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

Modulación de la comunicación Embrio-Materna en Bovinos, mediante mecanismos alternativos y complementarios a Interferon Tau

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Veterinarias

CONSTANZA JAVIERA AGUILERA GONZÁLEZ
CHILLÁN-CHILE
2023

Profesor Guía: Lleretny Rodriguez Alvares
Dpto. de Ciencia Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepciòn

© Constanza Aguilera González. 2023

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

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

Profesor Guía

Dra. Lleretny Rodriguez-Alvarez
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

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

Dr. Oscar Peralta Troncoso
Escuela de Medicina Veterinaria
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Claudio Aguayo Tapia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Director (s) de Programa

Dr Sebastian Muñoz Leal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Este texto es producto del apoyo incondicional recibido por todas las personas que me acompañaron en este gran viaje que es el doctorado. Nombrar a todos en un orden específico va en demérito de cada aporte que han hecho en esta meta lograda.

Darle a gracias a la profesora Lleretny Rodriguez por su aporte académico en la elaboración de esta tesis como en su ejecución. A si mismo agradecer a la Universidad de Concepción que me permitió ser partícipe apoyándome con sus instalaciones y acogiéndome en su programa de doctorado en Ciencias Veterinarias.

También quiero agradecer profundamente el soporte emocional brindado por mi familia en los momentos de dificultad.

A todos mis compañeros del programa en especial a Joel Cabezas por sus palabras de aliento, a Daniel Veraguas por su cálida amistad, a Diego Caamaño por su buena disposición en el trabajo, a Miguel Gutierrez, ya que sin su gran contribución este trabajo no seria posible. También a Yat Sen Wong por su crucial aporte en el análisis e interpretación de datos y su querida compañía en el proceso del programa. No puedo no nombrar a Diana Echeverry ya que fue un pilar fundamental en mi formación en el laboratorio.

A la beca nacional de doctorado de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, entidad que me ayudo a financiar gran parte de mis estudios de Doctorado de 4 años.

Gracias a la vida que me ha dado tanto
me dio dos luceros, que cuando los abro
perfecto distingo lo negro del blanco

Violeta Parra 1966

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por: FONDECYT REGULAR 1210334 (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico) y la beca nacional de doctorado número 21201060 de la “Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo”.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS ..... *ix*
ÍNDICE DE FIGURAS ..... *x*
ÍNDICE DE ANEXOS ..... *xii*
RESUMEN ..... *xiii*
ABSTRACT ..... *xiv*
I. INTRODUCCIÓN *1*
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA *4*
1. Desarrollo pre-implantatorio *4*
2. Desarrollo embrionario peri-implantatorio *5*
3. Efecto de los sistemas in vitro en el desarrollo embrionario *8*
4. Comunicación embrio-materna *11*
4.1 Comunicación del embrión con células oviductales **11**
4.2 Comunicación del embrión con células endometriales **14**
5. Vesículas extracelulares *22*
5.1 Caracterización **22**
5.2 Biogénesis **23**
5.3 Cargo **25**
5.4 Rol Biológico **27**
III. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA *30*
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS *33*
Hipótesis *33*
Objetivo General *33*
Objetivos Específicos *33*
V. MATERIALES Y MÉTODOS *34*
1. Diseño experimental *34*
2. Metodologia de investigación y desarrollo *40*
1) Lugar **40**
2) Producción de embriones **40**
a. Producción de embriones in vivo **40**
b. Producción de embriones in vitro **42**
Colecta de ovocitos y maduracion in vitro **42**
Fecundación in vitro (IVF) **42**

Cultivo in vitro **43**

3) Aislamiento y Caracterización de las vesículas extracelulares embrionarias **43**

a. Análisis de microscopía electrónica de transmisión **44**

b. Evaluación de los marcadores de superficie **45**

c. Análisis de seguimiento de nanopartículas **45**

4) Producción de líneas celulares endometriales **46**

5) Análisis del efecto de las vesículas extracelulares embrionarias sobre células epiteliales endometriales **47**

a. Internalización **47**

b. Análisis transcriptómico **47**

c. Análisis bioinformático de los datos de RNAseq (Experimento 2) **49**

d. Validación de los datos de secuenciación mediante RT-qPCR **50**

6) Métodos asociados al experimento 3 ..... **51**

a. Aislamiento de vesículas extracelulares provenientes de fluido uterino y medio de cultivo celular **51**

b. Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares de células endometriales en embriones bovinos producidos in vitro **52**

c. Evaluación de la calidad embrionaria en base a morfología y expresión génica **53**

d. Extracción de ARN y transcripción reversa de embriones bovinos pre-implantatorios **54**

e. Análisis de expresión génica de blastocistos bovinos pre-implantatorios, mediante qPCR **54**

3. Análisis estadístico ***56***

VI. RESULTADOS ***57***

Experimento 1: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación de embriones producidos in vitro e in vivo sobre células epiteliales endometriales in vitro **57**

Caracterización de nanopartículas colectadas de medios de cultivo embrionario **57**

Evaluación de la Internalización de vesículas extracelulares **60**

Análisis de la transcriptómica en células epiteliales endometriales **61**

Validación de los datos la secuenciación de RNA utilizando el análisis de transcripción reversa PCR **68**

Ontología de genes **70**

Experimento 2: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones durante los días 7-9 sobre las células epiteliales endometriales **72**

Caracterización de las vesículas extracelulares de embriones producidos in vivo e in vitro al día 7-9 de desarrollo **73**

Evaluación de la internalización de vesículas extracelulares provenientes de embriones bovinos producidos in vitro e in vivo, por parte de las células epiteliales endometriales bovinas en cultivo 75

Análisis de expresión génica de células endometriales expuestas a EVs de embriones bovinos producidos in vitro (EVs-IVP) e in vivo (EVs-IVV) durante los días 7-9 de desarrollo 76

Experimento 3: Evaluación de la internalización y el efecto de las EVs provenientes de células epiteliales endometriales in vitro e in vivo sobre el desarrollo y calidad embrionaria.. 79

Caracterización de las EVs provenientes de fluido uterino y células epiteliales endometriales 79

Evaluación de la internalización de las EVs provenientes de fluido uterino y células epiteliales endometriales por parte de embriones bovinos producidos in vitro. 82

Análisis del potencial de desarrollo in vitro y calidad embrionaria de embriones tratados con EVs derivadas de células endometriales y fluido uterino 84

VII. DISCUSIÓN 91

VIII. CONCLUSIONES 100

IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO 101

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de partidores específicos para evaluar expresión génica de células endometriales expuestas a vesículas extracelulares provenientes de embriones bovinos pre-implantatorios producidos in vitro e in vivo (Experimento1 y 2). **50**

Tabla 2. Secuencias de los partidores que se utilizaron para determinar calidad de los embriones pre-implantatorios bovinos expuestos a vesículas extracelulares de células endometriales en un modelo in vitro e in vivo. **55**

Tabla 3. Tamaño y concentración de la población de EVs secretadas durante la blastulación (días 5-7 de desarrollo embrionario) por embriones producidos in vitro e invivo. **58**

Tabla 4. Evaluación de los marcadores de superficie CD63, CD40, CD9 y CD81 en EVs secretadas durante la blastulación de embriones bovinos producidos in vitro o in vivo. **59**

Tabla 5. Genes asociados a la señalización de IFNT o función endometrial que están significativamente desregulados en las células epiteliales endometriales debido al efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos producidos in vivo (EVs- EVs-IVV) o in vitro (EVs-IVP). log2FC: log2 de las razones medias de expresión. Los genes se consideraron diferencialmente expresados cuando log2FC > 0,5 o < -0,5 y FDR < 0,05. ..... **65**

Tabla 6. Genes relacionados con función endometrial y señalización de Interferón tau con diferencias significativas entre los tratamientos EVs liberadas por embriones producidos in vivo (IVV) o in vitro (IVP). log2FC: log2 de las razones medias de expresión. Los genes se consideraron diferencialmente expresados cuando log2FC > 0,5 o < -0,5 y FDR < 0,05. ..... **66**

Tabla 7. Descriptores estadísticos de nanopartículas provenientes de medio de cultivo de embriones producidos in vivo e in vitro durante los días 7-9 de desarrollo. **74**

Tabla 8. Evaluación de los marcadores de superficie CD9, CD63, CD81 y CD40 en EVs secretadas por embriones producidos in vitro e in vivo durante los días 7-9 de desarrollo. **74**

Tabla 9. Descriptores estadísticos del análisis de seguimiento de partículas (NTA) para EVs provenientes de fluido uterino y medio de cultivo de células endometriales. **80**

Tabla 10. Evaluación de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo en vesículas extracelulares aisladas a partir de fluido uterino (EV-UF) y medio de cultivo de células endometriales bovinas (EVC). **82**

Tabla 11. Desarrollo de embriones producidos in vitro (experimento 3). **84**

Tabla 12. Descriptivo estadístico de los diámetros de embriones bovinos pre- implantatorios según el tratamiento y los respectivos días. **86**

Tabla 13. Análisis de anova anidado entre las variables tratamiento y tiempo anidado en tratamiento (tratamiento: factor (día)) que determinan diferencias en el diámetro de embriones pre-implantatorios bovinos **87**

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño Experimento 1: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación de embriones producidos in vitro e in vivo sobre células epiteliales endometriales in vitro. Se utilizaon 3 replicas técnicas por tratamiento.EVs: Vesículas extracelulares secretadas por embriones producidos in vitro o in vivo durante la blastulación (D5-7). 36

Figura 2. Diseño Experimento 2: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares producidas por blastocistos (día 7-9) bovinos producidos in vitro e in vivo en la expresión de genes asociados a la respuesta endometrial durante el periodo-pre-implantatorio..... 38

Figura 3. Diseño experimento 3: Evaluación del efecto de las EVs secretadas por células endometriales cultivadas in vitro e in vivo sobre la calidad y desarrollo de embriones pre-implantatorios bovinos. 40

Figura 4. Distribución de nanopartículas de EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro (A) o in vivo (B) durante el periodo de blastulación (mórula- blastocisto). El gráfico representa un promedio de replicados técnicos, basados en el diámetro, concentración y distribución de nanopartículas..... 58

Figura 5. EVs secretadas por embriones bovinos durante el periodo de blastulación (mórula a blastocisto). a: imágenes representativas de EVs aisladas de medio de cultivo de embriones producidos in vivo. b: imágenes de EVs aisladas de medios de cultivo de embriones producidos in vitro..... 60

Figura 6. Imágenes fluorescentes de células epiteliales endometriales incubadas con EVs secretadas durante la blastulación (días 5-7) por embriones bovinos producidos in vivo (EVs-IVV) o in vitro (EVs-IVP). A) EVs secretadas por embriones producidos in vitro. B) Evs secretadas por embriones producidos in vivo. C) control negativo (PBS / PHK67). Las células fueron incubadas con vesículas teñidas durante 24 horas. Flechas destacan los puntos verdes en el citoplasma celular, indicando EVs internalizadas..... 61

Figura 7. Análisis de componentes principales (PCA) de células epiteliales endometriales (bEECs) de los diferentes grupos de tratamientos (EVs-IVP, EVs-IVV y control). PCA fue construido utilizando el progama R, construido en base al log de Fold change de la expresion génica. Dos principales componentes fueron graficados, utilizando los 3 tratamientos (EVs-IVP, EVs-IVV y control) indicados con diferentes colores y formas. Los procentajes de varianza explicados por el componente principal 1 (48%) y componente principal 2 (36%). 63

Figura 8. A y B: Volcano plot mostrando el efecto de vesículas extracelulares provenientes de embriones bovinos en el patrón de expresión génico de células epiteliales endometriales. A: volcano plot con la compración EVs-IVV/control. B: Volcano plot con la comparación EVs-IVP/control. C: Número de genes desregulados (regulados a la alta o baja) mediante comparación EVs-IVP/control y EVs-IVV. D: Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados de los tres analsis. El diagrama de Venn fue construido utilizando Venny 2.1 https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/. 64

Figura 9. Mapa de calor del patrón de expresión en genes relacionados con la señalización de Interferón tau (FNT) y función endometrial en células epiteliales de endometrio bovino incubadas

con vesículas extracelulares (EVs) liberadas durante el periodo de blastulación por embriones bovinos producidos in vivo (IVV) o in vitro (IVP). Control, células incubas con PBS..... 67

Figura 10. Efecto de las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por embriones bovinos producidos in vivo (IVV) o in vitro (IVP) en el patrón de expresión génico de células epiteliales endometriales. A la derecha, volcano plot mostrando el efecto de EVs-IVV en comparación con las EVs-IVP en términos de genes desregulados en las células epiteliales endometriales. A la izquierda, Número de genes desregulados (regulados a la alta o baja) mediante comparación EVs-IVV/EVs-IVP. 68

Figura 11. Gráfico de análisis de correlación entre el valor de ARNseq y RTqPCR de cada gen evaluado. Se observa una tendencia similar para el valor de expresión génica detectado por la secuenciación (ARNseq) y RT-qPCR en las células tratadas con EVs-IVP y EVs-IVV Para evaluar correlación entre los valores de expresión génica se realizó como prueba estadística una correlación de Pearson. 69

Figura 12. Análisis de ontología de genes (G.O) basado en los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre los tres grupos de tratamiento EVs-IVV /control (a), EVs-IVP/control (b) y EVs-IVP / EVs-IVV (c). Las vías de señalización significativas fueron clasificadas como procesos biológicos 8BP), componentes celulares (CC) y función molecular (MF). 72

Figura 13. Representación gráfica de la distribución de nano partículas según su concentración y diámetro. A) Nano partículas provenientes de embriones producidos invitro durante los días 7-9 de desarrollo, B) Nano partículas provenientes de embriones producidos in vivo durante los días 7-9 de desarrollo. 73

Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro e in vivo durante los días 7-9 de desarrollo. a-b EVs aisladas de medio de cultivo de embriones bovinos producidos in vivo. c-d EVs aisladas de medio de cultivo embriones producidos in vitro. 75

Figura 15. Imágenes fluorescentes de células epiteliales endometriales cultivas con EVs previamente teñidas con PKH67 que fueron liberadas al medio de cultivo por embriones bovinos producidos in vitro (EVs-IVP 7-9) e in vivo (EVs-IVV 7-9) durante los días 7-9 de desarrollo. a) EVs de embriones producidos in vivo. b) EVs de embriones producidos in vitro. c) control (PBS / PKH67). 76

Figura 16. Expresión relativa de ARNm de genes vinculados a función endometrial y respuesta a interferón tau. Se utilizó el test Kruskall wallis para determinar diferencias significativas entre los grupos. Se considera diferencia estadísticamente significativa con valor de $p<0,05$, graficado con asteriscos, estableciendo diferencias estadísticamente significativas respecto al control (PBS). 78

