2. de igual manera se produjeron 30 embriones para el grupo *In vivo* y 30 embriones para el grupo *In vitro correspondiente al estadio de eclosión*. En la producción de embriones *In vivo* asumimos una media de recuperación de 5 embriones viables por cada donante, para lo cual superestimulamos 7 donantes en el Exp 1. y 7 donantes en el Exp.2. En el caso de los embriones *in vitro*, el rendimiento de embriones se basó en los resultados de *PIV* estandarizados por el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de Concepción (Velasquez et al., 2016; Mellisho et al., 2017, 2019); donde se consideró un rango de 30 a 45 % de desarrollo hasta estadio de mórula y de 20 a 30 % de desarrollo hasta el estadio de blastocisto..

A continuación, se detalla el diseño experimental del estudio.

Experimento 1. Evaluación de las características poblacionales y el perfil de miARNs de EVs secretadas en la etapa de blastulación por embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo*

En el experimento 1 se produjeron embriones tanto *In vivo* como *In vitro*. Los embriones producidos *In vivo* fueron generados por la técnica de Superovulación (SOV), inseminación artificial y lavado uterino de las hembras donantes (Bó and Mapletoft, 2014). Para lo cual 7 hembras donantes de genotipo cárnico fueron superestimuladas con hormona folículo estimulante (FSH) e inseminadas con semen comercial de toro (empresa ABS GLOBAL) de genotipo cárnico. Los embriones se colectaron al día 5 post - inseminación

mediante lavado uterino. Seguidamente, se seleccionaron los embriones en estadio de mórula (grado I, IETS 2010) los cuales se cultivaron individualmente en microgotas de 40 μ l de medio SOFaa (Fluido oviductal sintético-synthetic oviductal fluid) depletado de EVs. Se evaluó el estadio de desarrollo al día 7 post-inseminación y se determinó el porcentaje y calidad morfológica de blastocistos según la clasificación de la IETS, 2010. Se transfirieron individualmente los blastocistos grado 1 a una nueva gota de medio SOFaa sin depletar donde se mantuvieron en cultivo hasta el día 11 (estadio ovoide) de desarrollo embrionario para evaluar su capacidad de desarrollo post “eclosión” (**Figura 1**). El mismo día 7 se colectó y conservó a -80°C el medio de cultivo (SOF depletado) de los embriones de estadio de blastocistos y de grado 1. En paralelo se produjeron embriones *PIV*, mediante recuperación de ovocitos de ovarios de matadero, los ovocitos fueron clasificados, madurados, fertilizados *In vitro* los cuales se cultivaron en grupos (25 a 30 COCs en 500 μ L/pocillo de placa de 4 pocillos) en medio SOFaa. Al día 5 de cultivo se evaluó el estadio de desarrollo y se seleccionaron las mórulas (calidad morfológica según el Manual de la IETS, 2010) las cuales se cultivaron individualmente en microgotas de 40 μ l de medio SOFaa (fluido oviductal sintético) depletado de EVs hasta día 7. Se evaluó el estadio de desarrollo al día 7 post-inseminación y se determinó el porcentaje y calidad morfológica de blastocistos según el Manual de la IETS, 2010. Se colectó y conservó el medio de los embriones a -80°C en estadio de blastocistos de grado 1. Los blastocistos pasaron a una nueva gota de medio SOF sin depletar donde se mantuvieron en cultivo hasta el día 11 (estadio ovoide) de desarrollo embrionario para evaluar su capacidad de desarrollo post “eclosión” (**Figura 1**).

El medio de cultivo colectado de cada blastocisto al día 7 de desarrollo embrionario (embriones *PIV* e *IVV*) fueron identificados con su respectivo embrión para su posterior análisis de correlación. El medio de cultivo se conservó a -80°C para análisis de nanopartículas, citometría, microscopia

electrónica y secuenciación. Se determinaron las características de las nanopartículas aisladas mediante NTA (concentración, tamaño) y se evaluó la naturaleza de estas partículas mediante evaluación de marcadores de superficie de EVs (CD9, CD40, CD63 y CD81-tetraspaninas) y su morfología utilizando microscopía electrónica de transmisión en el Laboratorio de Microscopia de la Universidad de Concepción.

Para el experimento 1, se produjeron 30 blastocistos para el grupo *In vivo* y 60 blastocistos para el grupo *In vitro*.

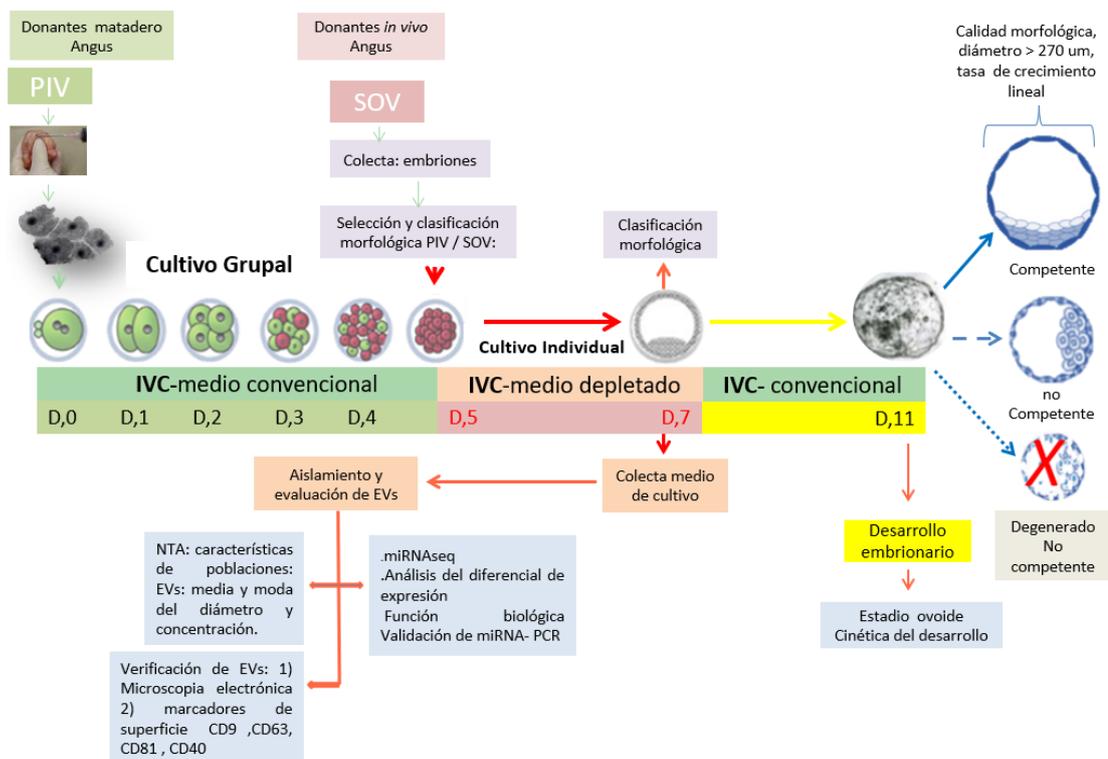


Figura 1 Esquema del diseño del Experimento 1.

Fuente: Elaboración Propia.

Experimento 2) Evaluación de las características poblacionales y el perfil de miARNs de EVs secretadas en la etapa de eclosión por embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo*.

En el experimento 1 se produjeron embriones tanto *In vivo* como *In vitro*. Los embriones producidos *In vivo* fueron generados por la técnica de Superovulación (SOV), inseminación artificial y lavado uterino de las hembras donantes (Bó and Mapletoft, 2014). Para lo cual 7 hembras donantes de genotipo cárnico fueron superestimuladas con hormona folículo estimulante (FSH) e inseminadas con semen comercial de toro (empresa ABS GLOBAL) de genotipo cárnico. Los embriones se colectaron al día 7 post-inseminación mediante lavado uterino. Seguidamente, se seleccionaron los embriones en estadio de blastocisto (grado I, IETS, 2010) los cuales se cultivaron individualmente en medio SOFaa (fluido oviductal sintético-synthetic oviductal fluid) depletado de EVs. Se evaluó el estadio de desarrollo al día 9 post-inseminación y se determinó el porcentaje y calidad morfológica de blastocistos eclosionados (calidad morfológica según el Manual de la IETS, 2010). Se colectó y conservó a -80°C el medio de cultivo (SOFaa depletado) de los embriones en estadio de blastocistos eclosionados. Los blastocistos pasaron a una nueva gota de medio SOF sin depletar donde se mantuvieron en cultivo hasta el día 11 de desarrollo embrionario (estadio ovoide) para evaluar su capacidad de desarrollo post eclosión (**Figura 2**). En paralelo se produjeron embriones mediante fecundación *In vitro* los cuales se cultivaron en grupos (25 a 30 COCs en 500µL/pocillo de placa de 4 pocillos) en medio SOFaa. Al día 7 de cultivo se evaluó el estadio de desarrollo y se seleccionaron las mórulas (calidad morfológica según el Manual de la IETS, 2010) las cuales se cultivaron individualmente en medio SOFaa (fluido oviductal sintético) depletado de EVs hasta día 9. Se evaluó el estadio de desarrollo al día 9 post-inseminación y se determinó el porcentaje y calidad morfológica de blastocistos eclosionados según el Manual de la (IETS, 2010).

Se colectó y conservó el medio de los embriones en estadio de blastocistos eclosionados. Los blastocistos pasaron a una nueva gota de medio SOF sin depletar donde se mantuvieron en cultivo hasta el día 11 (estadio ovoide) de desarrollo embrionario para evaluar su capacidad de desarrollo post eclosión (**Figura 2**).

El medio de cultivo colectado asociado a cada blastocisto al día 9 de desarrollo embrionario se identificó con su respectivo embrión para posterior análisis de correlación. El medio de cultivo se conservó a -80°C para análisis de nanopartículas, citometría, microscopia electrónica y secuenciación. Se determinaron las características de las nanopartículas aisladas mediante NTA (concentración, tamaño) y se evaluó la naturaleza de estas partículas mediante evaluación de marcadores de superficie (Tetraspaninas - CD9, CD63, CD81 y CD40) y morfología utilizando microscopía electrónica de transmisión en el Laboratorio de Microscopia de la Universidad de Concepción.

Para este experimento se produjo 30 blastocistos por cada grupo experimental (*In vivo* e *In vitro*).

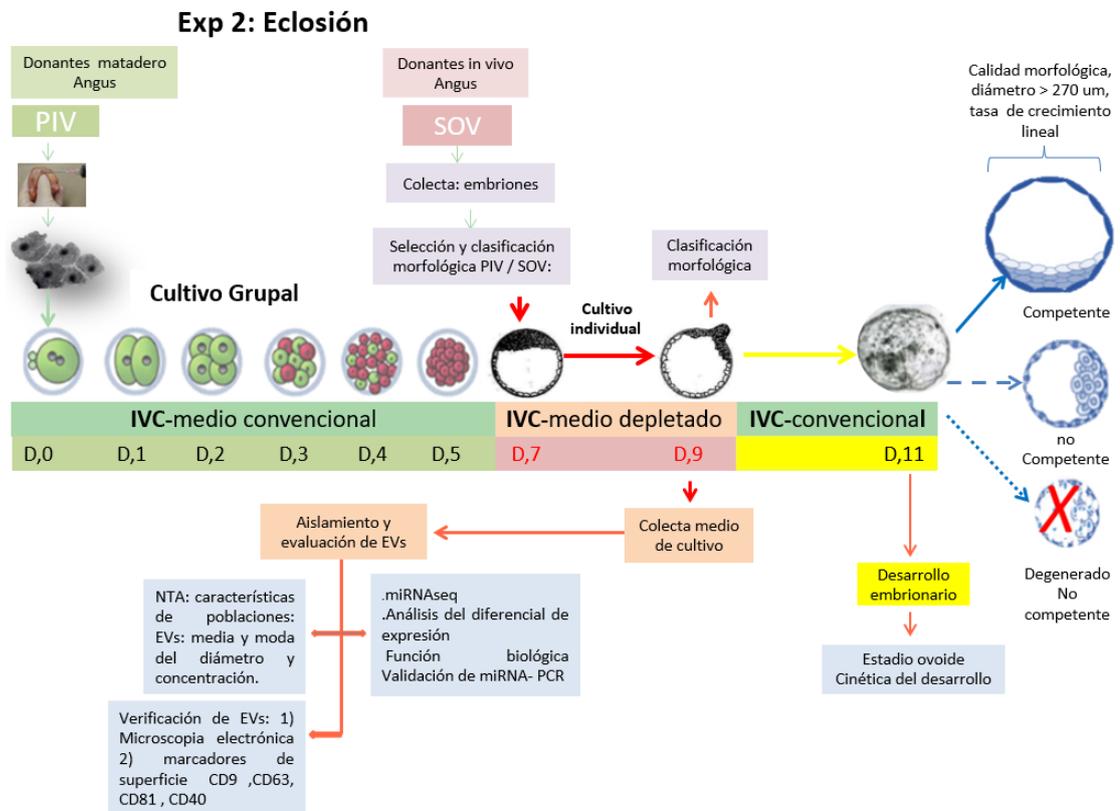


Figura 2 Esquema del diseño del Experimento 2.

Fuente: Elaboración Propia.

En la presente tabla se presenta la distribución del número de muestras y el código asignado, estadio de desarrollo blastulación-eclosión, y el origen *In vitro* e *In vivo* de los embriones.

Tabla 4 Diseño experimental: distribución de grupos, muestras y replicas de los experimentos 1 y 2 respectivamente.

| Muestras ID | Estadio de Desarrollo | Origen |
|----------------|---|--|
| <i>PIV 5-7</i> | Blastulación (Exp. 1) Día 5 a día 7 | <i>In vitro</i> Seis replicas 6 réplicas (EVs x10 embriones x réplica) |
| <i>PIV 5-7</i> | | |
| <i>IVV 5-7</i> | | <i>In vivo</i> 3 réplicas (EVs x10 embriones x replica) |
| <i>IVV 5-7</i> | | |
| <i>IVV 5-7</i> | | |
| <i>PIV 7-9</i> | Eclosión (Exp. 2) Día 7 a día 9 | <i>In vitro</i> 3 réplicas (EVs x10 embriones x replica) |
| <i>PIV 7-9</i> | | |
| <i>PIV 7-9</i> | | |
| <i>IVV 7-9</i> | | <i>In vivo</i> 3 réplicas (EVs x10 embriones x replica) |
| <i>IVV.7-9</i> | | |
| <i>IVV 7-9</i> | | |

PIV= producción de embriones *In vitro* 5-7= estadio blastulación
IVV= producción de embriones *in vitro* 7-9= estadio blastulación

Fuente: Elaboración Propia.

2. Metodologías de investigación y desarrollo

2.1. Lugar

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción (UDEC), campus Chillán; Región de Ñuble.

2.2. Producción de embriones In vivo

Los embriones producidos *In vivo/IVV* fueron obtenidos de hembras Angus Rojo, clínicamente sanas (Phillips and Jahnke, 2016), en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria del departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Concepción-campus Chillán. Para la obtención de los embriones *In vivo* se utilizó el procedimiento de superovulación, inseminación y colecta de embriones descrito por (G.A. Bó & Mapletoft, 2020), con algunas modificaciones en los tiempos de inseminación de las donadoras. Los procedimientos con estos animales fueron ejecutados previa aprobación del comité de ética de la Facultad de Ciencias veterinarias de la Universidad de Concepción. Inicialmente se realizó un control ginecológico para determinar el estatus ovárico y uterino para mantener una integridad funcional de los órganos reproductivos (Phillips & Jahnke, 2016).

Se realizó a las donantes una valoración la población folicular mediante ultrasonografía (Sonoscape X3V con traductor sectorial de 5 MHz). Para sincronizar de la emergencia de la onda folicular entre las donantes, el Día 0 en la mañana (07:00 am) se aplicó un dispositivo intravaginal de 1,38 gr de Progesterona (CIDR®; Zoetis) + 2.5 mg de benzoato de estradiol (Zoetis) im. + 50 mg de progesterona im. (Phillips and Jahnke, 2016; Bó and Mapletoft, 2020). La estimulación hormonal para SOV se inició en la mañana (07:00 am) del día 4 hasta el día 7. Cada animal donante del grupo control recibió 250 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario,

Canadá) distribuidos en 8 tratamientos im. (con un rango decreciente de 50 mg a 10 mg) a intervalos de 12 horas durante un período de 4 días. Dos dosis de prostaglandina F2alfa (DL-cloprostenol, Ciclase®, Zoetis) am/pm (500µm) se administraron con 12 horas de diferencia en el día 6, y los CIDR se retiraron 12 horas antes de la última aplicación de NIH-FSH-P1 en el día 7 (Gabriel A. Bó et al., 2006). A las 48 horas después de la primera dosis DL-cloprostenol las donadoras presentaron celo (07:00 am), y se les aplicó 0,021 mg de Acetato de Buzerelina (im) (Conceptal® MSD). Luego de 12 horas de presentado el celo en las donantes superovuladas se efectuó la primera inseminación y a las 48 del inicio del celo se realizó la segunda inseminación.

Las donantes fueron inseminadas por un técnico experimentado, usando semen comercial de toros de raza Angus Rojo. La colecta de los embriones de las donadoras se realizó en el día 5 y en el día 7 después del inicio del celo mediante un lavado uterino transrectal de sistema cerrado descrito en detalles por Bó et al.(2010), usando cateteres uterinos de silicon tipo Foley de 2 vías, y medios de colección comerciales ABT360 Complete Flush (Bó and Mapletoft, 2014).

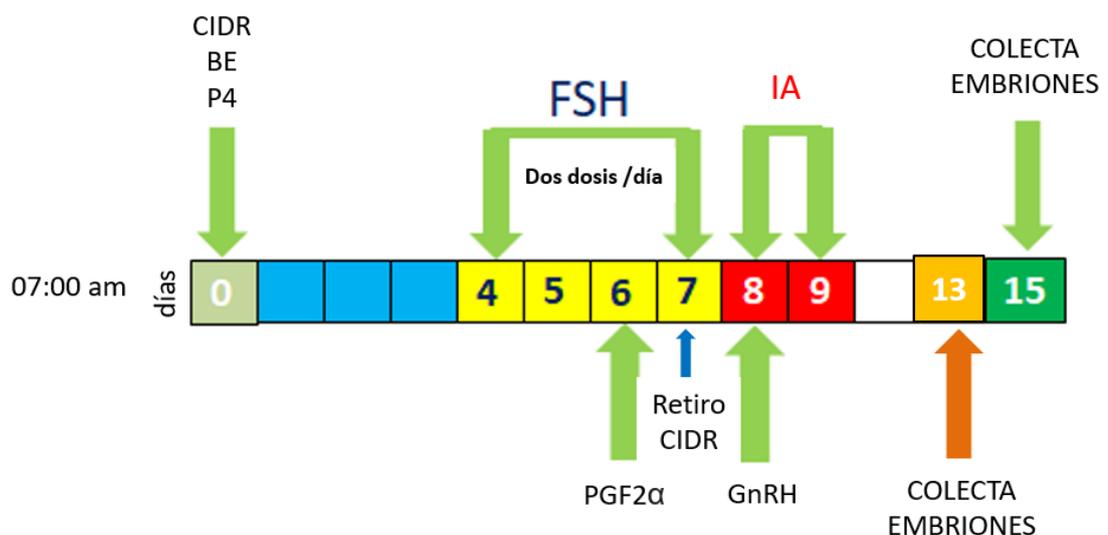


Figura 3 Esquemas del protocolo de producción In vivo de embriones. Se aplicó un protocolo de tratamiento superestimulador de 4 días basado en la sincronización de la emergencia de la onda folicular, aplicación del CIDR, NIH-FSH-P1 (250 mg), Inseminación artificial y colecta de embriones (Bó and Mapletoft, 2014).

Fuente: Elaboración Propia.

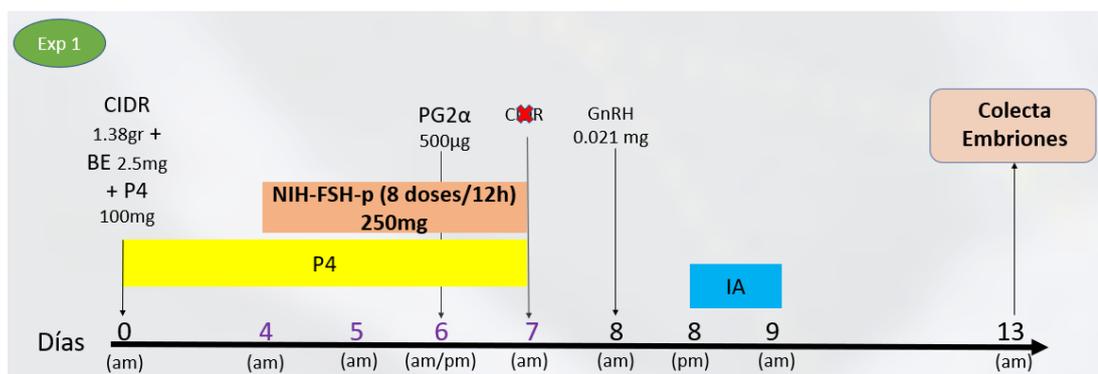


Figura 4 Esquema de tratamientos superestimuladores basados en FSH para donantes de aptitud cárnica- *Bos taurus*, Día; E₂, 2mg de benzoato de estradiol; P₄, 50 mg de progesterona; PGF_{2 α} , 500 μ g de cloprostenol. Experimento 1: la colecta de embriones se realizó al día 13 del protocolo (Bó and Mapletoft, 2014).

Fuente: Elaboración Propia.

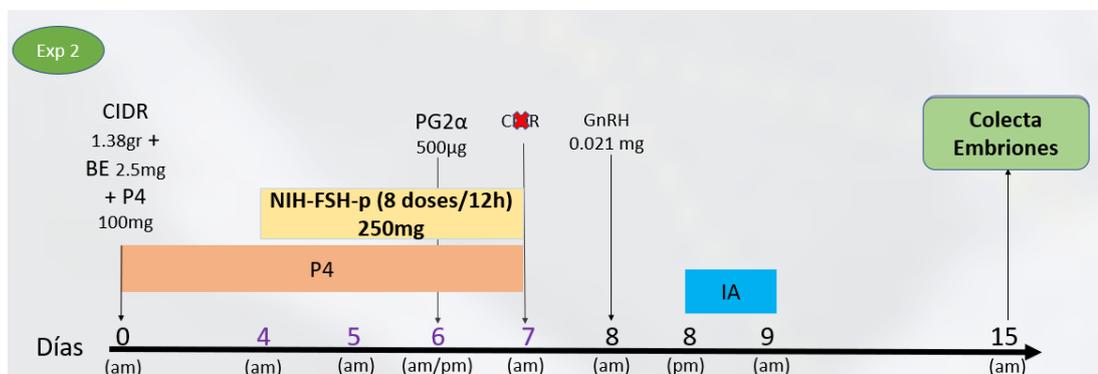


Figura 5 Esquema de tratamientos superestimulatorios basados en FSH para: donantes de aptitud cárnica- Bos taurus,, Día; E₂, 2mg de benzoato de estradiol; P₄, 50 mg de progesterona; PGF_{2α}, 500ug de cloprostenol. Experimento 2: la colecta de embriones se realizó al día 15 del protocolo (Bó and Mapletoft, 2014).

Fuente: Elaboración Propia.

2.3. Producción de embriones In vitro

Colecta y maduración ovocitaria

Los complejos cúmulo-ovocito (COCs) fueron obtenidos de ovarios de vacas con actitud cárnica de un matadero local (Frigosur, Chillan, Chile). El procedimiento de obtención, maduración, fecundación y cultivo se realizó en base a los protocolos descritos por (Velasquez et al., 2016; Mellisho et al., 2017). Los ovarios colectados de hembras sacrificadas se transportaron en termos con solución fisiológica (0.9% de NaCl + 20 mg de gentamicina) a una temperatura de 36°C +/- 1°C hacia el laboratorio de biotecnología animal de la UDEC. Los COCs fueron obtenidos por aspiración del líquido de folículos antrales (3 a 6 mm de diámetro) con aguja 19G de 1 pulgada y seleccionados para la maduración *In vitro* sobre la base de las características morfológicas descritas por la IETS (G. A. Bó & Mapletoft, 2013).

Los COCs se visualizaron bajo un estereomicroscopio (20 a 40X) provisto de platina térmica, inmediatamente fueron transferidos a una placa de 100 mm con medio de manipulación (TCM199 con 4 mM de bicarbonato de sodio, 18 mM de Hepes y suplementado con 10 % de SFB y 50 mg/ml de gentamicina) temperados a 38 °C para ser lavados y clasificados bajo un aumento de 40X. Los COCs fueron evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías (Boni et al., 2002; Balaban et al., 2011); (Grado 1) completamente rodeados por más de 3 capas de células del cúmulus y citoplasma homogéneo, (2) ovocitos parcialmente rodeados por células del cúmulus y

citoplasma irregular, (3) ovocitos desnudos y (4) ovocitos rodeados por fibrina, con aspecto de tela de araña y cumulus expandido. Los COCs se clasificaron como viables (calidad 1 y 2) y no viables (calidad 3 y 4). Solo se usaron COCs de Grado 1 para los procesos de maduración y fecundación *In vitro*.

Los COCs obtenidos se maduraron *In vitro* (MIV) en placas de 4 pocillos en grupos de hasta 25 COCs en una atmósfera de 5 % de CO₂ en aire, humedad del 90 % y 39 °C durante 20 a 22 horas. La MIV de COCs colectados se realizó en un medio de cultivo TCM 199 para la maduración suplementado con 0.6 mM de glutamina, 0.2 mM de piruvato, 0.01 UI/ml de FSH y LH, 1 µg/ml de estradiol, 50 µg/ml de gentamicina, 10 ng/ml de EGF y 10 % de SFB.

Fecundación In vitro (FIV)

Los espermatozoides se obtuvieron de pajillas comerciales de 0,25 ml, descongeladas a 35°C por 30 segundos. Los espermatozoides se separaron del diluyente utilizando el método de percoll. Para seleccionar los espermatozoides se utilizó el método de minipercoll 90/45. En breve, en un microtubo se colocó 250 µl de percoll 45 % en la gradiente superior y 250 µl de percoll 90 % en la gradiente inferior. En la parte superior de la gradiente se depositarán 250 µl de semen; seguidamente se llevó a centrifugación a 1.021 g por 6 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, y al pellet obtenido de espermatozoides se resuspendió en 500 µl de medio de fecundación y se centrifugó a 454 g por 3 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo el pellet (porción rica en espermatozoides). Se analizó la calidad y cantidad espermática, para estandarizar la concentración final de 10X10⁶ espermatozoides motiles/ml. La dosis espermática por ovocito para la fecundación fue de 10.000 espermatozoides por pocillos en 500 µl de medio FIV con 25 a 30 ovocitos maduros. La fecundación se realizó en medio TALP-FIV suplementado con 0.01 mg/ml de heparina, 2 mM de piruvato, 50 mg/ml de gentamicina y 6 mg /ml de SAB libre de ácidos grasos. La FIV se

realizó en atmósfera de 5 % de CO₂, humedad del 90 % a 39 °C durante 18 horas.

Cultivo In vitro (CIV)

Transcurridas las 18 h post fecundación, los presuntos cigotos se desnudaron de las células del cúmulo mecánicamente en vórtex por 3 min en medio TCM-199 con HEPES + 0,3 mg/mL de hialuronidasa. Los presuntos cigotos se depositaron en una placa de 60 mm con medio de manipulación y posteriormente se lavaron dos veces en medio de manipulación y finalmente en medio de cultivo equilibrado. El cultivo se realizó en placa de 4 pocillos (25 a 30 cigotos en 500 µl) en medio de cultivo SOFaa, suplementado con 0,4 mm piruvato sódico, 0.2 mm de l-glutamina, 1 X de aminoácidos esenciales y no esenciales, 10 ng/ml de EGF, 2 % de SFB, 0.1 mg/ml de ácido cítrico, 0,5 mg/ml de mio-Inositol y 0.3 % de albúmina sérica bovina (SAB) libre de ácidos grasos e incubadas a 38.5 °C, 5 % de CO₂, 5% de O₂, 90 % de N₂ y humedad mayor al 85 %, hasta el estadio de mórula (Día 5 post *In vitro*-fecundación).

Experimento 1): Al día 5 de desarrollo, los embriones en estadio de mórula Grado 1 fueron seleccionadas y cultivadas individualmente en placas de 96 pocillo en 80 µl de medio de cultivo SOFaa depletado de EVs. La incubación se realizó a 38.5°C y mezcla de gases (5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N) y 85 % de humedad, hasta el día 7 de desarrollo. Al día 7 los embriones fueron evaluados y clasificados según su calidad morfológica y se colectó el medio de cultivo el cual se conservó a -80°C para posterior evaluación de EVs. Al día 7 los blastocistos se pasaron a un nuevo medio de cultivo (1 embrión en 130 µl con SOFaa convencional, para continuar su monitoreo hasta el día 11 de desarrollo (post- FIV/IA). La incubación se realizará a 38.5°C y mezcla de gases (5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂) y 85 % de humedad.

Experimento 2): Al día 7 de desarrollo, los embriones fueron clasificados, los blastocistos grado I se seleccionaron y cultivaron individualmente en placas de 96 pocillos en 80 µl de medio de cultivo SOFaa depletado de EVs. La incubación se realizó a 38.5°C y mezcla de gases (5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N) y 85 % de humedad, hasta el día 9 de desarrollo. Al día 9 los embriones fueron evaluados y clasificados según su calidad morfológica y se colectó el medio de cultivo el cual se conservó a -80°C para la posterior evaluación de EVs. Al día 9 los blastocistos se pasaron a un nuevo medio de cultivo (1 embrión en 130 µL con SOFaa convencional, para continuar su monitoreo hasta el día 11 de desarrollo (post-FIV/IA). La incubación se realizó a 38.5°C y mezcla de gases (5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N) y 85 % de humedad.

2.4. Clasificación embrionaria

La primera selección de embriones (*In vitro/In vivo*) se realizó al día 5 post FIV/IA donde se seleccionaron embriones en el estadio de mórula y posteriormente al día 7 donde se evaluó el desarrollo hasta estadio de blastocisto. Los criterios de clasificación morfológica de los embriones, se realizaron de acuerdo con las pautas de clasificación de la Sociedad Internacional de Tecnologías de Embriones (IETS, 2010) (Bó and Mapletoft, 2013; Rocha et al., 2016), basado en dos criterios: 1) calidad (CB) y 2) etapa de desarrollo (ED).

- ED: 1: 1 célula; 2: 2 a 16 células (blastómeras), 3: mórula temprana: 16 a 32 blastómeras; 4: mórula; 5: blastocisto temprano; 6: Blastocisto; 7: blastocisto expandido; 8: blastocisto protruyendo.

Mórula compacta: día 5-6, aprox. 32-64 blastómeras. Sus blastómeras están unidos y constituyen una masa compacta ocupa el 60-70% del espacio perivitelino. Blastocisto temprano: día 7 aproximado, 100-150 células, presencia inicial de células trofoectodérmicas y formación de

una cavidad (blastocelo), ocupa 70-80% del espacio perivitelino. Blastocisto: día 7-8, aprox. 150-200 células, hay diferenciación entre el trofoblasto (más oscura), que constituyen una pared que se adosa a la zona pelúcida y la masa celular interna (o disco embrionario). Blastocisto expandido: día 7-8, 200 a 300 células, el diámetro aumenta considerable (1.2 a 1.5x), adelgazamiento de la zona pelúcida a 1/3 de su espesor original y comienza su protrusión.

Blastocisto protruido: día 8,5-9, 300-500 células, eliminación de zona pelúcida, forma esférica con blastocelo bien definido. La zona se ha debilitado bajo la presión del crecimiento del blastocisto

- CB: 1: Excelente (macizo bien definido, sin defectos visibles, las blastómeras son claramente visibles, de color y estructura esferoide uniforme y células trofoblásticas alargadas sin signos de degeneración en blastocelo, zona pelúcida lisa y espacio perivitelino bien definido); y 2: Buenos (presencia de pocas blastómeras desprendidas, el macizo posee una pequeña cantidad de detritus celulares y su forma puede ser ligeramente irregular; 3: Malos (zona pelúcida irregular, macizo disgregado, presencia de vacuolas en citoplasma y espacio perivitelino, blastómeras separadas, células trofoblásticas con signos de degeneración, blastocelo pignótico).



Figura 6 Cronología del desarrollo embrionario. Morfología de diferentes estadios de desarrollo. Manual IETS, 2010 (Bó and Mapletoft, 2013; Rocha et al., 2016).

Los blastocistos seleccionados al día 7 y 9 puestos en cultivo extendido individual (Experimento 1y 2), fueron monitoreados diariamente (a la misma hora) para determinar viabilidad y diámetro. La última evaluación se realizó al día 11 de desarrollo, donde se consideraron embriones competentes aquellos que tengan una morfología que indique viabilidad celular, y un crecimiento lineal durante el periodo de cultivo, diámetro >270 μm (Mellisho et al., 2017, 2019)

Los criterios de clasificación morfológica de los blastocistos al Día 11 fueron de: Competentes (C) diámetro > 270 μm , calidad 1 y 2, menos competentes (LC) diámetro > 160 μm y 270 μm , calidad 3 y No Competente (NC) diámetro < 160 μm , calidad 3 y 4. Los embriones que no son viables o que no cumplan con al menos dos de los tres criterios, fueron considerados como no competentes.

2.5. Aislamiento de EVs y caracterización de nanopartículas

Aislamiento de EVs

Los medios de cultivo de embriones de días 7 y día 9 se analizaron de forma individual y fueron sujeto de la purificación de EVs. La técnica de aislamiento de EVs usada fue publicada por Thery et al. (2006) y estandarizado en nuestro laboratorio por Mellisho et al. (2017). El protocolo está diseñado para eliminar las células y los detritos celulares mediante centrifugaciones seriadas. El protocolo está conformado por 4 pasos que consisten en una centrifugación diferencial: paso 1, centrifugación a 200-700xg/10-20 min, para eliminar detritos del medio; paso 2, 1500-3500xg/ 10-20 min; paso 3, 10000-12000xg/ 30 min, de los cuales el sobrenadante se usó para el siguiente paso; paso 4, 100000-120000xg/120 min; en este paso final se eliminó el sobrenadante, y el pellet que contiene las EVs se reconstituyó en 500 µl de PBS. ~500 µL de sobrenadante se filtra en Amicon® Ultra-15 (100 kDa), centrifugado a 2500 x g y se resuspendieron en 250 µL de PBS. Las EVs aisladas se analizaron para determinar sus características poblacionales de acuerdo con los criterios establecidos por la ISEV.

Análisis de tamaño y concentración de partículas

La caracterización general de la población de nanopartículas aisladas del medio de cultivo de cada blastocisto se evaluó mediante seguimiento de nanopartículas (NTA según siglas en inglés). Esta evaluación permitió determinar la concentración (partículas/ml) y tamaño de las partículas (nm). Este equipo utiliza las propiedades tanto de dispersión de luz como de movimiento Browniano para obtener la distribución del tamaño de las partículas en suspensión líquida. Para este análisis el pellet aislado de nanopartículas se diluido 1/20 (30 µl de pellets en 570 µl PBS). El equipo que se uso fue el NanoSight NS300 con Laser 488 azul (Mavern Instrument, Uk) de acuerdo al protocolo del fabricante (Malvern Instruments, 2015) y

recomendaciones de (Bachurski et al., 2019). Las muestras diluidas se cargaron a la cámara automáticamente con velocidad de flujo constante, utilizando “bomba de jeringa para nanoSinght” con el fin de reducir errores del operador. La temperatura del análisis se fijó a 25°C con ajustes de cámara apropiada y enfoque correcto para identificar la dispersión de la luz de partículas. El software NTA 2.3 fue utilizado para la captura de datos y análisis de tamaño y concentración de nanopartículas basadas en el movimiento Browniano y medida de la dispersión de luz. El reporte NTA entrega información global y por muestra, siendo los indicadores de mayor interés el tamaño medio de partículas, desviación estándar del tamaño de partículas, concentración de partículas y gráfica de distribución del tamaño de las partículas de la muestra.

Microscopía electrónica de transmisión

Con las EVs aisladas de los medios de cultivo de los embriones, de día 7 y de día 9 de desarrollo generados por *PIV* e *IVV*, se prepararon 4 grillas de cobre para la microscopía electrónica, siguiendo el protocolo descrito por Yuana (2017) y Théry et al., (2006). Inicialmente, una grilla de cobre de 200 mesh recubierta con formvar-carbón fue cargada en una gota de 50 µL de EVs aisladas durante 3 min. Luego, las grillas se lavaron del exceso de EVs en 3 gotas de 50 µl de PBS, para luego fijarlas en una gota de 50 µL de 1% de glutaraldehído en PBS de 0,1 M. Seguidamente, las grillas fueron contrastadas en una gota de 50 µL de solución de uranil oxalato (Electron Microscopy Sciences, USA) (pH 7,0) durante 5 min, para luego transferirla a una gota de 50 µL de metilcelulosa-UA (Sigma M6385) durante 10 min en superficie de hielo. Luego, las grillas se secaron al aire a temperatura ambiente durante la noche. Finalmente, cada una de las grillas fueron colocadas en el soporte de muestra del TEM para realizar la búsqueda y adquisición de imágenes de EVs a un aumento de 40.000X a 80.000X. Se capturaron un aproximado de 5 imágenes por muestra sobre una base individual que fueron

procesadas con el software ImageJ (V1.47t, NIH, USA. <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Análisis de marcadores de superficie

Se evaluó la presencia de marcadores específicos de EVs (microvesículas/exosomas), definidos por la ISEV. La presencia de estos marcadores (CD9, CD63, CD40 y CD81) se determinaron mediante citometría de flujo, siguiendo los procedimientos estandarizados en nuestro laboratorio (Mellisho et al., 2017). Inicialmente, 35 μL ó 4×10^8 partículas de EV's se mezclaron con 0.125 μL ó 1.25×10^5 partículas de perlas de látex de 4 μm de diámetro (Life Technologies, Santiago, Chile) en un volumen final de 100 μL de PBS para ser incubadas durante 18 hrs a 4 °C. Posteriormente, se añadieron 22 μL de glicina 1 M en PBS y se mezclaron suavemente (para bloquear los sitios no unidos de las perlas de látex), manteniéndolas durante 45 minutos a temperatura ambiente. El complejo de EVs + perlas de látex se lavó dos veces con 1 mL de PBS con 0.5% de BSA por centrifugación a 1500 x g durante 3 min a temperatura ambiente. Se recuperaron 100 μL de los complejos EVs + perlas de látex y se incubaron con anticuerpos contra CD63 (FITC-conjugated; Abcam, ab18235), CD9 (FITC-conjugated; Abcam, ab34162), CD81 (PE-conjugated; Abcam ab81436) o CD40L (PE/Cy5®-conjugated; Abcam ab25044) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó una reacción del anticuerpo (CD63, CD9, CD40 y CD81) con las perlas de látex como control negativo. Para realizar el análisis, 100 μL del complejo de EVs + perlas de látex marcadas, se resuspendieron con 400 μL de fluido de enfoque para citometría de flujo usando el equipo Attune™ NxT Flow Cytometer (Life Technologies, Inc, USA).

