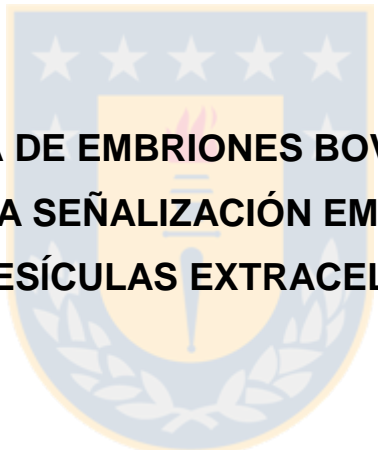




Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Veterinarias-Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias



**LA COMPETENCIA DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS  
*in vitro* MODIFICA LA SEÑALIZACIÓN EMBRIONARIA MEDIADA  
POR VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

EDWIN ALBERTO MELLISHO SALAS  
CHILLÁN-CHILE  
2018

Profesor Guía: Lleretny Rodríguez Álvarez, Ph.D  
Dpto. de Ciencia Animal, Facultad de Ciencia Veterinarias  
Universidad de Concepción, Chile

## **La competencia de embriones bovinos producidos *in vitro* modifica la señalización embrionaria mediada por vesículas extracelulares**

### **RESUMEN**

Las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por los blastocistos pueden ser relevantes, como un buen predictor de la competencia de los embriones producidos *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de miARN contenido en EVs secretadas por embriones bovinos con diferente velocidad de desarrollo *in vitro* y competencia pre-implantatoria. El trabajo fue abordado con dos experimentos. El primer experimento fue para identificar y caracterizar las EVs secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios. Para esto se consideró la secreción durante la etapa de desarrollo posterior a la blastulación (día 7-9 de desarrollo *in vitro*) y se incluyeron solo embriones protruidos para eliminar el efecto de la zona pelúcida. Además, se consideraron embriones producidos *in vitro* utilizando dos tecnologías que producen embriones con diferente competencia: 1) partenogénicos (PA), menos competentes y 2) *fecundación in vitro* (IVF), más competentes. Un segundo experimento fue para realizar una determinación no invasiva de competencia embrionaria considerando características de poblaciones de EVs secretadas durante la etapa de blastulación y parámetros morfocinéticos del embrión. Para esto, los embriones fueron cultivados en grupos, hasta el día 5 de desarrollo *in vitro*, en este momento se seleccionaron las mórulas, las cuales se cultivaron individualmente en SOFaa depletado hasta el día 7.5. Durante este periodo los embriones fueron monitoreados para determinar el momento de la aparición del blastocelo, como indicador cinético de desarrollo embrionario: 1) blastulación temprana (EB: Día 6.5) y 2) blastulación tardía (LB: Día 7.5). Al día 7.5, se determinaron las características morfológicas de los blastocistos siguiendo los criterios de la IETS. Al día 7.5, se colectó individualmente el medio de cultivo, se identificó con el embrión correspondiente y se conservó a -80 °C para posteriores análisis. Los blastocistos evaluados (día 7.5) fueron transferidos a medio SOFaa dep fresco hasta el día 11 de desarrollo *in vitro* para determinar su potencial de desarrollo post-eclosión, de acuerdo a su crecimiento. A los parámetros tamaño y concentración de EVs generados por Nano Tracking Analysis (NTA), se les realizó análisis de varianza y la comparación de medias test HSD. Posteriormente, las

variables de morfología del blastocisto y características morfológicas de las EVs fueron sometidas a análisis de componentes principales (PCA) y análisis de conglomerados (CA) para la posibilidad de discriminar los grupos de embriones. Finalmente, se utilizó un análisis de regresión logística binaria, para construir modelos no invasivos de predicción de competencia embrionaria. El análisis estadístico se realizó con el programa SAS versión ocho para Windows y programa IBM SPSS Statistics versión 19. En el experimento 1, el análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) reveló la presencia de vesículas heterogéneas de diferentes tamaños y población: microvesículas (MVs) y exosomas (EXs) de forma redondeada, encerrados por una capa doble de lípidos y con un rango de 30 a 385 nm de diámetro. Además, el análisis de citometría de flujo permitió identificar proteínas de superficie CD63 y CD9 como marcadores de EVs. El NTA generó datos sobre las características morfológicas de las EVs, tamaño y concentración. El perfil (concentración y tamaño) de partículas secretadas por embriones derivados de IVF, fue diferente a las secretadas por embriones PA. En el experimento 2, las características morfológicas de los blastocistos se diferenciaron estadísticamente de acuerdo con el momento de blastulación y competencia por su tamaño y calidad. Los embriones más competentes del grupo de blastulación temprana secretaron EVs con mayor tamaño (122.9 nm), mientras que la mayor concentración de EVs ( $5,75 \times 10^9$  partículas / ml) correspondió al grupo no competente. La secuenciación de ARN pequeños mostró un total de dos biotipos, miARN (86 a 91%) y snoARN (9 a 14%). Además, se identificó un total de 182 miARN y 32 snoARN. El análisis de expresión diferencial de miARN entre blastocisto competente versus no competente, mostró 12 miARN regulados positivamente y 15 miARN regulados negativamente. Posteriormente, utilizando una regresión logística binaria, se construyó un modelo no invasivo para predecir la competencia embrionaria basada en una combinación de variables morfocinéticas de blastocisto y las características de EVs los cuales mostraron un alto ROC-AUC de 0.853. En conclusión, en este trabajo se demostró que los blastocistos bovinos secretan MVs/EXs a los medios de cultivo y esta secreción tiene características que varía dependiendo de la competencia embrionaria previa a la implantación, por lo tanto, es posible generar un nuevo modelo predictivo no invasivo de alta eficiencia para la selección de embriones bovinos.