Figura 17. Análisis del seguimiento de partículas provenientes tanto de fluido uterino como de medio de cultivo de células endometriales. a) Distribución de nanopartículas provenientes de fluido uterino, b) Distribución de nanopartículas provenientes de cultivo de células endometriales. 79

Figura 18. Imágenes de microscopia electrónica de transmisión para evaluar morfología en los aislados de EVs provenientes de fluido uterino (EV-UF) (a y b) y medio de cultivo de células endometriales (EVC) (c y d). 81

Figura 19. Internalización de EVs provenientes de fluido uterino (EV-UF) y cultivo de células endometriales (EVC) por parte de embriones bovinos producidos in vitro al día 6 y 8 de desarrollo embrionario. Los embriones fueron cultivados durante 24 horas con 83

Figura 20. Porcentaje de blastocistos expandidos (panel izquierdo) y protruidos (panel derecho) en relación al tratamiento a los días 7 y 9 de desarrollo in vitro. Análisis estadístico mediante prueba de Kruskall Wallis, post hoc Wilcoxon. Se consideró P<0,05 para establecer diferencias estadísticamente significativas. 85

Figura 21. Representación de los diámetros de embriones pre-implanatatorios bovinos producidos in vitro en relación a los días de desarrollo y tratamientos. EV-UF: Vesículas extracelulares derivadas de líquido folicular o de medio de cultivo de células endometriales: EVC. Contro: PBS. El eje X representa los días del desarrollo embrionario en los que se adicionaron las vesículas o PBS al medio de cultivo..... 87

Figura 22. Expresión relativa de ARNm de genes vinculados a a) apoptosis, b) estrés oxidativo, c) calidad embrionaria, d) metabolismo de la glucosa e implantación en embriones bovinos pre-implantatorios producidos in vitro. Prueba estadística anova y post hoc tuckey, diferencias significativas fueron consideradas con un valor de p<0,05. 90

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Figura 1 Inmunocitoquímica de citoqueratina. a) células epiteliales positivas a citoqueratina, b) células negativas al marcador de células estromales vimentina. 101

Anexo 2 Tabla 1. Comparación de los términos mediante prueba estadística Tuckey 101

Modulación de la comunicación embrio-materna en bovinos, mediante mecanismos alternativos y complementarios a interferón tau

RESUMEN

La comunicación embrio-materna se establece desde los primeros estadios del desarrollo embrionario y es esencial para la implantación. En bovinos, la molécula clave para el reconocimiento de la gestación es interferón tau (IFNT), la cual es secretada por el conceptus al día 16 de la gestación. Sin embargo, se ha determinado que el embrión en estadio de blastocisto es capaz de producir IFNT. Por otra parte, el embrión es capaz de secretar vesículas extracelulares (EVs) las cuales, se ha descubierto recientemente, juegan un papel importante en la comunicación que establece el embrión con el endometrio. Esto debido a que las EVs son nano partículas que poseen como cargo moléculas con actividad biológica. Recientemente, se ha determinado que el embrión en estadios tempranos de desarrollo, es capaz de inducir una respuesta diferente en las células endometriales epiteliales (bEECs) a través de sus EVs según el tipo de producción embrionaria (in vivo, in vitro). Asimismo, se demostró que las EVs maternas, también presentan diferencias en su cargo al ser obtenidas mediante cultivo de celular (producción in vitro) en comparación a su obtención bajo condiciones in vivo. El objetivo de este trabajo fue determinar, si las condiciones de producción in vitro Modifican la comunicación embrio-materna establecida a través de las EVs. Para ello se buscó primero determinar, si las EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vivo e in vitro durante el periodo pre-implantatorio inducen modificaciones transcriptomicas, activando la señalización de IFNT en las bEECs. Para ello, se evaluó si durante el desarrollo embrionario temprano (blastulación, días 5-7 de desarrollo), las EVs de los embriones producidos in vitro (EVs-IVP) e in vivo (EVs-IVV), inducían una respuesta diferente a nivel transcriptómico en las bEECs. Junto con ello, se buscó determinar el efecto de las EVs provenientes de embriones en estadio más avanzado de desarrollo (día 7-9) producidos tanto in vitro como in vivo, en la expresión genes vinculados a función endometrial y señalización de IFNT en las bEECs. Parte del objetivo de este trabajo fue también determinar el efecto del sistema de producción in

vitro en las EVs provenientes de células endometriales. Para ello, se evaluó el efecto de EVs provenientes de fluido uterino (EV-UF) y de cultivo celular (EVC) en el desarrollo pre-implantatorio (Día 5-9 de desarrollo) de embriones bovinos producidos in vitro. Para obtener las EVs embrionarias del periodo de blastulación (5-7 de desarrollo), mórulas bovinas producidas in vitro e in vivo fueron cultivadas individualmente por 48 horas para posteriormente aislar desde el medio de cultivo las EVs embrionarias. Una vez obtenidas, las EVs fueron teñidas con PKH67 y añadidas al medio de cultivo de bEECs para evaluar su internalización. Posteriormente se evaluó el perfil transcriptomico de las bEECs mediante secuenciación del ARN mensajero. Tanto las EVs-IVV como las EVs-IVP indujeron la expresión de genes clásicos y no clásicos inducidos por interferón (ISGs) y otras vías de señalización vinculadas a función endometrial en bEECs. Un número mayor de genes diferencialmente expresados fueron inducidos por EVs-IVP (3552) en comparación a las EVs-IVV (1838). En el análisis de ontología de genes, se demostró que las EVs-IVP/IVV inducen una regulación a la alza de la vía de señalización extracelular de exosomas, respuesta de las células ante estímulos y procesos de modificación de proteínas. Respecto al efecto en las bEECs de las EVs-IVP/IVV provenientes de embriones de día 7-9 de desarrollo, blastocistos expandidos fueron cultivados individualmente por 48 horas para el aislamiento de sus EVs. Posteriormente se evaluó la internalización de las EVs embrionarias por parte de las bEECs para luego determinar la expresión génica mediante RT-qPCR. Se determinó que los genes no clásicos inducidos por IFNT lograron ser activados en las bEECs únicamente por las EVs-IVP. Por último, en relación al efecto de las EVs provenientes de EVC y EV-UF en el desarrollo embrionario, las EVC lograron inducir una activación de genes viculados a pluripotecia, mientras que las EV- UF indujeron una mayor expresión de IFNT por parte de los embriones bovinos además de un incremento sostenido durante el desarrollo del diámetro y tendencia a mayor cantidad de blastocistos expandidos y protruidos.

Modulation of embryo-maternal communication in cattle, through alternative and complementary mechanisms to interferon tau

ABSTRACT

Embryo-maternal communication is established from the first stages of embryonic development and is essential for implantation. In bovines, the key molecule for pregnancy recognition is interferon tau (IFNT), which is secreted by the conceptus on day 16 of gestation. However, it has been determined that the blastocyst stage embryo is capable of producing IFNT. On the other hand, the embryo is capable of secreting extracellular vesicles (EVs) which, recently discovered, play an important role in the communication that the embryo establishes with the endometrium. This is because EVs are nanoparticles that have molecules with biological activity as charge. Recently, it has been determined that the embryo in early stages of development is capable of inducing a different response in endometrial epithelial cells (bEECs) through its EVs depending on the type of embryonic production (in vivo, in vitro). Likewise, it was shown that maternal EVs also present differences in their charge when obtained by cell culture (in vitro production) compared to their obtaining under in vivo conditions. The objective of this work was to determine if the in vitro production conditions could modify the embryo-maternal communication established through the EVs. To do this, we first sought to determine if the EVs secreted by bovine embryos produced in vivo and in vitro during the pre-implantation period were able to induce transcriptomic modifications, activating IFNT signaling in bEECs. For this, it was evaluated whether during early embryonic development (blastulation, days 5-7 of development), the EVs of the embryos produced in vitro (EVs-IVP) and in vivo (EVs-IVV), induced a different response at the level of the embryo. transcriptomic in the bEECs. Along with this, we sought to determine the effect of EVs from embryos in a more advanced stage of development (day 7-9) produced both in vitro and in vivo, on the expression of genes linked to endometrial function and IFNT signaling in bEECs. Part of the objective of this work was also to determine the effect of the in vitro production system on EVs from endometrial cells. For this, the

effect of EVs from uterine fluid (EV-UF) and cell culture (EVC) on pre-implantation development (Day 5-9 of development) of bovine embryos produced in vitro was evaluated. To obtain the embryonic EVs from the blastulation period (5-7 years of development), bovine morulae produced in vitro and in vivo were cultured individually for 48 hours to later isolate the embryonic EVs from the culture medium. Once obtained, the EVs were stained with PKH67 and added to the bEECs culture medium to assess their internalization. Subsequently, the transcriptomic profile of the bEECs was evaluated by messenger RNA sequencing. Both EVs-IVV and EVs-IVP induced the expression of interferon-induced classical and non-classical genes (ISGs) and other signaling pathways linked to endometrial function in bEECs. A greater number of differentially expressed genes were induced by EVs-IVP (3552) compared to EVs-IVV (1838). In gene ontology analysis, it was shown that EVs-IVP/IVV induce an upregulation of the exosome extracellular signaling pathway, cell response to stimuli, and protein modification processes. Regarding the effect on the bEECs of the EVs-IVP/IVV from embryos on day 7-9 of development, expanded blastocysts were cultured individually for 48 hours for the isolation of their EVs. Subsequently, he evaluated the internalization of the embryonic EVs by the bEECs to later evaluate gene expression by RT-qPCR. It was determined that non-classical genes induced by IFNT were able to be activated in bEECs only by EVs-IVP. Finally, in relation to the effect of the EVs from EVC and EV-UF on embryonic development, the EVCs managed to induce an activation of genes linked to pluripotency, while the EV-UF induced a greater expression of IFNT by the bovine embryos, in addition to a sustained increase in diameter during development and a tendency to a greater number of expanded and protruded blastocysts.

I. INTRODUCCION

En bovinos, el desarrollo embrionario comienza con la formación del cigoto, iniciándose la etapa de segmentación que conlleva a la creación de una estructura multicelular, desarrollándose más tarde la mórula en el estadio de 16 células (Valadão et al., 2019). La primera diferenciación celular ocurre durante la blastulación, formándose el blastocisto, momento en el que un grupo de células origina el macizo celular interno (MCI) y otro el trofoectodermo (Harris et al., 2013). El MCI se caracteriza por ser células pluripotentes que darán lugar a tejido embrionario y extraembrionario, mientras que el trofoectodermo dará lugar a tejido extraembrionario, placenta, que participa en el reconocimiento molecular y físico de la gestación (Harris et al., 2013).

Los primeros 4 días del desarrollo embrionario en bovinos transcurren en el oviducto, lugar donde el embrión comienza su comunicación con el ambiente materno (Maillo et al., 2016). El oviducto proporciona los nutrientes y factores que requiere el embrión para su normal desarrollo dentro de los cuales se encuentran los factores de crecimiento como factor de crecimiento fibroblastoide (FGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento transformante beta (TGFb), entre otros (Maillo et al., 2016). En este período se producen eventos críticos para el desarrollo como la primera división celular, activación de genoma embrionario (EGA) y compactación de la mórula (Rizos et al., 2010). El oviducto tiene la capacidad de censar la presencia y características de los embriones, estableciéndose una comunicación recíproca. En equinos, solo aquellos ovocitos fecundados son transportados al útero (Betteridge y MitchellI 1974). De forma similar, en murinos, los ovocitos fecundados son transportados con mayor rapidez al útero en comparación a los no fecundados (Ortiz et al., 1986).

En sistemas in vitro, el fluido oviductal mejora la calidad y competencia de embriones bovinos (Lopera-Vasquez et al., 2017) de igual forma que el co-cultivo con células oviductales (Schmaltz-Panneau et al., 2015). Además, se ha demostrado en bovinos y otras especies, que las células oviductales inducen modificaciones en la expresión génica en el embrión. Durante los últimos años también se ha demostrado que el

embrión induce cambios en las células oviductales (Cordova et al., 2014; García et al., 2017). Ello evidencia la comunicación recíproca presente entre el oviducto y el embrión. Una vez que el embrión llega al útero, se establece una comunicación mediada por diversas moléculas. En bovinos, el útero secreta moléculas como CFS2 (factor estimulador de colonias 2), IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo1), bFGF (factor de crecimiento fibroblastoide), entre otras, las que permiten mejorar el desarrollo embrionario mediante un aumento en la proliferación celular, disminución de la apoptosis e incremento de la protrusión de los blastocistos (Hansen et al., 2014; Neira et al., 2010). A su vez el embrión posee receptores para las moléculas secretadas por el endometrio (Hansen et al., 2014) como receptores para el factor CFS2 e IGF1 entre otras (Mamo et al., 2012).

Además de la comunicación mediada por moléculas específicas, durante los últimos años se ha demostrado que las vesículas extracelulares (EVs) juegan un papel importante en la comunicación embrio-materna tanto en el oviducto como en el útero (Almiñana y Bauersachs, 2020). Las EVs se han descrito con un nuevo mecanismo de comunicación intracelular, participando en procesos tanto fisiológicos como patológicos. Las EVs son capaces de transportar grupos de moléculas, incluyendo microARNs, mARNS, proteínas, lípidos y ADN, las cuales son protegidas de la degradación mediante una bicapa lipídica. De esta forma, las EVs pueden interactuar con células cercanas o distantes, pudiendo provocar cambios funcionales en las células diana.

Se ha observado en bovinos que las proteínas de EVs provenientes de fluido oviductal son internalizadas por el embrión, mejorando su calidad y desarrollo (Almiñana et al., 2017). Así mismo, en patologías como endometritis, las EVs de pequeño tamaño, liberadas por el endometrio, contienen miARNs que son perjudiciales para el desarrollo embrionario (Wang et al., 2019). Además, en humanos, las EVs liberadas por el endometrio interactúan con el trofoblasto y promueven su crecimiento y diferenciación (Kurian y Modi, 2018). En humanos las EVs liberadas desde la placenta establecen una inmunotolerancia en el ambiente uterino necesaria para el desarrollo de la preñez (Kurian y Modi, 2018). Se ha demostrado que los embriones pre-implantatorios (en varias especies), secretan EVs desde los primeros estadios de desarrollo (Saadeldin et

al., 2014; Lee et al., 2015; Mellisho et al., 2017; Pavani et al., 2018; Dissanayake et al., 2020; Simon et al., 2020). Estas EVs secretadas por embriones tempranos son capaces de modificar la expresión génica de las células endometriales (Es-Haghi et al., 2019). Por tanto, el endometrio podría estar recibiendo "información" del embrión antes que este llegue al útero y antes que se secreten las señales clásicas de reconocimiento de la gestación (interferón tau en bovinos) (Almiñana y Bauersachs, 2020). Esto sugiere que las EVs están vinculadas a una comunicación recíproca entre el embrión y el ambiente materno.