2.6. Análisis del contenido de miARN en EVs aislados de medio de cultivo embrionario

Se realizó un análisis del global de las EVs (NTA) aisladas de medios de cultivo de los blastocistos del Experimento 1 y 2. Una vez realizado el análisis de NTA, las muestras se colectaron nuevamente y se organizaron 4 grupos experimentales: 1) EVs de embriones producidos *In vivo* (EVs-*IVV*) en estadio de a) blastulación (*IVV* 5-7) y b) de eclosión (*IVV* 7-9), y 2) EVs de embriones producidos *In vitro* (EVs-*PIV*) en estadio de c) blastulación (*PIV* 5-7) y d) de eclosión (*PIV* 7-9). De cada grupo del experimento 1 y 2 se organizaron tres réplicas respectivamente, que a su vez se conformaron un pool de medio de cultivo de 10 blastocistos por replica por grupo.

Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído de la suspensión de EVs de cada pool usando el kit de aislamiento kit Exosomal RNA Isolation Kit de Norgen (Canadá) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante y sugerencias de Lasser et al. (2012). El proceso de aislamiento se realizó en un ambiente y con materiales libres de ARNasas. Para la extracción de ARN, se añadió 300 µl del buffer de lisis A ,37.5 µl del buffer B a 200 µl de la suspensión (EVs), agitar en vórtex e incubar por 10 minutos para finalmente agregar 500 µl de Etanol al 96%. 500 µl de este mix se añadió a la columna "mini Spin column" y se centrifugó por 1 minuto a 3300 x g. Posteriormente la columna fue lavada con el buffer de lavado A por el mismo tiempo y revoluciones indicadas anteriormente. Finalmente se agregó 20 µl de buffer de elución a la columna y se centrifugó a 14 000 x g por 2 minutos para obtener el ARN total. El ARN aislado fue conservado a -80 °C, hasta su secuenciación.

Secuenciación de pequeños ARN y análisis de datos

La secuenciación de miARNs se realizó a través de la empresa Norgen Biotek Corp (Thorold, ON, Canadá). Las muestras de ARN se enviaron en hielo seco a Canadá. La empresa brindó el servicio de análisis de calidad del ARN extraído, secuenciación, preparación de librerías, evaluación de calidad de las secuencias, anotación y análisis de expresión diferencial. Las muestras secuenciadas fueron analizadas para su cuantificación de integridad de ARN utilizando el kit RNA Screen Tape Analysis (Agilent, USA). Todos los valores de las muestras fueron superiores a valor 7 de RIN procediéndose a la construcción de las librerías, estas fueron generadas utilizando el kit Small RNA library prep, siguiendo las instrucciones del fabricante, asignándosele los índices correspondientes a cada muestra. La preparación de las librerías y secuenciación se realizó mediante la plataforma NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 high-throughput sequencing platform (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Canada). Las bibliotecas fueron inspeccionadas utilizando el programa FastQC, evaluándose los valores de Phreads, longitud de reads, secuencias sobre representadas y adaptadores remanentes de la construcción de las librerías. Posteriormente se realizó un filtrado utilizando el programa FastPE teniendo como filtros, la exclusión de reads Phreads > 20, reads de baja complejidad y adaptadores.

Los reads resultantes fueron mapeados utilizando el programa Bowtie 2 contra la base de referencia de mirBase versión 21 y el genoma disponible en NCBI. Los resultantes archivos tipo SAM fueron indexados, ordenados por posición y convertidos en formato BAM, utilizando el programa SAMtools. Estos archivos fueron cuantificados utilizando el programa FeaturesCounts, utilizando el archivo de anotación disponible (GFF3), resultando en una matriz de cuentas (Raw counts).

Previo al análisis de Expresión diferencial se realizó una normalización de las librerías utilizando los valores de CPM mediante el paquete Voom- El análisis de diferencial de expresión se llevó a cabo mediante el paquete EdgeR en la plataforma R, utilizando un filtro de corte mínimo de 5 conteos totales por gen. La matriz de CPM (Conteos de genes por millón) fue creado utilizando el método de normalización TMM y ajustándose a un modelo lineal generalizado binomial negativo con un valor estadístico significativo de $p < 0.05$ y este último ajustado utilizando el procedimiento Benjamini-Hochberg obteniéndose el FDR significativo ($FDR < 0.05$). Los datos se representaron mediante “volcano plot”, mapa de calor y además se realizó análisis multidimensionales para visualizar la dispersión de los datos dentro de cada grupo.

2.7. Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el programa estadístico SAS v8 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU., 1999). La significancia estadística que se empleó fue $p < 0.05$.

Para el análisis de las características morfológicas de los blastocistos (estadio de desarrollo, calidad y diámetro) y características de EVs (media y moda del tamaño y concentración), se empleó el Test U de Mann-Whitney para datos sin supuestos de normalidad. Se aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la comparación de medias mediante el test HSD (Honestly-significant-difference) ó LSD (Least Significant Difference) y el análisis multidimensional (MDs) y de conglomerados (CA) a través de PROC PRINCOMP y PROC CLUSTER para discriminar grupos de embriones con diferente competencia. Para evaluar la correlación entre la competencia embrionaria, y capacidad de desarrollo, se aplicó un test de Pearson y test de Spermán. Según el diseño experimental diseñado los datos se ajustaron a un modelo lineal general de dos factores, siendo el tipo de Producción

(Origen de los embriones *PIV* e *IVV*) el primer factor y la ventana de desarrollo (Blastocisto y Blastocisto eclosionado), el segundo factor. Luego de la normalización de las cuentas, se utilizó el test Genewise quasi-likelihood (QL-F test). Posteriormente se realizó un análisis de genes blanco de los miARN diferencialmente expresados con el objetivo de identificar posibles miARN relacionados con funcionalidad y calidad embrionaria. Para esto los miARN diferencialmente expresados ($FDR < 0.05$ o $\log_{10} > 1.52$) y \log_2 Fold Change mayores a 1.2 (Sobrerregulados positivamente) y menores a -1.2 (Sobrerregulados Negativamente) fueron utilizados para la inferencia de sus genes blancos utilizando el software o paquete MirinGO. Con estos genes blancos se confecciono el análisis de Enriquecimiento de Ontología génica utilizando la plataforma DAVID, teniendo como resultado la identificación de la función de Proceso Biológico, Componentes celular y Función Molecular. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante VolcanoPlots y Heatmap utilizando el paquete ggplot2.

V. RESULTADOS

Para este estudio se propusieron dos experimentos que se enfocaron en la identificación y caracterización poblacional de las vesículas extracelulares (morfología y contenido) secretadas durante la blastulación (Exp. 1) y la eclosión (Exp. 2) por embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* durante su desarrollo *In vitro* hasta la etapa ovoide (Día 11). No obstante, los resultados se presentarán siguiendo el orden cronológico de actividades y respondiendo a los objetivos específicos.

1. Desarrollo embrionario y determinación de grupos experimentales.

Para este trabajo se produjeron *In vivo* e *In vitro* embriones bovinos pre-implantatorios, los cuales fueron distribuidos en dos grupos de acuerdo con la etapa de desarrollo a estudiar (blastulación y eclosión/ventanas 5-7 y 7-9 respectivamente) (Tabla 5). Para la evaluación de la secreción de EVs durante la ventana de blastulación (V5-7) se seleccionaron las mórulas (Día 5) colectadas *In vivo* o producidas *In vitro*, las cuales fueron cultivadas de forma individual hasta estadio de blastocisto. El 88,3 % de las mórulas producidas *In vivo* alcanzaron el estadio de blastocisto mientras que solo el 43,05 % de las producidas *In vitro* alcanzaron este estadio de desarrollo. El desarrollo de los blastocistos hasta el día 11 también fue significativamente menor en los embriones producidos *In vitro* ($P < 0.05$). Se observó un comportamiento similar del desarrollo de los embriones de la ventana 7-9. Para esta ventana de desarrollo se seleccionaron blastocistos de día 7, los cuales fueron colectados *In vivo* al día 7 post estro o producidos *In vitro*. Los blastocistos fueron cultivados individualmente hasta el día 9 de desarrollo. Tanto la tasa de blastocistos día 7 como de continuidad de desarrollo hasta el día 11 fue significativamente menor en los embriones producidos *In vitro* (Tabla 5).

Tabla 5 Características del desarrollo embrionario (datos de producción de embriones) PIV e IVV: No. Réplicas, No. Ovocitos, No. Cigotos / embriones No. Mórulas, No. Blastocistos, % blastocistos D7, No. Blastocistos D11, % Blastocistos viables D11.

| Tipo de embrión/grupo | Réplica | No. Ovocitos | No. Estructura colectada | % Embrión (nº total) | % Mórulas (nº total) | % Blastocisto D7 (nº total) | % Blastocisto D11 (nº total) |
|-----------------------|----------------|--------------|--------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| PIV 5-7 (n=6) | 6 ^T | 612 | | 82,5 (505) | 44,9 ^a (275) | 24,7 ^a (151) | 12,7 ^a (64) |
| IVV 5-7 (n=7) | 7* | | 61 | 85,2 (52) | 78,7 ^b (48) | 63,9 ^b (39) | 52,5 ^b (32) |
| PIV 7-9 (n=6) | 6 ^T | 701 | | 88,6 (621) | 41,2 ^a (289) | 26,8 ^a (187) | 14,0 ^a (92) |
| IVV 7-9 (n=7) | 7* | | 73 | 91,5 (65) | 83,6 ^b (61) | 71,2 ^b (52) | 61,6 ^b (45) |

PIV= producción *In vitro* IVV= producción *In vivo*

* Número de hembras superovuladas

T Número de grupos de fecundación *In vitro*

Fuente: Elaboración Propia.

Para el análisis de EVs solo se colectaron medios de cultivo de embriones competentes. La competencia embrionaria se definió por la capacidad de los blastocistos de eclosionar y continuar su desarrollo con un incremento lineal del diámetro hasta el día 11 post fecundación. Para esto, se determinó la viabilidad y el diámetro de cada embrión desde el día 7 de desarrollo. Se descartaron todos los embriones no protruidos y aquellos que mostraron signos de degeneración durante el periodo de cultivo extendido (Día 7 a día 11). Independientemente de la ventana de estudio, los embriones producidos *In vivo* tuvieron una mayor tasa de eclosión/sobrevida siendo esta superior al 50 %. La mayor tasa de desarrollo se observó en los embriones que fueron colectados al día 7 correspondientes a los producidos *In vivo* de la ventana 7-9, (Tabla 4).

La cinética de desarrollo, expresada como diámetro de los embriones, se representa en la figura 7. Se observaron diferencias significativas entre los grupos de embriones al día 7 y 8 de desarrollo. Estas diferencias estuvieron determinadas tanto por el método de producción como por la ventana de estudio. Sin embargo, al día 9 no se observaron diferencias en el diámetro de los embriones. A partir de este momento se observa nuevamente un efecto de la ventana de estudio y del origen embrionario. Los embriones de la ventana 5-7 mostraron una desaceleración en el crecimiento a partir del día 9, alcanzando un diámetro significativamente menor que los embriones de la ventana 7-9. Al día 11, los embriones del grupo *IVV5-7* tuvieron el menor diámetro, siendo este significativamente menor que sus contrapartes producidas *In vitro*. Sin embargo, se observó un comportamiento contrario en los embriones de la ventana 7-9, siendo los producidos *In vivo* los de mayor diámetro (*PIV5-7*: $381,93 \pm 97,48$; *IVV5-7*: $345,68 \pm 107,26$; *PIV7-9*: $471,72 \pm 77,24$; y *IVV7-9*: $508,69 \pm 90,56 \mu\text{m}$). Finalmente, basado en la competencia embrionaria se seleccionaron 133 medios de cultivos colectados en la ventana de estudio correspondiente al grupo experimental (*PIV5-7*; *IVV5-7*; *PIV7-9* y *IVV7-9*).

Cinética de desarrollo embrionario del día 7 al día 11

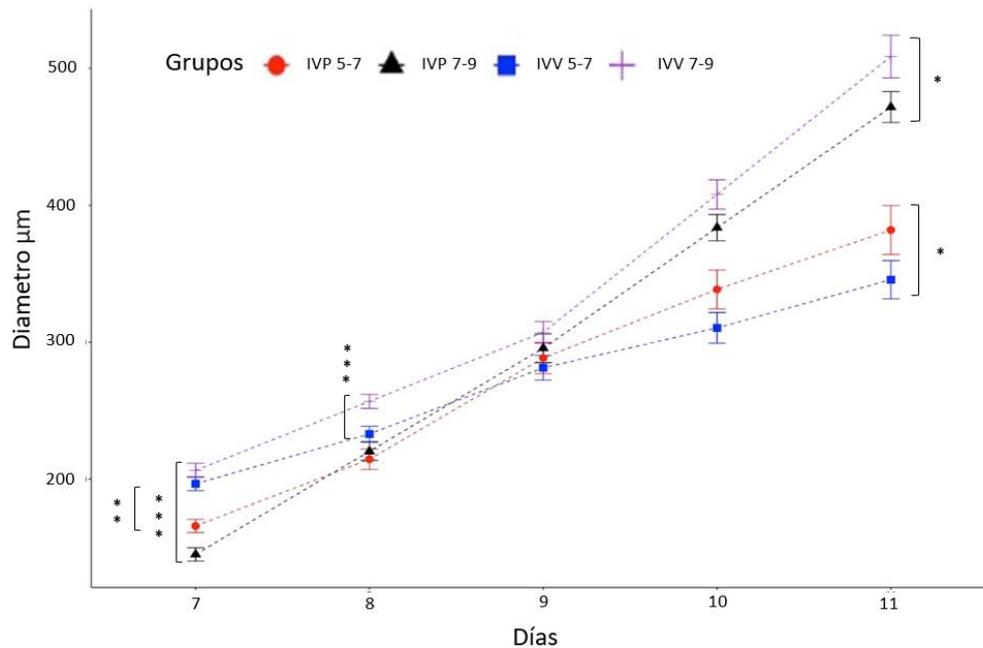


Figura 7 Desarrollo de blastocistos cultivados *In vitro* individualmente desde el día 7 hasta el día 11 post fecundación *In vitro* y post fecundación *In vivo*. PIV: Embriones producidos por fecundación *in vitro*; IVV embriones producidos *In vivo*. * $p < 0.05$.

Fuente: Elaboración Propia.

2. Aislamiento y Caracterización de Vesículas extracelulares, EVs (nanopartículas) procedentes de embriones producidos *In vitro* e *In vivo* en etapa de blastulación (Día 5-7) y eclosión (Día 7-9).

Se aislaron las nanopartículas de los medios de cultivo colectados. Inicialmente se caracterizaron estas nanopartículas para identificar la presencia de EVs. Esta caracterización se basó en los tres criterios básicos definidos por la Sociedad Internacional de Vesículas extracelulares (ISEV) para definir EVs: 1) presencia de marcadores de superficie específicos, 2) morfología y 3) Tamaño y concentración.

La presencia de marcadores proteicos, específicos de la superficie de EVs fueron determinados mediante citometría de flujo. Todas las muestras, correspondientes a medios de cultivo de embriones, así como el control positivo (EVs de suero fetal bovino) fueron positivas para los cuatro marcadores analizados (CD9, CD63, CD81 y CD40) (Tabla 6). Los controles negativos mostraron 0 % de positividad mientras que el medio depletado de EVs (sin embriones) tuvo un porcentaje de positividad inferior al 1% (Tabla 6).

Tabla 6 Caracterización de la presencia de marcadores específicos de vesículas extracelulares (tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y CD40) en nanopartículas secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios.

| Muestra | Marcador (% de positividad) | | | |
|--|-----------------------------|----------|----------|----------|
| | CD9 (%) | CD63 (%) | CD81 (%) | CD40 (%) |
| EVs Embriones 5-7 in vitro - blastulación | 10,5 | 24,4 | 36,6 | 9,3 |
| EVs Embriones 5-7 in vivo- blastulación | 3,5 | 7,6 | 3,8 | 20,8 |
| EVs Embriones 7-9 in vitro - eclosión | 17,9 | 3,9 | 15,7 | 9,2 |
| EVs Embriones 7-9 in vivo- eclosión | 7,4 | 13,0 | 7,8 | 18,5 |
| Suero fetal bovino SBT (control positivo) | 14,5 | 6,5 | 9,6 | 12 |
| Perlas (control negativo) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Perlas y anticuerpo (control negativo) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fluido sintético oviductal depletado (SOF-d) | 0,68 | 0,25 | 0,47 | 0,86 |

EVs embriones: secretadas por embriones producidos *In vivo* o *In vitro* durante la etapa de blastulación (Día 5-7) o eclosión (Día 7-9).

Fuente: Elaboración Propia.

La morfología de las nanopartículas se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se identificaron estructuras con morfología clásica de EVs, con un diámetro entre 100 y 500 nm, forma redondeada o de copa y la presencia de una bicapa (Figura. 8). No se observaron diferencias morfológicas entre las EVs de los embriones de los diferentes grupos experimentales.

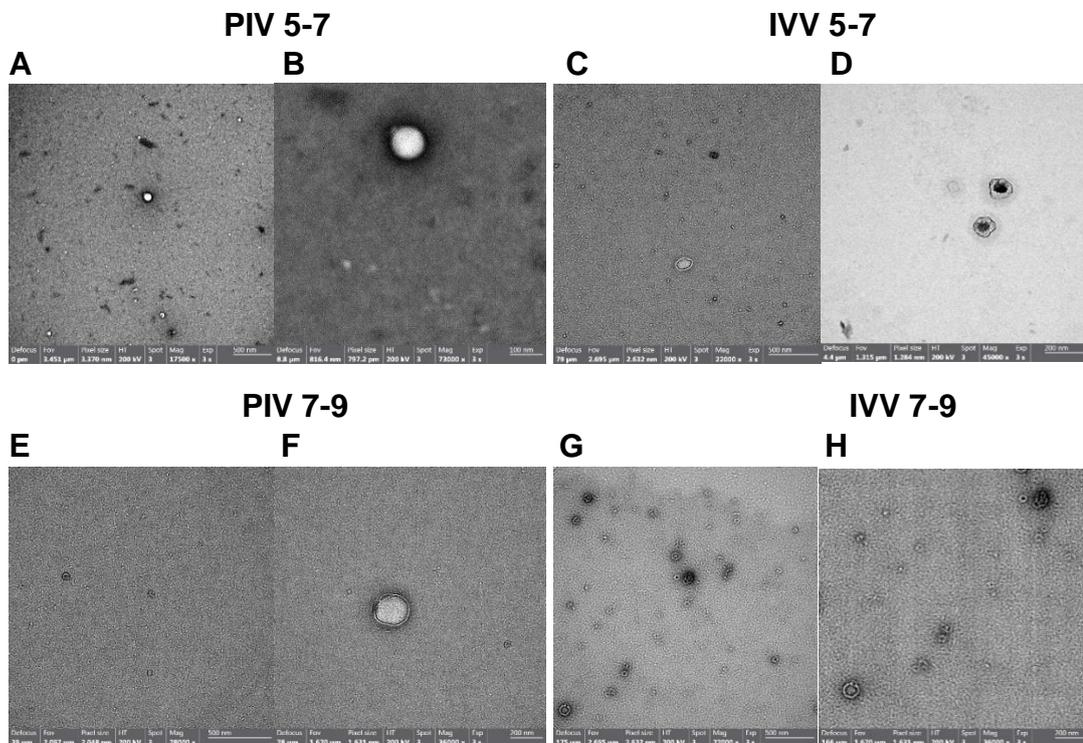


Figura 8 Imágenes representativas de la Microscopía Electrónica de Transmisión de Vesículas Extracelulares (EVs) secretadas por embriones bovinos producidos In vivo (IVV) o In vitro (PIV) en estadio de desarrollo de blastulación (Día 5-7) y eclosión (Día 7-9).

La concentración y el rango de tamaño de las partículas se determinó mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Este análisis detectó poblaciones de nanopartículas en el rango de 25-620 nm, pero con mayor concentración en el rango de pequeñas vesículas (menor de 200 nm) (Figura. 9).

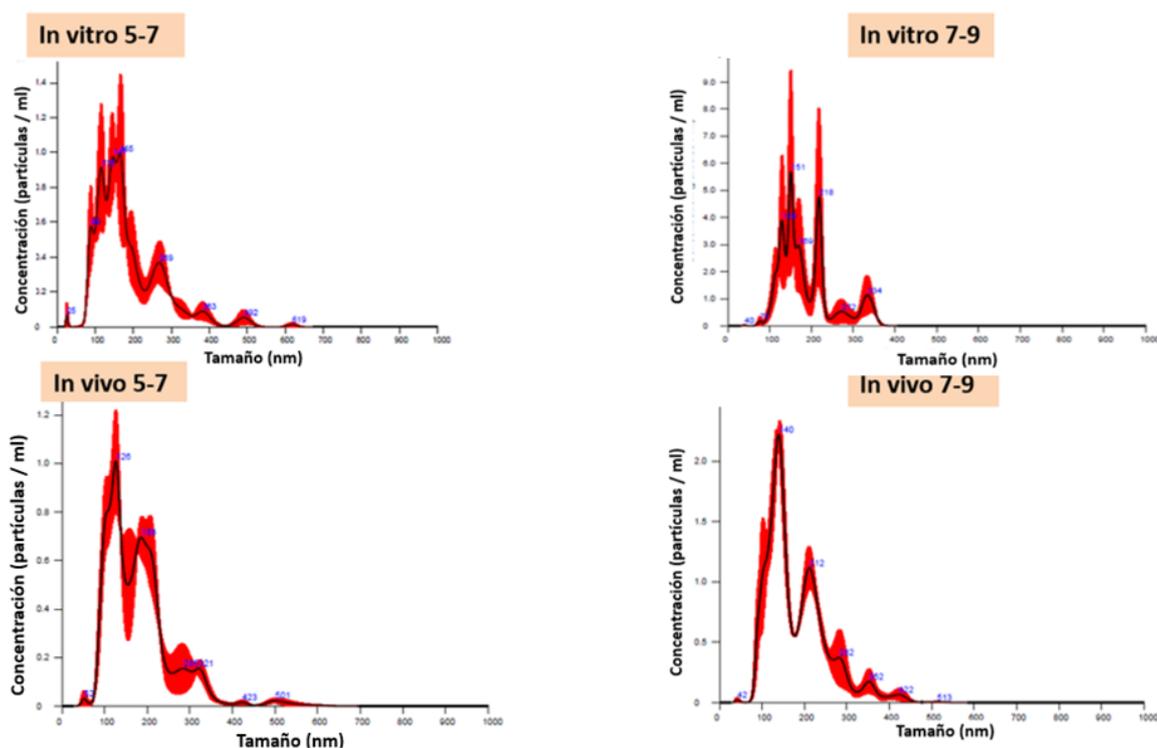


Figura 9 Concentración y tamaño de EVs por NTA (NANOSIGHT®). Etapas de blastulación (IVV/PIV 5-7) y de eclosión (IVV/PIV 7-9). Dilución 1/20 (30 µl de pellets EVs en 570 µl PBS).

Fuente: Elaboración Propia.

3. (Objetivo 1). Determinar el efecto del desarrollo embrionario *In vitro* e *In vivo* en las características de las poblaciones de vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación y eclosión en embriones bovinos.

En la tabla 7 se presentan los parámetros de concentración y tamaño de las EVs secretadas en las etapas de desarrollo de blastulación y de eclosión de embriones producidos *In vitro* e *In vivo*. Durante la blastulación (V5-7), los embriones producidos *In vivo* secretan vesículas más grandes mientras que la concentración se mantiene en niveles similares al grupo *In vitro*. Sin embargo, durante la etapa de desarrollo correspondiente a la eclosión (V7-9) no hubo un efecto del origen embrionario en el tamaño, pero sí hubo diferencias en la concentración de EVs (Tabla 7, Figura 10). Durante el desarrollo embrionario (entre las ventanas de blastulación y eclosión) la concentración de partículas en embriones producidos *In vitro* aumenta significativamente mientras que no hay diferencias en los embriones producidos *In vivo*. Se observa una disminución en el tamaño promedio de las partículas a medida que avanza el desarrollo tanto en embriones producidos *In vitro* como en aquellos producidos *In vivo* (Tabla 7).

Tabla 7 Parámetros de concentración y tamaño de la población de Vesículas extracelulares Evs secretadas por embriones bovinos durante las etapas de blastulación y eclosión producidos In vitro e In vivo.

| Parámetros EVs | Blastulación | | Eclosión | |
|---------------------------------|---|--|---|--|
| | <i>In vitro</i> (5-7) | <i>In vivo</i> (5-7) | <i>In vitro</i> (7-9) | <i>In vivo</i> (7-9) |
| Concentración (partículas x ml) | 2,9 x 10 ⁹ ± 0,3 ^{a(§)} | 2,6 x 10 ⁹ ± 0,8 ^a | 3,8 x 10 ⁹ ± 0,3 ^{b(t)} | 2,2 x 10 ⁹ ± 0,3 ^a |
| Tamaño (nm) | 124,7 ± 3,1 ^{a(§)} | 148,5 ± 4,1 ^{b(§)} | 118,1 ± 2,1 ^{a(t)} | 115,4 ± 1,8 ^{a(t)} |

Los valores se presentan como media ± EEM.

(a-b) muestran diferencias estadísticamente significativas comparando cada característica de EVs por origen del embrión ($p < 0,05$).

(§)(‡) muestran diferencias estadísticamente significativas comparando cada característica de EVs para embriones producidos *In vitro* o *In vivo* ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración Propia.

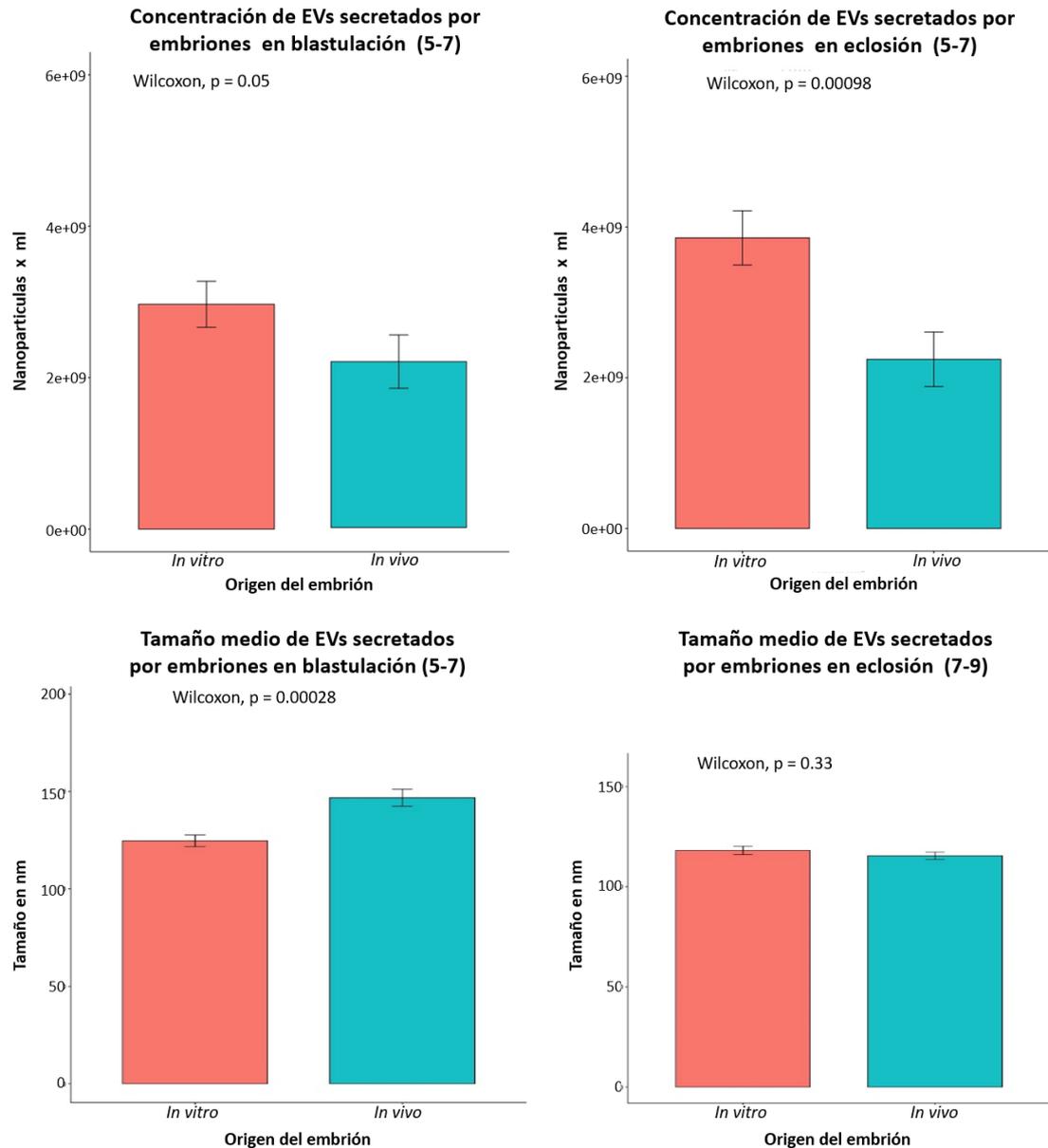
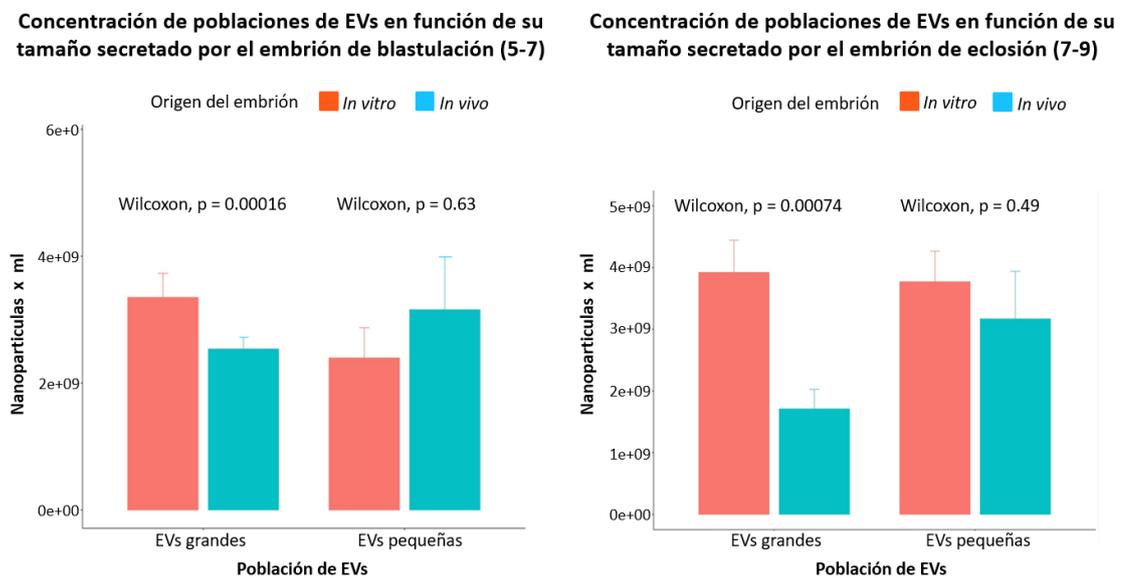


Figura 10 Concentración y tamaño de Vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos *In vitro* e *In vivo* durante las ventanas de desarrollo embrionario de blastulación 5-7 y de eclosión 7-9.

Fuente: Elaboración Propia.

4. (Objetivo 2). Evaluación de las características poblacionales de las EVs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* y su capacidad de desarrollo *In vitro* hasta la etapa ovoide (Día 11).

Para este objetivo se realizó un análisis de las características de concentración y tamaño de las EVs secretadas por embriones bovinos competentes durante las ventanas de desarrollo de blastulación (d5-7) y de eclosión (d7-9) de PIV e IVV. Se observaron dos poblaciones de vesículas extracelulares en relación con el tamaño: vesículas grandes (>120 nm) y vesículas pequeñas (≤ 120 nm) (Figura 11). Se observaron diferencias en las poblaciones de EVs secretadas dependiendo del origen embrionario; así los embriones producidos *In vitro* liberan una mayor cantidad de vesículas grandes tanto durante la etapa de blastulación como posterior a la eclosión (Figura 11).



*Figura 11 Concentración y tamaño de la población de Vesículas extracelulares EVs secretadas por embriones bovinos competentes producidos *In vitro* e *In vivo* (PIV e IVV) durante las ventanas de desarrollo embrionario de blastulación y de eclosión.*

Fuente: Elaboración Propia.

Adicionalmente se realizó un análisis de la correlación entre el diámetro embrionario y las características de las EVs secretadas (Figura. 12). En este análisis se observó que, independientemente de su origen, los embriones con mayor diámetro (>270µm) y definidos como competentes, secretan mayor cantidad de vesículas.

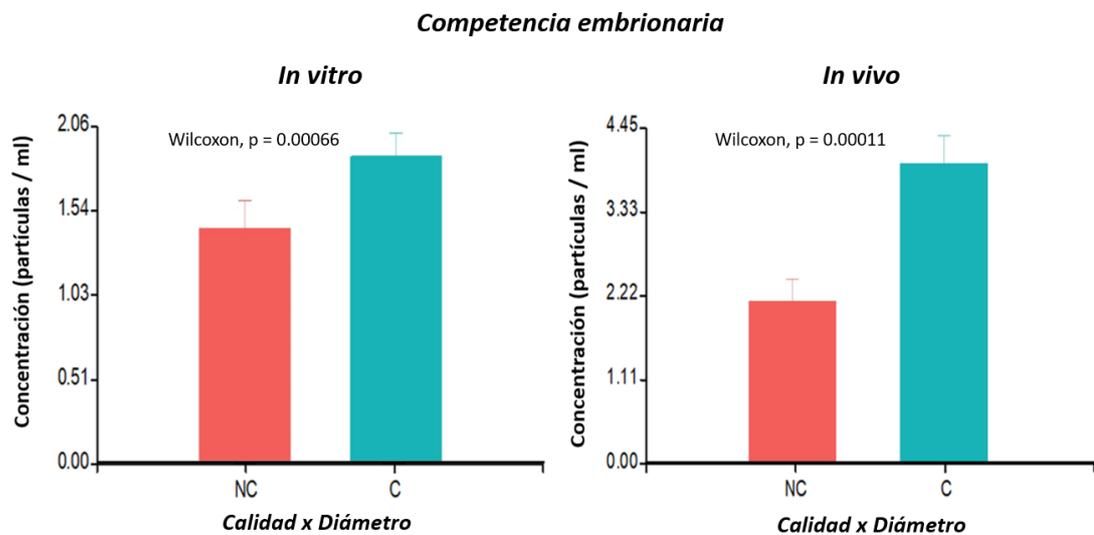


Figura 12 Desarrollo de blastocistos producidos *In vitro* e *In vivo* y cultivados individualmente *In vitro* desde el día 5 y 7 hasta el día 11 post PIV / SOV. Los blastocistos fueron agrupados a posteriori, según su desarrollo *In vitro*.

Fuente: Elaboración Propia.

5. (Objetivo 3). Determinar el efecto del desarrollo embrionario *In vitro* respecto al contenido de miARNs en vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación y eclosión en embriones bovinos.

En esta actividad se analizó el contenido de miARN. Posterior al análisis de NTA, Las EVs colectada a partir de los medios de cultivos de embriones en estadios de blastocistos y blastocisto eclosionados y de origen diferente,

fueron recuperadas y asignadas aleatoriamente a las diferentes réplicas experimentales para el análisis de contenido de miARN. Cada réplica experimental estuvo compuesta por EVs provenientes de 10 embriones. Se organizaron 6 réplicas del grupo *PIV* 5-7, 3 réplicas *IVV* 5-7, 3 réplicas *PIV* 7-9 y 3 réplicas *IVV* 7-9. Se realizó la extracción y análisis de calidad del ARN total de cada réplica o muestra (Tabla 7) muestra para verificar el RIN (RNA Integrity Number) y el potencial del análisis de secuenciación del miARN contenido. Los resultados en la Tabla 8 muestran que la integridad del ARN (>7,0) es apropiado para análisis de secuenciación. En todos los casos el RIN (del inglés “RNA integrity number”) fue mayor a 7 lo cual es considerado aceptable para el análisis de secuenciación.

Tabla 8 Cuantificación y calidad del ARN obtenido de las réplicas experimentales IVV 5-7,7-9 e PIV 5-7,7-9.

| Código de Muestra | Concentración ARN (ng/μL) | RIN |
|--------------------------|----------------------------------|------------|
| PIV 5-7 | 332 | >7 |
| PIV 5-7 | 1.298,5 | >7,5 |
| PIV 5-7 | 85 | >7,3 |
| PIV 5-7 | 1.298,5 | >7,2 |
| PIV 5-7 | 1.298,5 | >7,9 |
| PIV 5-7 | 1.298,5 | >7 |
| IVV 5-7 | 299 | 8 |
| IVV 5-7 | 208 | 8 |
| IVV 5-7 | 219 | 8,6 |
| IVV 7-9 | 268 | >8,1 |
| IVV 7-9 | 194 | >8,3 |
| IVV 7-9 | 216 | >8,6 |
| PIV 7-9 | 355 | >7,1 |
| PIV 7-9 | 276 | >8,1 |
| PIV 7-9 | 308 | >8,4 |

RIN: es un número que determina la integridad del ARN

PIV: embriones producidos *In vitro*

IVV: embriones producidos *In vivo*

Fuente: Elaboración Propia.