Por otra parte, la producción de embriones in vitro posee inconvenientes que no han podido ser solucionados, como las bajas tasas de formación de blastocistos (30-40%) (Rizos et al., 2008) y bajas tasas de preñez que no superan el 40% (Peterson y Lee, 2003). Parte de estas alteraciones pueden deberse al sistema de producción *in vitro*. Los embriones producidos in vitro sufren cambios significativos en los patrones de expresión génica como mecanismo de adaptación para continuar el desarrollo en condiciones no naturales (Wrenzycki et al., 2005b). Cuando los embriones son producidos in vitro, en la mayoría de las especies, como bovinos, estos son transferidos directamente al útero, en estado de blastocisto. Por tanto, el embrión no recibe factores aportados por el oviducto, pero el ambiente materno, en especial el endometrio, no recibe señales embrionarias durante los primeros días de desarrollo. Esto podría explicar, en parte, la baja tasa de implantación cuando los embriones son producidos in vitro.

Este trabajo se enfoca en los mecanismos que median la comunicación embrio-materna en el endometrio, los cuales garantizan el desarrollo embrionario y más tarde la implantación y continuidad de la gestación. Dentro de estos mecanismos, se resaltará el papel de las EVs y como los sistemas de producción in vitro pueden modificar el rol de las EVs en la comunicación bidireccional que ocurre entre el embrión y el componente materno

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

1. Desarrollo pre-implantatorio

La etapa pre-implantatoria está definida por el intervalo entre la fecundación y la implantación. En bovinos, al día 4 posterior a la inseminación, el 60% de los embriones permanece en el oviducto, mientras que al día 5 y 6 el 80 y 91% respectivamente se encuentran en el inicio craneal del cuerno uterino (Hackett et al., 1993). Para que ocurra la fecundación existen puntos cruciales como lo son: paso del espermatozoide por la corona radiata, penetración de la zona pelúcida, fusión de las membranas, reanudación de la meiosis del ovocito, formación de pronúcleo masculino, disolución de las membranas de los pronúcleos, condensación de los cromosomas y primera división mitótica (Valadão et al., 2019).

La fecundación conlleva a la formación del embrión unicelular, el cigoto, el cual experimenta sucesivas divisiones mitóticas que marcan la etapa de segmentación. Esta etapa se caracteriza por el incremento el número de células o blastómeras sin aumento del volumen citoplasmático lo que implica que con cada división estas células disminuyen su tamaño (Valadão et al., 2019).

A medida que avanza el proceso de segmentación, la reducción de la proporción entre el volumen citoplasmático y nuclear conlleva a cambios en el destino celular e inicio del proceso de compactación. En bovinos, la compactación se produce en el estadio de 16 células, observándose un aumento en el contacto entre las blastómeras, dando origen a un clúster de células compactas, la mórula (Valadão et al., 2019). En la mórula se define el destino celular y se induce la primera diferenciación celular, la cual se evidencia con la formación del blastocisto.

En bovinos, la etapa de blastulación se inicia al día 6.5 aproximadamente, observándose la formación de una cavidad llena de líquido, el blastocele. Este líquido está compuesto de proteínas, vesículas extracelulares y ácidos nucleicos (Jensen et al., 2014; Battaglia et al., 2019). El blastocele se expande y al día 7 ocupa alrededor del 75 % del blastocisto (Van Soom et al., 1997). Esta diferenciación celular está dirigida por la expresión selectiva de genes de pluripotencia. En bovinos OCT4 (Factor

de transcripción de dominio POU Pou5f) está presente durante todo el desarrollo embrionario pre-implantatorio (Khan et al., 2012). En la formación de blastocistos, OCT4 establece las características de pluripotencia en las células del MCI (macizo celular interno) (Kurosaka et al., 2004). En el blastocisto, la expresión de la proteína Oct4 ocurre tanto en el macizo celular interno (MCI) como en el trofoectodermo (TE) (Khan et al., 2012). En bovinos una disrupción del gen OCT4 impide la formación de blastocistos, sin embargo, la expresión de SOX2 (SRY-related HMG-box containing factor) no se ve afectada (Simmet et al., 2018). SOX2 cumple una función en conjunto e independiente con OCT4 para mantener las características de pluripotencia en las células del MCI (Daigneault et al., 2018). Al igual que OCT4, su transcripto se encuentra presente en todo el desarrollo embrionario, y es expresado como proteína principalmente en el MCI del blastocisto bovino sin estar presente en él TE (Khan et al., 2012).

Por otra parte, en bovinos la expresión de OCT4 es necesaria para el establecimiento de MCI ya que también controla la expresión de otros transcriptos asociados a pluripotencia. El bloqueo de la expresión de OCT4 genera una expresión aberrante de CDX2 (Tipo caudal Homeobox 2) (Daigneault et al., 2018) y una disminución en la expresión de NANOG (Factor de transcripción de Homeobox Nanog) en el MCI (Simmet et al., 2018). Oct4, Nanog y Sox2 son los factores de transcripción que determinan el linaje pluripotente de las células del MCI (Khan et al., 2012). Él TE está determinado por la expresión de Cdx2 y a diferencia de los murinos, Oct4 no reprime la expresión de Cdx2 en él TE (Berg et al., 2011).

2. Desarrollo embrionario peri-implantatorio

En humanos y murinos, la implantación comienza una vez que el blastocisto es liberado de la zona pelúcida. Sin embargo, en bovinos al igual que en otras especies de implantación tardía, existe una ventana peri-implantatoria de desarrollo embrionario previa a la implantación (Sánchez et al., 2019). Esta etapa culmina 2 semanas posterior a la formación del blastocisto con la aposición del embrión al útero (primer signo de implantación) (Degrelle et al., 2005). Una vez que el blastocisto protruye (día

8), se transforma en un conceptus ovoide (Hue et al., 2012). Posteriormente se produce la elongación del trofoblasto que comienza al día 12-14 alcanzando una longitud de 150-300mm previo al acoplamiento con el epitelio uterino y la implantación (Bai et al., 2013). Dentro de las etapas del desarrollo embrionario, el período de elongación previo a la implantación requiere de la interacción con el ambiente uterino además de una compleja activación de genes y factores de transcripción asociados a la diferenciación y mantenimiento del linaje trofoblástico e implantación entre otros (Hue et al., 2012). Es por ello que la elongación es considerada una etapa crítica que conlleva 30% de las pérdidas observadas posterior a la inseminación artificial dada la serie de procesos críticos que ocurren en esta etapa (diferenciación celular, crecimiento exponencial de las células del trofoblasto y reconocimiento de la gestación). (Hue et al., 2012).

Durante el período de elongación, el conceptus produce interferón tau (IFNT), principal molécula de reconocimiento de la gestación en bovinos (Thatcher et al., 1995). El IFNT actúa inhibiendo la transcripción del receptor de estradiol (ESR1), lo cual previene la formación del receptor de oxitocina (OXTR), prolongando de esta forma la vida media del cuerpo lutéo y manteniendo los niveles de progesterona que aseguren la gestación, impidiendo la formación de PGF2 alfa (Hansen et al., 2017). IFNT actúa sobre la vía JAK–STAT–IRF, activando de esta forma los genes estimulados por interferón (IGS) los cuales desempeñan papeles en la diferenciación endometrial, implantación y desarrollo del conceptus (Spencer et al., 2008).

En cuanto a la vía de señalización involucrada, IFNT se une a su receptor IFNAR presente en las células endometriales. IFNT induce la expresión de IGS clásicos (STAT1, STAT2, IRF9, B2M, ISG15, MHC, y OAS) o no clásicos (CST3, CTSL y LGALS15) dependiendo de la presencia o ausencia del represor transcripcional IRF2 (Spencer et al., 2008). Para que ocurra la expresión de los IGS clásicos se requiere de la activación de la vía JAK-STAT-IRF, culminando en la formación del factor de transcripción IRF9 que permite la expresión de secuencias ISRE lo cual determina la expresión de genes IGS (Spencer et al., 2008).

El trofoblasto, produce otras moléculas también importantes para la correcta implantación como prostaglandinas sintetasas, inhibidores de proteasas y proteínas asociadas a la preñez (PAGs) (Degrelle et al., 2005). La elongación del conceptus se encuentra dirigida por la expresión selectiva de factores de transcripción como, Hand1 (Proteína expresada en derivados del corazón y la cresta neural), Ets2 (Proteína C-ets-2) e INFT (Degrelle et al., 2005). A diferencia de otras especies, OCT4 y NANOG se encuentran presentes como transcripto en el trofoblasto al inicio de la elongación, sin embargo, la expresión de OCT4 disminuye con el tiempo mientras que CDX2 permanece expresado en el trofoblasto durante toda la elongación (Degrelle et al., 2005).

Durante la elongación del conceptus el trofoblasto está compuesto principalmente de células mononucleares que son las encargadas de producir INFT y posteriormente tienen como función el transporte de nutrientes hacia el feto (Igwebuike, 2006). El 15-20% de las células del trofoectodermo corresponden a células binucleadas, las cuales están presentes al día 19 del desarrollo embrionario (Igwebuike, 2006; Bazer et al., 2012). Las células binucleadas expresan moléculas como glicoproteínas asociadas a la preñez (PAGs), lactógeno placentario (PL) y proteínas relacionadas con prolactina (PRPs) durante el período cercano a la implantación (Hashizume, 2007). Además, se ha descrito que estas células son capaces de producir progesterona, por lo que tienen una función endocrina (Igwebuike, 2006).

La elongación es dirigida principalmente por el ambiente materno y depende en gran medida del histotrofo (Sánchez et al., 2019). El histotrofo corresponde a fluido luminal uterino, secretado por las células glandulares epiteliales superficiales y luminales (sGE y LE) (Bazer et al., 2015). Está compuesto por un conjunto de citoquinas, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, proteínas transportadoras, aminoácidos, azúcares, agua y otros elementos que contribuyen al desarrollo del trofoblasto (Bazer et al., 2015).

3. Efecto de los sistemas in vitro en el desarrollo embrionario

Si bien, existen diferentes sistemas de cultivo embrionario, la eficiencia del proceso de producción de embriones *in vitro* sigue siendo deficiente (40%) (Rizos et al., 2008) con bajas tasas de implantación debidas en parte a alteraciones en la formación de los placentomas y tasas de preñez que no superan el 40 % (Peterson y Lee, 2003). Además, otras alteraciones se han asociado a la producción de embriones *in vitro* transferidos como lo son: alteraciones de la razón del sexo al nacimiento siendo mayor la proporción de machos, aumento de las tasas de aborto espontáneo, incremento del peso al nacimiento, distocias, mortalidad de terneros y anormalidades fetales (Hasler, 2000).

Junto con ello, se han detectado alteraciones presentes en la expresión de genes asociados con el desarrollo y la totipotencia en embriones producidos *in vitro* (Wrenzycki et al., 2005b).

Los embriones bovinos transferidos pueden seguir diferente destino, desde un desarrollo normal, hasta aborto (muerte embrionaria o fetal) lo cual está determinado en parte, por malformaciones en el feto o en la placenta (Hill, et al., 2000). En bovinos, el síndrome de cría grande (LOS) es el conjunto de defectos en el desarrollo tanto del feto como de la placenta y los terneros provenientes de embriones IVF y SCNT (somatic cell nuclear transfer) (Farin et al., 2006; Wrenzycki et al., 2005a). Las principales pérdidas durante la gestación se han reportado por alteraciones placentarias (alteración en la irrigación, hipertrofia de placentomas, disminución en el numero de placentomas, y alteración de la función endocrinológica) en aquellos embriones producidos tanto por IVF como por SCNT (Smith et al., 2012). En el caso particular de los embriones producidos por SCNT, se han descrito alteraciones morfológicas y disminución de la irrigación placentaria, con áreas reducidas de cotiledones e incluso cotiledones hemorrágicos (Hill, et al., 2000).

Existen múltiples factores que podrían inducir alteraciones epigenéticas en los embriones producidos *in vitro*. Dentro de estos factores se encuentran: estimulación

hormonal ovárica, aspiración folicular, maduración *in vitro* del ovocito, manipulación del espermatozoide, criopreservación de los gametos, estrés de los embriones expuestos a manipulación *in vitro*, y cultivo embrionario (Urrego et al., 2014).

El método de cultivo embrionario, medio, condiciones atmosféricas, temperatura etc, afecta significativamente el desarrollo embrionario. En murinos existe un mayor nivel de metilación en embriones desarrollados *in vitro* comparados con aquellos producidos *in vivo*, lo cual podría explicar las aberraciones en la expresión génica posterior a la manipulación *in vitro* del embrión (Zaitseva et al., 2007). Estas alteraciones podrían deberse a modificaciones epigenéticas inducidas por las condiciones *in vitro* de cultivo, lo que modifica el patrón de metilación del ADN (Zaitseva et al., 2007).

En bovinos, los patrones de expresión de ARNms vinculados a procesos fisiológicos como metabolismo de la fructosa (GLUT5), apoptosis (BAX), comunicación celular, metabolismo y estrés oxidativo (G6PD) se han encontrado alterados en embriones producidos *in vitro* (Lonergan, 2003). Otro reporte también indica variaciones de los transcriptos en embriones producidos *in vitro*, obteniendo un mayor nivel del transcripto NADH-dehydrogenase en embriones producidos *in vivo* en comparación a los producidos *in vitro* (Tesfaye et al., 2004). También se ha reportado modificaciones en los transcriptos según el estadio de desarrollo del embrión producido *in vivo*, una vez iniciado el cultivo *in vitro*. Se ha determinado que los embriones producidos *in vivo,* que posteriormente son cultivados in vitro, modifican la expresión de sus transcriptos a partir de las primeras 10 horas de iniciación del cultivo *in vitro* (Lonergan, 2003), lo que demuestra la sensibilidad temprana del embrión frente a los factores externos ambientales (Tesfaye et al., 2004).

Los embriones bovinos producidos *in vitro* y por SCNT presentan reprogramación epigenética anormal de múltiples loci de genes impresos, evidenciado por la reducida metilación en comparación a los embriones producidos *in vivo* (Niemann et al., 2010). En la misma especie, los patrones de expresión de ARNm de genes relacionados a histonas se ven alterados en embriones producidos *in vitro* y por clonación somática en comparación a embriones producidos *in vivo* (Nowak-Imialek et al., 2008). Posiblemente, las alteraciones en la expresión génica de embriones producidos *in vitro*

y clonados se deban a una falla en la mantención de la metilación del ADN y modificación de las histonas (Urrego et al., 2014).

Los cambios en las características moleculares en embriones producidos in vitro se reflejan también en la comunicación embrio-materna. En ovinos, se ha determinado que los embriones producidos por IVF inducen una expresión aberrante de proteínas en las células endometriales carunculares en comparación a los producidos *in vivo* (Yang et al., 2020). Las proteínas que se ven alteradas en su expresión están vinculadas al metabolismo energético y homeostasis redox, por lo tanto, se podría deducir que los embriones ovinos producidos por IVF inducirían una respuesta inadecuada por parte del endometrio durante la señalización embrio-materna en la preñez (Yang et al., 2020).

Recientemente se ha demostrado que existe una comunicación embrio-materna mediada por EVs que son secretadas tanto por embriones pre-implantatorios como por células del tracto reproductor femenino. Las EVs son vesículas rodeadas por una bicapa lipídica que son secretadas al ambiente extracelular por diferentes tipos celulares (Théry et al., 2018). Existen diferentes tipos de EVs, las cuales han sido clasificadas por su tamaño o tipo celular secretor, sin embargo, la propiedad más relevante es que contienen moléculas de señalización (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos) que pueden ser internalizados por otros tipos celulares (Bellingham et al., 2012; Kahlert et al., 2014; Lee et al., 2016; Van Niel et al., 2018). Por esta característica, las EVs son consideradas como un mecanismo de comunicación celular ya que pueden modificar el fenotipo o funcionalidad de la célula receptora (Valadi et al., 2007; Lee et al., 2016; Mittelbrunn et al., 2011; Bellingham et al., 2012). Más adelante en esta revisión, se incluye un capítulo sobre la biogénesis, características y funcionalidad de las EVs, sin embargo, es importante destacar que las poblaciones de EVs secretadas por embriones pre-implantatorios pueden modificarse de acuerdo con la calidad y competencia de estos embriones (Mellisho et al., 2017; 2019; Taqi et al., 2019; Dissanayake et al., 2020).

Los sistemas de producción *in vitro* también inducen un estrés oxidativo en el embrión

incrementando la apoptosis y la expresión de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Taqi et al., 2019). A su vez, los embriones bajo un 20% de oxígeno expresan en mayor cantidad genes relacionados con la biogénesis de EVs que aquellos embriones expuestos a un 5% de oxígeno (Taqi et al., 2019). También se ha evidenciado que los embriones expuestos a un 20% de oxígeno, modifican el cargo de sus EVs, transmitiendo en ellas indicadores de estrés oxidativo lo que podría afectar la comunicación mediada por EVs bajo estas condiciones (Taqi et al., 2019).

Los embriones producidos *in vitro* difieren principalmente a los producidos *in vivo* en su competencia (Urrego et al., 2014). Los embriones bovinos no competentes secretan poblaciones de EVs con distintas caracterisitcas de tamaño y concentración (Mellisho et al., 2017). Además, los blastocistos con arresto en el desarrollo secretan una mayor concentración de EVs que aquellos con desarrollo continuado (Mellisho et al., 2017). Por otra parte, las EVs de blastocistos viables tienen en promedio un mayor diámetro y menor concentración en su población, en comparación a las EVs secretadas por blastocistos no viables (Mellisho et al., 2019). Junto con ello, al comparar el cargo entre EVs de blastocistos viables y no viables, se determinó que el cargo se ve modificado por esta condición, al presentarse una expresión diferencial de miARNs (micro ARNs) y snoARNs (ARN pequeño nuclear) en las EVs obtenidas de blastocistos viables y no viables (Mellisho et al., 2019).

4. Comunicación embrio-materna

4.1 Comunicación del embrión con células oviductales

En mamíferos, el primer sitio que toma contacto con el embrión es el oviducto. En bovinos, este contacto se produce durante los primeros 4 días del desarrollo embrionario (Maillo et al., 2016). En bovinos, el embrión permanece en el oviducto hasta la formación de la mórula por lo que durante esta etapa depende de los factores maternos secretados por las células oviductales. El epitelio oviductal está compuesto por células ciliadas y secretoras. Las células secretoras son las encargadas de producir fluido oviductal, el cual contiene diferentes componentes que inciden en la

competencia ovocitaria y desarrollo embrionario (Faquineli- Cavalcante et al., 2019).

A su vez, el fluido oviductal juega un papel relevante en el desarrollo embrionario (Maillo et al., 2016). Esto se debe a que contiene factores embriotróficos (Avilés et al., 2010), así como sustratos metabólicos (lactato piruvato, aminoácidos y glucosa) (Maillo et al., 2016), y otros componentes responsables de la protección de los gametos y el embrión contra el estrés oxidativo (Avilés et al., 2010).

La comunicación entre el embrión y el oviducto también ha sido estudiada mediante sistemas de co-cultivos con células oviductales. En equinos, el embrión induce una modificación en la expresión de genes asociados a interferón tipo1 en células epiteliales del oviducto (Smits et al., 2016). En ratones también se produce una modificación de la expresión de genes en el oviducto expuesto al embrión en desarrollo (Lee et al., 2002).

En bovinos, las células oviductales inducen modificación de la expresión génica en el embrión, incrementado la expresión de genes relacionados con el metabolismo (GLUT) y genes que protegen de ROS (GPX1) entre otros (Cordova et al., 2014).Además, el cocultivo con células oviductales incrementa la tasa de blastocistos y la calidad embrionaria (Cordova et al., 2014). Estas modificaciones en la expresión génica entre las células oviductales y el embrión bovino son bidireccionales (García et al., 2017). Las células oviductales incrementan la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria, antiviral y de genes inducidos por interferón (ISG) cuando están expuestas al embrión bovino (Schmaltz-Panneau et al., 2014).

Estudios *in vivo* han demostrado que existe comunicación recíproca entre el embrión y el oviducto. Es así como, en equinos, el transporte oviductal es iniciado por lo embriones (Freeman et al., 1992) mediante la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) (Weber et al., 1991). En esta especie también se reporta que los ovocitos no fecundados no son transportados, pudiendo estar retenidos por más de 24 días en el oviducto (Betteridge et al., 1974). En murinos, se ha demostrado que los ovocitos no fecundados demoran más en ser transportados a través del oviducto en comparación a los fecundados (Ortiz et al., 1986).

Mediante estudios exvivo en bovinos, utilizando un sistema de video de microscopia digital, se demostró que durante el paso del embrión por el oviducto (día 1-4 después de la fecundación) se produce un aumento de la vascularización del oviducto, especialmente en sitio donde se encuentra el embrión (Kölle et al., 2009). En este experimento, mediante microscopía electrónica de barrido, se determinó que el embrión inducía la formación de células secretoras y ciliadas en el epitelio oviductal (Kölle et al., 2009).

Además de la comunicación molecular entre el embrión y el ambiente materno, recientemente se ha demostrado las EVs secretadas tanto por el embrión cómo las células del oviducto, participan en esa interacción recíproca (Saadeldin et al., 2014; Lopera-Vásquez et al., 2016; Almiñana et al., 2017; Mellisho et al., 2017). En bovinos, las EVs secretadas por el oviducto contienen diferentes transcriptos que se expresan diferencialmente según el estadio del ciclo estral (Almiñana et al., 2018). Estas EVs secretadas por el oviducto poseen ARNms asociados al desarrollo embrionario, regulación epigenética y proliferación celular junto con la presencia de ARNs no codificantes (ncARNs) (Almiñana et al., 2018).

En la misma especie se ha descrito que las EVs provenientes de cultivo de células oviductales poseen un cargo proteíco diferente al de aquellas obtenidas *in vivo* (Almiñana et al., 2017). Mediante análisis funcionales, se determinó que las proteínas involucradas en funciones como unión de ovocito con espermatozoide, fecundación y desarrollo embrionario no estaban presentes en las EVs oviductales producidas *in vitro* (Almiñana et al., 2017).

Se ha documentado que los embriones son capaces de internalizar las EVs provenientes del oviducto y esto puede favorecer el desarrollo embrionario. Las EVs oviductales de bovinos, producidas *in vivo,* son internalizadas por parte de embriones producidos *in vitro*, produciendo un incremento de la tasa de blastocistos y la calidad embrionaria (Almiñana et al., 2017). Se ha determinado que las EVs de fluido oviductal bovinos proveniente del itsmo mejora la calidad de los embriones producidos *in vitro*, incrementando la tasa de sobrevivencia posterior a la vitrificación, en comparación a las EVs provenientes de ámpula (Lopera-Vasquez et al., 2017). En la misma especie,

mediante modelos *in vitro,* las EVs obtenidas de células oviductales, suplementadas al medio de embriones, inducen una mayor cantidad de células tanto en el trofoectodermo como en el número total de células, mejorando además la sobrevivencia de los blastocistos a la vitrificación (Lopera-Vásquez et al., 2016).

En murinos, las EVs obtenidas de fluido oviductal mejoran las tasas de nacimiento e implantación de los embriones transferidos mediante la suplementación de estas durante el cultivo embrionario *in vitro* (Qu et al., 2018). Además, en este estudio, los embriones suplementados con EVs aumentaron la expresión relativa de PAG1 (Glicoproteínas asociadas a la preñez) (Lopera-Vásquez et al., 2016). Actualmente, no se conocen estudios sobre la internalización de las EVs embrionarias por parte de las células oviductales (Almiñana y Bauersachs, 2020). Sin embargo, parece ser que las EVs embrionarias actuarían directamente sobre las células endometriales.

4.2 Comunicación del embrión con células endometriales

El conceptus, debe interactuar con diferentes tipos de células uterinas entre las que se encuentran células epiteliales glandulares (GE), células estromales, células epiteliales superficiales glandulares (sGE) y células epiteliales luminales (LE) (Bazer et al., 2015) las cuales conforman el endometrio junto con vasos sanguíneos y células inmunitarias (Spencer y Hansen, 2015). Estas glándulas uterinas son las encargadas de secretar un conjunto de citoquinas, enzimas, factores de crecimiento, hormonas, proteínas transportadoras, aminoácidos, azúcares, agua y otros elementos, denominado histotrofo, que contribuyen al desarrollo del trofoectodermo (Bazer et al., 2015).

En rumiantes, el endometrio, tiene dos áreas; la caruncular y la intercaruncular. Las áreas carunculares son el lugar donde ocurre la implantación superficial y contienen células LE y estroma (Spencer y Hansen, 2015). El establecimiento de la preñez en rumiantes comienza en el estadio de blastocisto e incluye reconocimiento de la preñez, la implantación y placentación (Spencer y Hansen, 2015). En rumiantes la molécula que determina el reconocimiento de la preñez al día 16 de la gestación es IFNT (Bazer 1991; Bazer y Thatcher, 2017; Forde y Lonergan, 2017). El IFNT es Interferón tipo 1 que es secretado por el trofoblasto del concepto (Bazer y Thatcher, 2017). IFNT

produce un efecto antiluteolítico mediante la inhibición de los receptores de Oxitocina en las células epiteliales endometriales. De esta forma se inhibe la secreción luteolítica pulsátil de prostaglandina F2 alfa (PGF2α) por parte del endometrio (Meyer et al., 1995; Forde y Lonergan, 2017). Adicionalmente, IFNT induce la expresión de prostaglandina E2 (PGE2) por parte del endometrio, la cual, permite la sobrevida y el crecimiento del trofoblasto junto con la expresión de genes relacionados con la elongación y la implantación en el epitelio endometrial (Brooks et al, 2014).

Por otra parte, la progesterona (P4), secretada por el cuerpo lúteo en el ovario tiene un efecto endocrino en el endometrio, estimulando la producción de factores embriotróficos, permitiendo la implantación y mantención de la preñez (Spencer y Hansen, 2015). La P4 también tiene un efecto positivo sobre la elongación del conceptus, incrementando la producción de IFNT por parte del trofoblasto (Lonergan y Forde, 2014).

En bovinos, la comunicación entre el embrión y el útero también está mediada por citoquinas y factores de crecimiento. Durante la etapa peri-implantatoria, el embrión y el endometrio establecen una comunicación mediada por ligandos que modulan funciones biológicas en ambos tejidos mediante sus respectivos receptores. Tal es el caso de IFNT y BMP7, ambos producidos por el conceptus, los cuales interactúan con receptores presentes en las células endometriales como IFNAR1 y IFNAR2 (receptores de IFNT) y los receptores de BMP7 (ACVR1 y ACVR2A). De la misma forma, los ligandos expresados por el endometrio, como por ejemplo IGF1 y EDN3 interactúan en receptores del conceptus como IGFBP3, IGF1R (receptores de IGF) y EDNRA, EDNRB (receptores de EDN3) (Mamo et al., 2012).

Las vías de señalización también son reguladas mediante la comunicación del embrión con el endometrio. La vía de señalización WNT está vinculada al desarrollo embrionario y es regulada por el endometrio. Esta vía regula el desarrollo pre-implantatorio en el embrión bovino (Denicol et al., 2013). La vía canónica de WNT puede inhibir el desarrollo embrionario si es sobre expresada, lo cual es regulado por Dickkopf 1 (DKK1), producida por el endometrio (Denicol et al., 2013). Por otra parte,

LIF (Factor Inhibidor de la Leucemia) que es también secretada por la madre junto con bFGF (factor de crecimiento básico para fibroblastos), incrementan la tasa de formación de blastocistos bovinos mediante el incremento de blastómeras y un incremento en la tasa de protrusión (Neira et al., 2010). ILB1 (interleuquina 1 beta) también es secretada por el endometrio y su expresión es regulada por el embrión una vez que comienza a producir IFNT al ambiente uterino (Rashid et al., 2018).

En el endometrio, la expresión de proteínas se ve modificada durante el reconocimiento de la preñez en bovinos. Estos cambios de secreción de proteínas al fluido uterino comienzan a ser más significativos desde la protrusión del embrión al día 10 hasta el proceso de elongación del conceptus y el reconocimiento de la preñez al día 16 (Forde et al., 2014). Al día 16 de la preñez aumenta la expresión de proteínas relacionadas con procesos biológicos como procesos metabólicos primarios y celulares, procesos catabólicos y de desarrollo entre otros (Forde et al., 2014). Las proteínas secretadas por el endometrio están asociadas al desarrollo del conceptus, reconocimiento de la gestación, enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos e inhibidores de proteasas (Forde et al., 2014).