En la tabla 9 se presenta el contenido de miARNs de EVs secretados por embriones *PIV* e *IVV* determinados mediante secuenciación. El programa Fastp detectó lecturas de 75 ± 1 pares de bases (Paired End), y al generar la limpieza de adaptadores y otros contaminantes, este resultó en un tamaño de inserto de 149 pares de bases, las cuales fueron mapeadas contra el genoma disponible en MirBase, versión 21. Para el análisis los datos fueron normalizados (Figura 13).

Tabla 9 Información general de la secuenciación de miARNs en EVs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos In vitro e In vivo.

| Código de Muestra | Lecturas detectadas | Lecturas post Procesamiento | miARN asignados | miARN >5 lecturas |
|-------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------|-------------------|
| <i>PIV</i> 5-7 | 13859562 | 7944580 | 179 | 86 |
| <i>PIV</i> 5-7 | 15927012 | 9783447 | 237 | 72 |
| <i>PIV</i> 5-7 | 11736048 | 9704148 | 262 | 63 |
| <i>PIV</i> 5-7 | 15286203 | 11272400 | 237 | 71 |
| <i>PIV</i> 5-7 | 17618453 | 13778727 | 275 | 76 |
| <i>PIV</i> 5-7 | 9178081 | 8008610 | 230 | 62 |
| <i>IVV</i> 5-7 | 22010845 | 17073205 | 122 | 122 |
| <i>IVV</i> 5-7 | 21834381 | 13506034 | 162 | 149 |
| <i>IVV</i> 5-7 | 25835589 | 15254128 | 124 | 121 |
| <i>IVV</i> 7-9 | 21420218 | 15611522 | 84 | 83 |
| <i>IVV</i> 7-9 | 18199385 | 16369572 | 95 | 90 |
| <i>IVV</i> 7-9 | 16266877 | 11575825 | 112 | 104 |
| <i>PIV</i> 7-9 | 24895283 | 13470230 | 82 | 81 |
| <i>PIV</i> 7-9 | 30703390 | 12300585 | 97 | 95 |
| <i>PIV</i> 7-9 | 21267193 | 15923259 | 122 | 109 |

IVV 5-7, *IVV* 7-9 e *PIV* 5-7, *PIV* 7-9: grupos experimentales

Fuente: Elaboración Propia.

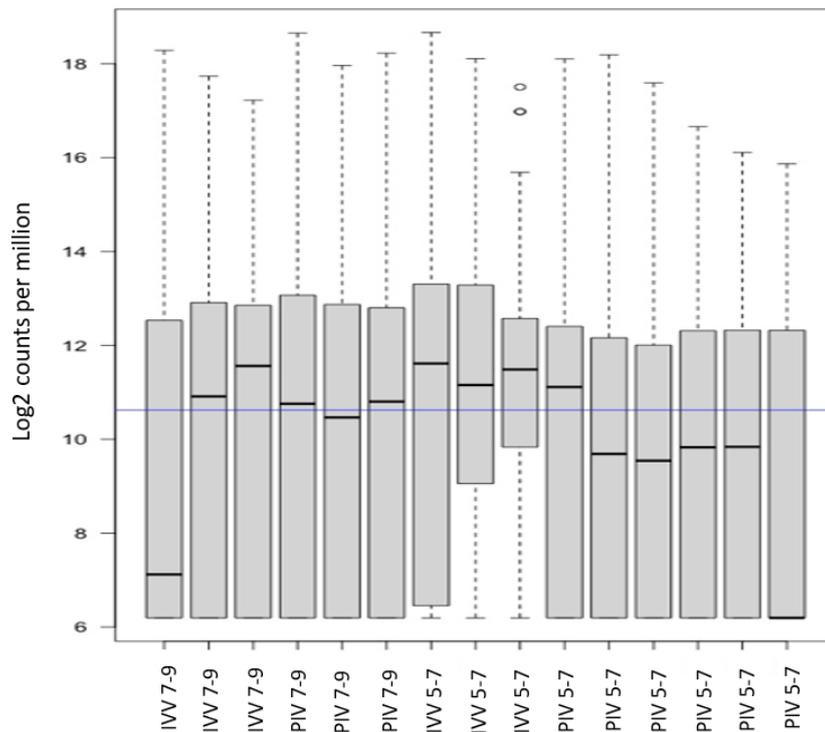


Figura 13 Normalización de datos. Lecturas de miARNs expresadas en Log2 conteos por millón en (CPM) > 5 conteos por millón en las muestras IVV 5-7,7-9 e PIV 5-7,7-9 mediante el método VROOM.

Fuente: Elaboración Propia.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para determinar la variabilidad de los conteos entre las réplicas de cada grupo experimental IVV 5-7,7-9 e PIV 5-7,7-9 (Figura 14). Se observó una dispersión y variabilidad entre los grupos PIV y los grupos IVV en el eje de las X, y en el eje de las Y, respectivamente. Los grupos PIV 5-7, IVV 5-7 y el PIV 7-9 presentan menor variabilidad intra - grupal mientras que el grupo IVV 7-9 presenta mayor variabilidad intra - grupal. Se observa mayor separación inter-grupal entre los grupos IVV e PIV de la ventana de blastulación (5-7) y menor separación inter - grupal entre los grupos IVV e PIV en la ventana de eclosión (7-9). En general

se observan tres grupos bien definidos en cuanto al contenido de miARNs: *IVV* 5-7; *PIV* 7-9, *IVV* 7-9 + *PIV* 5-7.

Distribución dimensional de los grupos experimentales: Análisis de componentes principales (ACP)

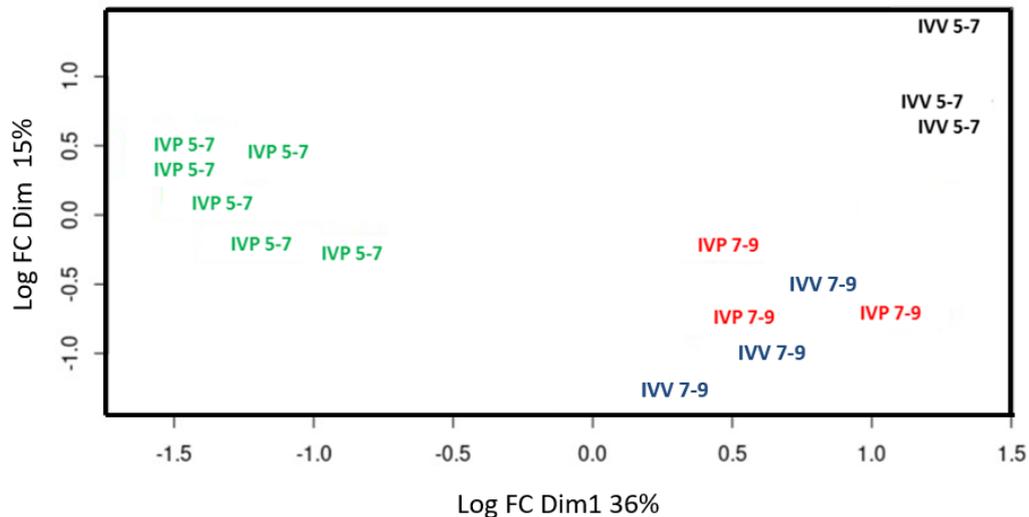


Figura 14 Análisis de componentes principales (ACP) de la distribución dimensional de los grupos experimentales: El eje de las X representa la relación inter - grupal y el eje de las Y representa la relación intra - grupal. El ACP muestra el grado de agrupación entre los grupos *PIV* 5-7 (verde), *IVV* 5-7 (negro), *PIV* 7-9 (rojo) y *IVV* 7-9 (azul). La reducción de las dimensionalidades está basada en el logaritmo de Fold Change de cada grupo (réplica).

Fuente: Elaboración Propia.

Se identificaron 122 miARNs con un CPM (conteos por millón) sobre 5, de estos 74 son comunes para todos los grupos experimentales (Figura 15). Por otra parte, se identificaron 3 miARNs (miR-R485, miR-660, miR-1271) exclusivos de las EVs secretadas durante la blastulación por embriones producidos *In vivo* (*IVV*5-7), 3 exclusivos para la ventana de blastulación (*PIV* e *IVV*: miR-151-2, miR-409-a, miR-155) y 2 exclusivos para los embriones *IVV* (blastulación y eclosión: miR-652a, miR-6529-b) (Figura 15). El análisis global de presencia diferencial de miARNs en las EVs permitió la identificación de 25 miARNs más variables a partir de los grupos de *PIV* e

IVV para cada una de las ventanas de desarrollo (Figura 16). De esta forma se identificaron diferencias marcadas entre las EVs de la ventana 5-7 de los embriones *PIV* con respecto al resto de los grupos experimentales.

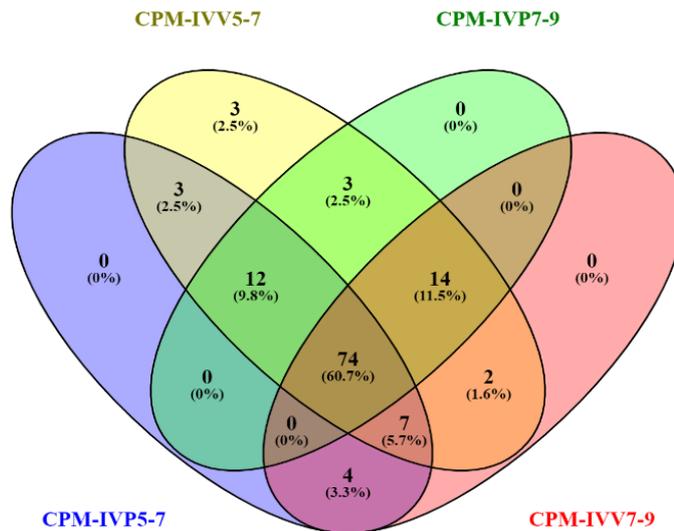


Figura 15 Diagrama de Venn representando los miARNs presentes en EVs secretadas de embriones funcionalmente competentes producidos *In vitro* (*PIV*) vs *In vivo* (*IVV*) comparando con los demás estadios de desarrollo de Blastulación vs Eclosión. Gráfico elaborado con programa Venn 2.1 <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>.

Fuente: Elaboración Propia.

Expresión de los 25 microARNs más variables de EVs secretados por embriones IVP e IVV

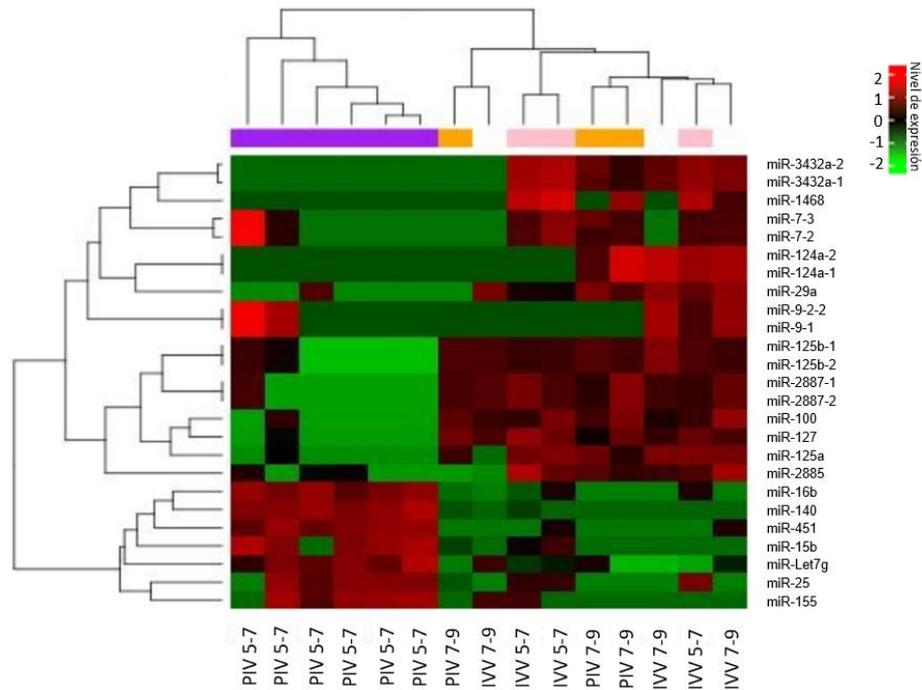


Figura 16 Diagrama “HeatMap” para la agrupación jerárquica de los 25 miARNs con mayor variabilidad entre los grupos experimentales. Cada fila representa un miARNs y cada columna, una muestra (estadio de desarrollo embrionario / In vitro e In vivo: blastulación IVP 5-7 (n=6 réplicas), PIV 5-7 (n=3 réplicas); eclosión: PIV 7-9 (n=3 réplicas), IVV 7-9 (n=3 réplicas). La escala de color ilustra el nivel relativo de expresión de los miARNs: rojo, por debajo del canal de referencia; y verde, superior a la referencia. En el “HeatMap” se observa un gradiente de color siendo rojo el mayor nivel de expresión, negro valores cercanos a la media y verde los valores de menor expresión.

Fuente: Elaboración Propia.

6. (Objetivo 4) Evaluación de la expresión diferencial de miARNs contenidos en las EVs secretadas durante la blastulación y eclosión de embriones bovinos producidos In vitro e In vivo.

Posteriormente se realizó un análisis de la expresión o presencia diferencial de miARNs en las EVs en función del origen embrionario (*In vitro* vs *In vivo*) para cada ventana de desarrollo. El análisis muestra 32 y 65 miARNs que

están mayormente representados en las EVs secretadas durante la etapa de blastulación por los embriones *PIV* e *IVV* respectivamente (Figura 17 y 18). Sin embargo, el contenido de miARNs es más homogéneo en las EVs secretadas durante la eclosión, detectándose solo 5 miARNs diferencialmente representados (miR-9-1, miR-9-2-2, miR-6529a, miR6529a, miR-30-d) y con mayor representación en las EVs secretadas por los embriones *IVV* (Figura 17 y 19).

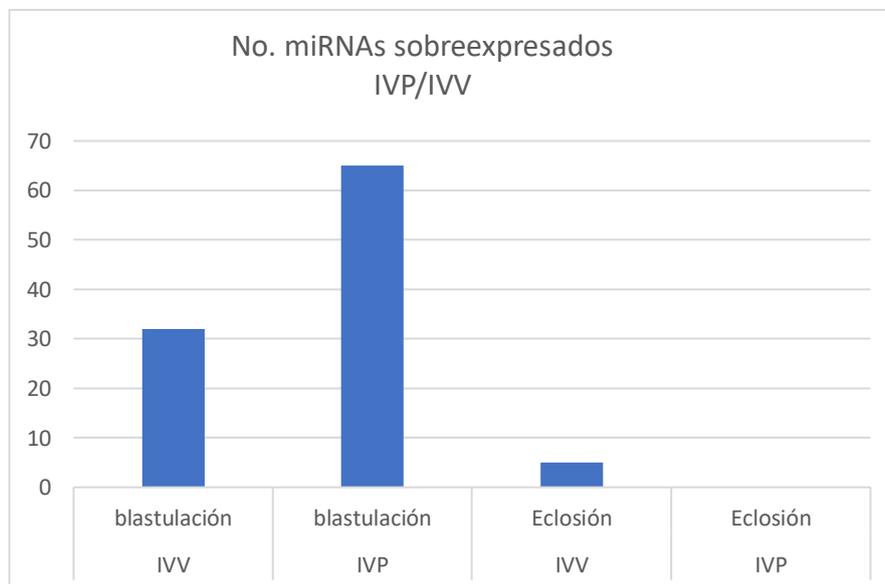


Figura 17 Análisis de presencia diferencial de miARNs en las EVs secretadas durante la blastulación o eclosión considerando el origen embrionario (PIV: In vitro; IVV: In vivo).

Fuente: Elaboración Propia.

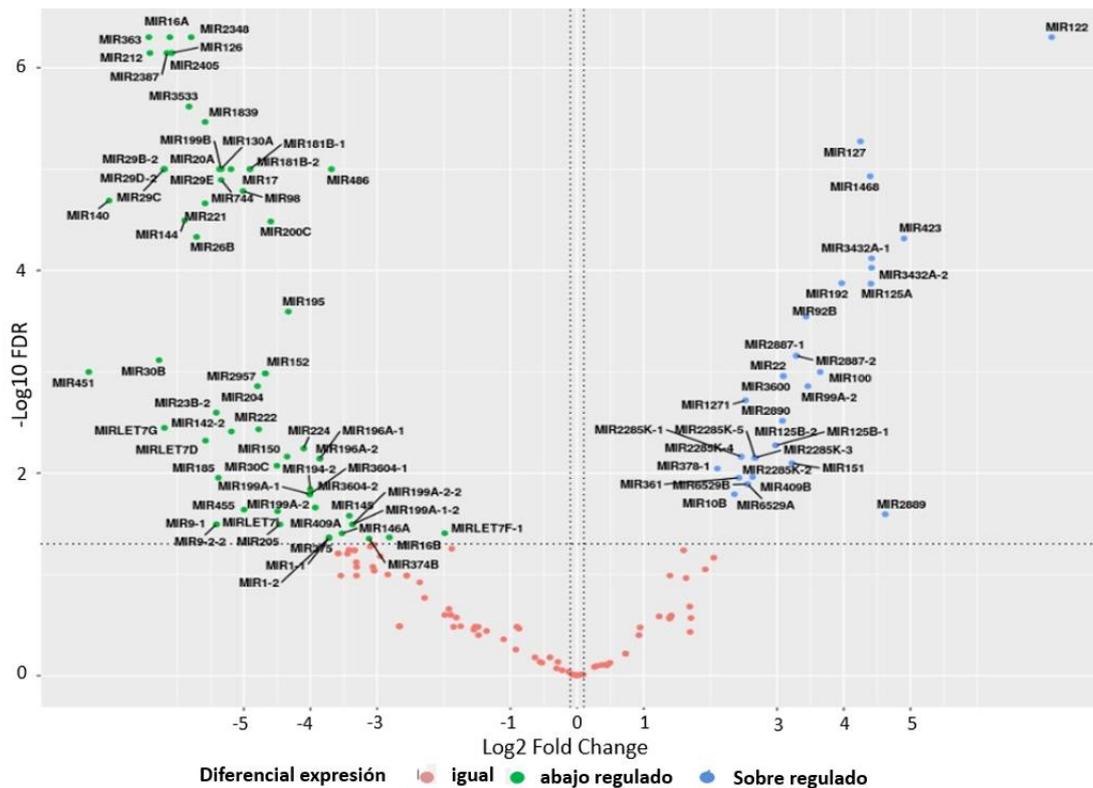


Figura 18 “Volcano Plot”. Expresión diferencial de miARNs secretados por embriones bovinos *In vitro* (izquierda) e *In vivo* (derecha) durante la etapa de blastulación. El eje y representa el log10 negativo de los valores FDR (un valor más alto indica una mayor importancia / significancia), y el eje x representa la diferencia de expresión medida entre el origen de los embriones producidos (PIV vs. IVV). $FDR < 0.05$ y \log_2 de “Fold Change” > 1.2 . Del valor 0 (vertical) hacia la izquierda se representan los miRNAs correspondientes a los embriones producidos *In vitro* y del valor 0 (vertical) hacia la derecha se representan los miARNs correspondientes a los embriones producidos *In vivo*. En rojo se muestran los miARNs no expresados, mientras que en azul y verde se representan los miARNs con diferente regulación.

Fuente: Elaboración Propia.

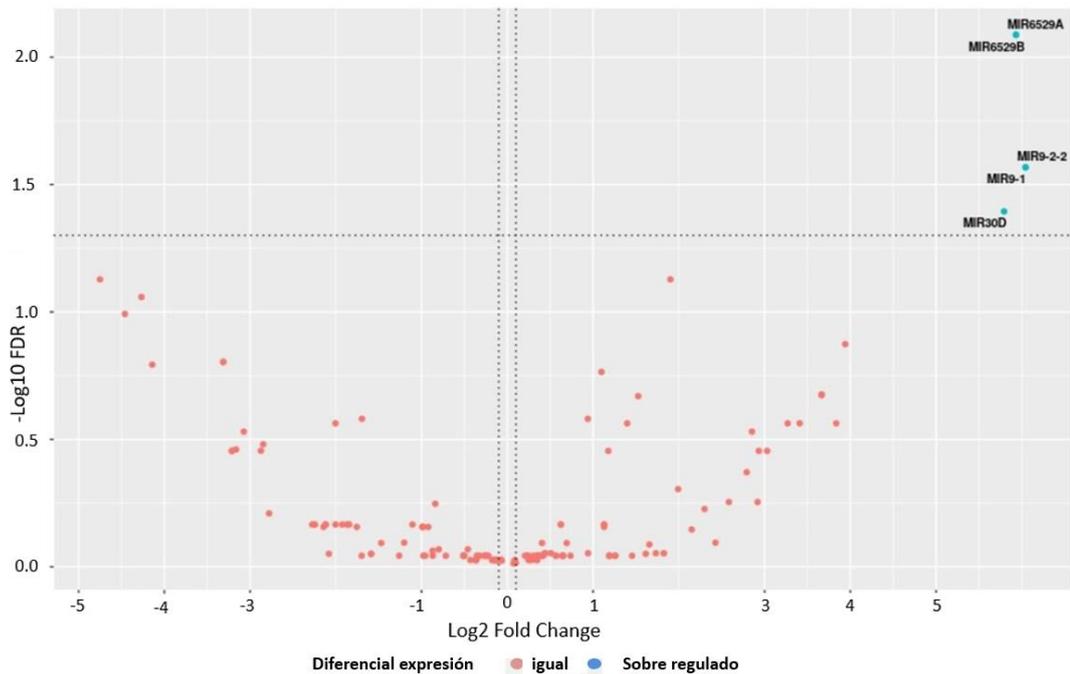


Figura 19 “Volcano Plot”. Expresión diferencial de miARNs secretados por embriones bovinos *In vitro* (izquierda) e *In vivo* (derecha) durante la etapa de eclosión. El eje y representa el log10 negativo de los valores FDR (un valor más alto indica una mayor importancia/significancia), y el eje x representa la diferencia de expresión medida entre el origen de los embriones producidos (PIV vs. IVV). $FDR < 0.05$ y \log_2 de “Fold Change” > 1.2 . Del valor 0 (vertical) hacia la izquierda se representan los miARNs correspondientes a los embriones producidos *In vitro* y del valor 0 (vertical) hacia la derecha se representan los miARNs correspondientes a los embriones producidos *In vivo*. En rojo se muestran los miARNs cuya expresión permaneció constante, mientras que en azul se representan los miARNs con sobreexpresión.

Fuente: Elaboración Propia.

Finalmente se analizó el efecto de la etapa de desarrollo (blastulación y eclosión) embrionario, sobre el contenido de miARNs en las EVs secretadas por embriones *IVV* o *PIV*. Se observó una disminución en el contenido de miARNs mayormente representados a medida que avanza el desarrollo embrionario, tanto para los embriones producidos *In vitro* como *In vivo* (Figuras 20,21,22). De la misma forma, el número de miARNs

diferencialmente representados es mayor en las EVs secretadas por los embriones producidos *In vitro* (Figura 20). Se identificaron 74 y 11 miARNs que están más representados en las EVs secretadas durante la blastulación con respecto a la eclosión por los embriones *PIV* e *IVV* respectivamente (Figura 23). Por otra parte 7 miARNs (miR-25, miR-1271, miR-660, miR-485, miR-155, miR-16b, miR-877) están altamente representados en las EVs secretadas durante la blastulación tanto en embriones *PIV* como *IVV*. En la ventana de eclosión se identificó un miARN (miRLet7g) exclusivo de las EVs de los embriones *In vivo* y 18 exclusivos en las EVs de los embriones *PIV* (Figura 23), mientras que 2 miARNs (miR-320a-1 y miR-320a-2) están igualmente representados en las EVs de los embriones de ambos orígenes.

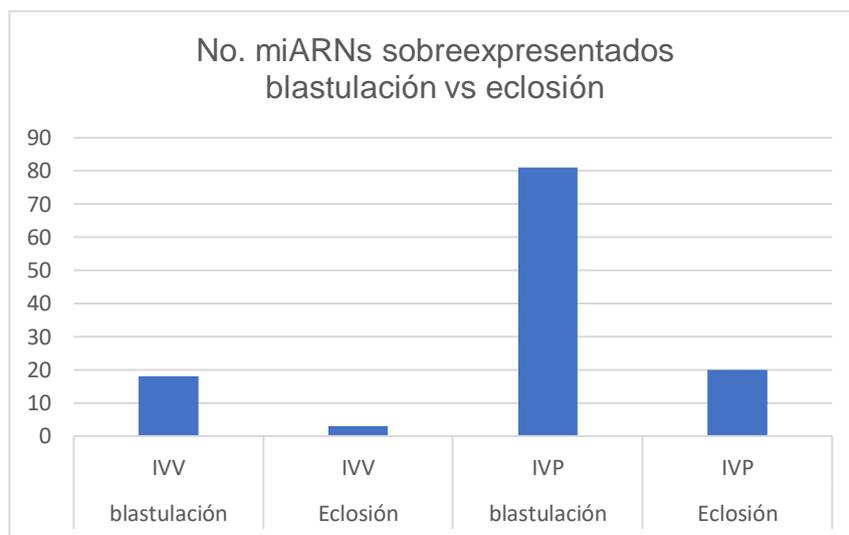


Figura 20 Análisis de presencia diferencial de miARNs en las EVs secretadas por embriones PIV: In vitro e IVV: In vivo considerando el efecto del estadio de desarrollo embrionario (blastulación y eclosión).

Fuente: Elaboración Propia.

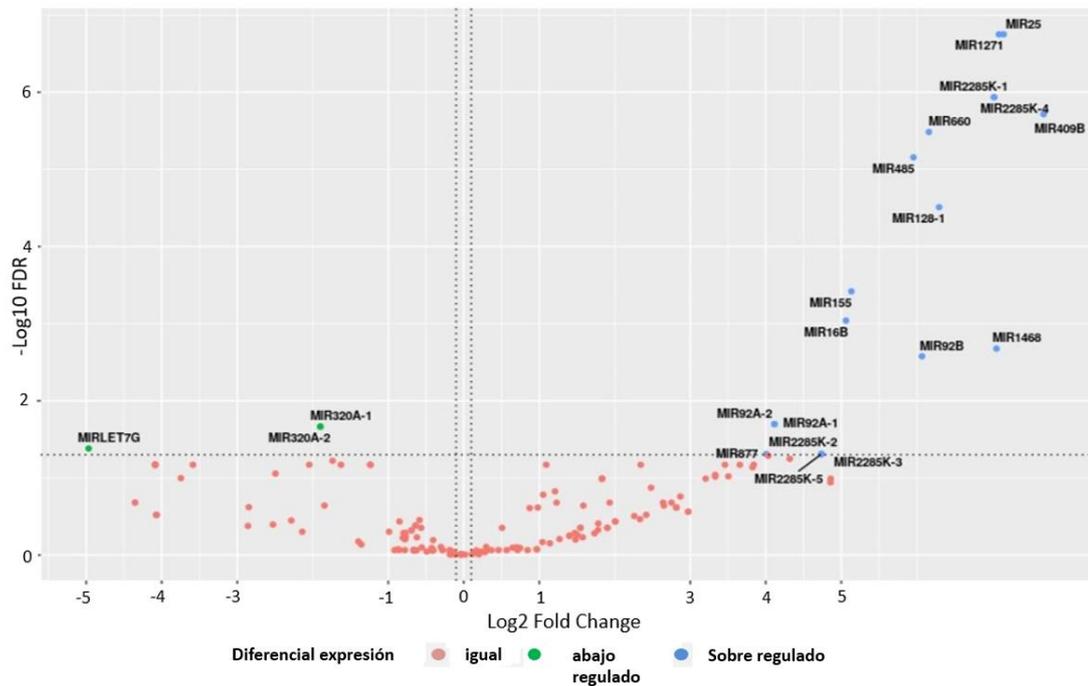


Figura 22 “Volcano Plot”. Expresión diferencial de miARNs secretados por embriones bovinos producidos in vivo durante la etapa de blastulación (derecha) y de eclosión (izquierda). El eje y representa el log10 negativo de los valores FDR (un valor más alto indica una mayor importancia/significancia), y el eje x representa la diferencia de expresión medida entre el origen de los embriones producidos (PIV vs. IVV). $FDR < 0.05$ y \log_2 de “Fold Change” > 1.2 . Del valor 0 (vertical) hacia la izquierda se representan los miARNs correspondientes a los embriones producidos In vitro y del valor 0 (vertical) hacia la derecha se representan los miARNs correspondientes a los embriones producidos In vivo. En rojo se muestran los miARNs no expresados, mientras que en azul y verde se representan los miARNs con diferente regulación.

Fuente: Elaboración Propia.

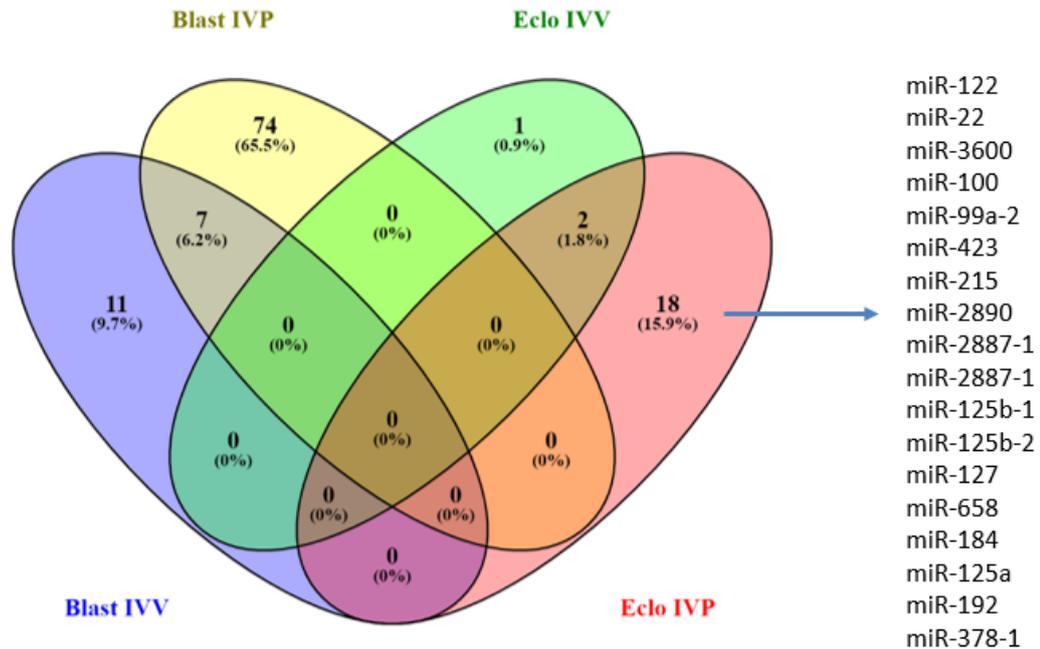


Figura 23 Diagrama de Venn representando los miARNs sobreexpresados o representados en EVs secretadas por embriones producidos In vivo (IVV) o In vitro (PIV) comparando la etapa de desarrollo: Blastulación vs eclosión. Gráfico elaborado con programa Venn 2.1 <https://bioinfoqp.cnb.csic.es/tools/venny/>.

Fuente: Elaboración Propia.

7. Análisis de Ontología Génica (OG): Análisis de enriquecimiento génico.

Se realizó un análisis de ontología génica para evaluar las vías reguladas por los miARNs detectados como diferencialmente representados en los grupos experimentales PIV 5-7, IVV 5-7, PIV 7-9 e IVV 7-9. Para este análisis se consideró la función molecular de los productos génicos, su rol en los procesos biológicos de múltiples vías y su localización en los componentes celulares. La medida de la magnitud se realizó utilizando (P-valor) para determinar las diferencias estadísticas (Tabla. 10,13). En las tablas (10,11,12,13) se indican los genes diana, los nombres de los genes interceptados por más de 1 miARN y la confiabilidad de la predicción $p < 0.05$. Se detectó que los miARNs sobreexpresados en las EVs secretadas durante la

eclosión por embriones *PIV*, afectan un mayor número de funciones biológicas, siendo 9 funciones exclusivamente afectadas por los miARNs secretados por este grupo de embriones (Figura 24).

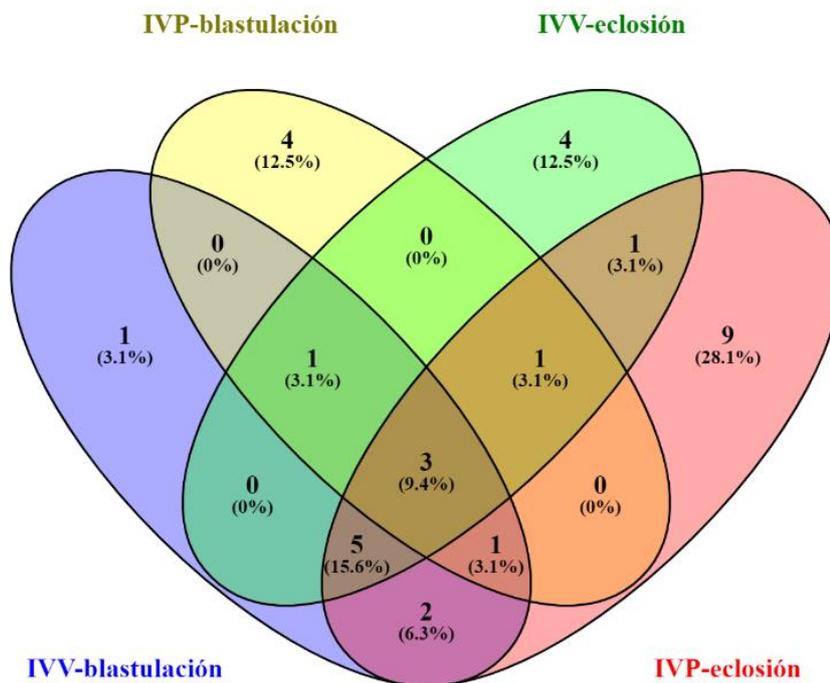


Figura 24 Diagrama de Venn representando la interacción de los procesos biológicos afectados por los miARNs sobrepresados en EVs secretadas durante la blastulación o eclosión por embriones bovinos producidos *In vitro* (*PIV*) o *In vivo* (*IVV*). Gráfico elaborado con programa Venn 2.1. <https://bioinfoqp.cnb.csic.es/tools/venny/>.

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 10 Ontología Génica considerando miARNs secretados por embriones bovinos producidos in vivo durante la etapa de desarrollo de blastulación.

| Ontología génica: termino / nombre | Ontología génica: Dominio | Número genes | Número intersección | Genes diana | p.value | Genes totales |
|---|--|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|
| Transporte de glicerol | Proceso biológico | 6 | 2 | AQP3, AQP7 | 0,00038515 | 16 |
| Regulación de la diferenciación de células T | Proceso biológico | 14 | 2 | TBX21, CARD11 | 0,002274883 | 150 |
| Vía de señalización del receptor de nucleótidos purinérgico acoplado a proteína G | Proceso biológico | 15 | 2 | P2RY2, P2RY14 | 0,002616115 | 20 |
| Vía de señalización del receptor de glutamato acoplado a proteína G | Proceso biológico | 16 | 2 | DAGLB, HOMER1 | 0,002979883 | 22 |
| Transporte de agua | Proceso biológico | 19 | 2 | AQP3, AQP7 | 0,004204058 | 31 |
| Citólisis | Proceso biológico | 20 | 2 | PRF1, GZMB | 0,004655635 | 38 |
| Citotoxicidad mediada por células asesinas naturales | Proceso biológico | 21 | 2 | GZMB, CLEC2A | 0,005128589 | 73 |
| Respuesta a glucocorticoides | Proceso biológico | 68 | 3 | APOA2, AGXT, CPN1 | 0,005147552 | 154 |

| | | | | | | |
|---|--------------------|----|---|----------------|-------------|----|
| Regulación de la transmisión sináptica, glutamatérgica | Proceso biológico | 27 | 2 | TPRG1L, HOMER1 | 0,008402666 | 72 |
| Partícula de lipoproteína de muy baja densidad | Componente celular | 20 | 2 | APOA2, APOO | 0,004655635 | 26 |
| Partícula de lipoproteína de alta densidad | Componente celular | 23 | 2 | APOA2, APOO | 0,006137723 | 33 |
| Actividad del canal de agua | Función molecular | 14 | 2 | AQP3, AQP7 | 0,002274883 | 21 |
| Actividad del receptor de nucleótidos purinérgico acoplado a proteína G | Función molecular | 15 | 2 | P2RY2, P2RY14 | 0,002616115 | 20 |

Ontología génica y análisis de vías basado en el diferencial de expresión de EVs - /VV5-7. La puntuación de enriquecimiento es igual a \log_{10} (valor P) que representa el nivel significativo de OG y vías. (OG: Ontología génica. $P < 0,05$ corregido por BH se consideró estadísticamente significativo).