La presencia del embrión en el tracto reproductivo regula la respuesta inmune local del útero inhibiendo la respuesta inmune innata en el sitio de implantación, para permitir que el útero tolere al embrión y lo apoye durante su desarrollo (Almiñana et al., 2012). En el caso particular del bovino, a pesar de que el pico de IFNT se produce al día 16, los embriones al día 7 en estadio de blastocisto ya secretan IFNT y se ha detectado su presencia como proteína en las células del trofoectodermo (Johnson et al 2006) iniciando la modificación endometrial (Radish et al., 2018). El IFNT induce, en células del sistema inmune materno, un incremento en la regulación de citoquinas antiinflamatorias (IL10) y una disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNFA, IL1B), generando también un aumento de la expresión de genes activados por interferón en las células inmunitarias (Rashid et al., 2018). Junto con ello, los embriones bovinos pre-implantatorios de día 5-9 inducen la expresión de genes IGS, además de activar las vías de señalización de IFNT en células epiteliales endometriales, en un modelo *in vitro* (Passaro et al., 2018; Talukder et al., 2017). En

este estudio, tambiénse describe la capacidad del embrión pre-implantatorio de inducir inmunomodulación en las células epiteliales endometriales, que se caracteriza por suprimir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNFalfa e IL1B. Por último, el embrión induce la expresión de la enzima PTGES (Prostaglandina E sintetasa) en las células endometriales *in vitro* (Talukder et al., 2017; Passaro et al., 2018). Una regulación similar se observa *in vivo* ya que el el embrión pre-implantatorio induce en el endometrio, la expresión de genes IGS y de la enzima PTGES (Sponchiado et al., 2017).

Por otra parte, las proteínas secretadas por el embrión también pueden reflejar anomalías en el desarrollo, produciendo una señal que puede ser recepcionada por el endometrio. En humanos, los blastocistos que fallan en implantarse envían señales a través de mir-661 al epitelio endometrial, el cual internaliza este miARN y disminuye la expresión de proteínas vinculadas a la implantación como MTA (proteína asociada a metástasis) y Nectina 1 (Cuman et al., 2015).

Los cambios que se producen en el embrión como consecuencia de los sistemas in vitro se ven reflejados en una aberrada interacción embrio-materna e implantación (Wrenzycki et al., 2001; Wrenzycki et al., 2005). En ovinos, se ha determinado que los embriones producidos por IVF inducen una expresión aberrante de proteínas en las células endometriales carunculares en comparación a los producidos in vivo (Yang et al., 2020).

En el período peri-implantatorio, tanto el embrión como el endometrio secretan EVs (Lee et al., 2015). En ovinos, las EVs obtenidas de fluido oviductal al día 14 del ciclo estral fueron marcadas con PKH67 y luego infundidas al útero de una hembra preñada de 6 días. Al día 14 de preñez se evidenció una internalización de las EVs por parte del trofoblasto del conceptus y el epitelio uterino (Burns et al., 2016). En este mismo estudio, los conceptus cultivados exvivo por 24 horas secretaron EVs al medio de cultivo. Al evaluar el cargo, estas vesículas contenían 231 proteínas y 512 mARNs. Estas EVs obtenidas del conceptus fueron marcadas con PKH67 e infundidas al útero de una hembra ciclante por 6 días. AL día 14, las EVs habían sido internalizadas por el

epitelio endometrial, no así por el estroma y el miometrio (Burns et al., 2016).

En cerdos, mediante un modelo *in vitro*, se determinó la internalización de EVs provenientes de trofoectodermo en células endoteliales aórticas maternas, observándose un incremento en la proliferación de estas células (Bidarimath et al., 2017). Al evaluar el cargo de las EVs obtenidas del trofoectodermo, se determinó la presencia de diferentes miRNAs y proteínas relacionadas con la angiogénesis (Bidarimath et al., 2017). A partir de esta evidencia, se podría deducir que las EVs secretadas por el trofoectodermo, pueden ser internalizadas por las células endoteliales e incrementar la vascularización del endometrio para la implantación (Almiñana y Bauersachs, 2020).

En humanos, la internalización de EVs embrionarias por parte de células epiteliales endometriales ha sido demostrada mediante un modelo *in vitro* (Giacomini et al., 2017). Este estudio demostró que embriones producidos *in vitro* de día 3 y 5 liberan EVs al medio de cultivo las cuales son internalizadas por las células epiteliales endometriales. Además, demostraron que la internalización de estas EVs se produce en forma selectiva, ya que las células no internalizaban EVs provenientes de medio control (medio de cultivo con suplementos de proteínas que contienen EVs) (Giacomini et al., 2017).

En ovinos, las células trofoectodérmicas cultivadas *in vitro*, internalizan EVs obtenidas de fluido uterino. Junto con ello, las EVs de fluido uterino inducen una mayor proliferación y producción de INFT por parte de las células del trofoectodermo (Ruiz-Gonzalez et al., 2014). En la misma especie, también se ha determinado la presencia de IFNT en vesículas provenientes del conceptus, los cuales inducen un aumento de la expresión de genes ISG en células epiteliales endometriales cultivadas *in vitro* (Nakamura et al., 2016). En bovinos se han obtenido EVs de pequeño tamaño (50-120 nm) de fluido uterino durante el período peri-implantatorio, al día 17, 20 y 22 del desarrollo embrionario (Kusama et al., 2018). Al evaluar el cargo, se encontraron 596 proteínas, de las cuales 172 estaban diferencialmente expresadas entre los días 17, 20 y 22. Entre estas proteínas se detectó IFNT, siendo mayor su expresión al día 20, Estas vesículas logran inducir la expresión de genes IGS en las células

endometriales epiteliales en un sistema *in vitro* (Kusama et al., 2018). Por último, las EVs aisladas al día 20 y 22 de fluido uterino, incrementaron la expresión del transcripto VCAM1 (molécula de adhesión vascular celular 1) en las células epiteliales endometiales, molécula de adhesión que se expresa en el periodo peri-implantatorio (Kusama et al., 2018).

En ovinos P4 induce una sobre regulación de miARNs en EVs obtenidas del fluido uterino. Estos miARNS regulan vías como PI3K/AKT, BMP y ARNs pequeños que regulan la actividad post-transcripcional (Burns et al., 2018). Lo cual sugiere que P4 podría inducir una comunicación con el embrión a través de las EVs de fluido uterino. Al evaluar las proteínas presentes en EVs obtenidas de fluido uterino luminal de oveja, se observó un perfil de expresión diferencial de proteínas entre hembras preñadas y ciclantes. La proteína PTGS2 fue encontrada en la mayoría de las muestras de hembras preñadas, mientras que CTSL1 fue detectada tanto en preñadas como no preñadas. Al evaluar la presencia de ARNs se determinó que la mayoría son ARNs pequeños, miARN en su conjunto. Estas EVs además son capaces de transmitir retrovirus endógeno a células de cultivo *in vitro*, por lo que se sugiere que estas EVs de fluido uterino pueden ser internalizadas por el embrión (Burns et al., 2014).

En bovinos también se ha evidenciado una expresión diferencial de proteínas en EVs provenientes de fluido uterino luminal entre hembras ciclantes y preñadas al día 16 de preñez (Malo Estepa et al., 2020). De las proteínas presentes en EVs, 67 estaban presentes únicamente en EVs obtenidas de hembras preñadas al día 16, de las cuales 35 también se encontraban presentes en medio de cultivo de conceptus al día 16 de desarrollo (Malo Estepa et al., 2020).

Las EVs también reflejan el estado fisiológico del endometrio. En bovinos, las EVs provenientes de úteros con endometritis, contienen miARNs diferencialmente expresados respecto a los úteros sanos y los embriones expuestos a EVs de úteros con endometritis, disminuyen su tasa de formación de blastocistos (Wang et al., 2019).

Al evaluar las EVs liberadas por epitelio luminal endometrial humano se determinó la presencia de miARNs que tienen como blanco genes implicados en vías de

señalización relacionadas con la implantación como vía de señalización VEGF, uniones adherentes y estrechas reguladas en los sitios de implantación, activación de la vía de señalización Jak-STAT entre otros (Ng et al., 2013). Por otra parte, las EVs liberadas por la línea celular de trofoblastos humanos, swam71, contienen proteínas relacionadas con respuesta inmunitaria, regulación del citoesqueleto y adhesión de la matriz celular mediada por integrina (Atay et al., 2011b).

En humanos, existe una comunicación entre las EVs derivadas de trofoblasto y macrófagos maternos durante la gestación (Atay et al., 2011a). Las EVs del trofoblasto inducen a los monocitos a producir IL-1b en un sistema *in vitro* (Atay et al., 2011a). También se ha descrito en la misma especie que las EVs desempeñan una función inmunoregulatoria como mecanismo de protección de la preñez ya que las EVs de pequeño tamaño (exosomas) de placenta, liberados a pre término de la gestación contienen Fas-L, molécula que inhibe la acción de linfocitos T, suprimiendo vías de activación como CD3 y JAK3 siendo una supresión que se correlaciona con los niveles de expresión de Fas-L en los exosomas (Taylor et al., 2006). Existen además otros mecanismos reportados de tolerancia materno-fetal, que están dados por la presencia del ligando NKG2D en exosomas de placenta humana, lo que genera una disminución la citotoxicidad de las NKs maternos (Hedlund et al., 2009).

En humanos, el trofoblasto secreta EVs que contienen miARNs, los cuales son trasportados por la circulación a tejidos maternos, lo cual sugiere que estas EVs pudiesen permitir la modificación del estatus epigenético en las células maternas receptoras (Luo et al., 2009). En esta misma especie se ha descrito que el miARN Hsa-miR-30d, secretado por las células endometriales, ya sea como molécula cargo de EVs o no, es internalizado por embriones murinos pre-implantatorios, modificando su expresión génica, aumentando la expresión de genes involucrados en el fenómeno de adhesión (Vilella et al., 2015).

Esta evidencia sugiere una comunicación estrecha entre la madre y el embrión mediada por vesículas extracelulares que potencialmente podrían modificar el estatus epigenético de la célula receptora y coordinar eventos importantes como la implantación y la inmunomodulación entre otros. Esta comunicación mediada por EVs

podría preparar el ambiente materno para la implantación antes de la señal principal inducida por el embrión.

5. Vesículas extracelulares

5.1 Caracterización

Las vesículas extracelulares (EVs) es el término genérico de partículas liberadas naturalmente por la célula, delimitadas por una bicapa lipídica, la cual no tiene presencia de núcleo y por lo tanto no puede replicarse (Théry et al., 2018). Existen diferentes tipos de vesículas extracelulares (EVs), los cuerpos apoptóticos, las microvesículas y los exosomas. En el caso particular de los exosomas, se ha determinado mínimos requerimientos que pudiesen ayudar a su discriminación como lo son: diámetros de 30 a 120 nm (Colombo et al., 2014), origen endosomal y estar enriquecidos con tetraspaninas (Hugel et al., 2005). Dentro de las vesículas extracelulares, las microvesículas (MVs) pueden medir desde 150 nm hasta 1000 nm de diámetro (Colombo et al., 2014) por lo que su tamaño puede superponerse al de los exosomas, y su origen proviene de la evaginación de la membrana plasmática (PM) (Raposo y Stoorvogel, 2013). Por otra parte, los cuerpos apoptóticos también están clasificados como vesículas extracelulares que se originan de células apoptóticas en los estadios tardíos de la muerte celular a diferencia de las MVs (Mathivanan et al., 2010). Los cuerpos apoptóticos pueden llegar a medir hasta 1 µm de diámetro (Colombo et al., 2014).

Con respecto a la biogénesis, no existe un consenso sobre marcadores específicos de los diferentes orígenes de las EVs, sean estos endosomal (exosomas) o derivado de membrana plasmática (ectosomas o MVs) (Théry et al., 2018). Determinar la biogénesis de las EVs es extremadamente difícil a menos que se pudiese utilizar una técnica de imagen en vivo para demostrar su liberación (Théry et al., 2018).

Para la caracterización, se evalúa la conformación proteica para determinar qué tipo de EVs se encuentran presentes en una muestra a analizar. Se ha determinado que las muestras de EVs deben demostrar la presencia (o enriquecimiento) de marcadores de EVs y la ausencia (o depleción) de contaminantes (Théry et al., 2018). Estos marcadores pueden ser generalizados a diferentes especies, células y condiciones

(Théry et al., 2018). Para ello se pueden utilizar ciertas técnicas moleculares como: Western blot (WB), citometría de flujo o análisis proteómicos globales utilizando técnicas de espectrometría de masas para identificar por ejemplo proteínas de transmembrana (Lötvall et al., 2014). Otra herramienta es el uso de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA por sus siglas en ingles) que permite determinar la distribución del tamaño y concentración de las EVs aisladas, basado en el movimiento browniano de las partículas en suspensión (Raposo y Stoorvogel, 2013).

Se ha evidenciado que las EVs pueden compartir diferentes marcadores de superficie como MHC clase II o clase I, proteínas de choque térmico 70 (HSC70/HSP73 y HSP70/HSP72) o actina. Existen, sin embargo, marcadores propios para aquellas EVs de pequeño tamaño, dentro de los cuales están Annexin XI, ADAM10 (proteína que contiene el dominio desintegrina y metaloproteinasa 10), ACE (enzima convertidora de angiotensina) EHD4 (Proteínas que contienen el dominio EHD 4) y en particular los exosomas deben ser además positivo a las tetraspaninas como a CD63 y/o CD9 y CD81 (Kowal et al., 2016). La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV), ha establecido marcadores moleculares para determinar la presencia de EVs en las muestras.

Es importante considerar que los aislados de EVs deben ser libres de contaminantes como proteínas séricas y componentes proteicos de compartimientos intracelulares (por ejemplo, retículo endoplásmatico, mitocondrias, etc) (Kowal et al., 2016). Por otra parte, la presencia de proteínas responsables de la formación de ILVs (vesículas intraluminales) dentro de los endosomas como lo son Rab GTPasa, SNAREs (receptor soluble de proteína de unión a factor sensible a N-etilmaleimida), Annexinas y flotillin pueden ser identificadas en EVs (Raposo y Stoorvogel, 2013).

5.2 Biogénesis

Los exosomas tienen su origen a partir de la formación de ILVs formadas por invaginaciones internas de un endosoma temprano, proveniente de la vía endocítica celular (Klumperman y Raposo, 2014). Estas invaginaciones dentro del endosoma producen los llamados cuerpos multivesiculares (MVBs) que posteriormente se pueden

fundir con la membrana plasmática y liberar sus vesículas internas (Pan et al., 1985). Esta formación esta mediada por complejos proteicos que se denominan Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) (Kowal et al., 2014; Colombo et al., 2014; Klumperman y Raposo, 2014).

Además, existen proteínas vinculadas tanto a la fusión de membranas con lisosomas como a la fusión de membrana de los MVBs con la membrana plasmática, estas proteínas reciben el nombre de complejo SNARE (Colombo et al., 2014).

A diferencia del debris celular, los exosomas no contienen proteínas al azar, ya que provienen de un compartimiento celular específico y están caracterizados por proteínas relacionadas con su origen como lo son los complejos ESCRT-II and ESCRT-III los que se encuentran en análisis proteómicos de los exosomas (Kowal et al., 2014).

Por otra parte, las MVs se generan por una redistribución de fosfolípidos de membrana y contracción de proteínas del citoesqueleto (Hugel et al., 2005). La membrana plasmática está compuesta por microdominios los cuales son regulados por traslocasas amino-fosfolipídicas (proteínas que transfieren fosfolípidos de un lado de la membrana a otro (Akers et al., 2013). Las flipasas son un tipo de traslocasas que transfieren fosfolípidos desde una región más externa de la membrana plasmática hacia la región más interna, mientras que las flopasas transfieren fosfolípidos desde la región más interna hacia la más externa (Akers et al., 2013). La formación de la MVs se produce por la evaginación de la membrana plasmática al generarse una translocación y externalización de la fosfatidilserina junto con una contracción de estructuras del citoesqueleto mediante interacciones de actina-miosina, lo que induce a la fusión de la membrana y liberación de las MVs (Hugel et al., 2005; Akers et al., 2013). Sin embargo, la formación de estas MVs también se puede producir por injuria celularo células necróticas que han perdido integridad de su membrana (Hugel et al., 2005).

5.3 Cargo

Las EVs presentan un cargo determinado de moléculas en su interior, dentro de estas se encuentran:

Proteínas

Dentro de los análisis de diferentes estudios proteómicos, se puede determinar que las proteínas con un mayor porcentaje de abundancia en los diferentes estudios, independientes del origen celular, en los exosomas son: ALIX (identificada en un 68%), TSG101 (37%), clatrina (37%) y HSP70 (89%) (Mathivanan et al., 2010).

En general las proteínas comunes en exosomas de diferente origen, provienen del citoesqueleto, proteínas del complejo ESCRT, tetraspaninas, moléculas de señalización y transporte (Mathivanan et al., 2009). Entre estas moléculas están las Rabs, proteínas GTPasas, encargadas del transporte y fusión de los exosomas con la membrana plasmática, y diferentes tipos de anexinas, las que permiten también el transporte y fusión de los exosomas para ser exportados (Mathivanan et al., 2009; Boriachek et al., 2017; Février y Raposo, 2004). En relación con su función molecular, el 52 % de las proteínas que tienen en común los exosomas están involucradas en comunicación celular y transducción de señales, mientras que el 19% está involucrada en crecimiento celular y mantención (Mathivanan et al., 2009).

A pesar de las diferencias en la biogénesis, los exosomas y las MVs poseen una composición similar de proteínas. Dentro de las proteínas presentes en las MVs se encuentran: ALIX, APP (proteína precursora de amiloide), ARF6, ARMMs (microvesículas mediadas por arrestina-dominio que contiene proteína 1), CRX4 (CXC receptor 4 de quimiocina), HSP70, ICAM (molécula de adhesión intercelular) además de la presencia de pequeñas GTPasas como RAB22a, entre otras (Van Niel et al., 2018). Además, existen otras proteínas provenientes del reciclamiento de endosomas que también pudiesen estar en el sitio de biogénesis de las MVs pudiendo ser incluidas en su cargo como lo son las moléculas MHC clase I, metaloproteínasa tipo 1 de matriz de membrana (MT1MMP, también conocida como MMP14), SNARE, VAMP3

(proteína 3 de membrana asociada a vesícula) (Van Niel et al., 2018).

Lípidos

Se ha descrito la presencia de lípidos en los exosomas que desempeñan ciertas funciones, como es el caso de la ceramida esfingolípida, la cual induce la diferenciación de las ILVs a exosomas (Trajkovic et al., 2008). Al utilizar bases de datos como ExoCarta, se ha determinado que existen 194 lípidos encontrados en exosomas, dentro de los cuales se describe la presencia de colesterol y otros esfingolípidos y fosfoglicéridos (Boriachek et al., 2017). Además, se ha demostrado que los exosomas contienen fosfolipasas (A2, C y D), prostaglandina E2 y 15-desoxi-12,14-prostaglandina J2 (15-d PGJ 2) principalmente, aunque también están presentes otras prostaglandinas como PGF2alfa y PGD2, lo que sugiere que los exosomas pueden contener estas moléculas como mensajeros (Subra et al., 2010). En general, dentro de los lípidos asociados a los exosomas, se encuentran aquellos vinculados a su origen como son: BMP (Bis-Mono-acilglicerofosfato) un poliglicerofosfolípido (requerido para la formación de cuerpos multivesiculares), ácido fosfatídico (vinculado a la producción de exosomas), ceramidas (importantes en la biogénesis y determinación de la ubicación de las transponina CD81), colesterol, oxisterol de unión a proteína (OSBP) que se une a VPS4 y permite la liberación del exosoma por fusión de membrana, entre otras. Además, los exosomas transportan ácidos grasos (ya sea en la membrana, en el lumen o unido a proteína) que posteriormente son recibidos por la célula blanco (Record et al., 2014).

Ácidos nucleicos

Se ha demostrado la presencia diversos tipos de ARN dentro de las EVs, tanto ARNm como ARN no codificante dentro de los cuales están los ARNt, LncARN, microARN (miARN), rARN, entre otros (Taylor y Taylor, 2008; Kesimer et al., 2009; Ohshima et al., 2010; Mittelbrunn et al., 2011; Lässer et al., 2011; Ng et al., 2013; Silva y Melo, 2015; Lee et al., 2016).

Existen investigaciones que han caracterizado la presencia de ARN en exosomas

aislados de diferentes fluidos como saliva, plasma y leche materna (Lässer et al., 2011). Además, los miARN secretados mediante EVs son transferibles y ejercen una función biológica en las células receptoras (Kosaka et al., 2010; Lee et al., 2016). La presencia tanto de ARN como miARN en las EVs también ha sido demostrada en diferentes tipos celulares como epitelio traqueo-bronqueal (Kesimer et al., 2009; Lee et al., 2016), células tumorales de cáncer ovárico (Taylor y Taylor, 2008), células T (Mittelbrunn et al., 2011) y cáncer gástrico (Ohshima et al., 2010) entre otros.

En cuanto a la presencia de ADN existen diferentes estudios que aseguran su presencia como cargo en las EVs (Waldenström et al., 2012; Kahlert et al., 2014; Thakur et al., 2014; Jin et al., 2016 Kalluri y LeBleu, 2016). Si bien no está clara la función que tendría este ADN, se cree que es un posible mecanismo para mantener la homeostasis celular al eliminar ADN dañino para la célula (Takahashi et al., 2017). Esto debido a que se demostró en células humanas, que, al inhibir la liberación de los exosomas, se produce una acumulación de ADN en el citoplasma, lo que desencadena una reacción inmunitaria que trae como consecuencia una liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que es parte de la respuesta al daño en el ADN (Takahashi et al., 2017).

5.4 Rol Biológico

Las EVs, se encuentran presentes en una gran variedad de células como: reticulocitos (Pan et al., 1985), células de sistema inmunológico (Mittelbrunn et al., 2011; Lee et al., 2016), mastocistos (Valadi et al., 2007), células neuronales (Bellingham et al., 2012), células de cáncer gástrico (Shedden et al., 2003; Ohshima et al., 2010), células de carcinoma ovárico (Taylory Taylor, 2008), espermatozoides (Simpson et al., 2008) y en embriones bovinos (Mellisho et al., 2017). Asimismo, las EVs pueden ser aislados de diferentes fluidos biológicos (Yuana et al., 2013), como plasma, saliva, (Lässer et al., 2011), líquido cerebro espinal (Raposo y Stoorvogel, 2013), suero asociado a la preñez (Taylor et al., 2006) y líquido amniótico (Asea et al., 2008) entre otros.

Como se mencionó en capítulos anteriores, el principal papel que se ha descrito que desempeñan las EVs, es el de comunicación intercelular (Yuana et al., 2013),

actuando como mensajeros debido a que transportan moléculas de información genética (ARNm, miARN), lípidos y proteínas (Ng et al., 2013) que son recepcionados por la célula diana, induciendo una modificación funcional en la célula receptora (Valadi et al., 2007; Lee et al., 2016). Se han descrito diversos mecanismos involucrados en la internalización de las EVs en la célula receptora, como endocitosis mediada por clatrina, y endocitosis independiente de clatrina como macropinocitosis, fagocitosis y fusión de membrana entre otros (Mulcahy et al., 2014).

Al transferir información genética, estas vesículas tendrían un gran impacto tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Esto último debido a que podrían contener proteínas o miARNs que modifican el estatus epigenético en la célula receptora (Lee et al., 2012). Una vez incorporado este ARN a la célula receptora, se ejerce una acción biológica en ella. Es así como se ha determinado que los exosomas provenientes de células de origen murino, portan ARNm funcional, generando polipéptidos por medio de traducción de su secuencia *in vitro* (Valadi et al., 2007). Además, al ser transferidos, estos ARN son capaces de generar proteínas de ratón en las células receptoras (mastocitos humanos) a modo de respuesta, lo que demuestra que el ARNm exosomal al ser transferido a una célula receptora puede ser traducido en ella (Valadi et al., 2007).

Dentro de sus funciones biológicas también se destaca su acción en procesos patológicos. Es así como se ha descrito que las EVs tienen un rol en el cáncer, induciendo proliferación celular y mediando los mecanismos de metástasis (Ohshima et al., 2010; Shedden et al., 2003).

Las EVs también está involucradas en la fisiología y plasticidad neuronal, e incluso, una expresión aberrante de los miARNs presentes en el exosoma, está asociado a desordenes neurodegenerativos como parkinson y alzheimer entre otros (Bellingham et al., 2012). Por otra parte, se ha descrito que las EVs, en particular, las MVs poseen un rol en la infección de células por parte del virus HIV, pudiendo transferir en su membrana receptores necesarios para la infección, a células carentes de estos receptores (Rozmyslowicz et al., 2003).

Otras funciones se le han atribuido a las EVs en la presentación de antígenos. En células T entregan miARNs a células presentadoras de antígeno por medio de sus exosomas (Mittelbrunn et al., 2011). Los linfocitos B liberan exosomas que contienen moléculas co-estimuladoras como CD86, CD80, MHCII y MHCI lo que sugiere su papel en la potenciación de la respuesta inmune (Clayton et al., 2001). Además, se ha evidenciado que las MVs provenientes de células epiteliales de pulmón poseen un cargo específico de miRNAs que inducen en el macrófago una respuesta proinflamatoria (Lee et al., 2016).

Durante los últimos años se ha evidenciado el papel de las EVs en procesos reproductivos, incluyendo desarrollo ovocitario, capacitación espermática, desarrollo embrionario y comunicación embrio-materna como se ha mencionado anteriormente en este documento. Se ha descrito que los exosomas liberados al fluido folicular contienen miARNs que tienen efecto sobre genes relacionados con vías de desarrollo folicular y crecimiento del ovocito (Sohel et al., 2013). Además, estos exosomas son internalizados por células de la granulosa, produciendo modificaciones en la expresión de ARNm (Sohel et al., 2013). Por lo tanto, estos exosomas generan efecto biológico en las células foliculares lo que a su vez tiene un efecto en la competencia ovocitaria y en el desarrollo posterior del embrión (Sohel et al., 2013).

A modo de conclusión se podría sugerir que los sistemas *in vitro* pudiesen modificar la comunicación embrio-materna. Esta sugerencia se basa en estudios mencionados en este trabajo, que demuestran que el sistema *in vitro* modifica tanto las vesículas extracelulares secretadas por embriones (cargo y morfología) como las vesículas extracelulares secretadas por el ambiente materno (cargo). Junto con ello, está demostrado que la comunicación entre el embrión y el ambiente materno está mediada por vesículas extracelulares siendo bidireccional. Por lo tanto, la comunicación embrio-materna mediada por EVs podría verse alterada en un modelo *in vitro*.

III. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA

La comunicación entre el embrión y el ambiente es importante para el correcto desarrollo. La comunicación embrio-materna es bidireccional y ocurre desde las etapas tempranas de desarrollo en el oviducto, siendo esencial a nivel del útero para la implantación y el desarrollo a término del embrión. Las EVs participan en la comunicación embrio-materna a través del cargo molecular el cual modula el desarrollo embrionario y la implantación. Por otra parte, los antecedentes demuestran diversas alteraciones en embriones producidos *in vitro*; desde cambios en la expresión génica, hasta alteraciones en el metabolismo y metilación de genes importantes en el desarrollo embrionario. Estas alteraciones producidas *in vitro* podrían explicar las bajas tasas tanto de desarrollo embrionario como de preñez (40%).

Se ha demostrado que la comunicación o interacción inducida por embriones producidos *in vitro* en las células endometriales desencadena una respuesta endometrial disfuncional. Esta inadecuada interacción podría ser la causa de las bajas tasas de implantación cuando los embriones son producidos *in vitro*. Al caracterizar el contenido de EVs provenientes de oviducto, se ha evidenciado que el sistema *in vitro* induce modificaciones de cargo que comprometen la presencia de proteínas importantes para el desarrollo embrionario temprano. Junto con ello, existen estudios que evidencian que el sistema *in vitro* modifica ciertas características como el cargo y la morfología de las EVs secretadas por embriones, por lo tanto, las alteraciones inducidas por los sistemas *in vitro* también son reflejadas en el cargo y función de las EVs secretadas tanto por el embrión como por el ambiente materno, pudiendo afectar la comunicación mediada por ellas.

Considerando estos antecedentes, posiblemente los sistemas de producción de embriones *in vitro* modifican la comunicación embrio-materna mediada por vesículas extracelulares. Cómo el sistema *in vitro* afecta los mecanismos de comunicación mediada por EVs entre el embrión y el endometrio es aún desconocido. Existen reportes que indican que durante el periodo peri-implantatorio, los embriones secretan EVs que contienen IFNT, las cuales al ser internalizadas por células endometriales

inducen la expresión de IGS (genes estimulados por interferón) en modelos *in vitro*. Si bien, no existen estudios que indiquen que el embrión bovino pre-implantatorio secrete Evs con cargo similar a los embriones de estadios más avanzados de desarrollo, existen diferentes estudios que han determinado que el embrión pre-implantatorio bovino (día 7-9 de desarrollo) expresa IFNT como proteína además de inducir la expresión IGS en células endometriales en modelos *in vitro* e *in vivo*. Junto con ello, Talukder et al (2017) determinó que durante los primeros días de desarrollo (días 5-9) el embrión induce modificaciones en la expresión génica de células endometriales, tales como, la expresión de IGS y citoquinas pro- inflamatorias, sin embargo, no existen más estudios que evalúen el efecto del embrión pre-implantatorio durante los primeros días de su llegada al útero.