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 11 Ontología Génica de miARNs secretados por embriones producidos In vitro durante la etapa de desarrollo de blastulación. Objetivos genéticos validados de los miARNs más significativos.

| Ontología génica: termino / nombre | Ontología génica: Dominio | Número genes | Número intersección | Genes diana | p.value | Genes totales |
|--|----------------------------------|---------------------|----------------------------|--|----------------|----------------------|
| Transporte de glicerol | Proceso biológico | 6 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,000232 | 16 |
| Transporte de agua | Proceso biológico | 19 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,002554 | 31 |
| Citólisis | Proceso biológico | 20 | 2 | PRF1, GZMB | 0,00283 | 38 |
| Citotoxicidad mediada por células asesinas naturales | Proceso biológico | 21 | 2 | CLEC2A, GZMB | 0,00312 | 73 |
| Excreción | Proceso biológico | 37 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,009498 | 66 |
| Espacio extracelular | Componente celular | 1454 | 13 | CBR3, IGFL1, KRT33A, ACTA1, APOA2, NPPA, BPIFB2, ZG16B, FREM3, LGALS4, MMP9, CSF2, CHIT1 | 0,00455 | 3386 |
| Matriz extracelular que contiene colágeno | Componente celular | 281 | 5 | LMAN1L, NPPA, FREM3, S100A10, MMP9 | 0,005236 | 430 |

| | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------|-----|---|-------------------------------|----------|-----|
| Actividad del canal de agua | Función molecular | 14 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,001377 | 21 |
| Actividad del canal | Función molecular | 30 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,006316 | 699 |
| Carbohidrato vinculante | Función molecular | 210 | 4 | LMAN1L, ZG16B, CLEC2A, LGALS4 | 0,009814 | 278 |

Ontología génica y análisis de vías basado en el diferencial de expresión de EVs - PIV5-7. La puntuación de enriquecimiento es igual a \log_{10} (valor P) que representa el nivel significativo de OG y vías. (OG: Ontología génica. $P < 0,05$ corregido por BH se consideró estadísticamente significativo).

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 12 Ontología Génica de miARNs secretados por embriones producidos In vitro durante la etapa de desarrollo de eclosión Objetivos genéticos validados de los miARNs más significativos.

| Ontología génica: termino / nombre | Ontología génica : Dominio | Número genes | Número intersección | Genes diana | p.value | Genes totales |
|--|-----------------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|----------------------|
| Vía de señalización del receptor acoplado a proteína G activadora de fosfolipasa C | Proceso biológico | 57 | 4 | ADRA1B, P2RY2, GRPR, PLCE1 | 0,000384 | 108 |
| Transporte de Glicerol | Proceso biológico | 6 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,00053 | 16 |
| Excreción | Proceso biológico | 37 | 3 | AQP7, AQP3, SCNN1B | 0,00142 | 66 |
| Regulación de la diferenciación de células T | Proceso biológico | 14 | 2 | TBX21, CARD11 | 0,003115 | 150 |
| Vía de señalización del receptor de nucleótidos purinérgico acoplado a proteína G | Proceso biológico | 15 | 2 | P2RY2, P2RY14 | 0,00358 | 20 |
| Vía de señalización del receptor de glutamato acoplado a proteína G | Proceso biológico | 16 | 2 | DAGLB, HOMER1 | 0,004076 | 22 |
| Reconocimiento de espermatozoides y óvulos | Proceso biológico | 16 | 2 | KCNU1, CATSPER4 | 0,004076 | 54 |
| Transporte de agua | Proceso biológico | 19 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,00574 | 31 |
| Citólisis | Proceso biológico | 20 | 2 | GZMB, PRF1 | 0,006353 | 38 |
| Citotoxicidad mediada por células asesinas naturales | Proceso biológico | 21 | 2 | GZMB, CLEC2A | 0,006994 | 73 |

| | | | | | | |
|---|--------------------|-----|---|---|----------|------|
| Señalización mediada por cGMP | Proceso biológico | 22 | 2 | NPPA, HTR2B | 0,007663 | 38 |
| Respuesta a la proteína desplegada | Proceso biológico | 68 | 3 | DNAJA1, HSPA13, HSPA4 | 0,008006 | 125 |
| Respuesta a glucocorticoides | Proceso biológico | 68 | 3 | AGXT, APOA2, CPN1 | 0,008006 | 154 |
| Proliferación celular | Proceso biológico | 381 | 7 | FOXN1, PAX1, FAM83A, ADRA1B, GRPR, PDS5B, PLCE1 | 0,008249 | 1895 |
| Desarrollo de fibras musculares esqueléticas | Proceso biológico | 24 | 2 | ACTA1, HOMER1 | 0,009085 | 37 |
| Regulación positiva del transporte de iones de calcio | Proceso biológico | 25 | 2 | HOMER1, LPAR3 | 0,009836 | 127 |
| Partícula de lipoproteína de muy baja densidad | Componente celular | 20 | 2 | APOA2, APOO | 0,006353 | 26 |
| Vesícula recubierta de clatrina | Componente celular | 65 | 3 | MALL, SNX18, DENND1C | 0,007069 | 203 |
| Partícula de lipoproteína de alta densidad | Componente celular | 23 | 2 | APOA2, APOO | 0,00836 | 33 |
| Actividad del canal de agua | Función molecular | 14 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,003115 | 21 |
| Actividad del receptor de nucleótidos purinérgico acoplado a proteína G | Función molecular | 15 | 2 | P2RY2, P2RY14 | 0,00358 | 20 |
| Unión a proteínas de choque térmico | Función molecular | 61 | 3 | APOA2, DNAJA1, HSPA13 | 0,005927 | 135 |
| Unión a proteínas de choque térmico | Función molecular | 21 | 2 | HTR2B, LPAR3 | 0,006994 | 30 |

Ontología génica y análisis de vías basado en el diferencial de expresión de EVs - PIV7-9. La puntuación de enriquecimiento es igual a \log_{10} (valor P) que representa el nivel significativo de OG y vías. (OG: Ontología génica. $P < 0,05$ corregido por BH se consideró estadísticamente significativo).

Fuente: Elaboración Propia.

Tabla 13 Ontología génica de miARNs secretados por embriones producidos In vivo durante la etapa de desarrollo de eclosión. Objetivos genéticos validados de los miARNs más abundantes.

| Ontología génica: termino / nombre | Ontología génica : Dominio | Número genes | Número intersección | Genes diana | p.value | Genes totales |
|--|-----------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------|----------------------|
| Citólisis | Proceso biológico | 20 | 4 | GZMB, PRF1, GZMM, C6 | 1,6E-05 | 38 |
| Vía de señalización del receptor acoplado a proteína G activadora de fosfolipasa C | Proceso biológico | 57 | 5 | PLCE1, ADRA1B, P2RY2, LTB4R, GRPR | 8,39E-05 | 108 |
| Transporte de glicerol | Proceso biológico | 6 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,000899 | 16 |
| Respuesta a la intensidad de la luz | Proceso biológico | 7 | 2 | KCNC2, GNAT1 | 0,001252 | 22 |
| Respuesta a glucocorticoides | Proceso biológico | 68 | 4 | CPN1, APOA2, AGXT, CALCR | 0,00201 | 154 |
| Excreción | Proceso biológico | 37 | 3 | AQP7, AQP3, SCNN1B | 0,003028 | 66 |
| Homeostasis de iones de sodio | Proceso biológico | 11 | 2 | SCNN1B, CYP4F12 | 0,003212 | 43 |
| Regulación de la diferenciación de células T | Proceso biológico | 14 | 2 | TBX21, CARD11 | 0,005234 | 150 |
| Vía de señalización del receptor de nucleótidos purinérgico acoplado a proteína G | Proceso biológico | 15 | 2 | P2RY2, P2RY14 | 0,006008 | 20 |
| Citotoxicidad mediada por células T | Proceso biológico | 16 | 2 | PRF1, GZMM | 0,006831 | 55 |
| Vía de señalización del receptor de | Proceso biológico | 16 | 2 | DAGLB, HOMER1 | 0,006831 | 22 |

| | | | | | | |
|---|-------------------|----|---|---------------|----------|----|
| glutamato acoplado a proteína G | | | | | | |
| Transporte de agua | Proceso biológico | 19 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,009585 | 31 |
| actividad de fosfolipasa C | Función molecular | 13 | 2 | PLCE1, PLCH2 | 0,004509 | 74 |
| Actividad del canal de agua | Función molecular | 14 | 2 | AQP7, AQP3 | 0,005234 | 21 |
| Actividad del receptor de nucleótidos purinérgico acoplado a proteína G | Función molecular | 15 | 2 | P2RY2, P2RY14 | 0,006008 | 20 |

Ontología génica y análisis de vías basado en el diferencial de expresión de EVs - /VV7-9. La puntuación de enriquecimiento es igual a \log_{10} (valor P) que representa el nivel significativo de OG y vías. (OG: Ontología génica. $P < 0,05$ corregido por BH se consideró estadísticamente significativo).

Fuente: Elaboración Propia.

VI. DISCUSIÓN

La producción *In vitro* de embriones en bovinos ha mostrado importantes avances en los últimos años, con un incremento exponencial debido a la gran demanda comercial y difusión de esta tecnología (Viana, 2019, 2022). Sin embargo, las tasas y competencia de blastocistos producidos *in vitro* aún mantienen niveles inferiores respecto a los producidos *In vivo*, (Rizos et al., 2008). Pese a las altas tasas de maduración y división logradas en los embriones *PIV*, las tasas de blastocistos varían del 20% al 40% (Lonergan et al., 2001), con tasas de desarrollo embrionario relativamente bajas, y menor capacidad de implantación y desarrollo a término (Merton et al., 2003).

En este trabajo, al día 7 la tasa de blastocistos producidos *In vivo* fue del 63.9 % y del 71.2 % para el grupo de blastulación y eclosión respectivamente, mientras que la tasa de blastocistos producidos *In vitro* fue del 24.7 % y 26.8 %. Esto significa que para la ventana de blastulación, un mayor número de mórulas producidas *In vivo* alcanzaron el estadio de blastocisto (día 7) comparado con las producidas *In vitro*. Por otro lado, independientemente de la ventana de estudio, un mayor número de blastocistos del grupo *In vivo* se desarrollaron hasta el día 11 respecto a los *In vitro* (84,6% vs 46,2% respectivamente), lo cual se ha definido como un criterio de competencia embrionaria.

Se han descrito varios factores que podrían estar influyendo en el comportamiento de los embriones *PIV*, entre ellos las condiciones de cultivo *In vitro*, las que no han logrado mejorar significativamente las tasas de desarrollo durante las últimas décadas (Rizos et al., 2002, 2008; Bennemann et al., 2018; Osman et al., 2018). Sin embargo, otros factores como la competencia ovocitaria antes y después de la maduración *In vitro* y el bajo potencial de desarrollo embrionario traducido por ejemplo, en errores en la

activación del genoma embrionario y la fragmentación del ADN, afectan la eficiencia de la producción de los embriones *In vitro* (Sirard et al., 2006; Tesfaye et al., 2009). Por tanto, se necesita información para comprender mejor y establecer protocolos efectivos de evaluación de la competencia funcional de los embriones *PIV* que permitan mejorar los resultados actuales. Existen reportes que indican que la cinética de desarrollo de los embriones *PIV* está relacionada con su competencia de desarrollo (Brevini et al., 2002; Somfai et al., 2010; Mellisho et al., 2019). En este trabajo se observaron diferencias significativas en la cinética de desarrollo entre los embriones producidos *In vitro* respecto los *In vivo*. De igual manera se observó un efecto en la cinética de desarrollo debido a la manipulación embrionaria durante diferentes estadios de desarrollo (blastulación y eclosión). Los embriones *In vivo* presentaron una mayor tasa de supervivencia que fue mayor al 50 % respecto a los *In vitro*, siendo superior el desarrollo de los embriones que fueron colectados en estadio de blastocisto (ventana 7-9 respecto a la 5-7).

Otros autores describen que cigotos bovinos cultivados *In vitro* tienen tasas de desarrollo similares a las desarrollados en un sistema *In vivo* (blastocistos al día 8 de desarrollo) (Enright et al., 2000). Sin embargo, es evidente que existen diferencias significativas en la capacidad de desarrollo de los embriones producidos *In vitro* e *In vivo*, incluso como consecuencia del tiempo que son expuesto a condiciones *In vitro*. En este trabajo se utilizó como sistema de evaluación de competencia embrionaria el desarrollo hasta el día 11 en un sistema de cultivo extendido, observándose diferencias significativas en las tasas de eclosión, de sobrevida y tamaño entre los embriones de los diferentes grupos experimentales.

En otros reportes se ha demostrado cómo las EVs secretadas por células oviductales aumentan el potencial de desarrollo de embriones *PIV* en cultivos *In vitro*., las cuales participan en la comunicación temprana con el ambiente materno (Almiñana et al., 2018; Almiñana and Bauersachs, 2019). El objetivo

de este trabajo fue determinar el posible efecto del origen embrionario de la etapa de desarrollo sobre las características de las vesículas extracelulares secretadas por embriones seleccionados como competentes. Con los resultados mencionados anteriormente se ha demostrado que efectivamente, ambas condiciones tienen un efecto significativo en la calidad y competencia de los embriones, lo que podría estar modulando la secreción de señales requeridas para la continuidad del desarrollo y éxito de la gestación.

Identificación, aislamiento y caracterización de EVs secretadas por embriones bovinos producidos *In vitro* e *In vivo* cultivados *In vitro* durante las etapas de blastulación (Día 5-7) y eclosión (Día 7-9).

Este estudio caracterizó la secreción de EVs de embriones bovinos durante la etapa de blastulación y eclosión de la zona pelúcida. La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) en 2014 propuso los "requisitos experimentales mínimos para estudios de vesículas extracelulares" (Lötvall et al., 2014), y en 2018 se consolidó una guía con un conjunto de estándares bioquímicos, biofísicos y funcionales que deben usarse para atribuir cualquier carga o función biológica específica a las EVs (Théry et al., 2018). En este trabajo se clasificaron como EVs las nanopartículas aisladas de medios de cultivo de embriones pre-implantatorios producidos *In vitro* e *In vivo*. En el 2017 se publica el primer reporte que demostró que los embriones bovinos pre-implantatorios secretan EVs al medio extracelular (Mellisho et al., 2017). Otros trabajos también demuestran que embriones porcinos y humanos liberan EVs al medio de cultivo (Saadeldin et al., 2014; Giacomini et al., 2017).

En este estudio, la definición de EVs se basó en los criterios usados por la ISEV (2014-2018). Las EVs fueron positivas para los marcadores de superficie evaluados (CD9, CD63, CD81 y CD40) y presentaron bicapa a la microscopía

electrónica de transmisión. Se observó mayor positividad a marcadores CD40 en las EVs de los embriones *In vivo* que en los *In vitro*; y mayor positividad de CD9, CD63 y CD81 en las EVs de los embriones *In vitro* respecto a los *In vivo*. Esto puede explicarse por la diferencia en la concentración de EVs secretadas por embriones de diferente origen y ventana de desarrollo, lo cual modifica la cantidad de EVs conjugadas a las perlas de látex, método utilizado para la identificación de los marcadores. El patrón de positividad de los marcadores de tetraspaminas fue similar en las EVs secretadas por los blastocistos bovinos (blastulación y eclosión) producidos *In vitro* e *In vivo*.

Adicionalmente, el análisis mediante microscopia electrónica de transmisión permitió confirmar la presencia de una bicapa en las nanopartículas aisladas, morfología similar a la reportada por otros autores para EVs de origen embrionario (Mellisho et al., 2017, 2019; Dissanayake et al., 2020; Melo-Baez et al., 2020). Por otro lado, el NTA permitió determinar el tamaño promedio y concentración de las poblaciones de EVs, identificándose poblaciones en el rango de 100 y 500 nm, pero con mayor concentración en el rango de vesículas pequeñas (< 200 nm). El tamaño de las EVs secretados por células eucariotas puede oscilar entre 30 y 150 nm de diámetro de las partículas pequeñas (Mathivanan et al., 2010). Otros autores describen que las EVs pequeñas podrían ser exosomas de 50 a 150 nm (Pan et al., 1985; Stoorvogel et al., 2002) y las microvesículas con un diámetro de 100 a 1000 nm (Théry et al., 2009). Otros autores han reportado diferentes rangos de tamaño, sin embargo, esto también está afectado por las condiciones de cultivo embrionario, así como el método utilizado para el aislamiento de las EVs (Saadeldin et al., 2014; Giacomini et al., 2017; Mellisho et al., 2017, 2019; Melo-Baez et al., 2020).

Está ampliamente descrito que la secreción de las EVs está modulada por el tipo celular y por el estado fisiológico de la célula de origen (Doyle & Wang, 2019). De esta forma, tanto el tamaño como concentración y carga de las EVs

se modifica ante diferentes estímulos. En este trabajo se identificó que los embriones producidos *In vivo* de la ventana de blastulación (V5-7) secretan vesículas con un tamaño promedio mayor, pero con concentración similar a los *in vitro*. Sin embargo, en la ventana de eclosión (V7-9) los embriones *In vitro* secretaron mayor concentración de EVs y sin diferencias en el tamaño. Esto indica diferencias en las poblaciones de EVs con respecto al origen del embrión, lo cual está en concordancia con la menor competencia asociada a los embriones *PIV* debido al alto estrés al que están expuestos en los sistemas *In vitro* (Lange-Consiglio et al., 2020). De la misma forma, la secreción de EVs por células embrionarias va a estar modulada por el estadio de desarrollo embrionario lo cual va a contribuir tanto por el número de células secretoras como por los diferentes tipos celulares que se forman a partir del proceso de diferenciación (Cruz et al., 2018). Adicionalmente, durante el desarrollo embrionario temprano se produce activación de la muerte celular ya sea para eliminar células con una dotación cromosómica errónea como en respuesta a estímulos ambientales desfavorables (Bedzhov & Zernicka-Goetz, 2015).

Adicionalmente se realizó un análisis separándose dos poblaciones de Vesículas extracelulares: vesículas grandes (>120 nm) y vesículas pequeñas (\leq 120 nm). Se detectaron diferencias en las poblaciones de EVs liberadas y estas están relacionadas con el origen embrionario, donde los embriones producidos *In vitro* liberan una mayor cantidad de vesículas grandes durante la etapa de blastulación como posterior a la eclosión. Reportes en embriones bovinos producidos mediante *PIV* o activación partenogenética (AP) cultivados hasta estadio de blastocisto, demostraron la presencia EVs de mayor tamaño en los embriones de *PIV* (FIV: 172.1 nm; AP: 69.16 nm) (Mellisho et al., 2017). Estos datos concuerdan con nuestros resultados y sugieren que existen diferentes poblaciones de EVs y que las características de estas poblaciones de EVs podrían variar de acuerdo con el origen del embrión. En este caso, los embriones AP son completamente incompetentes

y sin aporte paterno al genoma. Los embriones *PIV* son menos competentes que los *IVV* y tienen una población más grande de EVs grandes.

Adicionalmente se realizó un análisis de la relación entre el diámetro embrionario y las características de las EVs secretadas. En este análisis se observó que independientemente de su origen, los embriones con mayor diámetro (>270µm) y definidos como competentes, secretan mayor cantidad de vesículas. Los datos procesados y analizados por el sistema NTA mostraron que el perfil de concentración de partículas secretadas por embriones *In vitro* e *In vivo* competentes, fue diferente estadísticamente de la población de vesículas secretadas por embriones no competentes.

Varios autores han descrito que las EVs secretadas por los embriones pueden ser indicadores de viabilidad embrionaria. En el 2019, Mellisho et al., proponen que las características de las vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación pueden tener una correlación con la viabilidad embrionaria y su capacidad de continuar el desarrollo. Estos autores mostraron que los embriones con mayor competencia secretaban durante la blastulación EVs de mayor tamaño mientras que los no competentes secretan mayor cantidad de vesículas (Mellisho et al., 2019). Estos resultados coinciden con otro trabajo realizado en embriones bovinos donde también se mostró que, embriones de reducida competencia secretan mayor cantidad de EVs (Dissanayake et al., 2020). En este trabajo, se detectó que los embriones *IVV* durante la ventana de blastulación secretan EVs de mayor tamaño, mientras que los embriones *PIV* secretan mayor cantidad de EVs en la ventana de eclosión. Estos resultados estarían en concordancia con los trabajos mencionados anteriormente (Mellisho et al., 2019; Dissanayake et al., 2020). Por tanto, un mayor tamaño de partículas estaría relacionado con mayor competencia de embriones bovinos, mientras que una mayor concentración con menor competencia. Sin embargo, esto no parece ser extrapolable a otras especies. En humanos, los embriones de buena calidad secretan EVs con un tamaño

promedio de 202 nm mientras que 218 nm para embriones regulares, 222 nm para embriones pobres y 227 nm para embriones de mala calidad, es decir mientras menor es el tamaño de las EVs mayor es la calidad de los embriones (Ferreira et al., 2013).

Por otra parte, en este trabajo también se identificó un efecto del estadio de desarrollo sobre la secreción de EVs. Se determinó que para los embriones de *IVV* se mantiene constante la concentración de EVs secretadas entre las ventanas de blastulación y eclosión, pero el tamaño de las partículas es menor a medida que avanza el desarrollo embrionario. En el caso de los embriones de *PIV* el tamaño de las EVs tiene el mismo patrón, disminuyendo a medida que avanza el desarrollo, pero la concentración aumenta. De este resultado se podría concluir que el tamaño de las partículas disminuye a medida que avanza el desarrollo sin que haya un efecto del origen embrionario. Sin embargo, en embriones porcinos se ha reportado una asociación directa del tamaño de las EVs y el estadio de desarrollo embrionario, observando un incremento en el tamaño de las EVs desde el estadio de dos células hasta blastocisto (EVs <40 nm) y desde blastocito expandido hasta la eclosión (<120 nm) (Saadeldin et al., 2014). En embriones humanos también se ha observado un aumento en el tamaño de las EVs liberadas al medio de cultivo por embriones tempranos (D3) y blastocistos (D5) (Melo-Báez et al., 2023).

Por otro lado, las variaciones en la concentración de EVs secretadas parecen estar más relacionadas con la calidad embrionaria que con la ventana o estadio de desarrollo. En este sentido, otro trabajo en embriones bovinos reporta que la concentración de EVs no varía a medida que avanza el desarrollo pre-implantatorio en embriones de buena calidad, similar a lo observado en embriones *IVV* (Dissanayake et al., 2020).

Análisis del contenido de miARNs en EVs secretadas durante la blastulación y eclosión por embriones bovinos producidos *In vivo* o *In vitro*.

En mamíferos, la formación de blastocistos y de blastocisto eclosionados se caracterizan por dos segregaciones de linajes que dan como resultado la formación de células de trofectodermo, hipoblasto y epiblasto (Goossens et al., 2013). La determinación del destino celular durante estas primeras segregaciones de linaje está asociada con cambios en la expresión de factores de transcripción específicos (Goossens et al., 2013). Además del control basado en factores de transcripción, los microARN (miARN) desempeñan un papel importante en la regulación postranscripcional de las rutas de señalización que controlan la pluripotencia y la diferenciación celular (Goossens et al., 2013).

En este trabajo, además de las características poblacionales (tamaño y concentración) de las EVs se evaluó el contenido de miARNs. Se sabe que los miARN controlan varias funciones reproductivas, incluida la maduración de ovocitos, la implantación y el desarrollo embrionario temprano (Machtinger et al., 2016). El contenido molecular de las EVs modifica la expresión génica y, por tanto, la función de las células diana. Varios autores han identificado miARNs en EVs secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios y tanto el tipo como el número de miARNs varía en función de la calidad embrionaria (Mellisho et al., 2019; Melo-Báez et al., 2021).

En nuestro estudio para dilucidar el papel de los miARNs en embriones de diferente origen *In vivo* e *In vitro* en los estadios de desarrollo embrionario de blastulación y de blastocistos eclosionados se identificaron los miARNs más variables. A través de un análisis integrador de los datos de expresión de miARNs coincidentes, se priorizaron los pares de interacción de miARNs

candidatos. El perfil de expresión de los miARNs reveló 25 miARNs más variables secretados por embriones *In vivo* e *In vitro* y en las ventanas de blastulación y eclosión: miR-3432a-2, miR-343a-21, miR-1468, miR-7-3, miR-7-2, miR-124a-2, miR-124a-1, miR-29a, miR-9-2, miR-9-1, miR-125-b-1, miR-125-b-2, miR-2887-1, miR-2887-2, miR-100, miR-127, miR-125a, miR-2885, miR-168, miR-140, miR-451, miR-158, miR-Let7g, miR-25, miR-155.

Cada miARN puede regular cientos de ARNm y muchos miARNs ejercen sus funciones en un proceso biológico específico principalmente a través de la regulación de los ARNm diana (Bartel, 2009). Centrándonos en los miARNs mencionados anteriormente podemos destacar algunos con funciones significativas en el desarrollo embrionario. Por ejemplo, se ha descrito que miR-1468-5p regula el crecimiento y la progresión del ciclo celular al dirigirse a la subunidad M1 del ribonucleótido reductasa (RRM1) (K. Jiang et al., 2017b). La sobreexpresión de miR-1468-5p aumenta la actividad de la caspasa-3 y disminuye la migración y la proliferación celular y la formación de tubos similares a capilares (Sanchez et al., 2019). Por otra parte miR-7-3 y miR-7-2 están relacionados con el control de la invasión del trofoblasto (Shih et al., 2019). En humanos, la regulación negativa de miR-7 favorece la invasión del trofoblasto y la transición epitelial-mesenquimal mediada por TGF- β -Smad (Shih et al., 2019). En diversos contextos celulares miR-7 inhibe las vías de señalización mediadas por receptores, incluidas las señales de EGFR y STAT3 para promover la diferenciación y modular la adhesión celular (Zhang et al., 2014; Cui et al., 2014).

Se ha observado desregulación de miR-124a en varias neoplasias malignas, induciendo cambios en la metilación del ADN (Ben Dhiab et al., 2015). miR-124 promueve la proliferación y diferenciación de células del sistema nervioso a través de la inactivación de la vía Notch (S. Jiao et al., 2017). En murinos, miR-124 regula la expresión de SOX9 el cual está asociado al aumento del crecimiento embrionario (Grandjean et al., 2009). En presencia de miR-124,

SC1 (modulador de autorrenovación celular) regula las expresiones de pluripotencia y factores de diferenciación (Wei et al., 2017). Adicionalmente, la regulación negativa de miR-124, modula la expresión de PAX6 que promueve la migración de células madre embrionarias durante la gastrulación (Fang et al., 2014).

Por otra parte, miR-29a induce la senescencia celular a través de TGF- β por pérdida de H4K20me3 (Lyu et al., 2018) y es un miARN altamente conservado en varios tejidos reproductivos, incluidos los ovocitos y células de la granulosa, detectándose en el líquido folicular (Loannidis and Donadeu, 2016). En ratas, miR-29a es importante durante la implantación del embrión al regular los factores pro y anti-apoptóticos (BAK1, BMF y BCL-W) (Xia et al., 2014). En el útero de rata miR-29a se expresó altamente durante el período de implantación (Xia et al., 2014), y en mujeres con preeclampsia la regulación positiva de miR-29a suprime la migración y la invasión de células trofoblásticas (X. H. Xu et al., 2021). En otros estudios la pérdida de miR-29a provoca el fracaso de la implantación por inhibición de decidualización del estroma endometrial en el embarazo temprano en mujeres (Liu et al., 2021). La familia de miR-9 se expresa a partir de tres loci genómicos: miR-9-1, miR-9-2 y miR-9-3; estos miARNs tienen funciones específicas durante la diferenciación de células (Yoo et al., 2011), suprimen la proliferación celular y promueven la apoptosis en células tumorales (Jia et al., 2021; L. Q. Wang et al., 2013). Por otro lado miR-9-1 y miR-9-2 se dirigen directamente a varios genes que controlan la pluripotencia de las células madre embrionarias (Liu et al., 2012). Entre los objetivos conocidos de miR-9-2 se encuentra ECAD, un marcador de células madre embrionarias (Liu et al., 2012; Ma et al., 2016) y que puede reemplazar a OCT4 durante la reprogramación de células somáticas (Saunders et al., 2010; Redmer et al., 2011; Cruz-Santos et al., 2016). ECAD, miR-9-2 regulan directamente a Lin28 (Zhong et al., 2010). En este estudio, parece ser novedoso que la familia miR-9 esté presente en las EVs secretadas por embriones *IVV* eclosionados. No se ha descrito en

embriones bovinos en estadios tempranos, sin embargo, este hecho podría estar asociado con la regulación de la migración y proliferación celular durante el desarrollo embrionario y durante el remodelamiento endometrial para la implantación.

La familia miR-125, (miR-125a y miR-125b) suprimen la expresión de Lin28a durante las primeras etapas de la diferenciación (Zhong et al., 2010). Lin28a se une a varios miARN, como miRLet-7, miR-30 y miR-9 para modular múltiples funciones celulares como diferenciación, crecimiento, metabolismo y pluripotencia (Melton et al., 2010). En murinos, miR-125 modula a VEGF quien juega un papel importante en la implantación embrionaria, gestación temprana, vasculogénesis y angiogénesis tumoral (Zygmunt et al., 2003). La inactivación de un solo alelo de VEGF en ratones resulta en letalidad embrionaria y defectos en varios órganos (Ferrara, 2004).

miR-100 modula la proliferación y apoptosis de células del estroma endometrial (CEE) de cabra *In vitro* y la implantación de embriones *In vivo* (L. Ma et al., 2022). La sobreexpresión de miR-100 suprime la proliferación de CEE e induce la apoptosis. El miR-100 embrionario promueve la angiogénesis en células CEE y la proliferación del trofoblasto durante la implantación, activa la kinasas FAK/JNK (Tan et al., 2020). La expresión placentaria de miR-100 se ha relacionado con la proliferación celular y las vías de señalización de la insulina asociado a un crecimiento prenatal y posnatal (Carreras-Badosa et al., 2017).

En murinos miR-127 es un regulador esencial de RTL1 para el desarrollo de células placentarias (Ito et al., 2015). miR-127 participa en la reprogramación epigenética de las células donantes post transferencia nuclear somática (X. S. Cui et al., 2009). miR-127 acelera la diferenciación del mesodermo de las células madre embrionarias de ratón a través de la señalización nodal de Lefty2 (H. Ma et al., 2016). En blastocistos eclosionados de bovino, miR-127

desempeñan un papel importante en la regulación postranscripcional de la pluripotencia y la diferenciación de los linajes de células de trofoectodermo, hipoblasto y epiblasto (Goossens et al., 2013). La familia miR-125 es crucial en la regulación de genes maternos y en la activación del genoma a través de SEBOX y Lin28a en ovocitos y embriones (K. H. Kim et al., 2016). La combinación de alelos miR-25 y miR-125a se asocia con un mayor riesgo de falla recurrente en la implantación de embriones humanos (Lee et al., 2019). Otros miRNAs detectados también participan en la regulación de la comunicación embrio-materna e implantación como miR-140 (McCarthy et al., 2012); (Mazzarella et al., 2021), miR-451 (Z. Li et al., 2015), y miR-155 (Lu, 2022).

La familia Let-7, la familia miR-200 y la familia miR-30, se identifican expresados diferencialmente en estudios sobre la regulación de los procesos de decidualización endometrial en ratones (Tochigi et al., 2017). mir-Let-7a/g se expresan a la alza en epitelio uterino receptivo en humanos y ratas, bajo regulación inversa de estrógeno y progesterona (hormonas ováricas) (Q. Li et al., 2020). En un estudio donde se induce la expresión de miRlet-7a en blastocistos de ratón, disminuyó el número de sitios de implantación *In vivo*, prolongó la supervivencia *In vitro* de blastocistos y bloqueó la diferenciación del trofoblasto y el potencial de implantación de embriones humanos (Liu et al., 2012). La diapausa embrionaria es controlado por la madre; sin embargo, miRlet-7 podría inducir la diapausa mediante la supresión de la señalización de c-myc/mTORC1 y mTORC2 (Liu et al., 2012a). En nuestro estudio se identificó que miR-let7g está altamente expresado y es exclusivo de las EVs de los embriones bovinos *In vivo* en estadio de eclosión. Por tanto, podríamos suponer que este miARN en embriones bovinos producidos *In vivo*, participa activamente en la modulación del ambiente uterino y pluripotencia embrionaria para un mejor control del desarrollo y podría ser crucial en el paso de estadio de blastulación al estadio de eclosión.

Otros miARNs detectados en las EVs secretadas por los embriones bovinos están relacionados con el control de eventos como estrés oxidativo, metabolismo de los lípidos entre ellos miR-2885, miR-168 (Fatima et al., 2014; Sacco and Adeli, 2012) y miR-25 (Varga et al., 2013). También se ha observado que la expresión de miR-25 es mayor en embriones (blastocistos) bovinos degenerados; y en mujeres en sistemas de producción *In vitro* asociados a falla recurrente en la implantación (Kropp et al., 2014; Zhang et al., 2018; Lee et al., 2019). En otros estudios miR-25 y miR-16b se expresaron en embriones (Día 17 y 24 de gestación) *In vivo* con mortalidad embrionaria temprana (Pohler et al., 2017). Por lo tanto, en nuestro estudio la evaluación de la expresión de miARN en embriones bovinos sugiere que un embrión puede secretar selectivamente ciertos miARNs en su entorno extracelular dependiendo del origen del embrión sea *In vitro* o *In vivo*. Por tanto, su mayor expresión estaría relacionado con los procesos *PIV* lo cual modificaria y alteraría el desarrollo embrionario disminuyendo su competencia.

Los diferentes estudios sugieren que el ambiente uterino es crucial para que el desarrollo embrionario continúe. En tal sentido se han reportado varios miARNs que se inducen en el entorno peri-implantatorio con funciones inmuno-reguladoras (Chan et al., 2021). Nuestro estudio concuerda con este planteamiento, por ejemplo, miR-155 se detectó sobreexpresado en embriones *In vitro* e *In vivo* en etapa de blastulación y disminuido en eclosión, lo que podría estar asociado tanto a la calidad de los embriones como a los cambios moleculares que se producen durante el desarrollo pre-implantatorio. En murinos, miR-155 modula las células T reguladoras (células Treg) que confieren tolerancia inmunitaria adaptativa (Chan et al., 2021). La implantación del embrión depende de la adaptación inmune materna respecto a la disponibilidad y funcionalidad de células T reguladoras (Treg) (Schjenken et al., 2020; Chan et al., 2021) siendo similares en todos los mamíferos (Robertson et al., 2017; Ghaebi et al., 2019). Considerando los resultados de este trabajo es posible que en bovinos la diferencia en la regulación en la

secreción de miR-155 sea también clave en la preparación del útero para una adecuada implantación.

Efecto del origen embrionario y ventana de desarrollo sobre la presencia diferencial de miARNs contenidos en las EVs secretadas por embriones bovinos

Para evaluar el efecto de la ventana de desarrollo y el origen embrionario sobre el contenido de miARNs en las EVs se realizaron dos comparaciones. En la primera se consideró como variable el origen embrionario (*In vivo* o *In vitro*) para las ventanas de blastulación y eclosión. En un segundo análisis, se consideró como variable la etapa de desarrollo para embriones *PIV* o *IVV*. Se observaron diferencias en el contenido de miARN en función al origen embrionario (*In vivo* o *In vitro*) para cada una de las ventanas de desarrollo.

Los embriones bovinos producidos *In vivo* e *In vitro* tienen diferentes perfiles metabólicos y diferencias en los patrones de transcripción de genes (Bridi et al., 2021). Por tanto, descifrar el contenido de miARNs es importante para una mejor comprensión de las regulaciones génicas en los embriones de diferente origen. Otros trabajos han reportado diferencia en los perfiles de miARNs en EVs secretadas por embriones bovinos en relación a la calidad y origen embrionario (Mellisho et al., 2017, 2019; Melo-Baez et al., 2020). Adicionalmente, se han identificado miARNs relacionados con la regulación de vías de señalización que participan en la comunicación embrio-materna (Bridi et al., 2021).

En este trabajo también se identificaron miARNs diferencialmente representados en las EVs secretadas por embriones *PIV* vs *IVV*. miR-485, miR-660 y miR-1271 se detectaron exclusivamente en las EVs

secretadas durante la blastulación por embriones producidos *In vivo* (IVV5-7). En humanos, la expresión de miR-1271, miR-600 y miR-485 está asociada a varios tumores o enfermedades neurodegenerativas, regulando la proliferación celular y la metástasis tumoral (Maurel et al., 2013; Peng et al., 2020; Chen et al., 2022). La disminución de la expresión de miR-1271 se asocia con el carcinoma hepático y cáncer gástrico y mayor activación del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 y anti apoptótico Bcl-2 (Maurel et al., 2013; Yang et al., 2014). Por otra parte, también se ha observado un efecto de miR-1271 en la transición epitelial-mesenquimal en cáncer de ovario (Y. Jiao et al., 2019).

Por su parte, miR-660 promueve la progresión del cáncer de mama e hígado mediante la regulación negativa de TET2 y la activación de la señalización de PI3K/AKT/mTOR (Peng et al., 2020; Pan et al., 2021). La sobreexpresión de miR-660 se ha relacionado con metástasis en los ganglios linfáticos e invasión vascular de los tumores, mientras su silenciamiento actuaría como supresor de tumores inhibiendo la proliferación celular y la metástasis en células de cáncer de mama (Peng et al., 2020) cáncer de pulmón (Fortunato et al., 2014) y de carcinoma renal (He et al., 2018). miR-485 se ha identificado en enfermedades degenerativas como el Alzheimer (EA) y Parkinson (Xia Lin et al., 2022) y su regulación a la baja promueve la proliferación, la migración y la invasión en el cáncer de próstata mediante la activación de la señalización de TGF- β (Chen et al., 2022). Su silenciamiento inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis a través de la regulación negativa de MELK en el cáncer colonorrectal (Su et al., 2022).

Los tumores se caracterizan por un fenotipo muy cercano al de las células embrionarias en relación con la proliferación celular, menor control del ciclo celular e inducción de apoptosis. En este trabajo no se realizó una correlación de los niveles de miARN entre el embrión y las EVs, no obstante, la presencia de miR-1271, miR-485, miR-660 en EVs secretadas durante la blastulación

por embriones producidos *In vivo* podría, estar relacionado con una mayor expresión en el embrión, apoyando un fenotipo de mayor proliferación. Por tanto, si consideramos la hipótesis del papel de las EVs como mecanismo de descarte de moléculas al espacio extracelular, se podría especular sobre una transición a un estadio de mayor control apoptótico y proliferativo posterior a la blastulación.

Por otra parte, miR-151-2, miR-409a, miR-155 se detectaron solo en las EVs secretadas durante la ventana de blastulación tanto para embriones *IVP como IVV*. La presencia de estos miARNs en esta etapa podría estar relacionado con una función durante el proceso de diferenciación celular que tiene lugar durante la blastulación. Sin embargo, varios estudios sugieren que la sobreexpresión de miR-155 suprime la expansión de las células del cúmulus y la maduración de los ovocitos mediante la regulación de la expresión de los genes MECP2, JARID2, NOTCH1 SMAD2 y BCL2 (Dehghan et al., 2020a; Lu, 2022). En el bovino miR-155 está regulado al alza en los folículos atrésicos en comparación con los folículos sanos (Donadeu et al., 2017). Similar a esto, en porcinos la inhibición de miR-155 mejoró la competencia de desarrollo *in vitro* al aumentar el número de células y reduciendo los niveles apoptóticos (Chan et al., 2021). En este sentido, la alta presencia de este miARN en las EVs secretadas durante la blastulación podría explicarse como un mecanismo del embrión de descartar moléculas “dañinas” para el desarrollo embrionario. Ya se ha mencionado el papel relevante de miR-155 en la inmunorregulación del endometrio durante la implantación y la regulación de la migración del trofoblasto (Dai et al., 2012; Schjenken et al., 2020), por lo que la liberación en las EVs durante la blastulación estaría indicando un mecanismo temprano de preparación del ambiente materno. Adicionalmente se ha observado que, en bovinos, la circulación de miR-155 aumenta entre el día 0 y 60 de gestación (Ioannidis & Donadeu, 2017). Pero también una mayor expresión de miR-155 se ha relacionado con la respuesta a diferentes condiciones de estrés en diferentes especies (Miretti et al., 2020). Esto estaría en concordancia con la

inducción de mecanismos apoptóticos en embriones porcinos debido al aumento de la expresión relativa de miR-155 (Tanga et al., 2022). Esto podría explicar la ausencia de miR-155 en las EVs secretadas durante la etapa de eclosión y que coincide con los embriones de mayor tasa de crecimiento determinado en este estudio.

Por otro lado, la familia miR-151 es muy conservada entre mamíferos y su expresión es constante durante el desarrollo pre-implantatorio de embriones bovinos, desde el ovocito hasta el blastocisto (Cuthbert et al., 2019). miR-151 está involucrado en el crecimiento, desarrollo y tumorigénesis de diferentes tipos de tumores en humanos y juega un papel importante en la regulación de la proliferación y la migración de células del estroma de la médula ósea en ratones (Mierzejewski et al., 2022; Zhang et al., 2022). La disminución de este miARN en el embrión podría ser perjudicial para una correcta proliferación embrionaria, sin embargo, la ausencia de miR-151 en las EVs secretadas durante la eclosión no necesariamente está correlacionado con el contenido en el embrión.

Se identificaron otros miARNs que si bien están presente en las EVs independientemente del grupo experimental hay diferencias significativas en la cantidad detectada. Durante la blastulación, se observa un mayor contenido de miARNs en las EVs secretadas por embriones producidos *In vitro*. Sin embargo, durante la eclosión la diferencia es significativamente menor, observándose solo 5 miARNs (miR-6529a/b; miR-9-2-2; miR-9-1 y miR-30d) mayormente representados en las EVs de los embriones *In vivo*. Esto sugiere que existe asociación entre la secreción de EVs y su cargo y el sistema de producción de embriones *In vitro* o *In vivo*. Por tanto, es importante entender que el sistema de producción *In vitro* podría estar influyendo de forma indirecta en las poblaciones de EVs y su cargo (miARNs), lo que a su vez podría tener un efecto en la señalización embrionaria para el reconocimiento de la gestación.

Entre los miARNs más desregulados entre embriones *In vitro* e *In vivo* se contaron dos representantes de la familia de miR-9 el cual se ha discutido anteriormente. Por su parte, miR-30d en murinos promueven la placentación y desarrollo embrionario (Sadri et al., 2020), en cerdos, se ha detectado su expresión en células del cúmulo-ovocito y en los embriones tempranos (blastocistos) (Yang et al., 2012), y en humanos, genera un entorno inmunotolerante (Paul et al., 2019). En humanos, el endometrio expresa miR-30d el cual favorece la adhesión del embrión (Zhou & Dimitriadis, 2020). En general, se indica que la deficiencia de miR-30d materna y/o embrionaria afectaría la implantación embrionaria y el desarrollo fetal en el modelo murino (Balaguer et al., 2019). Por lo tanto, en nuestro estudio se considera que la presencia de miR-30d en las EVs secretadas durante la eclosión y en mayor medida por embriones *IVV* podría indicar el papel de este miARN en la interacción embrio-materna temprana en bovinos.

En general se observó una disminución en el contenido de miARNs sobreexpresados a medida que avanza el desarrollo embrionario tanto para los embriones producidos *In vitro* como *In vivo*. Esto se debe probablemente, a los cambios moleculares que tienen lugar durante la blastulación donde los eventos de compactación y formación del blastocele requieren una mayor modulación génica en comparación con la protrusión y eclosión embrionaria. Durante la transición de mórula a blastocisto se producen eventos moleculares más dinámicos, relacionados con la primera diferenciación celular y el establecimiento de dos tipos celulares diferentes, lo cual podría estar modulando el contenido de miARNs embrionarios y, por tanto, la cantidad cargada en las EVs (Lee et al., 2012; Hansen and Tríbulo, 2019; Petit et al., 2022).

En nuestro estudio se identificaron 7 miARNs (miR25, miR1271, miR660, miR485, miR155, miR16B, miR877) altamente representados en las EVs secretadas durante la blastulación en comparación con la eclosión. En la

ventana de eclosión embrionaria se identificó solo un miARN (miRLet7g) exclusivo de las EVs de los embriones *In vivo* y 2 miRNAs (miR320a-1 y miR320a-2) igualmente representados en las EVs de los embriones de ambos orígenes. Ya se ha discutido sobre el papel de varios de estos miARNs, especialmente durante la etapa de blastulación, sin embargo, otros de estos miARNs también se han detectado en embriones y se han relacionado con la calidad embrionaria y la regulación de la implantación. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de miR-25 es mayor en embriones (blastocistos) bovinos degenerados y en mujeres en sistemas de producción *In vitro* asociados a falla recurrente en la implantación (Kropp et al., 2014; Zhang et al., 2018; Lee et al., 2019). Al igual que miR-25, la alta expresión de miR-16b en embriones estarían asociado con mortalidad embrionaria temprana (Pohler et al., 2017).

Por otra parte, la familia Let7 juega un papel importante en los mamíferos en la diferenciación de células madre y células tumorales (Boyerinas et al., 2010). miRLet7g tienen una mayor expresión en epitelio uterino receptivo de humana y de ratón, y está bajo la regulación inversa de estrógeno y progesterona (Liu et al., 2020). La sobreexpresión de miRlet-7a ó la incubación con vesículas extracelulares enriquecidas con miRlet-7g de células epiteliales endometriales, prolongó la supervivencia *In vitro* de blastocistos de ratón (Liu et al., 2012). Respecto a los miR-320a-1; miR-320a-2, estos pertenecen a una familia más grande de miARN que tienen secuencias de nucleótidos muy similares y pueden ser funcionalmente redundantes (Rhee et al., 2013). MiR-320a se ha identificado como un supresor importante de tumores que reduce la migración celular (Zhang et al., 2012; Yu et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Estudios *In vitro* han descrito que los embriones pre-implantatorios humanos podrían estimular la decidualización celular mediante la migración de células del estroma endometrial a través de la secreción de miARNs (Liang et al., 2017). hsa-miR-320a ha sido reportado como el único miARN secretado

específicamente por embriones de alta calidad (Capalbo et al., 2016) y se sugiere que estimula la migración de células estromales decidualizadas al regular la organización del citoesqueleto (Fletcher & Mullins, 2010). Incluso se ha demostrado que hsa-miR-320a ya es secretado por los ovocitos que generan embriones con alta calidad morfológica (Feng et al., 2015). Otros trabajos han demostrado que miR-320a funciona de forma autocrina para mejorar el desarrollo morfológico de los embriones antes de la implantación (Feng et al., 2015).

En este estudio también se identificaron otros miARNs altamente variables en las EVs de los grupos de *PIV* e *IVV* y de blastulación y eclosión que podrían tener una participación importante en la modulación del desarrollo embrionario e interacción embrio-materna. Por ejemplo varias investigaciones han descrito que la expresión de miR-29b podría contribuir a la interrupción de la metilación del ADN al regular la expresión de *DNMT3a/b*, lo que provoca un bloqueo temprano del desarrollo embrionario en ratones, interrumpiendo la formación de mórula y blastocisto (Sinha et al., 2017). Otros estudios *In vitro* observaron que miR-21, miR-29c, Let-7, miR-125a, estarían involucrados en la especificación de trofoectodermo (Viswanathan et al., 2009) mientras que miR-378a-5p regula la migración y la capacidad de invasión de las células del trofoblasto humano (Xie et al., 2014; Luo et al., 2012).

En resumen, este estudio demuestra la variabilidad en el contenido de miARNs en las vesículas extracelulares debido al origen embrionario y la etapa de desarrollo pre-implantatoria. Esto se podría interpretar como efecto de la calidad embrionaria y de los procesos moleculares que tienen lugar durante este periodo de desarrollo. Por tanto, los miARNs identificados como exclusivos o diferencialmente representados en las EVs de los diferentes grupos experimentales podrían ser útiles como marcadores moleculares para la selección embrionaria. Los miARNs circulantes podrían ser considerados como biomarcadores eficaces debido a su estabilidad, capacidad de

información y detección no invasiva. Sin embargo, queda por estudiar si otras formas de miARNs extracelulares tienen funciones indicativas y si el resultado de los estudios de miARNs circulantes puede verse afectado por métodos analíticos y experimentales (Tiberio et al., 2015). Por tanto, se requerirá un mayor esfuerzo para aplicar un método estandarizado y consistente para determinar si los miARNs circulantes se pueden usar como biomarcadores confiables para los eventos de implantación, especialmente para detectar la receptividad endometrial.

VII. CONCLUSIONES

1. El origen embrionario (*In vivo* vs *In vitro*) y la etapa de desarrollo (blastulación vs eclosión) tienen un efecto sobre las características poblacionales (tamaño promedio y concentración) de vesículas extracelulares; los embriones *PIV* liberan mayor cantidad de EVs especialmente durante la etapa de eclosión mientras que los *IVV* secretan EVs de mayor tamaño durante la blastulación.
2. Independientemente del origen (*In vivo* o *In vitro*) los embriones más competentes (>270µm) secretan mayor cantidad de vesículas; embriones ovoides, seleccionados como competentes, que adquirieron un tamaño mayor, cualquiera sea su origen, secretan una mayor concentración de EVs.
3. El origen embrionario (*In vivo* vs *In vitro*) y la etapa de desarrollo tienen un efecto sobre el contenido de microARNs de las vesículas extracelulares; siendo mayor el número de microARNs detectados en las EVs de embriones *PIV* durante la blastulación mientras que no se observaron diferencias como consecuencia del origen embrionario durante la eclosión.
4. Se identificó un mayor número de microRNAs diferencialmente representados entre embriones *IVV* e *PIV* durante la etapa de blastulación con respecto a la eclosión; se identificaron 3 microARNs exclusivos de las EVs secretadas durante la blastulación por los embriones producidos *In vivo* y que podrían estar relacionados con la competencia embrionaria.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Otoi, T., Tachikawa, S., Yamashita, S., Satoh, T., & Hoshi, H. (1999). Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anatomy and Embryology*, 199(6), 519–527. <https://doi.org/10.1007/S004290050249>
- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301. <https://doi.org/10.1007/S10571-016-0366-Z>
- Abreu, C. M., Thomas, V., Knaggs, P., Bunkheila, A., Cruz, A., Teixeira, S. R., Alpuim, P., Francis, L. W., Gebril, A., Ibrahim, A., Margarit, L., Gonzalez, D., Freitas, P. P., Conlan, R. S., & Mendes Pinto, I. (2020). Non-invasive molecular assessment of human embryo development and implantation potential. *Biosensors & Bioelectronics*, 157. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112144>
- Acuña, O. S., Avilés, M., López-Úbeda, R., Guillén-Martínez, A., Soriano-Úbeda, C., Torrecillas, A., Coy, P., & Izquierdo-Rico, M. J. (2017). Differential gene expression in porcine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility, and Development*, 29(12), 2387–2399. <https://doi.org/10.1071/RD16457>
- Adona, P. R., Leal, C. L. V., Biase, F. H., De Bem, T. H., Mesquita, L. G., Meirelles, F. V., Ferraz, A. L., Furlan, L. R., Monzani, P. S., & Guemra, S. (2016). In vitro maturation alters gene expression in bovine oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, 24(4), 624–633. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000672>
- Al-Dossary, A. A., Strehler, E. E., & Martin-DeLeon, P. A. (2013). Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS One*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0080181>
- Almiñana, C., Tsikis, G., Labas, V., Uzbekov, R., da Silveira, J. C., Bauersachs, S., & Mermillod, P. (2018). Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-018-4982-5>
- Almiñana, Carmen, & Bauersachs, S. (2019). Extracellular Vesicles in the Oviduct: Progress, Challenges and Implications for the Reproductive

Success. *Bioengineering* (Basel, Switzerland), 6(2).
<https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING6020032>

Almiñana, Carmen, Corbin, E., Tsikis, G., Alcântara-Neto, A. S., Labas, V., Reynaud, K., Galio, L., Uzbekov, R., Garanina, A. S., Druart, X., & Mermillod, P. (2017). Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction* (Cambridge, England), 154(3), 253–268. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0054>

Almiñana, Carmen, Heath, P. R., Wilkinson, S., Sanchez-Osorio, J., Cuello, C., Parrilla, I., Gil, M. A., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., Martinez, E. A., & Fazeli, A. (2012). Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract. *PloS One*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0033625>

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A. H., Gardiner, C., Sargent, I. L., Wood, M. J. A., & Cooper, J. M. (2011). Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 360–367. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2011.01.029>

Anagnostopoulou, C., Maldonado Rosas, I., Singh, N., Gugnani, N., Chockalingham, A., Singh, K., Desai, D., Darbandi, M., Manoharan, M., Darbandi, S., Leonardi Diaz, S. I., Gupta, S., Henkel, R., Sallam, H. N., Boitrelle, F., Wirka, K. A., & Agarwal, A. (2022). Oocyte quality and embryo selection strategies: a review for the embryologists, by the embryologists. *Panminerva Medica*, 64(2), 171–184. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.22.04680-8>

Andra', A., Dinnyé S, A., Lonergan, P., Fair, T., Boland, M. P., & Yang, A. X. (1999). Timing of the First Cleavage Post-Insemination Affects Cryosurvival of In Vitro-Produced Bovine Blastocysts. *Mol. Reprod. Dev*, 53, 318–324. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199907\)53:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3)

Aparicio, B., Cruz, M., & Meseguer, M. (2013). Is morphokinetic analysis the answer? *Reproductive Biomedicine Online*, 27(6), 654–663. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2013.07.017>

Arce, J. C., Ziebe, S., Lundin, K., Janssens, R., Helmggaard, L., & Sørensen, P. (2006). Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Human Reproduction* (Oxford, England), 21(8), 2141–2148. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEL106>

Arnold, D. R., Bordignon, V., Lefebvre, R., Murphy, B. D., & Smith, L. C. (2006). Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction* (Cambridge, England),

132(2), 279–290. <https://doi.org/10.1530/REP.1.01217>

- Bachurski, D., Schuldner, M., Nguyen, P. H., Malz, A., Reiners, K. S., Grenzi, P. C., Babatz, F., Schauss, A. C., Hansen, H. P., Hallek, M., & Pogge von Strandmann, E. (2019). Extracellular vesicle measurements with nanoparticle tracking analysis - An accuracy and repeatability comparison between NanoSight NS300 and ZetaView. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596016>
- Badr, H., Bongioni, G., Abdoon, A. S. S., Kandil, O., & Puglisi, R. (2007). Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote (Cambridge, England)*, 15(4), 355–367. <https://doi.org/10.1017/S0967199407004315>
- Balaban, Baak, Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., Ebner, T., Gardner, D., Hardarson, T., Lundin, K., Cristina Magli, M., Mortimer, D., Mortimer, S., Munné, S., Royere, D., Scott, L., Smitz, J., Thornhill, A., Van Blerkom, J., & Van Den Abbeel, E. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(6), 1270–1283. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DER037>
- Balaban, Basak, Urman, B., Isiklar, A., Alatas, C., Aksoy, S., Mercan, R., Mumcu, A., & Nuhoglu, A. (2001). The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 16(11), 2357–2361. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/16.11.2357>
- Balaguer, N., Moreno, I., Herrero, M., González-Monfort, M., Vilella, F., & Simón, C. (2019). MicroRNA-30d deficiency during preconception affects endometrial receptivity by decreasing implantation rates and impairing fetal growth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 221(1), 46.e1-46.e16. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2019.02.047>
- Barnea, E. R. (2004). Insight into early pregnancy events: the emerging role of the embryo. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 51(5), 319–322. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2004.00159.X>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.01.002>
- Baskaran, S., Panner Selvam, M. K., & Agarwal, A. (2020). Exosomes of male reproduction. *Advances in Clinical Chemistry*, 95, 149–163. <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2019.08.004>
- Batista, R. I. T. P., Moro, L. N., Corbin, E., Alminana, C., Souza-Fabjan, J. M.

- G., Freitas, V. J. D. F., & Mermillod, P. (2021). Porcine oocyte preincubation in oviductal fluid flush before in vitro fertilization in the presence of oviductal epithelial cells improves monospermic zygote production. *Zygote*, 29(5), 350–357. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000046>
- Bauersachs, S., & Almiñana, C. (2020). Embryo-Maternal Interactions Underlying Reproduction in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–6. <https://doi.org/10.3390/IJMS21144872>
- Baumann, C. G., Morris, D. G., Sreenan, J. M., & Leese, H. J. (2007). The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Molecular Reproduction and Development*, 74(10), 1345–1353. <https://doi.org/10.1002/MRD.20604>
- Bazer, F. W., Seo, H., Wu, G., & Johnson, G. A. (2020). Interferon tau: Influences on growth and development of the conceptus. *Theriogenology*, 150, 75–83. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.01.069>
- Bazer, F. W., Spencer, T. E., Johnson, G. A., & Burghardt, R. C. (2011). Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 3(2), 745–767. <https://doi.org/10.2741/S184>
- Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2018.02.013>
- Bedzhov, I., & Zernicka-Goetz, M. (2015). Cell death and morphogenesis during early mouse development: are they interconnected? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 37(4), 372–378. <https://doi.org/10.1002/BIES.201400147>
- Behboodi, E., Anderson, G. B., BonDurant, R. H., Cargill, S. L., Kreuzer, B. R., Medrano, J. F., & Murray, J. D. (1995). Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 44(2), 227–232. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00172-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00172-5)
- Ben Dhiab, M., Ziadi, S., Ksaa, F., Louhichi, T., Ben Gacem, R., Ben Zineb, A., Amara, K., Hachana, M., & Trimeche, M. (2015). Methylation of miR124a-1, miR124a-2, and miR124a-3 in Hodgkin lymphoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(3), 1963–1971. <https://doi.org/10.1007/S13277-014-2802-3>
- Bennemann, J., Grothmann, H., & Wrenzycki, C. (2018). Reduced oxygen concentration during in vitro oocyte maturation alters global DNA

- methylation in the maternal pronucleus of subsequent zygotes in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, 85(11), 849–857. <https://doi.org/10.1002/MRD.23073>
- Berlanga, O., Bradshaw, H. B., Vilella-Mitjana, F., Garrido-Gómez, T., & Simón, C. (2011). How endometrial secretomics can help in predicting implantation. *Placenta*, 32 Suppl 3(SUPPL. 3). <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2011.06.002>
- Bertolini, M., Beam, S. W., Shim, H., Bertolini, L. R., Moyer, A. L., Famula, T. R., & Anderson, G. B. (2002). Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 63(3), 318–328. <https://doi.org/10.1002/MRD.90015>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, 10(3), 344–348. <http://www.animal-reproduction.org/article/5b5a604cf7783717068b46a2>
- Bó, G.A., & Mapletoft, R. J. (2020). Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*, 150, 353–359. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.02.001>
- Bó, Gabriel A., Baruselli, P. S., Chesta, P. M., & Martins, C. M. (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65(1), 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.008>
- Bó, Gabriel A., Guerrero, D. C., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Rogan, D., & Mapletoft, R. J. (2010). New approaches to superovulation in the cow. In *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 22, Issue 1, pp. 106–112). Reprod Fertil Dev. <https://doi.org/10.1071/RD09226>
- Bó, Gabriel A., & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38–48. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.09.020>
- Bolmberg, L. A., Hashizume, K., & Viebahn, C. (2008). Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic pattern formation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(2), 181–195. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0355>
- Boni, R., Cuomo, A., & Tosti, E. (2002). Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, 66(3), 836–842. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD66.3.836>

- Bonnet, A., Bevilacqua, C., Benne, F., Bodin, L., Cotinot, C., Liaubet, L., Sancristobal, M., Sarry, J., Terenina, E., Martin, P., Tosser-Klopp, G., & Mandon-Pepin, B. (2011). Transcriptome profiling of sheep granulosa cells and oocytes during early follicular development obtained by laser capture microdissection. *BMC Genomics*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-417>
- Botros, L., Sakkas, D., & Seli, E. (2008). Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 679–690. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAN066>
- Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., Murmann, A. E., & Peter, M. E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0184>
- Bracewell-Milnes, T., Saso, S., Abdalla, H., Nikolau, D., Norman-Taylor, J., Johnson, M., Holmes, E., & Thum, M. Y. (2017). Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 23(6), 723–736. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMX023>
- Braude, P., Bolton, V., & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 332(6163), 459–461. <https://doi.org/10.1038/332459A0>
- Breukelman, S. P., Perényi, Z., De Ruigh, L., Van Wagendonk-de Leeuw, A. M., Jonker, F. H., Vernooij, J. C. M., Beckers, J. F., Van Der Weijden, G. C., Vos, P. L. A. M., Dieleman, S. J., & Taverne, M. A. M. (2005). Plasma concentrations of bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG) do not differ during the first 119 days between ongoing pregnancies derived by transfer of in vivo and in vitro produced embryos. *Theriogenology*, 63(5), 1378–1389. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.07.008>
- Brevini, T. A. L., Lonergan, P., Cillo, F., Francisci, C., Favetta, L. A., Fair, T., & Gandolfi, F. (2002). Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*, 63(4), 510–517. <https://doi.org/10.1002/MRD.10191>
- Bridi, A., Andrade, G. M., del Collado, M., Sangalli, J. R., de Ávila, A. C. F. C. M., Motta, I. G., da Silva, J. C. B., Pugliesi, G., Silva, L. A., Meirelles, F. V., da Silveira, J. C., & Perecin, F. (2021). Small extracellular vesicles derived from in vivo- or in vitro-produced bovine blastocysts have different

miRNAs profiles-Implications for embryo-maternal recognition. *Molecular Reproduction and Development*, 88(9), 628–643. <https://doi.org/10.1002/MRD.23527>

Brison, D. R., Houghton, F. D., Falconer, D., Roberts, S. A., Hawkhead, J., Humpherson, P. G., Lieberman, B. A., & Leese, H. J. (2004). Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(10), 2319–2324. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEH409>

Burns, G., Brooks, K., Wildung, M., Navakanitworakul, R., Christenson, L. K., & Spencer, T. E. (2014). Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PloS One*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0090913>

Burns, G. W., Brooks, K. E., O'Neil, E. V., Hagen, D. E., Behura, S. K., & Spencer, T. E. (2018). Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. *Biology of Reproduction*, 98(5), 612–622. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY011>

Burns, G. W., Brooks, K. E., & Spencer, T. E. (2016). Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep1. *Biology of Reproduction*, 94(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134973>

Burrola-Barraza, M. E., Hernández-Seáñez, R., Barceló-Fimbres, M., Rodríguez-Almeida, F. A., González-Rodríguez, E., García-Quiñónez, S., Grado-Ahuir, J. A., & Moreno-Brito, V. (2011). Dicer gene expression during early bovine embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 78(9), 622. <https://doi.org/10.1002/MRD.21367>

Camargo, L. S. A., Munk, M., Sales, J. N., Wohlfres-Viana, S., Quintão, C. C. R., & Viana, J. H. M. (2019). Differential gene expression between in vivo and in vitro maturation: a comparative study with bovine oocytes derived from the same donor pool. *JBRA Assisted Reproduction*, 23(1), 7–14. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180084>

Campoy, I., Lanau, L., Altadill, T., Sequeiros, T., Cabrera, S., Cubo-Abert, M., Pérez-Benavente, A., Garcia, A., Borrós, S., Santamaria, A., Ponce, J., Matias-Guiu, X., Reventós, J., Gil-Moreno, A., Rigau, M., & Colas, E. (2016). Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols. *Journal of Translational Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12967-016-0935-4>

Cánepa, M. J., Ortega, N. M., Monteleone, M. C., Mucci, N., Kaiser, G. G., Brocco, M., & Mutto, A. (2014). Expression profile of genes as indicators

of developmental competence and quality of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *PloS One*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108139>

Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Cimadomo, D., Noli, L., Khalaf, Y., Farcomeni, A., Ilic, D., & Rienzi, L. (2016). MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertility and Sterility*, 105(1), 225-235.e3. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.09.014>

Carreras-Badosa, G., Bonmat, A., Ortega, F. J., Mercader, J. M., Guindo-Martnez, M., Torrents, D., Prats-Puig, A., Martinez-Calcerrada, J. M., De Zegher, F., Ibanez, L., Fernandez-Real, J. M., Lopez-Bermejo, A., & Bassols, J. (2017). Dysregulation of Placental miRNA in Maternal Obesity Is Associated With Pre- and Postnatal Growth. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(7), 2584–2594. <https://doi.org/10.1210/JC.2017-00089>

Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, A. C., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A., & Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology*, 223(2), 217–237. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9767>

Castilla, J. A., De Assín, R. R., Gonzalvo, M. C., Clavero, A., Ramírez, J. P., Vergara, F., & Martínez, L. (2010). External quality control for embryology laboratories. *Reproductive Biomedicine Online*, 20(1), 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2009.09.033>

Castro, F. O., Sharbati, S., Rodríguez-Alvarez, L. L., Cox, J. F., Hultschig, C., & Einspanier, R. (2010). MicroRNA expression profiling of elongated cloned and in vitro-fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 73(1), 71–85. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.08.003>

Cebrian-Serrano, A., Silvestre, M., ... S. R.-... A. T. I., & 2013, undefined. (2013). Effect of sex-sorted sperm on development and quality of in vitro-produced bovine embryos derived from ovum pick up oocytes. *Riunet.Upv.Es*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27646/tesisupv4038.pdf?sequence=1#page=143>

Cerny, K. L., Garrett, E., Walton, A. J., Anderson, L. H., & Bridges, P. J. (2015). A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-015-0077-1>

Cervero, A., Horcajadas, J. A., Domínguez, F., Pellicer, A., & Simón, C. (2005).

Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reproductive Biomedicine Online*, 10(2), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60943-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60943-1)

Chan, H. Y., Moldenhauer, L. M., Groome, H. M., Schjenken, J. E., & Robertson, S. A. (2021). Toll-like receptor-4 null mutation causes fetal loss and fetal growth restriction associated with impaired maternal immune tolerance in mice. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-95213-1>

Chen, C., Zhao, Y., Yu, Y., Li, R., & Qiao, J. (2016). MiR-125b regulates endometrial receptivity by targeting MMP26 in women undergoing IVF-ET with elevated progesterone on HCG priming day. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP25302>

Chen, D., Fan, J., Li, X., Jiao, Z., Tang, G., Guo, X., Chen, H., Wang, J., & Men, T. (2022). Downregulation of miR-485-3p promotes proliferation, migration and invasion in prostate cancer through activation of TGF- β signaling. *Histology and Histopathology*, 37(5), 423–430. <https://doi.org/10.14670/HH-18-416>

Chen, H. R., Juan, H. C., Wong, Y. H., Tsai, J. W., & Fann, M. J. (2017). Cdk12 Regulates Neurogenesis and Late-Arising Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 27(3), 2289–2302. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHW081>

Chen, Y., Zhao, Y., Yin, Y., Jia, X., & Mao, L. (2021). Mechanism of cargo sorting into small extracellular vesicles. *Bioengineered*, 12(1), 8186–8201. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1977767>

Cheong, A. W. Y., Pang, R. T. K., Liu, W. M., Kottawatta, K. S. A., Lee, K. F., & Yeung, W. S. B. (2014). MicroRNA Let-7a and dicer are important in the activation and implantation of delayed implanting mouse embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(4), 750–762. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DET462>

Choi, D., Go, G., Kim, D. K., Lee, J., Park, S. M., Di Vizio, D., & Gho, Y. S. (2020). Quantitative proteomic analysis of trypsin-treated extracellular vesicles to identify the real-vesicular proteins. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1757209>

Choi, Y. H., Gustafson-Seabury, A., Velez, I. C., Hartman, D. L., Bliss, S., Riera, F. L., Roldán, J. E., Chowdhary, B., & Hinrichs, K. (2010). Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 140(6), 893–902. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0141>

- Chu, B., Zhong, L., Dou, S., Wang, J., Li, J., Wang, M., Shi, Q., Mei, Y., & Wu, M. (2015). miRNA-181 regulates embryo implantation in mice through targeting leukemia inhibitory factor. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(1), 12–22. <https://doi.org/10.1093/JMCB/MJV006>
- Cizmar, P., & Yuana, Y. (2017). Detection and Characterization of Extracellular Vesicles by Transmission and Cryo-Transmission Electron Microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1660, 221–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_18/COVER
- Clemente, M., Lopez-Vidriero, I., O'Gaora, P., Mehta, J. P., Forde, N., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2011). Transcriptome Changes at the Initiation of Elongation in the Bovine Conceptus¹. *Biology of Reproduction*, 85(2), 285–295. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091587>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-101512-122326>
- Copp, A. J. (1995). Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends in Genetics: TIG*, 11(3), 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)89008-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)89008-3)
- Corcoran, D., Fair, T., Park, S., Rizos, D., Patel, O. V., Smith, G. W., Coussens, P. M., Ireland, J. J., Boland, M. P., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2006). Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction (Cambridge, England)*, 131(4), 651–660. <https://doi.org/10.1530/REP.1.01015>
- Cordova, A., Perreau, C., Uzbekova, S., Ponsart, C., Locatelli, Y., & Mermillod, P. (2014). Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*, 81(9), 1163–1173. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.01.012>
- Côté, I., Vigneault, C., Laflamme, I., Laquerre, J., Fournier, É., Gilbert, I., Scantland, S., Gagné, D., Blondin, P., & Robert, C. (2011). Comprehensive cross production system assessment of the impact of in vitro microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(1), 99–112. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0477>
- Coy, P., & Yanagimachi, R. (2015). The Common and Species-Specific Roles

of Oviductal Proteins in Mammalian Fertilization and Embryo Development. *BioScience*, 65(10). <https://doi.org/10.1093/biosci/biv119>

Cruz-Santos, M. C., Aragón-Raygoza, A., Espinal-Centeno, A., Arteaga-Vázquez, M., Cruz-Hernández, A., Bako, L., & Cruz-Ramírez, A. (2016). The Role of microRNAs in Animal Cell Reprogramming. *Stem Cells and Development*, 25(14), 1035–1049. <https://doi.org/10.1089/SCD.2015.0359>

Cruz, L., Romero, J. A. A., Iglesia, R. P., & Lopes, M. H. (2018). Extracellular Vesicles: Decoding a New Language for Cellular Communication in Early Embryonic Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(AUG). <https://doi.org/10.3389/FCELL.2018.00094>

Cui, X. S., Zhang, D. X., Ko, Y. G., & Kim, N. H. (2009). Aberrant epigenetic reprogramming of imprinted microRNA-127 and Rtl1 in cloned mouse embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 390–394. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.12.148>

Cui, Y., Xiao, Z., Chen, T., Wei, J., Chen, L., Liu, L., Chen, B., Wang, X., Li, X., & Dai, J. (2014). The miR-7 identified from collagen biomaterial-based three-dimensional cultured cells regulates neural stem cell differentiation. *Stem Cells and Development*, 23(4), 393–405. <https://doi.org/10.1089/SCD.2013.0342>

Cuman, C., Van Sinderen, M., Gantier, M. P., Rainczuk, K., Sorby, K., Rombauts, L., Osianlis, T., & Dimitriadis, E. (2015). Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine*, 2(10), 1528–1535. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2015.09.003>

Cuthbert, J. M., Russell, S. J., White, K. L., & Benninghoff, A. D. (2019). The maternal-to-zygotic transition in bovine in vitro-fertilized embryos is associated with marked changes in small non-coding RNAs†. *Biology of Reproduction*, 100(2), 331–350. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY190>

da Silveira, J. C., Andrade, G. M., Collado, M. del, Sampaio, R. V., Sangalli, J. R., Silva, L. A., Pinaffi, F. V. L., Jardim, I. B., Cesar, M. C., Nogueira, M. F. G., Cesar, A. S. M., Coutinho, L. L., Pereira, R. W., Perecin, F., & Meirelles, F. V. (2017). Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0179451>

Dai, Y., Qiu, Z., Diao, Z., Shen, L., Xue, P., Sun, H., & Hu, Y. (2012). MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of human extravillous

trophoblast derived HTR-8/SVneo cells via down-regulating cyclin D1.
Placenta, 33(10), 824–829.
<https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2012.07.012>

- De Assín, R. R., Clavero, A., Gonzalvo, M. C., Ramírez, J. P., Zamora, S., Fernández, A., Martínez, L., & Castilla, J. A. (2009). Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(6), 824–829. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2009.09.026>
- De Los Santos, M. J., Apter, S., Coticchio, G., Debrock, S., Lundin, K., Plancha, C. E., Prados, F., Rienzi, L., Verheyen, G., Woodward, B., & Vermeulen, N. (2016). Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Human Reproduction (Oxford, England)*, 31(4), 685–686. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEW016>
- De Souza, D. K., De Souza, D. K., Salles, L. P., Salles, L. P., & Rosa E Silva, A. (2015). Aspects of energetic substrate metabolism of *in vitro* and *in vivo* bovine embryos. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(3), 191–197. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143744>
- Degrelle, S. A., Champion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., Renard, J. P., & Hue, I. (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental Biology*, 288(2), 448–460. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2005.09.043>
- Dehghan, Z., Mohammadi-Yeganeh, S., & Salehi, M. (2020). MiRNA-155 regulates cumulus cells function, oocyte maturation, and blastocyst formation. *Biology of Reproduction*, 103(3), 548–559. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAA098>
- Diskin, M. G., Murphy, J. J., & Sreenan, J. M. (2006). Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science*, 96(3–4), 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.008>
- Dissanayake, K., Nõmm, M., Lättekivi, F., Ressaissi, Y., Godakumara, K., Lavrits, A., Midekessa, G., Viil, J., Bæk, R., Jørgensen, M. M., Bhattacharjee, S., Andronowska, A., Salumets, A., Jaakma, Ü., & Fazeli, A. (2020). Individually cultured bovine embryos produce extracellular vesicles that have the potential to be used as non-invasive embryo quality markers. *Theriogenology*, 149, 104–116. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.03.008>
- Do, V. H., Catt, S., Amaya, G., Batsiokis, M., Walton, S., & Taylor-Robinson, A. W. (2018). Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified *in vitro*-derived embryos are transferred into recipients.

Theriogenology, 120, 105–110.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.07.027>

- Donadeu, F. X., Mohammed, B. T., & Ioannidis, J. (2017). A miRNA target network putatively involved in follicular atresia. *Domestic Animal Endocrinology*, 58, 76–83.
<https://doi.org/10.1016/J.DOMANIEND.2016.08.002>
- Dong, X., Sui, C., Huang, K., Wang, L., Hu, D., Xiong, T., Wang, R., & Zhang, H. (2016). MicroRNA-223-3p suppresses leukemia inhibitory factor expression and pinopodes formation during embryo implantation in mice. *American Journal of Translational Research*, 8(2), 1155.
[/pmc/articles/PMC4846958/](https://doi.org/10.1016/J.AJTR.2016.08.002)
- Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Hubel, C. A., Stolz, D. B., Morelli, A. E., & Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular Human Reproduction*, 18(8), 417–424. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAS013>
- Donnay, I., Van Langendonck, A., Auquier, P., Grisart, B., Vansteenbrugge, A., Massip, A., & Dessy, F. (1997). Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*, 47(8), 1549–1561. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00160-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00160-X)
- dos Santos, É. C., de Lima, C. B., Annes, K., & Milazzotto, M. P. (2016). Noninvasive characterization of metabolites secreted in culture media by bovine embryos during in vitro production. *Metabolomics*, 12(5). <https://doi.org/10.1007/S11306-016-1029-2>
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/CELLS8070727>
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P., & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 780–788.
<https://doi.org/10.1016/J.NANO.2011.04.003>
- Driver, A. M., Peñagaricano, F., Huang, W., Ahmad, K. R., Hackbart, K. S., Wiltbank, M. C., & Khatib, H. (2012). RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-118>
- Ealy, A. D., & Wooldridge, L. K. (2017). The evolution of interferon-tau. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(5), F1–F10.