Teniendo como base estas evidencias, es posible hipotetizar que el embrión, durante el periodo pre-implantatorio secreta vesículas extracelulares que señalizan vías de IFNT en las células endometriales. Además, considerando que no existe evidencia acerca del efecto de vesículas de embriones pre-implantatorios en etapas más tempranas de desarrollo (día 5-7) en las células endometriales, sería importante caracterizar el efecto de estas vesículas en la comunicación embrio-materna.

Por lo tanto, en este trabajo, se busca determinar el efecto de las EVs secretadas por embriones pre-implantatorios en estadios tempranos de desarrollo (día 5-7) y finales del periodo pre-implantatorio (día 7-9) en las células endometriales. Junto con ello, se busca evaluar cómo los sistemas de producción (*in vitro/in vivo*) de embriones modifican el efecto de las EVs secretadas durante la etapa pre-implantatoria en la comunicación con el ambiente materno, utilizando un modelo *in vitro* de células endometriales. Por último, considerando que el embrión peri-implantatorio internaliza las EVs provenientes del endometrio, se busca evaluar la internalización y el efecto que tendrían las EVs provenientes de endometrio en el embrión durante el periodo pre-implantatorio (día 5-9). Para ello, se determinará el efecto de las EVs endometriales producidas *in vitro*/*in vivo* sobre el desarrollo embrionario, al ser suplementadas durante el cultivo de embriones producidos *in vitro.* Por último, como se ha mencionado anteriormente, el cargo de las vesículas extracelulares provenientes

de fluido uterino se ve modificado según la etapa del ciclo estral en la que se encuentra el individuo, por lo tanto, para los experimentos se considerará utilizar EVs provenientes de células en fase luteal, tanto para vesículas provenientes de fluido uterino, como de cultivo celular con el objetivo de simular la interacción que ocurre entre el embrión y el componente materno durante la gestación.

IV. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La comunicación embrio-materna mediada por vesículas extracelulares se inicia en estadios tempranos del desarrollo embrionario y es modificada por los sistemas in vitro.

Objetivo General

Determinar el efecto de los sistemas in vitro sobre la comunicación embrio-materna temprana, mediada por vesículas extracelulares.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones pre-implantatorios (día 5-7) producidos *in vitro* e *in vivo*, sobre la expresión génica global de células epiteliales endometriales en un modelo *in vitro*.

2. Determinar el efecto de las vesículas extracelulares producidas por blastocistos (día 7-9) bovinos producidos *in vitro* e *in vivo* sobre la expresión de genes asociados a la respuesta endometrial en células epiteliales endometriales durante el periodo-pre-implantatorio.

3. Evaluar la internalización y determinar el efecto de las vesículas extracelulares secretadas por células epiteliales endometriales producidas *in vivo* e *in vitro* sobre la calidad y competencia de embriones bovinos pre-implantatorios producidos *in vitro* durante los días 5-9 del desarrollo embrionario.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

Experimento 1. Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones producidos *in vitro* e *in vivo*, en células endometriales en un modelo *in vitro*. Este experimento responde al objetivo 1. Se aislaron las EVs secretadas durante los días 5-7 de desarrollo embrionario.

Los embriones producidos *in vivo* fueron obtenidos mediante la técnica de superovulación y colecta de embriones (MOET, por sus siglas en inglés) (Garcia et al., 2015). La superovulación se realizó con hormona folículo estimulante (FHS) y posteriormente las hembras donantes fueron inseminadas con semen comercial (ABS, Chile). Al día 5 posterior a la inseminación, los embriones en estadio mórula fueron obtenidos mediante lavado uterino y luego transferidos a cultivo individual (en gotas de 40 µl) en medio SOF (fluido oviductal sintético) depletado de EVs, durante 48 horas (hasta el día
7 de desarrollo embrionario). Posteriormente, los embriones se clasificaron y se colectó el medio de los blastocistos de calidad 1 y 2.

En paralelo se produjeron embriones mediante fecundación *in vitro,* los cuales se cultivaron en grupos (25 a 30 CCOs en 500µl/pocillo de placa de 4 pocillos) en medio SOF. Al día 5 de cultivo se evaluó el estado de desarrollo y se seleccionaron mórulas, las cuales, fueron cultivadas individualmente, similar a lo descrito para embriones producidos *in vivo*. Al día 7 se colectó el medio de los blastocistos de calidad 1 y 2.

Los medios de cultivo se almacenaron a -80 °C para el aislamiento de EVs y posterior caracterización y análisis. Se realizó la caracterización de las nanopartículas aisladas para la identificación de EVs. Para esto se utilizaron los 3 criterios propuestos por la ISEV: identificación de marcadores de superficie, mediante citometría de flujo, determinación del diámetro y concentración utilizando análisis de seguimiento de partículas (NTA), y determinación de las características morfológicas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para calcular el número de grupos de producción embrionaria requeridos, se consideró la obtención de al menos 45 blastocistos calidad 1 y 2 en cada grupo (*in vivo* e *in vitro*). Para determinar el número de donantes se consideró una media de recuperación de 5 embriones viables, por tanto, se superestimularon 9 hembras. Para la producción de embriones *in vitro* se consideró una eficiencia de 30 % de desarrollo hasta mórula y 15 % a blastocisto en un sistema de cultivo individual y en medio depletado de EVs, de acuerdo con los resultados de nuestro laboratorio (Velásquez et al., 2016, Mellisho et al., 2017; 2019). El número de embriones por grupo ha sido determinado según la concentración de EVs secretadas por embriones producidos por IVF, descrito por Mellisho et al. (2017).

Paralelamente se expandió una línea celular previamente seleccionada para este trabajo. La línea celular utilizada fue aislada en el proyecto post doctoral número 3180447, células aisladas durante la fase luteal y caracterizadas como células epiteliales endometriales mediante inmunicitoquimica (positivas a citoqueratina y negativas para vimentina). Los individuos donantes fueron caracterizados en su fase reproductiva según los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona medidos por la técnica RIA, para seleccionar únicamente aquellos úteros que provengan de fase luteal. La línea a utilizar para este trabajo provenía de un individuo con una concentración de 3.53 pg/ml de estradiol y 11.5 ng/ml de progesterona. Se realizó una caracterización de esta línea celular midiendo la expresión de citoqueratina utilizando la técnica de citometría de flujo. Se utilizaron tres réplicas técnicas por tratamiento a excepción del control donde se incluyeron 5 réplicas. Las placas fueron sembradas con una densidad de $0{,}3x10^6$ células por placa de 35 mm. Se cultivaron las células endometriales con medio suplementado con EVs marcadas previamente con tinción verde fluorescente lipofílica (PKH67), provenientes de embriones producidos *in vitro* (tratamiento 1), embriones producidos *in vivo* (tratamiento 2) y PBS (tratamiento 3; control negativo). La concentración de EVs adicionada fue de 1×10^8 partículas por ml en cada placa de cultivo de 35 mm de diámetro con un 60% de confluencia, según lo descrito por Koh et al., (2020). Posterior a las 24 horas de la suplementación al medio con EVs embrionarias se evaluó la internalización mediante detección de

fluorescencia. Posterior a las 48 horas de iniciado el cultivo con medio condicionado con EVs, se procedió a la lisis de las células para la obtención del ARN total para realizar el análisis de expresión génica global de las células epiteliales endometriales (Figura 1).

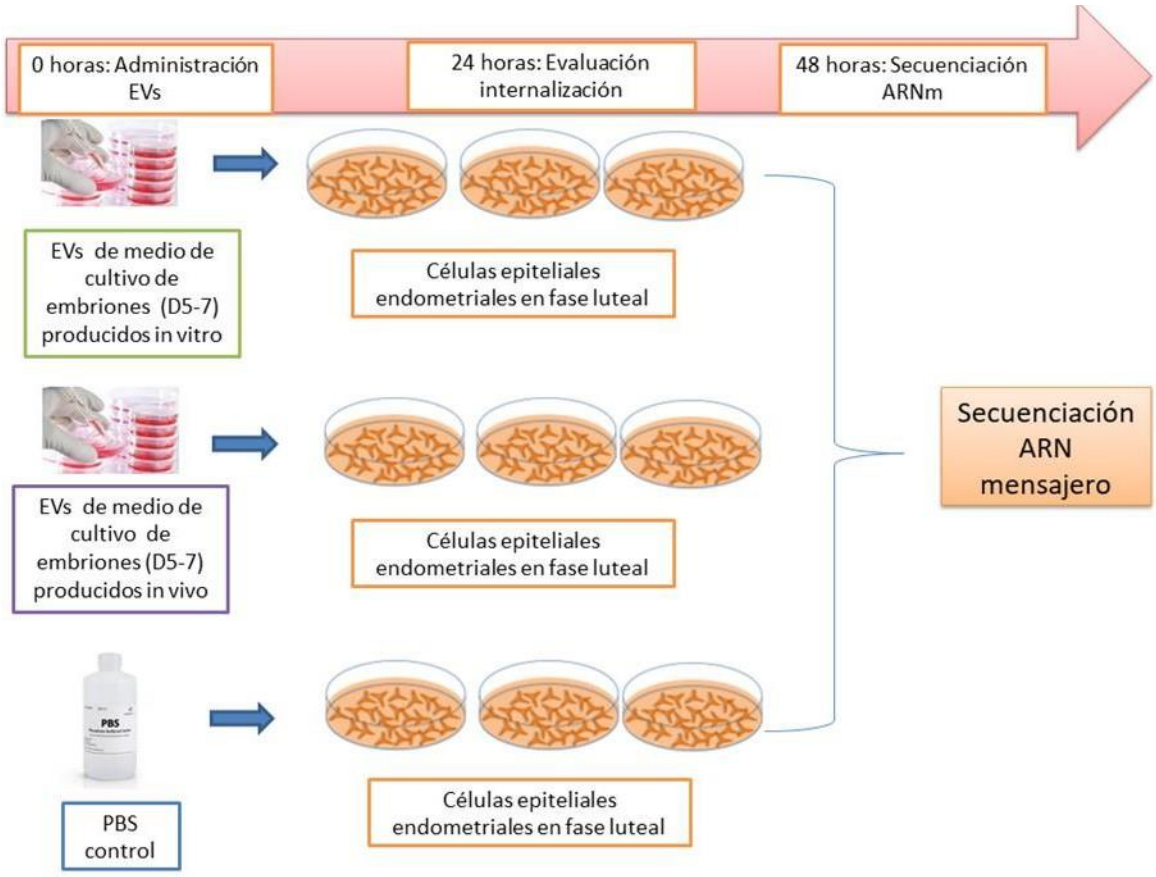


Figura 1. Diseño Experimento 1: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas durante la blastulación de embriones producidos in vitro e in vivo sobre células epiteliales endometriales in vitro. Se utilizaon 3 replicas técnicas por tratamiento. EVs: Vesículas extracelulares secretadas por embriones producidos in vitro o in vivo durante la blastulación (D5-7). *Fuente: elavoración propia.*

Experimento 2. Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones durante los días 7-9 sobre las células epiteliales endometriales.

Este experimento responde al objetivo 2 en el cual se evaluó el efecto de las EVs secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios producidos *in vivo* e *in vitro*, durante los días 7-9 de desarrollo (etapa de protrusión). En este caso, los blastocistos producidos *in vivo* fueron colectados al día 7 mediante lavado uterino y posteriormente fueron transferidos a placas para realizar el cultivo individual hasta el día 9. Los blastocistos producidos *in vitro* fueron cultivados en grupo hasta el día 7 y luego los blastocistos se transfirieron a cultivo individual en gotas para realizar el cultivo individual hasta el día 9. Posteriormente se colectó el medio de cultivo de embriones de calidad 1- 2 protruidos y se realizó el aislamiento de las EVs secretadas al medio de cultivo para la caracterización descrita en el experimento anterior. Paralelamente las EVs aisladas fueron adicionadas al medio de cultivo de las células epiteliales endometriales similar a lo mencionado en el experimento anterior. Se evaluaron mediante RT-PCR los genes vinculados con la respuesta a IFNT (ISG15, OAS1Y, MX1, MX2), MMP14 (remodelamiento de la matriz extracelular), MUC1 (adhesión celular), PTGES (metabolismo de eicosanoides), IFNAR1 y IFNAR2 (receptores y vía de señalización de IFNT). Se utilizó la misma línea celular descrita anteriormente con 3 réplicas técnicas por tratamiento, pero en placas de 12 pocillos cantidad inicial de 0,1 x 10^6 células. Al alcanzar el 60% de confluencia, las EVs fueron adicionadas al medio de cultivo. La cantidad de nano partículas administradas fue de 1×10^8 (Koh et al., (2020).

Una vez transcurridas las 24 horas de la suplementación al medio de cultivo con EVs embrionarias, se procedió a la evaluación de la internalización de las EVs embrionarias por parte de las células epiteliales endometriales, mediante el marcaje con PKH67 utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente. A las 48 horas posteriores a la suplementación, se realizó la colecta de este medio de cultivo para aislar las EVs provenientes de las células epiteliales endometriales condicionadas previamente con EVs embrionarias, estas fueron utilizadas en el experimento 3. Paralelamente, se realizó una lisis de las células y se extrajo el ARN total para realizar el análisis de expresión génica (Figura 2).