<https://doi.org/10.1530/REP-17-0292>

- Ealy, A. D., Wooldridge, L. K., & McCoski, S. R. (2019). BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *Journal of Animal Science*, *97*(6), 2555–2568. <https://doi.org/10.1093/JAS/SKZ116>
- Eckersley-Maslin, M. A., Alda-Catalinas, C., & Reik, W. (2018). Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(7), 436–450. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0008-Z>
- El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M. A., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2006). Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological Genomics*, *28*(1), 84–96. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00111.2006>
- Enright, B. P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F. A., Yang, X., & Boland, M. P. (2000). Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, *54*(5), 659–673. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00381-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00381-2)
- Estepa, I. M., Tinning, H., Vasconcelos, E. J. R., Fernandez-Fuertes, B., Sánchez, J. M., Burns, G. W., Spencer, T. E., Lonergan, P., & Forde, N. (2020). Protein Synthesis by Day 16 Bovine Conceptuses during the Time of Maternal Recognition of Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS21082870>
- Evsikov, S. V., Vagyna, I. N., & Solomko, A. P. (1996). Mechanisms of cell number regulation in the peri-implantation mouse blastocyst. *The Journal of Experimental Zoology*, *276*(3), 201–208. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097010x\(19961015\)276:3<201::aid-jez4>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097010x(19961015)276:3<201::aid-jez4>3.0.co;2-r)
- Fabiani, R., Johansson, L., Lundkvist, Ö., Ulmsten, U., & Ronquist, G. (1994). Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, *57*(3), 181–188. [https://doi.org/10.1016/0028-2243\(94\)90298-4](https://doi.org/10.1016/0028-2243(94)90298-4)
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D. C., Hyttel, P., Ward, F. A., & Boland, M. P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, *58*(2), 186–195. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200102\)58:2<186::aid-mrd8>3.0.co;2-](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200102)58:2<186::aid-mrd8>3.0.co;2-)

n

- Fang, J., Zhang, T., Liu, Y., Li, Y., Zhou, S., Song, D., Zhao, Y., Feng, R., Zhang, X., Li, L., & Wen, J. (2014). PAX6 downregulates miR-124 expression to promote cell migration during embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells and Development*, 23(19), 2297–2310. <https://doi.org/10.1089/SCD.2013.0410>
- Farin, P. W., Crosier, A. E., & Farin, C. E. (2001). Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 55(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00452-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00452-0)
- Farin, Peter W., Piedrahita, J. A., & Farin, C. E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 65(1), 178–191. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.022>
- Fatima, A., Waters, S., O'Boyle, P., Seoighe, C., & Morris, D. G. (2014). Alterations in hepatic miRNA expression during negative energy balance in postpartum dairy cattle. *BMC Genomics*, 15(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-28>
- Fazeli, A. (2011). Maternal communication with gametes and embryo: a personal opinion. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 46 Suppl 2(SUPPL. 2), 75–78. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2011.01870.X>
- Fazeli, Alireza, & Pewsey, E. (2008). Maternal communication with gametes and embryos: a complex interactome. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 7(2), 111–118. <https://doi.org/10.1093/BFGP/ELN006>
- Feng, R., Sang, Q., Zhu, Y., Fu, W., Liu, M., Xu, Y., Shi, H., Xu, Y., Qu, R., Chai, R., Shao, R., Jin, L., He, L., Sun, X., & Wang, L. (2015). MiRNA-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP08689>
- Fereshteh, Z., Schmidt, S. A., Al-Dossary, A. A., Accerbi, M., Arighi, C., Cowart, J., Song, J. L., Green, P. J., Choi, K., Yoo, S., & Martin-DeLeon, P. A. (2018). Murine Oviductosomes (OVS) microRNA profiling during the estrous cycle: Delivery of OVS-borne microRNAs to sperm where miR-34c-5p localizes at the centrosome. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-34409-4>
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581–611.

<https://doi.org/10.1210/ER.2003-0027>

- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, *14*(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Ferreira, Y. J., Gardiner, C., Poli, M., Turner, K., Child, T., Sargent, I. L., Theofanakis, C., Dinopoulou, V., Mavrogianni, D., Anagnostou, E., Bletsas, R., Kallianidis, K., Loutradis, D., Kiessling, A. A., Azzarello, A., Hoest, T., Mikkelsen, A. L., Ohgi, S., Hagiwara, C., ... Matern, D. (2013). Session 66: Embryo quality: does it predict pregnancy? *Human Reproduction*, *28*(suppl_1), i104–i106. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DET200>
- Fischer-Brown, A. E., Lindsey, B. R., Ireland, F. A., Northey, D. L., Monson, R. L., Clark, S. G., Wheeler, M. B., Kesler, D. J., Lane, S. J., Weigel, K. A., & Rutledge, J. J. (2004). Embryonic disc development and subsequent viability of cattle embryos following culture in two media under two oxygen concentrations. *Reproduction, Fertility, and Development*, *16*(8), 787–793. <https://doi.org/10.1071/RD04026>
- Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, *463*(7280), 485–492. <https://doi.org/10.1038/NATURE08908>
- Forde, N., & Lonergan, P. (2012). Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? *The Journal of Reproduction and Development*, *58*(2), 189–195. <https://doi.org/10.1262/JRD.2011-021>
- Forde, N., Mehta, J. P., McGettigan, P. A., Mamo, S., Bazer, F. W., Spencer, T. E., & Lonergan, P. (2013). Alterations in expression of endometrial genes coding for proteins secreted into the uterine lumen during conceptus elongation in cattle. *BMC Genomics*, *14*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-321>
- Fortunato, O., Boeri, M., Moro, M., Verri, C., Mensah, M., Conte, D., Caleca, L., Roz, L., Pastorino, U., & Sozzi, G. (2014). Mir-660 is downregulated in lung cancer patients and its replacement inhibits lung tumorigenesis by targeting MDM2-p53 interaction. *Cell Death & Disease*, *5*(12), e1564. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2014.507>
- Franasiak, J. M., Forman, E. J., Patounakis, G., Hong, K. H., Werner, M. D., Upham, K. M., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2018). Investigating the impact of the timing of blastulation on implantation: management of embryo-endometrial synchrony improves outcomes. *Human Reproduction Open*, *2018*(4). <https://doi.org/10.1093/HROPEN/HOY022>

- Fryc, K., Nowak, A., Kij, B., Kochan, J., Bartlewski, P. M., & Murawski, M. (2021). Timing of cleavage divisions determined with time-lapse imaging is linked to blastocyst formation rates and quality of in vitro-produced ovine embryos. *Theriogenology*, *159*, 147–152. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.10.031>
- Fulka, H., St. John, J. C., Fulka, J., & Hozák, P. (2008). Chromatin in early mammalian embryos: achieving the pluripotent state. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *76*(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/J.1432-0436.2007.00247.X>
- Garcia-Herreros, M., Carter, T. F., Villagmez, D. A. F., MacAulay, A. D., Rath, D., King, W. A., & Lonergan, P. (2010). Incidence of chromosomal abnormalities in bovine blastocysts derived from unsorted and sex-sorted spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development*, *22*(8), 1272–1278. <https://doi.org/10.1071/RD10052>
- García, E. V., Miceli, D. C., Rizo, G., Valdecantos, P. A., & Barrera, A. D. (2015). Effect of early addition of bone morphogenetic protein 5 (BMP5) to embryo culture medium on in vitro development and expression of developmentally important genes in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, *84*(4), 589–599. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.04.018>
- Gardiner, C., Ferreira, Y. J., Dragovic, R. A., Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2013). Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of Extracellular Vesicles*, *2*(1). <https://doi.org/10.3402/JEV.V2I0.19671>
- Gardner, D. K., & Lane, M. (2005). Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproduction, Fertility, and Development*, *17*(3), 361–370. <https://doi.org/10.1071/RD04103>
- Gardner, D. K., Seli, E., Sakkas, D., & Wells, D. (2013). Human gametes and preimplantation embryos: Assessment and diagnosis. *Human Gametes and Preimplantation Embryos: Assessment and Diagnosis*, 1–306. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6651-2>
- Gardner, D. K., Wale, P. L., Collins, R., & Lane, M. (2011). Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *26*(8), 1981–1986. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DER143>
- Ghaebi, M., Abdolmohammadi-Vahid, S., Ahmadi, M., Eghbal-Fard, S., Dolati, S., Nouri, M., Talebi, M., Hamdi, K., Marofi, F., Aghebati-Maleki, L., Jadidi-

- Niaragh, F., Dopour, M., & Yousefi, M. (2019). T cell Subsets in Peripheral Blood of Women with Recurrent Implantation Failure. *Journal of Reproductive Immunology*, 131, 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2018.11.002>
- Ghanem, N., Salilew-Wondim, D., Gad, A., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., & Hoelker, M. (2011). Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(4), 551–564. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0476>
- Giacomini, E., Vago, R., Sanchez, A. M., Podini, P., Zarovni, N., Murdica, V., Rizzo, R., Bortolotti, D., Candiani, M., & Viganò, P. (2017). Secretome of in vitro cultured human embryos contains extracellular vesicles that are uptaken by the maternal side. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-05549-W>
- Gomez, T., Feyeux, M., Boulant, J., Normand, N., David, L., Paul-Gilloteaux, P., Fréour, T., & Mouchère, H. (2022). A time-lapse embryo dataset for morphokinetic parameter prediction. *Data in Brief*, 42. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2022.108258>
- Goossens, K., Mestdagh, P., Lefever, S., Van Poucke, M., Van Zeveren, A., Van Soom, A., Vandesompele, J., & Peelman, L. (2013). Regulatory microRNA network identification in bovine blastocyst development. *Stem Cells and Development*, 22(13), 1907–1920. <https://doi.org/10.1089/SCD.2012.0708>
- Goovaerts, I. G. F., Leroy, J. L. M. R., Van Soom, A., De Clercq, J. B. P., Andries, S., & Bols, P. E. J. (2009). Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology*, 71(5), 729–738. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.09.038>
- Graf, A., Krebs, S., Zakhartchenko, V., Schwalb, B., Blum, H., & Wolf, E. (2014). Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(11), 4139–4144. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1321569111//DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201321569SI.PDF>
- Grandjean, V., Gounon, P., Wagner, N., Martin, L., Wagner, K. D., Bernex, F., Cuzin, F., & Rassoulzadegan, M. (2009). The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development (Cambridge, England)*, 136(21), 3647–3655.

<https://doi.org/10.1242/DEV.041061>

- Greening, D. W., Nguyen, H. P. T., Elgass, K., Simpson, R. J., & Salamonsen, L. A. (2016). Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. *Biology of Reproduction*, *94*(2). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.115.134890>
- Guignot, F., Perreau, C., Reigner, F., Mermillod, P., & Duchamp, G. (2012). Establishment of pregnancies after transfer of biopsied equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, *32*(7), 402–403. <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2012.05.018>
- Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Fair, T., Moreira, P. N., Pintado, B., De La Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2004). Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, *68*(4), 441–448. <https://doi.org/10.1002/MRD.20113>
- Gutierrez-Adan, A., White, C. R., Van Soom, A., & Mann, M. R. W. (2015). Why we should not select the faster embryo: lessons from mice and cattle. *Reproduction, Fertility, and Development*, *27*(5), 765–775. <https://doi.org/10.1071/RD14216>
- Haaf, T. (2006). Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *310*, 13–22. https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5_2
- Hade, M. D., Suire, C. N., & Suo, Z. (2021). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/CELLS10081959>
- Haeger, J. D., Hambruch, N., & Pfarrer, C. (2016). The bovine placenta in vivo and in vitro. *Theriogenology*, *86*(1), 306–312. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.043>
- Haggarty, P., Wood, M., Ferguson, E., Hoad, G., Srikantharajah, A., Milne, E., Hamilton, M., & Bhattacharya, S. (2006). Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *21*(3), 766–773. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEI385>
- Halstead, M. M., Ma, X., Zhou, C., Schultz, R. M., & Ross, P. J. (2020). Chromatin remodeling in bovine embryos indicates species-specific regulation of genome activation. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-18508-3>

- Hamdi, M., Cañon-Beltrán, K., Mazzarella, R., Cajas, Y. N., Leal, C. L. V., Gutierrez-Adan, A., González, E. M., Da Silveira, J. C., & Rizos, D. (2021). Characterization and profiling analysis of bovine oviduct and uterine extracellular vesicles and their miRNA cargo through the estrous cycle. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(12). <https://doi.org/10.1096/FJ.202101023R>
- Hamdi, M., Lopera-Vasquez, R., Mailló, V., Sanchez-Calabuig, M. J., Núñez, C., Gutierrez-Adan, A., & Rizos, D. (2018). Bovine oviductal and uterine fluid support in vitro embryo development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 30(7), 935–945. <https://doi.org/10.1071/RD17286>
- Hamdi, M., Sánchez-Calabuig, M. J., Rodríguez-Alonso, B., Arnal, S. B., Roussi, K., Sturmey, R., Gutiérrez-Adán, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2019). Gene expression and metabolic response of bovine oviduct epithelial cells to the early embryo. *Reproduction (Cambridge, England)*, 158(1), 85–94. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0561>
- Hansen, P. J. (2014). Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 752, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3_1
- Hansen, P. J., & Tríbulo, P. (2019). Regulation of present and future development by maternal regulatory signals acting on the embryo during the morula to blastocyst transition - insights from the cow. *Biology of Reproduction*, 101(3), 526–537. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOZ030>
- Harris, E. A., Stephens, K. K., & Winuthayanon, W. (2020). Extracellular Vesicles and the Oviduct Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–20. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218280>
- Hasan, M. M., Reshi, Q. U. A., Lättekivi, F., Viil, J., Godakumara, K., Dissanayake, K., Andronowska, A., Jaakma, Ü., & Fazeli, A. (2021). Bovine follicular fluid derived extracellular vesicles modulate the viability, capacitation and acrosome reaction of bull spermatozoa. *Biology*, 10(11), 1154. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10111154/S1>
- Hashizume, K., Ushizawa, K., Patel, O. V., Kizaki, K., Imai, K., Yamada, O., Nakano, H., & Takahashi, T. (2007). Gene expression and maintenance of pregnancy in bovine: roles of trophoblastic binucleate cell-specific molecules. *Reproduction, Fertility, and Development*, 19(1), 79–90. <https://doi.org/10.1071/RD06118>
- Hasler, J. F., Cardey, E., Stokes, J. E., & Bredbacka, P. (2002). Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial

environment. *Theriogenology*, 58(8), 1457–1469.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01044-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01044-0)

Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., McCauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E., & Trimmer, S. A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43(1), 141–152.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)00020-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)00020-U)

Hasler, John F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152–169.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.09.010>

Hauser, P., Wang, S., & Didenko, V. V. (2017). Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1554, 193–200. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9_12

Havlicek, V., Kuzmany, A., Cseh, S., Brem, G., & Besenfelder, U. (2010). The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 45(5), 832–837.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2009.01364.X>

He, T., Chen, P., Jin, L., Hu, J., Li, Y., Zhou, L., Yang, S., Mao, X., Gui, Y., Chen, Y., & Lai, Y. (2018). MiR-660-5p is associated with cell migration, invasion, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 17(1), 2051–2060.
<https://doi.org/10.3892/MMR.2017.8052/HTML>

Heras, S., De Coninck, D. I. M., Van Poucke, M., Goossens, K., Bogado Pascottini, O., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., De Sutter, P., Leroy, J. L. M. R., Gutierrez-Adan, A., Peelman, L., & Van Soom, A. (2016). Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. *BMC Genomics*, 17(1).
<https://doi.org/10.1186/S12864-016-2393-Z>

Hernández-Vargas, P., Muñoz, M., & Domínguez, F. (2020). Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-OMICs to improve reproductive outcomes. *Human Reproduction Update*, 26(2), 264–301. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMZ042>

Herrera, C., Morikawa, M. I., Bello, M. B., Von Meyeren, M., Eusebio Centeno, J., Dufourq, P., Martinez, M. M., & Llorente, J. (2014). Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*, 81(5), 758–763.

<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.12.013>

- Hinton, A., Afrikanova, I., Wilson, M., King, C. C., Maurer, B., Yeo, G. W., Hayek, A., & Pasquinelli, A. E. (2010). A distinct microRNA signature for definitive endoderm derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 19(6), 797–807. <https://doi.org/10.1089/SCD.2009.0224>
- Ho, J. R., Arrach, N., Rhodes-Long, K., Salem, W., McGinnis, L. K., Chung, K., Bendikson, K. A., Paulson, R. J., & Ahmady, A. (2018). Blastulation timing is associated with differential mitochondrial content in euploid embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(4), 711–720. <https://doi.org/10.1007/S10815-018-1113-9>
- Hoelker, M., Held, E., Salilew-Wondim, D., Schellander, K., Tesfaye, D., Hoelker, M., Held, E., Salilew-Wondim, D., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2014). Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 22–36. <https://doi.org/10.1071/RD13255>
- Holm, P., Booth, P. J., & Callesen, H. (2002). Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction (Cambridge, England)*, 123(4), 553–565. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230553>
- Holm, P., Shukri, N. N., Vajta, G., Booth, P., Bendixen, C., & Callesen, H. (1999). Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology*, 50(8), 1285–1299. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00227-1)
- Homer, H., Rice, G. E., & Salomon, C. (2017). Review: Embryo- and endometrium-derived exosomes and their potential role in assisted reproductive treatments-liquid biopsies for endometrial receptivity. *Placenta*, 54, 89–94. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2016.12.011>
- Hosseini, S. M., Dufort, I., Caballero, J., Moulavi, F., Ghanaei, H. R., & Sirard, M. A. (2015). Transcriptome profiling of bovine inner cell mass and trophectoderm derived from in vivo generated blastocysts. *BMC Developmental Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12861-015-0096-3>
- Hu, Q., Su, H., Li, J., Lyon, C., Tang, W., Wan, M., & Hu, T. Y. (2020). Clinical applications of exosome membrane proteins. *Precision Clinical Medicine*, 3(1), 54–66. <https://doi.org/10.1093/PCMEDI/PBAA007>

- Huang, A., Isobe, N., & Yoshimura, Y. (2017). Changes in localization and density of CD63-positive exosome-like substances in the hen oviduct with artificial insemination and their effect on sperm viability. *Theriogenology*, *101*, 135–143. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.06.028>
- Hue, I., Renard, J.-P., Viebahn, C., Hue, I., Renard, J.-P., & Viebahn, C. (2001). Brachyury is expressed in gastrulating bovine embryos well ahead of implantation. *Development Genes and Evolution* *2001* *211*:3, 211(3), 157–159. <https://doi.org/10.1007/S004270100138>
- Imakawa, K., Bai, R., Nakamura, K., & Kusama, K. (2017). Thirty years of interferon-tau research; Past, present and future perspective. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, *88*(7), 927–936. <https://doi.org/10.1111/ASJ.12807>
- Imakawa, K., Matsuno, Y., & Fujiwara, H. (2022). New Roles for EVs, miRNA and lncRNA in Bovine Embryo Implantation. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 944370. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.944370>
- Ioannidis, J., & Donadeu, F. X. (2016). Circulating miRNA signatures of early pregnancy in cattle. *BMC Genomics*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-016-2529-1>
- Ioannidis, J., & Donadeu, F. X. (2017). Changes in circulating microRNA levels can be identified as early as day 8 of pregnancy in cattle. *PloS One*, *12*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174892>
- Isom, S. C., Li, R. F., Whitworth, K. M., & Prather, R. S. (2012). Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, *79*(3), 197–207. <https://doi.org/10.1002/MRD.22013>
- Ispada, J., De Lima, C. B., Sirard, M. A., Fontes, P. K., Nogueira, M. F. G., Annes, K., & Milazzotto, M. P. (2018). Genome-wide screening of DNA methylation in bovine blastocysts with different kinetics of development. *Epigenetics & Chromatin*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/S13072-017-0171-Z>
- Ito, M., Sferruzzi-Perri, A. N., Edwards, C. A., Adalsteinsson, B. T., Allen, S. E., Loo, T. H., Kitazawa, M., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F., Stewart, C. L., & Ferguson-Smith, A. C. (2015). A trans-homologue interaction between reciprocally imprinted miR-127 and Rtl1 regulates placenta development. *Development (Cambridge, England)*, *142*(14), 2425–2430.

<https://doi.org/10.1242/DEV.121996>

- Jankovičová, J., Sečová, P., Michalková, K., & Antalíková, J. (2020). Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–30. <https://doi.org/10.3390/IJMS21207568>
- Jia, C. Y., Xiang, W., Liu, J. Bin, Jiang, G. X., Sun, F., Wu, J. J., Yang, X. L., Xin, R., Shi, Y., Zhang, D. D., Li, W., Zuberi, Z., Zhang, J., Lu, G. X., Wang, H. M., Wang, P. Y., Yu, F., Lv, Z. W., Ma, Y. S., & Fu, D. (2021). MiR-9-1 Suppresses Cell Proliferation and Promotes Apoptosis by Targeting UHRF1 in Lung Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1177/15330338211041191>
- Jiang, K., Zhi, T., Xu, W., Xu, X., Wu, W., Yu, T., Nie, E., Zhou, X., Bao, Z., Jin, X., Zhang, J., Wang, Y., & Liu, N. (2017b). MicroRNA-1468-5p inhibits glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by targeting RRM1. *American Journal of Cancer Research*, 7(4), 784–800. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28469953/>
- Jiang, L., Paone, S., Caruso, S., Atkin-Smith, G. K., Phan, T. K., Hulett, M. D., & Poon, I. K. H. (2017a). Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-14305-Z>
- Jiang, Z., Lin, J., Dong, H., Zheng, X., Marjani, S. L., Duan, J., Ouyang, Z., Chen, J., & Tian, X. (2018). DNA methylomes of bovine gametes and in vivo produced preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, 99(5), 949–959. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY138>
- Jiao, S., Liu, Y., Yao, Y., & Teng, J. (2017). miR-124 promotes proliferation and differentiation of neuronal stem cells through inactivating Notch pathway. *Cell & Bioscience*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/S13578-017-0194-Y>
- Jiao, Y., Zhu, G., Yu, J., Li, Y., Wu, M., Zhao, J., & Tian, X. (2019). miR-1271 inhibits growth, invasion and epithelial–mesenchymal transition by targeting ZEB1 in ovarian cancer cells. *Oncotargets and Therapy*, 12, 6973–6980. <https://doi.org/10.2147/OTT.S219018>
- Juan, H. C., Lin, Y., Chen, H. R., & Fann, M. J. (2016). Cdk12 is essential for embryonic development and the maintenance of genomic stability. *Cell Death and Differentiation*, 23(6), 1038–1048. <https://doi.org/10.1038/CDD.2015.157>
- Juriscicova, A., Casper, R. F., Maclusky, N. J., Mills, G. B., & Librach, C. L.

- (1996). HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 161–165. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.161>
- Kaith, S., Saini, M., Raja, A. K., Sahare, A. A., Jyotsana, B., Madheshiya, P., Palta, P., Chauhan, M. S., Manik, R. S., & Singla, S. K. (2015). Early cleavage of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos is an indicator of their developmental competence and quality. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 50(2), 214–220. <https://doi.org/10.1111/RDA.12472>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1208–1215. <https://doi.org/10.1172/JCI81135>
- Kang, T., Atukorala, I., & Mathivanan, S. (2021). Biogenesis of Extracellular Vesicles. *Subcellular Biochemistry*, 97, 19–43. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67171-6_2/FIGURES/2
- Kaňka, J., Kepková, K., & Němcová, L. (2009). Gene expression during minor genome activation in preimplantation bovine development. *Theriogenology*, 72(4), 572–583. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.04.014>
- Karagkouni, D., Karavangeli, A., Paraskevopoulou, M. D., & Hatzigeorgiou, A. G. (2021). Characterizing miRNA-lncRNA Interplay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2372, 243–262. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1697-0_21
- Kastelowitz, N., & Yin, H. (2014). Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle size and lipid chemical probes. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 15(7), 923–928. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201400043>
- Katz-Jaffe, M. G., & McReynolds, S. (2013). Embryology in the era of proteomics. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1073–1077. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.12.038>
- Keefer, C. L., Pant, D., Blomberg, L., & Talbot, N. C. (2007). Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. *Animal Reproduction Science*, 98(1–2), 147–168. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2006.10.009>
- Kim, J. H., Niwa, K., Lim, J. M., & Okuda, K. (1993). Effects of Phosphate, Energy Substrates, and Amino Acids on Development of in Vitro-Matured,

in Vitro-Fertilized Bovine Oocytes in a Chemically Defined, Protein-Free Culture Medium. *Biology of Reproduction*, 48(6), 1320–1325. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD48.6.1320>

Kim, K. H., Seo, Y. M., Kim, E. Y., Lee, S. Y., Kwon, J., Ko, J. J., & Lee, K. A. (2016). The miR-125 family is an important regulator of the expression and maintenance of maternal effect genes during preimplantational embryo development. *Open Biology*, 6(11). <https://doi.org/10.1098/RSOB.160181>

Kimura, K., & Matsuyama, S. (2014). Successful nonsurgical transfer of bovine elongating conceptuses and its application to sexing. *The Journal of Reproduction and Development*, 60(3), 210–215. <https://doi.org/10.1262/JRD.2013-137>

Kirkegaard, K., Svane, A. S. P., Nielsen, J. S., Hindkjær, J. J., Nielsen, N. C., & Ingerslev, H. J. (2014). Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of Day 3 and 5 embryo culture medium does not predict pregnancy outcome in good prognosis patients: a prospective cohort study on single transferred embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(11), 2413–2420. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEU236>

Kirkegaard, Kirstine, Ahlström, A., Ingerslev, H. J., & Hardarson, T. (2015). Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertility and Sterility*, 103(2), 323–332. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2014.11.003>

Klein, C. (2015). Pregnancy Recognition and Implantation of the Conceptus in the Mare. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 216, 165–188. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3_9

Klohonatz, K. M., Cameron, A. D., Hergenreder, J. R., da Silveira, J. C., Belk, A. D., Veeramachaneni, D. N. R., Bouma, G. J., & Bruemmer, J. E. (2016). Circulating miRNAs as Potential Alternative Cell Signaling Associated with Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare. *Biology of Reproduction*, 95(6), 1–12. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.116.142935>

Kovacs, P. (2014). Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-124>

Krawczynski, K., Bauersachs, S., Reliszko, Z. P., Graf, A., & Kaczmarek, M. M. (2015). Expression of microRNAs and isomiRs in the porcine endometrium: implications for gene regulation at the maternal-conceptus interface. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S12864-015-2172-2>

- Krawczynski, K., Najmala, J., Bauersachs, S., & Kaczmarek, M. M. (2015). MicroRNAome of porcine conceptuses and trophoblasts: expression profile of micrornas and their potential to regulate genes crucial for establishment of pregnancy. *Biology of Reproduction*, 92(1). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.114.123588>
- Kresowik, J. D. K., Devor, E. J., Van Voorhis, B. J., & Leslie, K. K. (2014). MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: a potential biomarker for optimum receptivity. *Biology of Reproduction*, 91(1). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.116590>
- Kropp, J., & Khatib, H. (2015). Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6552–6563. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-9510>
- Kropp, J., Salih, S. M., & Khatib, H. (2014). Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Frontiers in Genetics*, 5(APR). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2014.00091>
- Kuijk, E. W., Du Puy, L., Van Tol, H. T. A., Oei, C. H. Y., Haagsman, H. P., Colenbrander, B., & Roelen, B. A. J. (2008). Differences in early lineage segregation between mammals. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 237(4), 918–927. <https://doi.org/10.1002/DVDY.21480>
- Kurosaka, S., Eckardt, S., & McLaughlin, K. J. (2004). Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. *Biology of Reproduction*, 71(5), 1578–1582. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.104.029322>
- Kusama, K., Nakamura, K., Bai, R., Nagaoka, K., Sakurai, T., & Imakawa, K. (2018). Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 1370–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.176>
- Kushnir, V. A., Barad, D. H., Albertini, D. F., Darmon, S. K., & Gleicher, N. (2017). Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004-2013. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-016-0225-2>
- Kyogoku, H., Wakayama, T., Kitajima, T. S., & Miyano, T. (2018). Single nucleolus precursor body formation in the pronucleus of mouse zygotes and SCNT embryos. *PloS One*, 13(8).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0202663>

- Lane, M., & Gardner, D. K. (1997). Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Fertility*, *109*(1), 153–164. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1090153>
- Lange-Consiglio, A., Lazzari, B., Pizzi, F., Idda, A., Cremonesi, F., & Capra, E. (2020). Amniotic microvesicles impact hatching and pregnancy percentages of in vitro bovine embryos and blastocyst microRNA expression versus in vivo controls. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-57060-Z>
- Lange-Consiglio, A., Perrini, C., Albini, G., Modena, S., Lodde, V., Orsini, E., Esposti, P., & Cremonesi, F. (2017). Oviductal microvesicles and their effect on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction (Cambridge, England)*, *154*(2), 167–180. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0117>
- Latham, Keith, E. (2001). Embryonic genome activation. *Frontiers in Bioscience*, *6*(1), d748. <https://doi.org/10.2741/latham>
- Latifkar, A., Hur, Y. H., Sanchez, J. C., Cerione, R. A., & Antonyak, M. A. (2019). New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *Journal of Cell Science*, *132*(13). <https://doi.org/10.1242/JCS.222406>
- Lee, J. Y., Ahn, E. H., Kim, J. O., Park, H. S., Ryu, C. S., Kim, J. H., Kim, Y. R., Lee, W. S., & Kim, N. K. (2019). Associations between microRNA (miR-25, miR-32, miR-125, and miR-222) polymorphisms and recurrent implantation failure in Korean women. *Human Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/S40246-019-0246-Y>
- Lee, Y. M., Chen, H. W., Maurya, P. K., Su, C. M., & Tzeng, C. R. (2012). MicroRNA regulation via DNA methylation during the morula to blastocyst transition in mice. *Molecular Human Reproduction*, *18*(4), 184–193. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAR072>
- Leibo, S. P., & Loskutoff, N. M. (1993). Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, *39*(1), 81–94. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90025-Z](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90025-Z)
- Leroy, J. L.M.R., Opsomer, G., De Vliegher, S., Vanholder, T., Goossens, L., Geldhof, A., Bols, P. E. J., De Kruif, A., & Van Soom, A. (2005). Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, *64*(9), 2022–2036. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.05.003>
- Leroy, Jo L.M.R., Valckx, S. D. M., Jordaens, L., De Bie, J., Desmet, K. L. J.,

- Van Hoeck, V., Britt, J. H., Marei, W. F., & Bols, P. E. J. (2015). Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality: critical views on what we learned from the dairy cow model. *Reproduction, Fertility, and Development*, 27(4), 693–703. <https://doi.org/10.1071/RD14363>
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews. Genetics*, 3(9), 662–673. <https://doi.org/10.1038/NRG887>
- Li, Q., Liu, W., Chiu, P. C. N., & Yeung, W. S. B. (2020). Mir-let-7a/g Enhances Uterine Receptivity via Suppressing Wnt/ β -Catenin Under the Modulation of Ovarian Hormones. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 27(5), 1164–1174. <https://doi.org/10.1007/S43032-019-00115-3>
- Li, Z., Jia, J., Gou, J., Zhao, X., & Yi, T. (2015). MicroRNA-451 plays a role in murine embryo implantation through targeting Ankrd46, as implicated by a microarray-based analysis. *Fertility and Sterility*, 103(3), 834-844.e4. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2014.11.024>
- Liang, J., Wang, S., & Wang, Z. (2017). Role of microRNAs in embryo implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-017-0309-7>
- Lim, K. T., Gupta, M. K., Lee, S. H., Jung, Y. H., Han, D. W., & Lee, H. T. (2013). Possible involvement of Wnt/ β -catenin signaling pathway in hatching and trophectoderm differentiation of pig blastocysts. *Theriogenology*, 79(2). <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.08.018>
- Lin, Xia, Wang, R., Li, R., Tao, T., Zhang, D., & Qi, Y. (2022). Diagnostic Performance of miR-485-3p in Patients with Parkinson's Disease and its Relationship with Neuroinflammation. *Neuromolecular Medicine*, 24(2), 195–201. <https://doi.org/10.1007/S12017-021-08676-W>
- Lin, Xiaoyuan, Beckers, E., Cafferty, S. M., Gansemans, Y., Szymańska, K. J., Pavani, K. C., Catani, J. P., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., De Sutter, P., Van Soom, A., & Peelman, L. (2019). Bovine Embryo-Secreted microRNA-30c Is a Potential Non-invasive Biomarker for Hampered Preimplantation Developmental Competence. *Frontiers in Genetics*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00315>
- Lingenfelter, B. M., Tripurani, S. K., Tejomurtula, J., Smith, G. W., & Yao, J. (2011). Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 9. <https://doi.org/10.1186/1477-7827->

- Liu, A., Jin, M., Xie, L., Jing, M., Zhou, Y., Tang, M., Lin, T., & Wang, D. (2021). Loss of miR-29a impairs decidualization of endometrial stromal cells by TET3 mediated demethylation of Col1A1 promoter. *IScience*, 24(9). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.103065>
- Liu, W. M., Pang, R. T. K., Cheong, A. W. Y., Ng, E. H. Y., Lao, K., Lee, K. F., & Yeung, W. S. B. (2012a). Involvement of microRNA lethal-7a in the regulation of embryo implantation in mice. *PloS One*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037039>
- Liu, W. M., Pang, R. T. K., Chiu, P. C. N., Wong, B. P. C., Lao, K., Lee, K. F., & Yeung, W. S. B. (2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 490–494. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1110368109>
- Liu, X., Gao, R., Chen, X., Zhang, H., Zheng, A., Yang, D., Ding, Y., Wang, Y., & He, J. (2013). Possible roles of mmu-miR-141 in the endometrium of mice in early pregnancy following embryo implantation. *PloS One*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0067382>
- Lloyd, R. E., Romar, R., Matás, C., Gutiérrez-Adán, A., Holt, W. V., & Coy, P. (2009). Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 137(4), 679–687. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0405>
- Lo Cicero, A., Stahl, P. D., & Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Current Opinion in Cell Biology*, 35, 69–77. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2015.04.013>
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, 69(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.09.007>
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., & Boland, M. P. (2003). Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 38(4), 259–267. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0531.2003.00437.X>
- Lonergan, Pat, Fair, T., Forde, N., & Rizos, D. (2016). Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 86(1), 270–277. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.040>

- Loneragan, Patrick, Rizos, D., Ward, F., & Boland, M. P. (2001). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 41(5), 427–437. <https://doi.org/10.1051/RND:2001142>
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltran-Brena, P., Calle, A., Redruello, A., Lopez-Martin, S., Gutierrez-Adan, A., Yanez-Mo, M., Ramirez, M. A., & Rizos, D. (2016). Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0148083>
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., Angel Ramirez, M., Yanez-Mo, M., & Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 153(4), 461–470. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0384>
- López-Gatius, F., Garbayo, J. M., Santolaria, P., Yániz, J. L., Almería, S., Ayad, A., de Sousa, N. M., & Beckers, J. F. (2007). Plasma pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) concentrations during gestation in Neospora-infected dairy cows. *Theriogenology*, 67(3), 502–508. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.08.014>
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Vizio, D. Di, Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). <https://doi.org/10.3402/JEV.V3.26913>
- Lu, J.-C. (2022). *Expression and significance of miR-155 during embryo implantation*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1346128/v1>
- Luo, L., Ye, G., Nadeem, L., Fu, G., Yang, B. B., Honarparvar, E., Dunk, C., Lye, S., & Peng, C. (2012). MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 13), 3124–3132. <https://doi.org/10.1242/JCS.096412>
- Luo, S. S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Takeshita, T., & Takizawa, T. (2009). Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biology of Reproduction*, 81(4), 717–729. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.108.075481>
- Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M. G., & Griffiths, G. M. (2014).

The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9).
<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A016840>

- Lyu, G., Guan, Y., Zhang, C., Zong, L., Sun, L., Huang, X., Huang, L., Zhang, L., Tian, X. L., Zhou, Z., & Tao, W. (2018). TGF- β signaling alters H4K20me3 status via miR-29 and contributes to cellular senescence and cardiac aging. *Nature Communications*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/S41467-018-04994-Z>
- Ma, H., Yu, L., Zhao, Z. A., Lu, X., Yu, Y., Zhang, X., Wang, Q., & Li, L. (2016). MicroRNA-127 Promotes Mesendoderm Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells by Targeting Left-Right Determination Factor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(23), 12126–12135.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M116.723247>
- Ma, L., Zhang, M., Cao, F., Han, J., Han, P., Wu, Y., Deng, R., Zhang, G., An, X., Zhang, L., Song, Y., & Cao, B. (2022). Effect of MiR-100-5p on proliferation and apoptosis of goat endometrial stromal cell in vitro and embryo implantation in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(9), 2543–2556. <https://doi.org/10.1111/JCMM.17226>
- Machado, G. M., Ferreira, A. R., Pivato, I., Fidelis, A., Spricigo, J. F., Paulini, F., Lucci, C. M., Franco, M. M., & Dode, M. A. (2013). Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 80(11), 936–947.
<https://doi.org/10.1002/MRD.22230>
- Machtinger, R., Baccarelli, A. A., & Wu, H. (2021). Extracellular vesicles and female reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(3), 549–557. <https://doi.org/10.1007/S10815-020-02048-2>
- Machtinger, R., Laurent, L. C., & Baccarelli, A. A. (2016). Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, 22(2), 182–193.
<https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMV055>
- Macleay, J. A., Chakrabarty, A., Xie, S., Bixby, J. A., Roberts, R. M., & Green, J. A. (2003). Family of kunitz proteins from trophoblast: Expression of the trophoblast Kunitz domain proteins (TKDP) in cattle and sheep. *Molecular Reproduction and Development*, 65(1), 30–40.
<https://doi.org/10.1002/MRD.10262>
- Maddox-Hyttel, P., Alexopoulos, N. I., Vajta, G., Lewis, I., Rogers, P., Cann, L., Callesen, H., Tveden-Nyborg, P., & Trounson, A. (2003). Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial

post-hatching development of bovine embryos. In *Reproduction* (Vol. 125, Issue 4, pp. 607–623). <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250607>

Maillo, V., Rizos, D., Besenfelder, U., Havlicek, V., Kelly, A. K., Garrett, M., & Lonergan, P. (2012). Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 3865–3876. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-5270>

Maillo, Veronica, Gaora, P., Forde, N., Besenfelder, U., Havlicek, V., Burns, G. W., Spencer, T. E., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2015). Oviduct-Embryo Interactions in Cattle: Two-Way Traffic or a One-Way Street? *Biology of Reproduction*, *92*(6). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.115.127969>

Maillo, Veronica, Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2016). Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from in vivo and in vitro studies. *Theriogenology*, *86*(1), 443–450. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.060>

Mains, L. M., Christenson, L., Yang, B., Sparks, A. E. T., Mathur, S., & Van Voorhis, B. J. (2011). Identification of apolipoprotein A1 in the human embryonic secretome. *Fertility and Sterility*, *96*(2). <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2011.05.049>

Malpotra, S., Goel, P., Shyam, S., Singh, M. K., & Palta, P. (2022). Global DNA methylation profiles of buffalo (*Bubalus bubalis*) preimplantation embryos produced by handmade cloning and in vitro fertilization. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-09207-8>

Malvern Instruments. (2015). *Manual: NanoSight NS300 user manual MAN0516* (Issue September). www.malvern.com

Mamo, S., Rizos, D., & Lonergan, P. (2012). Transcriptomic changes in the bovine conceptus between the blastocyst stage and initiation of implantation. *Animal Reproduction Science*, *134*(1–2), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.011>

Mansouri-Attia, N., Sandra, O., Aubert, J., Degrelle, S., Everts, R. E., Giraud-Delville, C., Heyman, Y., Galio, L., Hue, I., Yang, X., Tian, X. C., Lewin, H. A., & Renard, J. P. (2009). Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(14), 5687–5692. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0812722106>

Marin, D., & Scott, R. T. (2018). Extracellular vesicles: a promising tool for

assessment of embryonic competence. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 30(3), 171–178.
<https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000458>

Martin-DeLeon, P. A. (2016). Uterosomes: Exosomal cargo during the estrus cycle and interaction with sperm. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 8(1), 115–122. <https://doi.org/10.2741/S451>

Mathew, D. J., Peterson, K. D., Senn, L. K., Oliver, M. A., & Ealy, A. D. (2022). Ruminant conceptus-maternal interactions: interferon-tau and beyond. *Journal of Animal Science*, 100(7). <https://doi.org/10.1093/JAS/SKAC123>

Mathew, D. J., Sánchez, J. M., Passaro, C., Charpigny, G., Behura, S. K., Spencer, T. E., & Lonergan, P. (2019). Interferon tau-dependent and independent effects of the bovine conceptus on the endometrial transcriptome†. *Biology of Reproduction*, 100(2), 365–380. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOY199>

Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907–1920. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2010.06.006>

Maurel, M., Jalvy, S., Ladeiro, Y., Combe, C., Vachet, L., Saggiocco, F., Bioulac-Sage, P., Pitard, V., Jacquemin-Sablon, H., Zucman-Rossi, J., Laloo, B., & Grosset, C. F. (2013). A functional screening identifies five micrnas controlling glypican-3: role of mir-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 57(1), 195–204. <https://doi.org/10.1002/HEP.25994>

Mazzarella, R., Bastos, N. M., Bridi, A., del Collado, M., Andrade, G. M., Pinzon, J., Prado, C. M., Silva, L. A., Meirelles, F. V., Pugliesi, G., Perecin, F., & da Silveira, J. C. (2021). Changes in Oviductal Cells and Small Extracellular Vesicles miRNAs in Pregnant Cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.639752>

McMillan, W. H. (1998). Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. *Theriogenology*, 50(7), 1053–1070. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00207-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00207-6)

McRae, C., Sharma, V., & Fisher, J. (2013). Metabolite Profiling in the Pursuit of Biomarkers for IVF Outcome: The Case for Metabolomics Studies. *International Journal of Reproductive Medicine*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/603167>

Meirelles, F. V., Caetano, A. R., Watanabe, Y. F., Ripamonte, P., Carambula,

- S. F., Merighe, G. K., & Garcia, S. M. (2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 13–20. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.05.012>
- Mellisho, E. A., Briones, M. A., Velásquez, A. E., Cabezas, J., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2019). Extracellular vesicles secreted during blastulation show viability of bovine embryos. *Reproduction (Cambridge, England)*, 158(6), 477–492. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0233>
- Mellisho, E. A., Velásquez, A. E., Nuñez, M. J., Cabezas, J. G., Cueto, J. A., Fader, C., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2017). Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. *PloS One*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0178306>
- Melo-Báez, B., Mellisho, E. A., Cabezas, J., Velásquez, A. E., Veraguas, D., Escobar, D. A. C., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2021). Nanoparticles from culture media are internalized by in vitro-produced bovine embryos and its depletion affect expression of pluripotency genes. *Animal Reproduction*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0028>
- Melo-Báez, B., Mellisho, E. A., Wong, Y. S., Cabezas, J., Caamaño, D., Aguilera, C., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodriguez-Alvarez, L. (2023). Bovine embryos release extracellular vesicles with differential miRNA signature during the compaction and blastulation stages. *Reproductive Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2022.100725>
- Melo-Baez, B., Wong, Y. S., Aguilera, C. J., Cabezas, J., Mançanares, A. C. F., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodriguez-Alvarez, L. (2020). MicroRNAs from Extracellular Vesicles Secreted by Bovine Embryos as Early Biomarkers of Developmental Competence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–17. <https://doi.org/10.3390/IJMS21238888>
- Melton, C., Judson, R. L., & Blelloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 463(7281), 621–626. <https://doi.org/10.1038/NATURE08725>
- Merton, J. S., De Roos, A. P. W., Mullaart, E., De Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. A. M., & Dieleman, S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2), 651–674. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-3)
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remoh, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo

implantation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(10), 2658–2671. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DER256>

Mierzejewski, B., Michalska, Z., Jackowski, D., Streminska, W., Janczyk-Ilach, K., Koblowska, M., Iwanicka-Nowicka, R., Gromadka, A., Ciemerych, M. A., & Brzoska, E. (2022). The miR151 and miR5100 Transfected Bone Marrow Stromal Cells Increase Myoblast Fusion in IGFBP2 Dependent Manner. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(6), 2164–2178. <https://doi.org/10.1007/S12015-022-10350-Y>

Miles, J. R., Farin, C. E., Rodriguez, K. F., Alexander, J. E., & Farin, P. W. (2004). Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction*, 71(6), 1919–1926. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.104.031427>

Miles, J. R., Farin, C. E., Rodriguez, K. F., Alexander, J. E., & Farin, P. W. (2005). Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. *Biology of Reproduction*, 73(4), 663–671. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.105.040808>

Milewski, R., & Ajduk, A. (2017). Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(2), R37–R53. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0004>

Milewski, R., Szpila, M., & Ajduk, A. (2018). Dynamics of cytoplasm and cleavage divisions correlates with preimplantation embryo development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 155(1), 1–14. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0230>

Minasi, M. G., Greco, P., Varricchio, M. T., Barillari, P., & Greco, E. (2020). The clinical use of time-lapse in human-assisted reproduction. *Therapeutic Advances in Reproductive Health*, 14, 263349412097692. <https://doi.org/10.1177/2633494120976921>

Mineno, J., Okamoto, S., Ando, T., Sato, M., Chono, H., Izu, H., Takayama, M., Asada, K., Mirochnitchenko, O., Inouye, M., & Kato, I. (2006). The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Research*, 34(6), 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL096>

Miretti, S., Lecchi, C., Ceciliani, F., & Baratta, M. (2020). MicroRNAs as Biomarkers for Animal Health and Welfare in Livestock. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 578193. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.578193/FULL>

Miura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Higashijima, A., Kinoshita, A., Yoshiura, K. I., & Masuzaki, H. (2010). Identification of pregnancy-associated

- microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1767–1771. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2010.147660>
- Moore, K., & Thatcher, W. W. (2006). Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1254–1266. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72194-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72194-4)
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13138>
- Morotti, F., Sanches, B. V., Pontes, J. H. F., Basso, A. C., Siqueira, E. R., Lisboa, L. A., & Seneda, M. M. (2014). Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, 81(5), 696–701. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.12.002>
- Motato, Y., de los Santos, M. J., Escriba, M. J., Ruiz, B. A., Remohí, J., & Meseguer, M. (2016). Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertility and Sterility*, 105(2), 376-384.e9. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.11.001>
- Nagano, M. (2019). Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, 65(3), 195. <https://doi.org/10.1262/JRD.2019-022>
- Nakamura, K., Kusama, K., Bai, R., Sakurai, T., Isuzugawa, K., Godkin, J. D., Suda, Y., & Imakawa, K. (2016). Induction of IFNT-stimulated genes by conceptus-derived exosomes during the attachment period. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158278>
- Nakamura, K., Kusama, K., Ideta, A., Kimura, K., Hori, M., & Imakawa, K. (2019). Effects of miR-98 in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune regulation during the peri-implantation period in cattle. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56879-w>
- Nakano, H., Takahashi, T., Imai, K., & Hashizume, K. (2001). Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. *Cell and Tissue Research*, 303(2), 263–270. <https://doi.org/10.1007/S004410000316>
- Ng, Y. H., Rome, S., Jalabert, A., Forterre, A., Singh, H., Hincks, C. L., & Salamonsen, L. A. (2013). Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PloS One*, 8(3).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0058502>

- Nguyen, H. P. T., Simpson, R. J., Salamonsen, L. A., & Greening, D. W. (2016). Extracellular Vesicles in the Intrauterine Environment: Challenges and Potential Functions. *Biology of Reproduction*, 95(5). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.116.143503>
- Nicholls, C., Li, H., & Liu, J. P. (2012). GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 39(8), 674–679. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1681.2011.05599.X>
- Niwa, H., Miyazaki, J. I., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Noguchi, T., Aizawa, T., Munakata, Y., & Iwata, H. (2020). Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained in vitro and in vivo. *The Journal of Reproduction and Development*, 66(1), 35–39. <https://doi.org/10.1262/JRD.2019-100>
- O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., & Breakefield, X. O. (2020). RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(10), 585–606. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-0251-Y>
- O'Neil, E. V., Burns, G. W., Ferreira, C. R., & Spencer, T. E. (2020). Characterization and regulation of extracellular vesicles in the lumen of the ovine uterus†. *Biology of Reproduction*, 102(5), 1020–1032. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAA019>
- O'Neill, C. (2005). The role of paf in embryo physiology. *Human Reproduction Update*, 11(3), 215–228. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMI003>
- O'Neill, C. (2008). The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. *Human Reproduction Update*, 14(3), 275–288. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMN002>
- Ogushi, S., & Saitou, M. (2010). The nucleolus in the mouse oocyte is required for the early step of both female and male pronucleus organization. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(5), 495–501. <https://doi.org/10.1262/JRD.09-184H>
- Oliveira, L. J., Barreto, R. S. N., Perecin, F., Mansouri-Attia, N., Pereira, F. T. V., & Meirelles, F. V. (2012). Modulation of maternal immune system during pregnancy in the cow. *Reproduction in Domestic Animals*,

47(SUPPL.4), 384–393. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2012.02102.X>

Ortiz-Quintero, B. (2016). Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Proliferation*, 49(3), 281–303. <https://doi.org/10.1111/CPR.12262>

Osman, E., Franasiak, J., & Scott, R. (2018). Oocyte and Embryo Manipulation and Epigenetics. *Seminars in Reproductive Medicine*, 36(3–04). <https://doi.org/10.1055/S-0039-1688801>

Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacoheh, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), 19–30. <https://doi.org/10.1038/NCB2000>

Ott, T. L. (2019). Symposium review: Immunological detection of the bovine conceptus during early pregnancy. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 3766–3777. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-15668>

Ottolini, C. S., Kitchen, J., Xanthopoulou, L., Gordon, T., Summers, M. C., & Handyside, A. H. (2017). Tripolar mitosis and partitioning of the genome arrests human preimplantation development in vitro. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-09693-1>

Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 101(3), 942–948. <https://doi.org/10.1083/JCB.101.3.942>

Pan, Y., Zhan, L., Chen, L., Chen, L., & Sun, C. (2021). miR-660 promotes liver cancer cell proliferation by targeting PPP2R2A. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(1), 1–8. <https://doi.org/10.3892/ETM.2021.10115>

Paul, A. B. M., Sadek, S. T., & Mahesan, A. M. (2019). The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (Vol. 36, Issue 2, pp. 179–187). <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1326-y>

Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 487–514. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-013118-111902>

- Peng, B., Li, C., He, L., Tian, M., & Li, X. (2020). miR-660-5p promotes breast cancer progression through down-regulating TET2 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 53(12), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20209740>
- Penitente-Filho, J. M. (2015). Improved in vitro production systems for bovine embryos. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 10. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510048>
- Pennetier, S., Perreau, C., Uzbekova, S., Thélie, A., Delaleu, B., Mermillod, P., & Dalbiès-Tran, R. (2006). MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-26>
- Pernaute, B., Spruce, T., Rodriguez, T. A., & Manzanares, M. (2011). MiRNA-mediated regulation of cell signaling and homeostasis in the early mouse embryo. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(4), 584–591. <https://doi.org/10.4161/CC.10.4.14728>
- Perry. (2017). 2016 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Newsletter, Embryo Technology*, Undefined. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1370004235478795152>
- Petit, F. G., Jamin, S. P., Kernanec, P. Y., Becker, E., Halet, G., & Primig, M. (2022). EXOSC10/Rrp6 is essential for the eight-cell embryo/morula transition. *Developmental Biology*, 483, 58–65. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2021.12.010>
- Phillips, P. E., & Jahnke, M. M. (2016). Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 32(2), 365–385. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2016.01.008>
- Pohler, K. G., Green, J. A., Moley, L. A., Gunewardena, S., Hung, W. T., Payton, R. R., Hong, X., Christenson, L. K., Geary, T. W., & Smith, M. F. (2017). Circulating microRNA as candidates for early embryonic viability in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, 84(8), 731–743. <https://doi.org/10.1002/MRD.22856>
- Ponsuksili, S., Tesfaye, D., Schellander, K., Hoelker, M., Hadlich, F., Schwerin, M., & Wimmers, K. (2014). Differential expression of miRNAs and their target mRNAs in endometria prior to maternal recognition of pregnancy associates with endometrial receptivity for in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 91(6). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.114.121392>

- Pontes, J. H. F., Melo Sterza, F. A., Basso, A. C., Ferreira, C. R., Sanches, B. V., Rubin, K. C. P., & Seneda, M. M. (2011). Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, *75*(9), 1640–1646. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.12.026>
- Pontes, J. H. F., Nonato-Junior, I., Sanches, B. V., Ereno-Junior, J. C., Uvo, S., Barreiros, T. R. R., Oliveira, J. A., Hasler, J. F., & Seneda, M. M. (2009). Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, *71*(4), 690–697. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.09.031>
- Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(3), 166–180. <https://doi.org/10.1038/NRI3607>
- Prather, R. S., & First, N. L. (1988). A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species. *Journal of Animal Science*, *66*(10), 2626–2635. <https://doi.org/10.2527/JAS1988.66102626X>
- Qu, P., Qing, S., Liu, R., Qin, H., Wang, W., Qiao, F., Ge, H., Liu, J., Zhang, Y., Cui, W., & Wang, Y. (2017). Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. *PloS One*, *12*(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174535>
- Qu, P., Zhao, Y., Wang, R., Zhang, Y., Li, L., Fan, J., & Liu, E. (2019). Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth rates after embryo transfer in mice. *Reproduction, Fertility, and Development*, *31*(2), 324–332. <https://doi.org/10.1071/RD18203>
- Ralston, A., & Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Developmental Biology*, *313*(2), 614–629. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2007.10.054>
- Ramos-Ibeas, P., Lamas-Toranzo, I., Martínez-Moro, Á., de Frutos, C., Quiroga, A. C., Zurita, E., & Bermejo-Álvarez, P. (2020). Embryonic disc formation following post-hatching bovine embryo development in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, *160*(4), 579. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0243>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, *200*(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/JCB.201211138>

- Rasmussen, S., Block, J., Seidel, G. E., Brink, Z., McSweeney, K., Farin, P. W., Bonilla, L., & Hansen, P. J. (2013). Pregnancy rates of lactating cows after transfer of in vitro produced embryos using X-sorted sperm. *Theriogenology*, 79(3), 453–461. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.10.017>
- Rebollar-Lazaro, I., & Matson, P. (2010). The culture of human cleavage stage embryos alone or in groups: effect upon blastocyst utilization rates and implantation. *Reproductive Biology*, 10(3), 227–234. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60042-4](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60042-4)
- Redmer, T., Diecke, S., Grigoryan, T., Quiroga-Negreira, A., Birchmeier, W., & Besser, D. (2011). E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Reports*, 12(7), 720–726. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2011.88>
- Reed, M. L., Woodward, B. J., & Swain, J. E. (2011). Single or Group Culture of Mammalian Embryos: The Verdict of the Literature. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*, 2(2), 77–87. <https://doi.org/10.1177/205891581100200203>
- Rhee, J. K., Shin, S. Y., & Zhang, B. T. (2013). Construction of microRNA functional families by a mixture model of position weight matrices. *PeerJ*, 1(1). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.199>
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., De La Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(SUPPL.4), 44–50. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2008.01230.X>
- Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Pérez-Garnelo, S., De la Fuente, J., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68(1), 236–243. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.102.007799>
- Rizos, D., Ramirez, M. A., Pintado, B., Lonergan, P., & Gutierrez-Adan, A. (2010). Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology*, 73(6), 777–785. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.10.001>
- Rizos, Dimitrios, Maillo, V., Sánchez-Calabuig, M. J., & Lonergan, P. (2017). The Consequences of Maternal-Embryonic Cross Talk During the Periconception Period on Subsequent Embryonic Development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1014, 69–86. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62414-3_4

- Rizos, Dimitrios, Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1002/MRD.1153>
- Robertson, S. A., Zhang, B., Chan, H., Sharkey, D. J., Barry, S. C., Fullston, T., & Schjenken, J. E. (2017). MicroRNA regulation of immune events at conception. *Molecular Reproduction and Development*, 84(9), 914–925. <https://doi.org/10.1002/MRD.22823>
- Rocha, J. C., Passalia, F., Matos, F. D., Maserati, M. P., Alves, M. F., De Almeida, T. G., Cardoso, B. L., Basso, A. C., & Nogueira, M. F. G. (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assisted Reproduction*, 20(3), 150–158. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160033>
- Rodríguez-Alvarez, L., Cox, J., Tovar, H., Einspanier, R., & Castro, F. O. (2010a). Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and in vitro produced embryos. *Zygote (Cambridge, England)*, 18(3), 269–279. <https://doi.org/10.1017/S0967199409990323>
- Rodríguez-Alvarez, L., Cox, J., Navarrete, F., Valdés, C., Zamorano, T., Einspanier, R., & Castro, F. O. (2009). Elongation and gene expression in bovine cloned embryos transferred to temporary recipients. *Zygote*, 17(4), 353–365. <https://doi.org/10.1017/S0967199409005486>
- Rodríguez-Alvarez, L., Manriquez, J., Velasquez, A., & Castro, F. O. (2013). Constitutive expression of the embryonic stem cell marker OCT4 in bovine somatic donor cells influences blastocysts rate and quality after nucleus transfer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 49(9), 657–667. <https://doi.org/10.1007/S11626-013-9650-0>
- Rodríguez-Alvarez, L., Sharbati, J., Sharbati, S., Cox, J. F., Einspanier, R., & Castro, F. O. (2010b). Differential gene expression in bovine elongated (Day 17) embryos produced by somatic cell nucleus transfer and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 74(1), 45–59. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.12.018>
- Rosenbluth, E. M., Shelton, D. N., Wells, L. M., Sparks, A. E. T., & Van Voorhis, B. J. (2014). Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1493–1500. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2014.01.058>

- Saadeldin, I. M., Kim, S. J., Choi, Y. Bin, & Lee, B. C. (2014). Improvement of Cloned Embryos Development by Co-Culturing with Parthenotes: A Possible Role of Exosomes/Microvesicles for Embryos Paracrine Communication. *Https://Home.Liebertpub.Com/Cell*, 16(3), 223–234. <https://doi.org/10.1089/CELL.2014.0003>
- Saadeldin, I. M., Oh, H. J., & Lee, B. C. (2015). Embryonic-maternal cross-talk via exosomes: potential implications. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*, 8, 103–107. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S84991>
- Sacco, J., & Adeli, K. (2012). MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 23(3), 220–225. <https://doi.org/10.1097/MOL.0B013E3283534C9F>
- Sadri, M., Shu, J., Kachman, S. D., Cui, J., & Zemleni, J. (2020). Milk exosomes and miRNA cross the placenta and promote embryo survival in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 160(4), 501–509. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0521>
- Sagini, K., Costanzi, E., Emiliani, C., Buratta, S., & Urbanelli, L. (2018). Extracellular Vesicles as Conveyors of Membrane-Derived Bioactive Lipids in Immune System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS19041227>
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N. L., Parrish, J. J., & Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 101(3–4), 225–240. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2006.09.016>
- Salamonsen, L. A., Evans, J., Nguyen, H. P. T., & Edgell, T. A. (2016). The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 75(3), 218–225. <https://doi.org/10.1111/AJI.12450>
- Sallam, H. N., Sallam, N. H., & Sallam, S. H. (2016). Non-invasive methods for embryo selection. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 8(2), 87. [/pmc/articles/PMC5130307/](https://pmc/articles/PMC5130307/)
- Salomon, C., Torres, M. J., Kobayashi, M., Scholz-Romero, K., Sobrevia, L., Dobierzewska, A., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., & Rice, G. E. (2014). A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PloS One*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0098667>
- Sánchez, J. M., Mathew, D. J., Passaro, C., Fair, T., & Lonergan, P. (2018). Embryonic maternal interaction in cattle and its relationship with fertility.

Reproduction in Domestic Animals, 53, 20–27.
<https://doi.org/10.1111/rda.13297>

Sanchez, V., Golyardi, F., Mayaki, D., Echavarria, R., Harel, S., Xia, J., & Hussain, S. N. A. (2019). Negative regulation of angiogenesis by novel micro RNAs. *Pharmacological Research*, 139, 173–181.
<https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2018.11.010>

Santos, É. C. dos, Fonseca Junior, A. M. da, de Lima, C. B., Ispada, J., Silva, J. V. A. da, & Milazzotto, M. P. (2021). Less is more: Reduced nutrient concentration during in vitro culture improves embryo production rates and morphophysiology of bovine embryos. *Theriogenology*, 173, 37–47.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2021.07.010>

Saunders, L. R., Sharma, A. D., Tawney, J., Nakagawa, M., Okita, K., Yamanaka, S., Willenbring, H., & Verdin, E. (2010). miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging*, 2(7), 415–431.
<https://doi.org/10.18632/AGING.100176>

Sawai, K. (2009). Studies on gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *The Journal of Reproduction and Development*, 55(1), 11–16. <https://doi.org/10.1262/JRD.20131>

Scaruffi, P. (2015). Exogen markers of human embryo quality in culture medium. *Current Trends in Clinical Embriology*.
<https://doi.org/10.11138/CCE/2015.2.6.209>

Schjenken, J. E., Moldenhauer, L. M., Zhang, B., Care, A. S., Groome, H. M., Chan, H. Y., Hope, C. M., Barry, S. C., & Robertson, S. A. (2020). MicroRNA miR-155 is required for expansion of regulatory T cells to mediate robust pregnancy tolerance in mice. *Mucosal Immunology*, 13(4), 609–625. <https://doi.org/10.1038/S41385-020-0255-0>

Seli, E., Sakkas, D., Scott, R., Kwok, S. C., Rosendahl, S. M., & Burns, D. H. (2007). Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 88(5), 1350–1357.
<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.07.1390>

Shapiro, B. S., Daneshmand, S. T., Garner, F. C., Aguirre, M., & Ross, R. (2008). Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertility and Sterility*, 89(1), 20–26.
<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2006.08.092>

- Shen, L. J., He, J. L., Yang, D. H., Ding, Y. Bin, Chen, X. M., Geng, Y. Q., Liu, S. J., Liu, X. Q., & Wang, Y. X. (2013). Mmu-microRNA-200a overexpression leads to implantation defect by targeting phosphatase and tensin homolog in mouse uterus. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *20*(12), 1518–1528. <https://doi.org/10.1177/1933719113488453>
- Shih, J. C., Lin, H. H., Hsiao, A. C., Su, Y. T., Tsai, S., Chien, C. L., & Kung, H. N. (2019). Unveiling the role of microRNA-7 in linking TGF- β -Smad-mediated epithelial-mesenchymal transition with negative regulation of trophoblast invasion. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(5), 6281–6295. <https://doi.org/10.1096/FJ.201801898RR>
- Shirasuna, K., Matsumoto, H., Matsuyama, S., Kimura, K., Bollwein, H., & Miyamoto, A. (2015). Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. *Reproduction (Cambridge, England)*, *150*(3), 217–225. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0085>
- Silva-Santos, K. C., Santos, G. M. G., Siloto, L. S., Hertel, M. F., Andrade, E. R., Rubin, M. I. B., Sturion, L., Melo-Sterza, F. A., & Seneda, M. M. (2011). Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, *76*(6), 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.05.008>
- Silva-Santos, K. C., Siloto, L. S., Santos, G. M. G., Morotti, F., Marcantonio, T. N., & Seneda, M. M. (2014). Comparison of Antral and Preantral Ovarian Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus-taurus* Cows with High or Low Antral Follicles Counts. *Reproduction in Domestic Animals*, *49*(1), 48–51. <https://doi.org/10.1111/RDA.12222>
- Silva, T., Santos, E. C., Annes, K., Soares, C. A., Leite, R. F., Lima, C. B., & Milazzotto, M. P. (2016). Morphokinetic-related response to stress in individually cultured bovine embryos. *Theriogenology*, *86*(5), 1308–1317. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.072>
- Simmet, K., Zakhartchenko, V., Philippou-Massier, J., Blum, H., Klymiuk, N., & Wolf, E. (2018). OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(11), 2770–2775. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1718833115>
- Simon, C., Greening, D. W., Bolumar, D., Balaguer, N., Salamonsen, L. A., & Vilella, F. (2018). Extracellular Vesicles in Human Reproduction in Health

and Disease. *Endocrine Reviews*, 39(3), 292–332.
<https://doi.org/10.1210/ER.2017-00229>

Sinha, P. B., Tesfaye, D., Rings, F., Hossien, M., Hoelker, M., Held, E., Neuhoff, C., Tholen, E., Schellander, K., & Salilew-Wondim, D. (2017). MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation. *Journal of Ovarian Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13048-017-0336-1>

Sirard, M. A. (2011). Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(6), 483–488.
<https://doi.org/10.1007/S10815-011-9554-4>

Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126–136.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.020>

Skopets, B., Li, J., Thatcher, W. W., Roberts, R. M., & Hansen, P. J. (1992). Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (type I trophoblast interferon) and bovine interferon-alpha I1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 34(1–2), 81–96.
[https://doi.org/10.1016/0165-2427\(92\)90153-H](https://doi.org/10.1016/0165-2427(92)90153-H)

Skotland, T., Ekroos, K., Kauhanen, D., Simolin, H., Seierstad, T., Berge, V., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 70, 122–132.
<https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2016.10.011>

Sohel, M. M. H., Hoelker, M., Noferesti, S. S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., Rings, F., Uddin, M. J., Spencer, T. E., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2013). Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PloS One*, 8(11).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0078505>

Somfai, T., Inaba, Y., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, S., Konishi, K., & Imai, K. (2010). Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(2), 200–207. <https://doi.org/10.1262/JRD.09-097a>

Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R., & Lamb, G. C. (2001). Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56(2), 287–297.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00563-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00563-5)

- Spencer, T. E. (2013). Early pregnancy: Concepts, challenges, and potential solutions. *Animal Frontiers*, 3(4), 48–55. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0033>
- Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7. <https://doi.org/10.2741/SPENCER>
- Spencer, T. E., Forde, N., Dorniak, P., Hansen, T. R., Romero, J. J., & Lonergan, P. (2013). Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction (Cambridge, England)*, 146(4), 377–387. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0165>
- Spencer, T. E., Sandra, O., & Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: Insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135(2), 165–179. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0327>
- Spindler, R. E., & Wildt, D. E. (2002). Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture. *Biology of Reproduction*, 66(1), 167–173. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD66.1.167>
- Stahl, P. D., & Raposo, G. (2019). Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 34(3), 169–177. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00045.2018>
- Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P. L., & Scaruffi, P. (2013). Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(10), 2652–2660. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DET314>
- Stigliani, S., Persico, L., Lagazio, C., Anserini, P., Venturini, P. L., & Scaruffi, P. (2014). Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Molecular Human Reproduction*, 20(12), 1238–1246. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAU086>
- Stoorvogel, W. (2015). Resolving sorting mechanisms into exosomes. *Cell Research*, 25(5), 531–532. <https://doi.org/10.1038/CR.2015.39>
- Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J., & Raposo, G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(5), 321–330. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0854.2002.30502.X>

- Stringfellow, D. A., Seidel, S. M., & International Embryo Transfer Society. (1998). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 170. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UI.JS>
- Su, S., Lu, W., Liu, J., Li, L., Liu, L., Li, X., Ye, D., & Yu, Z. (2022). Circ_0007031 Silencing Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Apoptosis via Downregulating MELK at a miR-485-3p-Dependent Way in Colorectal Cancer. *Biochemical Genetics*, 60(2), 576–597. <https://doi.org/10.1007/S10528-021-10111-5>
- Sudiman, J., Sutton-McDowall, M. L., Ritter, L. J., White, M. A., Mottershead, D. G., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2014). Bone morphogenetic protein 15 in the pro-mature complex form enhances bovine oocyte developmental competence. *PloS One*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0103563>
- Sugimura, S., Akai, T., & Imai, K. (2017). Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *The Journal of Reproduction and Development*, 63(4), 353–357. <https://doi.org/10.1262/JRD.2017-041>
- Suh, N., Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Shenoy, A., Chen, J., & Belloch, R. (2010). MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Current Biology: CB*, 20(3), 271–277. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2009.12.044>
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., & Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 35(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.BCMD.2005.03.005>
- Sulovsky, P., & Schatten, G. (2000). Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *International Review of Cytology*, 195, 1–65. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62703-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62703-5)
- Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS18061153>
- Tan, Q., Shi, S., Liang, J., Cao, D., Wang, S., & Wang, Z. (2020). Endometrial cell-derived small extracellular vesicle miR-100-5p promotes functions of trophoblast during embryo implantation. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 23, 217–231. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2020.10.043>

- Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S. C., Sun, Y. A., Lee, C., Tarakhovsky, A., Lao, K., & Surani, M. A. (2007). Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes & Development*, 21(6), 644–648. <https://doi.org/10.1101/GAD.418707>
- Tanga, B. M., Fang, X., Bang, S., Seong, G., De Zoysa, M., Saadeldin, I. M., Lee, S., & Cho, J. (2022). MiRNA-155 inhibition enhances porcine embryo preimplantation developmental competence by upregulating ZEB2 and downregulating ATF4. *Theriogenology*, 183, 90–97. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.02.019>
- Tannetta, D., Dragovic, R., Alyahyaei, Z., & Southcombe, J. (2014). Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cellular & Molecular Immunology*, 11(6), 548–563. <https://doi.org/10.1038/CMI.2014.42>
- Tao, T., Robichaud, A., Mercier, J., & Ouellette, R. (2013). Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(1), 63–68. <https://doi.org/10.1007/S10815-012-9892-X>
- Teh, W. T., McBain, J., & Rogers, P. (2016). What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(11), 1419–1430. <https://doi.org/10.1007/S10815-016-0773-6>
- Tekin, S., Ealy, A. D., Wang, S. Z., & Hansen, P. J. (2000). Differences in lymphocyte-regulatory activity among variants of ovine IFN-tau. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 20(11), 1001–1005. <https://doi.org/10.1089/10799900050198444>
- Teng, F., & Fussenegger, M. (2020). Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 8(1). <https://doi.org/10.1002/ADVS.202003505>
- Terriou, P., Giorgetti, C., Hans, E., Salzmann, J., Charles, O., Cignetti, L., Avon, C., & Roulier, R. (2007). Relationship between even early cleavage and day 2 embryo score and assessment of their predictive value for pregnancy. *Reproductive Biomedicine Online*, 14(3), 294–299. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60870-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60870-X)
- Tesfaye, D., Ghanem, N., Carter, F., Fair, T., Sirard, M. A., Hoelker, M., Schellander, K., & Lonergan, P. (2009). Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(3), 451–461. <https://doi.org/10.1071/RD08190>

- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology, Chapter 3*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.CB0322S30>
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews. Immunology, 9*(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/NRI2567>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles, 7*(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Tiberio, P., Callari, M., Angeloni, V., Daidone, M. G., & Appierto, V. (2015). Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *BioMed Research International, 2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/731479>
- Tochigi, H., Kajihara, T., Mizuno, Y., Mizuno, Y., Tamaru, S., Kamei, Y., Okazaki, Y., Brosens, J. J., & Ishihara, O. (2017). Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells. *Scientific Reports, 7*. <https://doi.org/10.1038/SREP40001>
- Tong, M., Abrahams, V. M., & Chamley, L. W. (2018). Immunological effects of placental extracellular vesicles. *Immunology and Cell Biology, 96*(7), 714–722. <https://doi.org/10.1111/IMCB.12049>
- Tribulo, P., da Silva Leão, B. C., Lehloenya, K. C., Mingoti, G. Z., & Hansen, P. J. (2017). Consequences of endogenous and exogenous WNT signaling for development of the preimplantation bovine embryo. *Biology of Reproduction, 96*(6), 1129–1141. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOX048>
- Tríbulo, P., Siqueira, L. G. B., Oliveira, L. J., Scheffler, T., & Hansen, P. J. (2018). Identification of potential embryokines in the bovine reproductive tract. *Journal of Dairy Science, 101*(1), 690–704. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13221>
- Tripurani, S. K., Lee, K. B., Wang, L., Wee, G., Smith, G. W., Lee, Y. S., Latham, K. E., & Yao, J. (2011). A novel functional role for the oocyte-

specific transcription factor newborn ovary homeobox (NOBOX) during early embryonic development in cattle. *Endocrinology*, 152(3), 1013–1023. <https://doi.org/10.1210/EN.2010-1134>

Turchinovich, A., Baranova, A., Drapkina, O., & Tonevitsky, A. (2018). Cell-Free Circulating Nucleic Acids as Early Biomarkers for NAFLD and NAFLD-Associated Disorders. *Frontiers in Physiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.01256>

Turner, K., Martin, K. L., Woodward, B. J., Lenton, E. A., & Leese, H. J. (1994). Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 9(12), 2362–2366. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A138453>

Ugajin, T., Terada, Y., Hasegawa, H., Velayo, C. L., Nabeshima, H., & Yaegashi, N. (2010). Aberrant behavior of mouse embryo development after blastomere biopsy as observed through time-lapse cinematography. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2723–2728. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.06.056>

Ushizawa, K., Herath, C. B., Kaneyama, K., Shiojima, S., Hirasawa, A., Takahashi, T., Imai, K., Ochiai, K., Tokunaga, T., Tsunoda, Y., Tsujimoto, G., & Hashizume, K. (2004). cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 2. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-77>

Uysal, F., Kahveci, S., Sukur, G., & Cinar, O. (2022). Embryo culture media differentially alter DNA methylating enzymes and global DNA methylation in embryos and oocytes. *Journal of Molecular Histology*, 53(1), 63–74. <https://doi.org/10.1007/S10735-021-10038-6>

van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*, 35(1), 99–118. <https://doi.org/10.14573/ALTEX.1705101>

van der Weijden, V. A., Chen, S., Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., & Schoen, J. (2017). Gene expression of bovine embryos developing at the air-liquid interface on oviductal epithelial cells (ALI-BOEC). *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12958-017-0310-1>

Van Leeuwen, J., Berg, D. K., & Pfeffer, P. L. (2015). Morphological and Gene

Expression Changes in Cattle Embryos from Hatched Blastocyst to Early Gastrulation Stages after Transfer of In Vitro Produced Embryos. *PLoS One*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0129787>

- van Loendersloot, L., Repping, S., Bossuyt, P. M. M., van der Veen, F., & van Wely, M. (2014). Prediction models in in vitro fertilization; where are we? A mini review. *Journal of Advanced Research*, 5(3), 295. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2013.05.002>
- Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.125>
- Van Soom, A., Ysebaert, M. T., & De Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 47(1), 47–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10982795\(199705\)47:1<47::AIDMRD7>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)10982795(199705)47:1<47::AIDMRD7>3.0.CO;2-Q)
- Van Wagtenonk-De Leeuw, A. M., Aerts, B. J. G., & Den Daas, J. H. G. (1998). Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology*, 49(5), 883–894. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00038-7)
- Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D. G. D., de Kruif, A., & Van Soom, A. (2007). Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(4), 709–718. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0109>
- Varga, Z. V., Kupai, K., Szucs, G., Gáspár, R., Pálóczi, J., Faragó, N., Zvara, Á., Puskás, L. G., Rázga, Z., Tiszlavicz, L., Bencsik, P., Görbe, A., Csonka, C., Ferdinandy, P., & Csont, T. (2013). MicroRNA-25-dependent up-regulation of NADPH oxidase 4 (NOX4) mediates hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress and subsequent dysfunction in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, 111–121. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2013.05.009>
- Vasconcelos, J. L. M., Jardina, D. T. G., Sá Filho, O. G., Aragon, F. L., & Veras, M. B. (2011). Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 75(6), 1153–1160. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.11.027>

- Vejlsted, M., Du, Y., Vajta, G., & Maddox-Hyttel, P. (2006). Post-hatching development of the porcine and bovine embryo--defining criteria for expected development in vivo and in vitro. *Theriogenology*, *65*(1), 153–165. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.021>
- Velasquez, A. E., Castro, F. O., Veraguas, D., Cox, J. F., Lara, E., Briones, M., & Rodriguez-Alvarez, L. (2016). Splitting of IVP bovine blastocyst affects morphology and gene expression of resulting demi-embryos during in vitro culture and in vivo elongation. *Zygote (Cambridge, England)*, *24*(1), 18–30. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000677>
- Velásquez, A., Mellisho, E., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2019). Effect of BMP15 and/or AMH during in vitro maturation of oocytes from involuntarily culled dairy cows. *Molecular Reproduction and Development*, *86*(2), 209–223. <https://doi.org/10.1002/MRD.23096>
- Velasquez, L. A., Maisey, K., Fernandez, R., Valdes, D., Cardenas, H., Imarai, M., Delgado, J., Aguilera, J., & Croxatto, H. B. (2001). PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human Fallopian tube: possible role of embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *16*(8), 1583–1587. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/16.8.1583>
- Velker, B. A. M., Denomme, M. M., & Mann, M. R. W. (2012). Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture. *Biology of Reproduction*, *86*(5). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.111.096602>
- Vergouw, C. G., Heymans, M. W., Hardarson, T., Sfontouris, I. A., Economou, K. A., Ahlström, A., Rogberg, L., Lainas, T. G., Sakkas, D., Kieslinger, D. C., Kosteljik, E. H., Hompes, P. G. A., Schats, R., & Lambalk, C. B. (2014). No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *29*(3), 455–461. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DET456>
- Viana, J. (2020). 2019 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. *Embryo Transfer Newsletter*, *38*(4), 14–26
- Viana, J. H. (2022). 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Embryo industry on a new level: over one million embryos produced in vitro. *Embryo Technology Newsletter*, *36*(4), 8–25. https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2018.pdf
- Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M.,

- Martínez, S., Marcilla, A., & Simón, C. (2015). Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development (Cambridge, England)*, *142*(18), 3210–3221. <https://doi.org/10.1242/DEV.124289>
- Viswanathan, S. R., Mermel, C. H., Lu, J., Lu, C. W., Golub, T. R., & Daley, G. Q. (2009a). microRNA expression during trophectoderm specification. *PloS One*, *4*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006143>
- Viswanathan, S. R., Mermel, C. H., Lu, J., Lu, C. W., Golub, T. R., & Daley, G. Q. (2009b). microRNA expression during trophectoderm specification. *PloS One*, *4*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006143>
- Wang, H. M., Zhang, X., Qian, D., Lin, H. Y., Li, Q. L., Liu, D. L., Liu, G. Y., Yu, X. D., & Zhu, C. (2004). Effect of ubiquitin-proteasome pathway on mouse blastocyst implantation and expression of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biology of Reproduction*, *70*(2), 481–487. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.103.021634>
- Wang, Haibin, & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews. Genetics*, *7*(3), 185–199. <https://doi.org/10.1038/NRG1808>
- Wang, Haibin, Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(5), 939–980. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2012.12.011>
- Wang, Hengqin, Wang, X., Meng, K., Gong, X., Wang, Y., Zhang, Y., & Quan, F. (2020). [Effect of extracellular vesicles and microRNAs in follicular fluid on follicular development]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, *36*(4), 632–642. <https://doi.org/10.13345/J.CJB.190250>
- Wang, L. Q., Kwong, Y. L., Kho, C. S. B., Wong, K. F., Wong, K. Y., Ferracin, M., Calin, G. A., & Chim, C. S. (2013). Epigenetic inactivation of miR-9 family microRNAs in chronic lymphocytic leukemia - Implications on constitutive activation of NFκB pathway. *Molecular Cancer*, *12*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-173/FIGURES/5>
- Wang, M., Gao, Y., Qu, P., Qing, S., Qiao, F., Zhang, Y., Mager, J., & Wang, Y. (2017). Sperm-borne miR-449b influences cleavage, epigenetic reprogramming and apoptosis of SCNT embryos in bovine. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-13899-8>
- Wang, Y., Li, X., & Tao, B. (2016). Improving classification of mature microRNA

by solving class imbalance problem. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP25941>

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/NRG2484>

Waqas, M. Y., Zhang, Q., Ahmed, N., Yang, P., Xing, G., Akhtar, M., Basit, A., Liu, T., Hong, C., Arshad, M., Rahman, H. M. S. U., & Chen, Q. (2017). Cellular Evidence of Exosomes in the Reproductive Tract of Chinese Soft-Shell Turtle *Pelodiscus sinensis*. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological and Integrative Physiology*, 327(1), 18–27. <https://doi.org/10.1002/JEZ.2065>

Wei, Q., Liu, H., Ai, Z., Wu, Y., Liu, Y., Shi, Z., Ren, X., & Guo, Z. (2017). SC1 Promotes MiR124-3p Expression to Maintain the Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells by Inhibiting the MEK/ERK Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 44(5), 2057–2072. <https://doi.org/10.1159/000485945>

Wheeler, M. B., Rutledge, J. J., Fischer-Brown, A., VanEtten, T., Malusky, S., & Beebe, D. J. (2006). Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65(1), 219–227. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.032>

Wilson, R. D., Weigel, K. A., Fricke, P. M., Rutledge, J. J., Leibfried-Rutledge, M. L., Matthews, D. L., & Schutzkus, V. R. (2005). In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *Journal of Dairy Science*, 88(2), 776–782. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(05\)72741-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(05)72741-7)

Wolf, E., Arnold, G. J., Bauersachs, S., Beier, H. M., Blum, H., Einspanier, R., Fröhlich, T., Herrler, A., Hiendleder, S., Kölle, S., Prella, K., Reichenbach, H. D., Stojkovic, M., Wenigerkind, H., & Sinowatz, F. (2003). Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 38(4), 276–289. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0531.2003.00435.X>

Wong, C. C., Loewke, K. E., Bossert, N. L., Behr, B., De Jonge, C. J., Baer, T. M., & Pera, R. A. R. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology* 28:10, 28(10), 1115–1121. <https://doi.org/10.1038/nbt.1686>

Wrenzycki, C. (2018). Gene expression analysis and in vitro production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present

concepts and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 14–19. <https://doi.org/10.1111/RDA.13260>

Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E., & Niemann, H. (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 17(1–2), 23–35. <https://doi.org/10.1071/RD04109>

Wu, G., Han, D., Gong, Y., Sebastiano, V., Gentile, L., Singhal, N., Adachi, K., Fishedick, G., Ortmeier, C., Sinn, M., Radstaak, M., Tomilin, A., & Schöler, H. R. (2013). Establishment of totipotency does not depend on Oct4A. *Nature Cell Biology*, 15(9), 1089–1097. <https://doi.org/10.1038/NCB2816>

Wu, X., Viveiros, M. M., Eppig, J. J., Bai, Y., Fitzpatrick, S. L., & Matzuk, M. M. (2003). Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature Genetics*, 33(2), 187–191. <https://doi.org/10.1038/NG1079>

Wuensch, A., Habermann, F. A., Kurosaka, S., Klose, R., Zakhartchenko, V., Reichenbach, H. D., Sinowatz, F., McLaughlin, K. J., & Wolf, E. (2007). Quantitative monitoring of pluripotency gene activation after somatic cloning in cattle. *Biology of Reproduction*, 76(6), 983–991. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.106.058776>

Wydooghe, E., Vaele, L., Piepers, S., Dewulf, J., Van Abbeel, E. Den, De Sutter, P., & Van Soom, A. (2014). Individual commitment to a group effect: strengths and weaknesses of bovine embryo group culture. *Reproduction (Cambridge, England)*, 148(5), 519–529. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0213>

Xia, H. F., Jin, X. H., Cao, Z. F., Hu, Y., & Ma, X. (2014). MicroRNA expression and regulation in the uterus during embryo implantation in rat. *The FEBS Journal*, 281(7), 1872–1891. <https://doi.org/10.1111/FEBS.12751>

Xie, H., Tranguch, S., Jia, X., Zhang, H., Das, S. K., Dey, S. K., Kuo, C. J., & Wang, H. (2008). Inactivation of nuclear Wnt-beta-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development (Cambridge, England)*, 135(4), 717–727. <https://doi.org/10.1242/DEV.015339>

Xie, L., Mouillet, J. F., Chu, T., Parks, W. T., Sadovsky, E., Knöfler, M., & Sadovsky, Y. (2014). C19MC microRNAs regulate the migration of human trophoblasts. *Endocrinology*, 155(12), 4975–4985. <https://doi.org/10.1210/EN.2014-1501>

- Xu, Q., & Xie, W. (2018). Epigenome in Early Mammalian Development: Inheritance, Reprogramming and Establishment. *Trends in Cell Biology*, 28(3), 237–253. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2017.10.008>
- Xu, R., Li, C., Liu, X., & Gao, S. (2021). Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. *Protein & Cell*, 12(1), 7–28. <https://doi.org/10.1007/S13238-020-00757-Z>
- Xu, X. H., Tang, L. C., Hao, F., & Jin, L. P. (2021). Upregulation of miR-29a suppressed the migration and invasion of trophoblasts by directly targeting LOXL2 in preeclampsia. *Journal of Hypertension*, 39(8), 1642–1651. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002837>
- Yang, C., Song, G., & Lim, W. (2019). Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders. *Reproduction (Cambridge, England)*, 158(5), R189–R196. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0147>
- Yang, C. X., Du, Z. Q., Wright, E. C., Rothschild, M. F., Prather, R. S., & Ross, J. W. (2012). Small RNA profile of the cumulus-oocyte complex and early embryos in the pig. *Biology of Reproduction*, 87(5), 117–118. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.111.096669/2514057>
- Yang, M., Shan, X., Zhou, X., Qiu, T., Zhu, W., Ding, Y., Shu, Y., & Liu, P. (2014). miR-1271 Regulates Cisplatin Resistance of Human Gastric Cancer Cell Lines by Targeting IGF1R, IRS1, mTOR, and BCL2. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14(6), 884–891. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140528161318>
- Yang, Q., Lin, J., Liu, M., Li, R., Tian, B., Zhang, X., Xu, B., Liu, M., Zhang, X., Li, Y., Shi, H., & Wu, L. (2016). Highly sensitive sequencing reveals dynamic modifications and activities of small RNAs in mouse oocytes and early embryos. *Science Advances*, 2(6). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.1501482>
- Yang, Yanhong, Bai, W., Zhang, L., Yin, G., Wang, X., Wang, J., Zhao, H., Han, Y., & Yao, Y. Q. (2008). Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 237(9), 2315–2327. <https://doi.org/10.1002/DVDY.21666>
- Yang, Yuan, Xie, Y., Wu, M., Geng, Y., Li, R., Xu, L., Liu, X., & Pan, Y. (2017). Expression of mmu-miR-96 in the endometrium during early pregnancy and its regulatory effects on stromal cell apoptosis via Bcl2. *Molecular Medicine Reports*, 15(4), 1547–1554. <https://doi.org/10.3892/MMR.2017.6212>
- Yang, Z., Liu, J., Collins, G. S., Salem, S. A., Liu, X., Lyle, S. S., Peck, A. C.,

- Sills, E. S., & Salem, R. D. (2012). Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Molecular Cytogenetics*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1755-8166-5-24>
- Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R. E., Tsien, R. W., & Crabtree, G. R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 476(7359), 228–231. <https://doi.org/10.1038/NATURE10323>
- Yu, J., Wang, J. G., Zhang, L., Yang, H. P., Wang, L., Ding, D., Chen, Q., Yang, W. L., Ren, K. H., Zhou, D. M., Zou, Q., Jin, Y. T., & Liu, X. P. (2016). MicroRNA-320a inhibits breast cancer metastasis by targeting metadherin. *Oncotarget*, 7(25), 38612–38625. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9572>
- Yu, L., Jia, C., Lan, Y., Song, R., Zhou, L., Li, Y., Liang, Y., & Wang, S. (2017). Analysis of embryo intactness and developmental potential following slow freezing and vitrification. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(5), 285–293. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1362060>
- Zaborski, D., Grzesiak, W., Szatkowska, I., Dybus, A., Muszynska, M., & Jedrzejczak, M. (2009). Factors affecting dystocia in cattle. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 44(3), 540–551. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2008.01123.X>
- Zhang, F., Chen, K., Tao, H., Kang, T., Xiong, Q., Zeng, Q., Liu, Y., Jiang, S., & Chen, M. (2018). miR-25-3p, Positively Regulated by Transcription Factor AP-2 α , Regulates the Metabolism of C2C12 Cells by Targeting Akt1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS19030773>
- Zhang, H., Cai, K., Wang, J., Wang, X., Cheng, K., Shi, F., Jiang, L., Zhang, Y., & Dou, J. (2014). MiR-7, inhibited indirectly by lincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(11), 2858–2868. <https://doi.org/10.1002/STEM.1795>
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.GPB.2015.02.001>
- Zhang, Q., Zhang, H., Jiang, Y., Xue, B., Diao, Z., Ding, L., Zhen, X., Sun, H., Yan, G., & Hu, Y. (2015). MicroRNA-181a is involved in the regulation of human endometrial stromal cell decidualization by inhibiting Krüppel-like

factor 12. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13(1).
<https://doi.org/10.1186/S12958-015-0019-Y>

Zhang, W., Niu, H., Wang, R., Liu, C., & Wang, Y. (2022). MicroRNA-151 regulates the growth, drug sensitivity and epithelial mesenchymal transition of human glioma cells by targeting profilin 2. *Acta Biochimica Polonica*, 69(1), 147–153. https://doi.org/10.18388/ABP.2020_5777

Zhang, X., Sun, Y., Dong, X., Zhou, J., Sun, F., Han, T., Lei, P., Mao, R., Guo, X., Wang, Q., Li, P., Qu, T., Huang, J., Li, L., Huang, T., Zhong, Y., & Gu, J. (2019). Mitochondrial DNA and genomic DNA ratio in embryo culture medium is not a reliable predictor for in vitro fertilization outcome. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-41801-1>

Zhang, Y., He, X., Liu, Y., Ye, Y., Zhang, H., He, P., Zhang, Q., Dong, L., Liu, Y., & Dong, J. (2012). microRNA-320a inhibits tumor invasion by targeting neuropilin 1 and is associated with liver metastasis in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 27(3), 685–694. <https://doi.org/10.3892/OR.2011.1561>

Zhang, Z., Li, X., Sun, W., Yue, S., Yang, J., Li, J., Ma, B., Wang, J., Yang, X., Pu, M., Ruan, B., Zhao, G., Huang, Q., Wang, L., Tao, K., & Dou, K. (2017). Loss of exosomal miR-320a from cancer-associated fibroblasts contributes to HCC proliferation and metastasis. *Cancer Letters*, 397, 33–42. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.03.004>

Zhao, Z., Zhao, Q., Warrick, J., Lockwood, C. M., Woodworth, A., Moley, K. H., & Gronowski, A. M. (2012). Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clinical Chemistry*, 58(5), 896–905. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2011.179283>

Zhong, X., Li, N., Liang, S., Huang, Q., Coukos, G., & Zhang, L. (2010). Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41961–41971. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.169607>

Zhou, W., & Dimitriadis, E. (2020). Secreted MicroRNA to Predict Embryo Implantation Outcome: From Research to Clinical Diagnostic Application. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2020.586510>

Zhu, L., Marjani, S. L., & Jiang, Z. (2021). The Epigenetics of Gametes and Early Embryos and Potential Long-Range Consequences in Livestock Species-Filling in the Picture With Epigenomic Analyses. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.557934>

- Ziebe, S. (2013). Morphometric analysis of human embryos to predict developmental competence. *Reproduction, Fertility, and Development*, 26(1), 55–64. <https://doi.org/10.1071/RD13296>
- Zygmunt, M., Herr, F., Münstedt, K., Lang, U., & Liang, O. D. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 110(SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(03\)00168-4](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(03)00168-4)

IX. ANEXOS. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Anexo Tabla 1 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de blastulación por embriones *In vitro* e *In vivo*.

| miARNs | logFC | P.Value | adj.P.Val | Sobrerregulado |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------------------------|
| miR-122 | 7,11977225 | 1,0233E-08 | 4,99311E-07 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-423 | 4,90446344 | 8,392E-06 | 4,8457E-05 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-2889 | 4,62367751 | 0,01196358 | 0,025493817 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-3432a-2 | 4,41735381 | 1,7373E-05 | 9,4233E-05 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-3432a-1 | 4,41735381 | 1,3611E-05 | 7,61385E-05 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-125a | 4,40791067 | 2,6435E-05 | 0,000135197 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-1468 | 4,39606751 | 1,5127E-06 | 1,17729E-05 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-127 | 4,25057035 | 3,2765E-07 | 5,33172E-06 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-192 | 3,97047595 | 2,5393E-05 | 0,000133688 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-100 | 3,64623903 | 0,00023107 | 0,001007442 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-99a-2 | 3,46236769 | 0,0003729 | 0,001390595 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-92b | 3,43367113 | 5,9167E-05 | 0,00028624 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-2887-1 | 3,29006583 | 0,00015138 | 0,000694778 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-2887-2 | 3,29006583 | 0,00015138 | 0,000694778 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-151 | 3,22395527 | 0,00298947 | 0,007986784 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-451 | -7,32714885 | 0,00023638 | 0,001007442 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-140 | -7,02145285 | 2,9707E-06 | 2,04523E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-363 | -6,42519973 | 9,1544E-09 | 4,99311E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-212 | -6,40911035 | 2,989E-08 | 7,14904E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-30b | -6,27239756 | 0,00017174 | 0,000768526 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-29b-2 | -6,19598119 | 1,1949E-06 | 1,00166E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-29c | -6,19598119 | 1,1949E-06 | 1,00166E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-29d-2 | -6,19598119 | 1,1949E-06 | 1,00166E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-29e | -6,19598119 | 1,1949E-06 | 1,00166E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-Let7g | -6,19115301 | 0,00104053 | 0,003581815 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-2387 | -6,15544101 | 2,17E-08 | 7,14904E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-16a | -6,11100483 | 1,1158E-08 | 4,99311E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-126 | -6,08219779 | 3,1951E-08 | 7,14904E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-2405 | -6,08219779 | 2,6589E-08 | 7,14904E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR144 | -5,88716976 | 5,0052E-06 | 3,19974E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo Tabla 2 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de eclosión por embriones *In vitro* e *In vivo*.

| miARNs | logFC | P.Value | adj.P.Val | Sobrerregulado |
|---------------|--------------|----------------|------------------|-------------------------|
| miR-9-1 | 6,04368301 | 0,00060446 | 0,02704949 | Eclosión <i>In vivo</i> |
| miR-9-2-2 | 6,04368301 | 0,00060446 | 0,02704949 | Eclosión <i>In vivo</i> |
| miR-6529a | 5,93267734 | 9,1214E-05 | 0,00816363 | Eclosión <i>In vivo</i> |
| miR-6529b | 5,93267734 | 9,1214E-05 | 0,00816363 | Eclosión <i>In vivo</i> |
| miR-30d | 5,79324838 | 0,00112538 | 0,04028866 | Eclosión <i>In vivo</i> |

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo Tabla 3 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de blastulación y eclosión por embriones *In vitro*.

| miARNs | logFC | P.Value | adj.P.Val | Sobrerregulado |
|---------------|--------------|----------------|------------------|------------------------------|
| miR-451 | 9,57826492 | 2,9982E-09 | 5,3668E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-16b | 7,75357145 | 2,2797E-07 | 2,4004E-06 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-140 | 7,26370738 | 3,3642E-07 | 2,8676E-06 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-151-2 | 7,244989 | 1,0193E-06 | 6,2913E-06 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-185 | 7,19236478 | 2,3801E-06 | 9,6825E-06 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-9-1 | 7,10316676 | 8,9568E-06 | 2,838E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-9-2-2 | 7,10316676 | 8,9568E-06 | 2,838E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-25 | 6,71409104 | 1,0799E-05 | 3,2762E-05 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-15b | 6,48298916 | 0,00010087 | 0,00028661 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-30b | 6,28382701 | 0,00012027 | 0,00033638 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-142-2 | 6,07045751 | 1,9847E-06 | 9,1608E-06 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-363 | 6,00398517 | 1,9055E-08 | 7,7138E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-212 | 5,9878958 | 5,6022E-08 | 7,7138E-07 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-29b-2 | 5,77476664 | 2,1195E-06 | 9,1608E-06 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-29c | 5,77476664 | 2,1195E-06 | 9,1608E-06 | Blastulación <i>In vitro</i> |
| miR-122 | -4,92872754 | 3,8271E-06 | 1,3981E-05 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-22 | -4,59778738 | 1,8059E-06 | 8,9794E-06 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-3600 | -4,59778738 | 1,8059E-06 | 8,9794E-06 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-100 | -3,82697749 | 0,0001351 | 0,0003664 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-99a-2 | -3,81936872 | 0,00012725 | 0,00035044 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-423 | -3,45694553 | 0,00053222 | 0,00127022 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-215 | -3,45387558 | 0,00152946 | 0,00337991 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-2890 | -3,41454942 | 0,00032051 | 0,0007859 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-2887-1 | -3,33168358 | 0,00021155 | 0,00053333 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-2887-2 | -3,33168358 | 0,00021155 | 0,00053333 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-125b-1 | -3,28810077 | 0,00075465 | 0,00169247 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR125b-2 | -3,28810077 | 0,00075641 | 0,00169247 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-127 | -3,15404362 | 0,00015075 | 0,00040275 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-658 | -3,14524501 | 0,0015715 | 0,00343047 | Eclosión <i>In vitro</i> |
| miR-184 | -3,10102548 | 0,02447849 | 0,04338267 | Eclosión <i>In vitro</i> |

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo Tabla 4 miARNs expresados diferencialmente estadísticamente significativos secretados durante la etapa de blastulación y eclosión por embriones *In vivo*.

| miARNs | logFC | P.Value | adj.P.Val | Over UpRegulated |
|---------------|--------------|----------------|------------------|-----------------------------|
| miR-409b | 7,67965552 | 5,3747E-08 | 1,9241E-06 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-25 | 7,15030266 | 1,9818E-09 | 1,7737E-07 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-1271 | 7,08935141 | 1,9682E-09 | 1,7737E-07 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-1468 | 7,05627471 | 0,00012934 | 0,00210479 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-2285k-1 | 7,02415581 | 2,586E-08 | 1,1572E-06 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-2285k-4 | 7,02415581 | 2,586E-08 | 1,1572E-06 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-128-1 | 6,29608769 | 1,3818E-06 | 3,0918E-05 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-660 | 6,16156103 | 1,0963E-07 | 3,2706E-06 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-92b | 6,06953399 | 0,0001776 | 0,00264925 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-485 | 5,95700139 | 2,7245E-07 | 6,967E-06 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR155 | 5,13438498 | 1,9178E-05 | 0,00038143 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR16b | 5,06224994 | 5,0993E-05 | 0,00091277 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-2285k-2 | 4,73743023 | 0,00575374 | 0,04904379 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-2285k-3 | 4,73743023 | 0,00575374 | 0,04904379 | Blastulación <i>In vivo</i> |
| miR-Let7g | -4,96811155 | 0,00394696 | 0,04155921 | Eclosión <i>In vivo</i> |
| miR-320a-1 | -1,8980483 | 0,00192897 | 0,02158032 | Eclosión <i>In vivo</i> |
| miR-320a-2 | -1,8980483 | 0,00192897 | 0,02158032 | Eclosión <i>In vivo</i> |

Fuente: Elaboración Propia.

Anexo Tabla 5 CPM. miARNs secretados durante la etapa de blastulación y eclosión por embriones In vitro e In vivo.

| miARNs | CPM- PIV5-7 | miARNs | CPM-IVV5- 7 | miARNs | CPM- PIV7-9 | miARNs | CPM-IVV7- 9 |
|---------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|
| miR-9-1 | 1968,64688 | miR-6529a | 2538,67762 | miR-30d | 1174,29883 | miR-6529a | 1922,67249 |
| miR-9-2-2 | 1968,64688 | miR-6529b | 2538,67762 | miR-10b | 13447,6866 | miR-6529b | 1922,67249 |
| miR-30d | 4401,44404 | miR-9-1 | 259,571635 | miR-409b | 1996,63041 | miR-9-1 | 2327,81674 |
| mirR-10b | 25218,1781 | miR-9-2-2 | 259,571635 | miR-92b | 2507,45787 | miR-9-2-2 | 2327,81674 |
| mirR-409b | 140,438955 | miR-30d | 5846,01437 | miR-29a | 3512,18399 | miR-30d | 7721,30244 |
| miR-92a | 231,295273 | miR-10b | 97826,7499 | miR-92a-1 | 8952,96324 | miR-10b | 38380,6902 |
| miR-29a | 280,87791 | miR-409b | 4105,16941 | miR-92a-2 | 8952,96324 | miR-92b | 528,84719 |
| miR-92a-1 | 18898,8388 | miR-92b | 6569,22237 | miR-215 | 4529,99148 | miR-29a | 8373,98045 |
| miR-92a-2 | 15827,1365 | miR-29a | 2244,08357 | miR-122 | 58661,3965 | miR-92a-1 | 2347,27353 |
| miR-122 | 1762,56976 | miR-92a-1 | 16385,228 | miR-Let7f-1 | 5911,42017 | miR-92a-2 | 2347,27353 |
| miR-29b-2 | 421,316864 | miR-92a-2 | 16366,104 | miR-184 | 35820,0765 | miR-215 | 2634,36311 |
| miR-29c | 421,316864 | miR-215 | 181,677921 | miR-423 | 23724,3689 | miR-122 | 111415,378 |
| miR-29d-2 | 421,316864 | miR-122 | 295003,833 | miR-148a | 10890,1767 | miR-29b-2 | 1110,53091 |
| miR-29e | 421,316864 | miR-Let7f-1 | 4873,88745 | miR-186 | 25,2104926 | miR-29c | 1110,53091 |
| miR-Let7f-1 | 20731,6221 | miR-184 | 15279,0583 | miR-Let7f-2 | 6817,08788 | miR-29d-2 | 1110,53091 |
| miR-184 | 13073,9814 | miR-423 | 69170,3519 | miR-30c | 439,273677 | miR-29e | 1110,53091 |
| miR-423 | 2680,68819 | miR-142-2 | 47,8099793 | miR-423-2 | 1491,6689 | miR-Let7f-1 | 12657,3145 |
| miR-142-2 | 1038,0136 | miR-148a | 11886,2535 | miR-Let7d | 1019,43337 | miR-184 | 8268,48669 |
| miR-148a | 5192,3814 | miR-186 | 5297,90773 | miR-375 | 629,166824 | miR-423 | 37636,4643 |
| miR-186 | 874,074979 | miR-361 | 2885,79515 | miR-658 | 5532,0825 | miR-142-2 | 1079,36844 |
| miR-361 | 125,348314 | miR-Let7f-2 | 5292,21809 | miR-103-1 | 1244,09942 | miR-148a | 5162,36561 |
| miR-Let7f-2 | 20850,6866 | miR-30c | 105,181954 | miR-103-2 | 1244,09942 | miR-186 | 1083,66199 |
| miR-30c | 482,541652 | miR-423-2 | 2007,68737 | miR-191 | 6799,04029 | miR-361 | 918,980363 |
| miR-423-2 | 867,596174 | miR-Let7d | 62,1882677 | miR-Let7g | 1296,02215 | miR-Let7f-2 | 12668,2821 |
| miR-Let7d | 1951,2371 | miR-375 | 284,313329 | miR-23a | 108,417849 | miR-30c | 4,33481303 |
| miR-375 | 406,226223 | miR-658 | 2185,7406 | miR-183 | 14813,6997 | miR-423-2 | 2955,04708 |
| miR-103-1 | 1050,33447 | miR-103-1 | 513,950598 | miR-200b | 1323,00869 | miR-Let7d | 10,9676096 |
| miR-103-2 | 1050,33447 | miR-103-2 | 513,950598 | miR-107 | 840,922585 | miR-375 | 26,2700323 |
| miR-191 | 34423,0658 | miR-191 | 23172,9805 | miR-128-1 | 747,91128 | miR-658 | 1064,2354 |
| miR-451 | 14001,2882 | miR-451 | 688,729837 | miR-128-2 | 747,91128 | miR-191 | 9630,50213 |
| miR-Let7g | 8308,50206 | miR-Let7g | 184,018257 | miR-143 | 9267,80895 | miR-451 | 702,239711 |
| miR-148b | 119,064446 | miR-148b | 414,201161 | miR-144 | 507,583903 | miR-Let7g | 3135,83311 |
| miR-23a | 1947,33314 | miR-23a | 1752,60686 | miR-205 | 503,318497 | miR-148b | 1085,79335 |
| miR-183 | 12798,8591 | miR-183 | 10582,5374 | miR-2285k-1 | 428,578374 | miR-23a | 1699,23387 |
| miR-185 | 2593,14316 | miR-185 | 449,413805 | miR-2285k-4 | 428,578374 | miR-183 | 8057,60933 |

| | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| miR-128-1 | 231,295273 | miR-200b | 760,590344 | miR-320a-1 | 22675,2409 | miR-185 | 438,704386 |
| miR-128-2 | 370,70857 | miR-107 | 513,950598 | miR-320a-2 | 22675,2409 | miR-200b | 1288,49266 |
| miR-143 | 4068,16482 | miR-128-1 | 1659,94587 | miR-146b | 7705,63565 | miR-143 | 5566,716 |
| miR-144 | 1327,46101 | miR-128-2 | 792,994131 | miR-222 | 469,704507 | miR-205 | 10,9676096 |
| miR-205 | 1365,43128 | miR-143 | 5858,98771 | miR-26a-1 | 10903,805 | miR-320a-1 | 31134,434 |
| miR-320a-1 | 7674,47405 | miR-144 | 9,56199585 | miR-26a-2 | 10903,805 | miR-320a-2 | 31134,434 |
| miR-320a-2 | 7674,47405 | miR-205 | 473,205858 | miR-26c | 10903,805 | miR-146b | 2640,60044 |
| miR-146b | 2926,26085 | miR-2285k-1 | 2413,40159 | miR-455 | 781,52527 | miR-222 | 4,33481303 |
| miR-222 | 469,424165 | miR-2285k-4 | 2413,40159 | miR-30b | 16,8069951 | miR-26a-1 | 7781,33367 |
| miR-26a-1 | 10074,7566 | miR-320a-1 | 9656,62927 | miR-21 | 3890,67616 | miR-26a-2 | 7781,33367 |
| miR-26a-2 | 10074,7566 | miR-320a-2 | 9656,62927 | miR-2889 | 6888,87826 | miR-26c | 7781,33367 |
| miR-26c | 10074,7566 | miR-146b | 2459,2012 | miR-100 | 36968,1826 | miR-30b | 2516,9853 |
| miR-455 | 1105,92787 | miR-222 | 23,9402843 | miR-151 | 7785,39371 | miR-21 | 4049,33924 |
| miR-30b | 1231,07338 | miR-26a-1 | 20189,8422 | miR-30a | 369,969101 | miR-2889 | 23297,8271 |
| miR-21 | 6132,36748 | miR-26a-2 | 20189,8422 | miR-10a | 23468,0966 | miR-100 | 42589,8334 |
| miR-2889 | 708,231772 | miR-26c | 20189,8422 | miR-30e | 5199,38302 | miR-151 | 7112,6515 |
| miR-100 | 4054,52494 | miR-455 | 357,787929 | miR-378-2 | 4494,07585 | miR-30a | 1506,37032 |
| miR-151 | 3244,20612 | miR-30b | 28,6859876 | miR-101-1 | 41,1898692 | miR-10a | 12733,1428 |
| miR-30a | 3878,91415 | miR-21 | 3161,04835 | miR-101-2 | 41,1898692 | miR-30e | 2400,68775 |
| miR-10a | 24256,9471 | miR-2889 | 50495,7616 | miR-1246 | 6682,39441 | miR-378-2 | 2056,96517 |
| miR-30e | 1813,55909 | miR-100 | 34842,0634 | miR-3596 | 12642,026 | miR-101-1 | 1062,02919 |
| miR-378-2 | 1653,1769 | miR-151 | 19161,5377 | miR-Let7b | 12642,026 | miR-101-2 | 1062,02919 |
| miR-101-1 | 482,541652 | miR-30a | 1677,09606 | miR-Let7l | 928,395347 | miR-1246 | 7080,5603 |
| miR-101-2 | 482,541652 | miR-10a | 20321,7191 | miR-1-1 | 959,449819 | miR-3596 | 12781,8758 |
| miR-1246 | 3126,86743 | miR-30e | 796,11456 | miR-1-2 | 959,449819 | miR-Let7b | 12781,8758 |
| miR-3596 | 12407,3415 | miR-378-2 | 6216,16445 | miR-7-3 | 1511,8429 | miR-Let7l | 2181,19614 |
| miR-Let7b | 12407,3415 | miR-101-1 | 1939,7059 | miR-124a-1 | 4174,56569 | miR-1-1 | 45,3024326 |
| miR-Let7l | 11463,5062 | miR-101-2 | 1939,7059 | miR-12a-2 | 4174,56569 | miR-1-2 | 45,3024326 |
| miR-1-1 | 1219,18436 | miR-1246 | 5467,73152 | miR-124b | 4174,56569 | miR-7-3 | 515,842751 |
| miR-1-2 | 1219,18436 | miR-3596 | 10486,1045 | miR-125a | 4390,74374 | miR-124a-1 | 3121,16512 |
| miR-7-3 | 2865,71375 | miR-Let7b | 10486,1045 | miR-125b-1 | 12407,9493 | miR-124a-2 | 3121,16512 |
| miR-125a | 119,064446 | miR-Let7l | 727,553424 | miR-125b-2 | 12407,9493 | miR-124b | 3121,16512 |
| miR-125b-1 | 1162,92011 | miR-1-1 | 721,689182 | miR-15b | 25,2104926 | miR-125a | 6175,83973 |
| miR-125b-2 | 1162,92011 | miR-1-2 | 721,689182 | miR-182 | 12812,9618 | miR-125b-1 | 17616,0122 |
| miR-151-2 | 1351,36629 | miR-7-3 | 3174,25566 | miR-192 | 6368,45873 | miR-125b-2 | 17616,0122 |
| miR-155 | 119,064446 | miR-124a-1 | 1045,30199 | miR-22 | 325211,429 | miR-182 | 10147,611 |
| miR-15b | 2795,29068 | miR-124a-2 | 1045,30199 | miR-2285k-2 | 428,578374 | miR-192 | 5930,62809 |
| miR-182 | 14262,1625 | miR-124b | 1045,30199 | miR-2285k-3 | 428,578374 | miR-22 | 230454,137 |
| miR-192 | 1512,02045 | miR-125a | 11225,8443 | miR-2285k-5 | 428,578374 | miR-2285k-2 | 572,19532 |
| miR-22 | 33636,1142 | miR-125b-1 | 10566,7343 | miR-24-2 | 1413,1243 | miR-2285k-3 | 572,19532 |

| | | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| miR-24-2 | 1315,81454 | miR-125b-2 | 10547,6103 | miR-2478 | 665,446511 | miR-2285k-5 | 572,19532 |
| miR-25 | 3454,6504 | miR-1271 | 2570,24259 | miR-25 | 25,2104926 | miR-24-2 | 1088,19326 |
| miR-26b | 1211,86696 | miR-151-2 | 1897,94324 | miR-26b | 25,2104926 | miR-2478 | 322,056677 |
| miR-27a-2 | 7504,16381 | miR-155 | 749,612659 | miR-27a-2 | 11784,5353 | miR-27a-2 | 9871,96672 |
| miR-27b | 10651,4792 | miR-15b | 648,8583 | miR-27b | 17074,7838 | miR-27b | 13823,5396 |
| miR-2887-1 | 343,331163 | miR-182 | 9050,23185 | miR-2887-1 | 8266,14116 | miR-2887-1 | 5528,20025 |
| miR-2887-2 | 343,331163 | miR-192 | 18055,8049 | miR-2887-2 | 8266,14116 | miR-2887-2 | 5528,20025 |
| miR-3600 | 33636,1142 | miR-22 | 121796,941 | miR-2898 | 1692,20934 | miR-2898 | 490,59883 |
| miR-378-1 | 279,852252 | miR-2285k-2 | 2793,63362 | miR-3432a-1 | 1104,34312 | miR-3432a-1 | 2052,65036 |
| miR-409 | 377,542189 | miR-2285k-3 | 2793,63362 | miR-3432a-2 | 1422,53005 | miR-3432a-2 | 2052,65036 |
| miR-486 | 158578,076 | miR-2285k-5 | 2793,63362 | miR-3600 | 325211,429 | miR-3600 | 230454,137 |
| miR-7-2 | 2865,71375 | miR-24-2 | 1613,57421 | miR-378-1 | 2416,20797 | miR-378-1 | 2453,0302 |
| miR-99A-2 | 2278,46453 | miR-2478 | 223,820408 | miR-486 | 7511,45295 | miR-486 | 7654,17782 |
| miR-99B | 4644,61336 | miR-25 | 2920,84845 | miR-7-2 | 1026,98664 | miR-7-2 | 515,842751 |
| miR-127 | 119,064446 | miR-26b | 19,1239917 | miR-99a-2 | 20338,2366 | miR-99a-2 | 22017,0024 |
| miR-140 | 3383,47641 | miR-27a-2 | 3851,2086 | miR-99b | 2210,43604 | miR-99b | 10757,9148 |
| miR-16B | 5260,13337 | miR-27b | 11922,709 | miR-127 | 6093,77207 | miR-127 | 3497,52685 |
| miR-2890 | 357,193338 | miR-2887-1 | 7020,40322 | miR-140 | 8,40349753 | miR-1468 | 255,753969 |
| miR-Let7a-1 | 14725,1626 | miR-2887-2 | 7020,40322 | miR-1468 | 1519,29821 | miR-2890 | 6467,2457 |
| miR-Let7a-2 | 14725,1626 | miR-2898 | 296,421871 | miR-16b | 8,40349753 | miR-Let7a-1 | 6042,13813 |
| miR-Let7a-3 | 14725,1626 | miR-3432a-1 | 9448,27802 | miR-2890 | 7289,11821 | miR-Let7a-2 | 6042,13813 |
| MIR-Let7c | 3867,33707 | miR-3432a-2 | 9448,27802 | miR-Let7a-1 | 9698,50634 | miR-Let7a-3 | 6042,13813 |
| MIR-181a-1 | 2341,49903 | miR-3600 | 121796,941 | miR-Let7a-2 | 9698,50634 | miR-Let7c | 4513,80058 |
| MIR-181a-2 | 2341,49903 | miR-378-1 | 3338,97752 | miR-Let7a-3 | 9698,50634 | miR-181a-1 | 2408,01939 |
| MIR-23b-2 | 1170,59328 | miR-409a | 301,664333 | miR-Let7c | 5711,24068 | miR-181a-2 | 2408,01939 |
| | | miR-485 | 1135,84461 | miR-181a-1 | 1997,70979 | miR-23b-2 | 416,769166 |
| | | miR-486 | 8779,70235 | miR-181a-2 | 1997,70979 | | |
| | | miR-660 | 1320,17714 | miR-23b-2 | 129,617564 | | |
| | | miR-7-2 | 3179,07196 | | | | |
| | | miR-99a-2 | 16410,1248 | | | | |
| | | miR-99b | 11062,9717 | | | | |
| | | miR-127 | 11407,4525 | | | | |
| | | miR-140 | 28,6859876 | | | | |
| | | miR-1468 | 9366,07468 | | | | |
| | | miR-16B | 896,164972 | | | | |
| | | miR-2890 | 5986,78993 | | | | |
| | | miR-Let7a-1 | 7109,45079 | | | | |
| | | miR-Let7a-2 | 7119,01279 | | | | |
| | | miR-Let7a-3 | 7358,06268 | | | | |
| | | miR-Let7c | 3666,14898 | | | | |

| | |
|------------|------------|
| miR-181a-1 | 2819,05702 |
| miR-181a-2 | 2819,05702 |
| miR-23b-2 | 47,8099793 |

Fuente: Elaboración Propia.