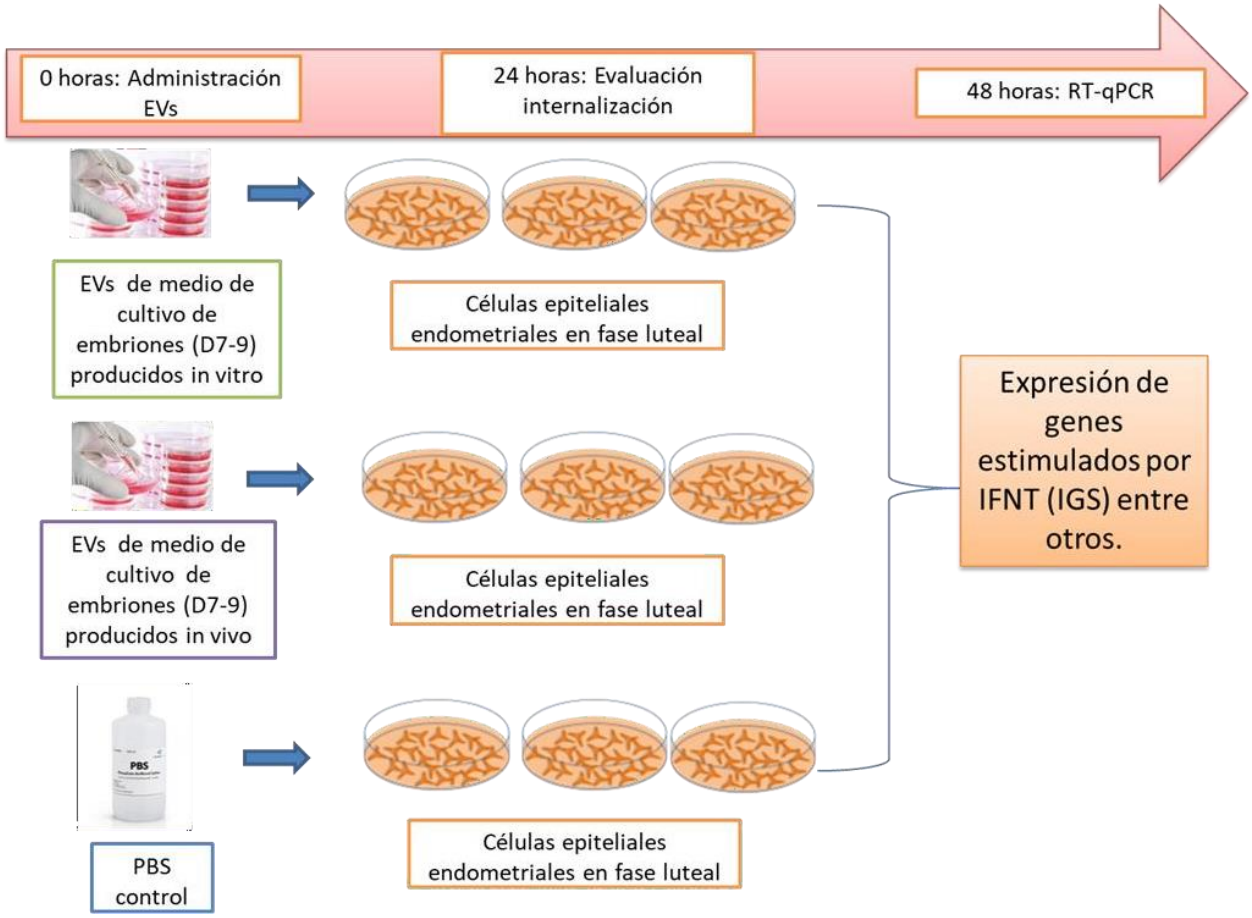


Figura 2. Diseño Experimento 2: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares producidas por blastocistos (día 7-9) bovinos producidos in vitro e in vivo en la expresión de genes asociados a la respuesta endometrial durante el periodo-pre-implantatorio. *Fuente: elavoración propia.*

Experimento 3. Evaluación de la internalización y determinacion del efecto de las vesículas extracelulares secretadas por células epiteliales endometriales producidas in vivo e in vitro sobre la calidad y competencia de embriones bovinos pre-implantatorios producidos in vitro durante los días 5-9 del desarrollo embrionario.

Este experimento responde a al objetivo 3 y se enfocó en evaluar el efecto de las EVs maternas (*in vivo* o *in vitro*) sobre el desarrollo pre-implantatorio de embriones bovinos producidos *in vitro*. Se realizó aislamiento de EVs provenientes de medio de cultivo de células epiteliales endometriales cultivadas *in vitro* y de fluido uterino de hembras en fase luteal las cuales fueron caracterizadas mediante NTA, TEM y citometría de flujo.

Los embriones fueron producidos in vitro y cultivados en grupo hasta estadio de mórula, momento en el cual se seleccionaron las mórulas (n=90) para asignarlas aleatoriamente a uno de los tres grupos (1: EVs de células; 2: EVs de fluido uterino y 3: control negativo). Las mórulas fueron cultivadas en medio SOFdep al cual se le adicionó las EVs provenientes de las células endometriales o de fluido uterino (excepto para el control negativo) al día 5 (estadio de mórula) y al día 7 (estadio de blastocisto) de desarrollo embrionario, con el objetivo de evaluar el efecto de forma continua en el desarrollo hasta blastocisto y en la capacidad de protrusión de los embriones. Para esto se adicionó en cada momento una concentración de $2.4x10^8$ de partículas en 500µl de medio SOFdep (Lopera et al., 2016; Fu et al., 2021). Se realizó evaluación de la internalización de las EVs en los embriones pre-implantatorios utilizando la tinción PKH67 para las EVs y Hoechst para la evaluación del núcleo de las blastómeras posterior a las 24 horas de añadir las EVs endometriales.

Al día 7 se determinó el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, al día 9 el porcentaje de embriones protruidos. Al día 9 de desarrollo se evaluó la calidad de los embriones y estos fueron utilizados para la evaluación mediante RT-PCR de la expresión de genes vinculados con la calidad embrionaria. Los genes a evaluar fueron genes asociados a pluripotencia (OCT4, NANOG, SOX2), reconocimiento de gestación (IFNT), regulación del estrés oxidativo (GPX1), gene vinculado al metabolismo y obtención de energía (G6PD) y el gen vinculado a la implantación (PAG1). Para esto, se evaluaron 3 grupos de 10 embriones para cada grupo experimental (Figura 3).

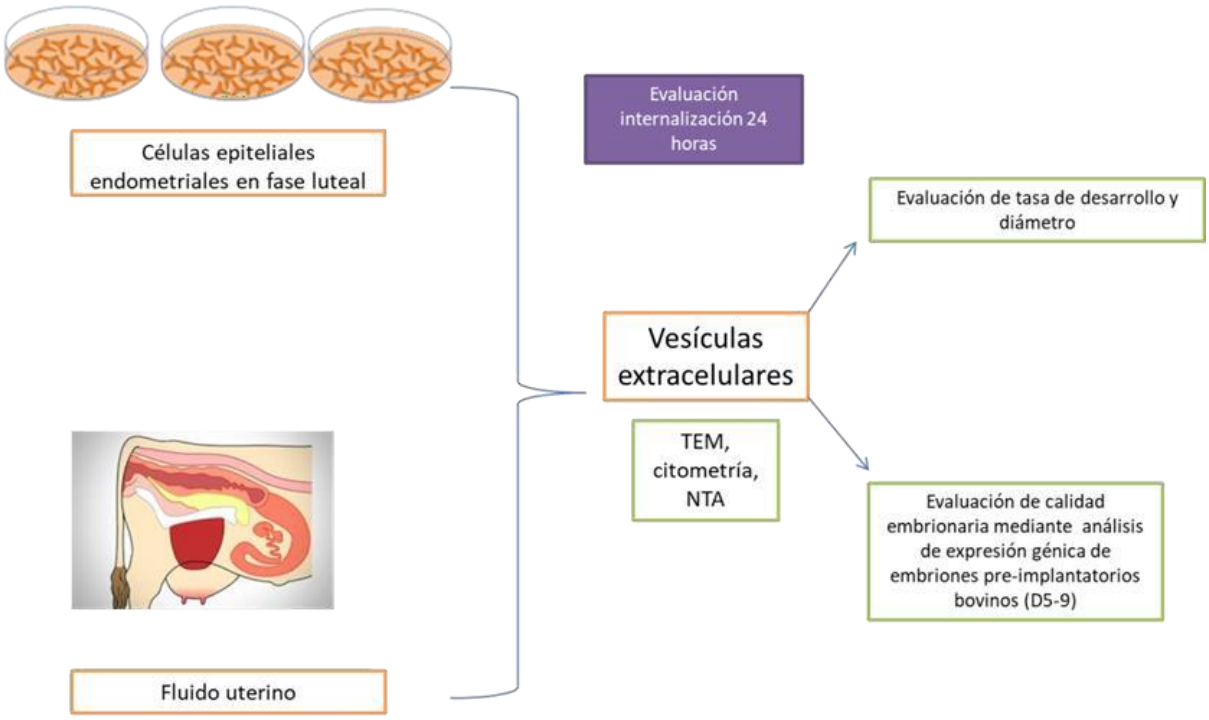


Figura 3. Diseño experimento 3: Evaluación del efecto de las EVs secretadas por células epiteliales endometriales cultivadas in vitro e in vivo sobre la calidad y desarrollo de embriones pre-implantatorios bovinos. *Fuente: elavoración propia.*

2. Metodologías de investigación y desarrollo

1) Lugar

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Ciencia Animal de la facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción (UDEC), Campus Chillan; Región del Ñuble.

2) Producción de embriones

a. Producción de embriones in vivo

Los embriones fueron obtenidos de hembras bovinas provenientes de las instalaciones de la facultad de Medicina Veterinaria del departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Concepción, campus Chillán. Las hembras serán superovuladas e inseminadas y posteriormente los embriones fueron colectados según lo descrito por

García et al. (2015) con algunas modificaciones. Previo a la manipulación de los animales se obtuvo la aprobación del comité de ética de la Universidad de Concepción. Se realizó ablación folicular transvaginal guiada por ultrasonido (Sonoscape X3V con traductor sectorial de 5 MHz) de folículos de 5 a 10 mm o más de diámetro (folículo dominante) y aplicó 2,5 mg de benzoato de estradiol +50 mg de progesterona o 2500 UI de GnRh para sincronizar la emergencia de la onda folicular entre las hembras bovinas. En presencia de cuerpo lúteo, se administró una dosis de PGF2α (500 mg de D-cloprostenol Estrumate; Vétoquinol, Quebec, Canadá) por vía intramuscular. El celo fue detectado visualmente y la sincronización de la ovulación se realizó utilizando 2500UI de GnRh, evaluando mediante ultrasonografía transrectal. Día -7/10 las hembras presentaron celo, el día -3 se colocó un dispositivo liberador de progesterona P4 (CIDER-1.38 gr); Vétoquinol) en el vestíbulo de la vagina + 100 mg de P4 (im)+ 2 mg de benzoato de estradiol (im). El día -1.5 se produce la ablación folicular y el Día 0 es el día esperado de la aparición de las oleadas foliculares (Bergfelt al., 1994; Singh et al., 2004).

Los tratamientos de super ovulación se iniciaron en la mañana del día 0, Cada animal donante del grupo control recibió 250 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canadá) distribuidos en 10 tratamientos im (con un rango decreciente de 50mg a 10mg) a intervalos de 12 horas durante un período de 5 días. Dos dosis de PGF se administraron con 12 horas de diferencia en el día 3 y 4, y los CIDER se retiraron 24 horas antes de la última aplicación de NIH-FSH-P1 (Bó et al., 2006). 48 horas después de la segunda dosis D-cloprostenol las donadoras presentaron celo, y se les aplicó 5000 UI de GnRh (im). Luego de 12 horas de presentado el celo se efectuó la primera inseminación y a las 48 horas segunda inseminación a las vacas superovuladas.

La colecta de embriones se realizó al día 5 post inseminación mediante lavado uterino para el Experimento 2 y al día 7 para el Experimento 3. Los embriones colectados fueron cultivados en medio SOF (fluido oviductal sintético) depletado para la evaluación posterior de las EVs secretadas al medio de cultivo.

b. Producción de embriones in vitro

Colecta de ovocitos y maduración in vitro (IVM)

La colecta de ovocitos se realizó a partir de ovarios obtenidos del matadero Frigosur (Chillán). Los folículos de diámetros entre 3 y 8 mm fueron puncionados con una aguja hipodérmica de 19 G y jeringa de 10 ml, para posteriormente recolectar el líquido folicular obtenido en tubos cónicos de 15 ml. El líquido folicular se dejó decantar por 10 a 15 minutos a 37°C para obtener un pellet rico en ovocitos. Luego el sobrenadante fue eliminado y se adicionó medio de manipulación (TCM-199 con HEPES CON 10% SFB (suero fetal bovino)) para el lavado. Los complejos cúmulo-ovicitos (CCOs) se seleccionaron según su calidad, siendo calidad I y II aquellos CCOs que posean un citoplasma homogéneo, oscuro y con más de dos capas compactas de células del cúmulo (de Loos et al., 1989). Para la selección se utilizó estereomicroscopio 20X a 40X. Para la IVM se utilizaron placas 4-well (Nunc, Thermo Scientific, USA) (25 a 30 COCs por 500 µL) en medio de maduración (medio 199 suplementado con 0,6 mM de glutamina, 0,2 mM de piruvato, 0,2 U/mL de FSH/LH, 1 µg/mL de estradiol, 50 µg/ML de gentamicina, 10ng/mL de EGF y 10% de SFB) durante 22 a 24 hrs a 38ºC, en una atmósfera controlada con 5% de CO_2 (Velásquez et al. 2016).

Fecundación in vitro (IVF)

Los ovocitos previamente madurados, fueron fecundados utilizando semen comercial. Para la selección de espermatozoides mótiles se realizó la técnica de percoll mediante una gradiente de centrifugación (4.500 rpm por 6 minutos) discontinua (45/90% de Percoll) y posterior lavado por centrifugación con medio de fecundación (TALP-IVF) El pellet obtenido se lavó en 500 µL de medio de fecundación y centrifugó a 3.000 RPM por 3 minutos. La concentración de espermatozoides mótiles de la muestra obtenida se evaluó mediante conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer, además de motilidad en cámara de Makler. La fecundación se realizó en grupos de 25-30 CCO´s y una concentración de espermatozoides de 1 x 10^6 / mL (10,000 espermatozoides: 1 ovocito). La incubación de ambos gametos se realizó durante 18-20 horas en placas de 4 pocillos, en 500 µL de medio de fecundación (TALP FIV suplementado con

0,01mg/mL de heparina, 2 mM de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina y 6 mg/mL de BSA) en atmósfera controlada con 5% de CO_2. En cada pocillo de la placa de fecundación se transfirieron 30 CCOs maduros con 500 µL de medio de fecundación.

Cultivo in vitro

Transcurrido el periodo de fecundación, los presuntos cigotos fueron denudados de las células de cúmulo mediante la acción de hialuronidasa (0,3 mg/ml) y mecánicamente por medio de vórtex por 4 minutos en medio TCM-199 con HEPES. Luego los embriones fueron cultivados en placas de 4 pocillos (25 a 30 cigotos por pocillo) con 500 µl de medio SOF cada uno (SOF suplementado con 0,37 mM de citrato trisódico; 2,77 mM de mioinositol; 10 ng/mL de EGF; 2% de SFB y 3 mg/mL) durante 5 días. Posteriormente los embriones fueron transferidos a cultivo individual en gotas de 40 µl con SOF depletado de EVs hasta el día 7 de desarrollo. Para el experimento 2, los embriones fueron cultivados en placas de 4 pocillos (25 a 30 cigotos por pocillo) con 500 µl de medio SOF cada uno (SOF suplementado con 0,37 mM de citrato trisódico; 2,77 mM de mioinositol; 10 ng/mL de EGF; 2% de SFB y 3 mg/mL) durante 7 días y posteriormente fueron transferidos a cultivo individual en gotas de 40 µl con medio SOF depletado de EVs hasta el día 9 de desarrollo.

El cultivo se realizó a 38°C en mezcla de tri-gases 5% CO_2, 5% O_2 y 90% de N_2 en atmósfera de aire, procedimiento descrito por Rodríguez et al. (2008) y Velázquez et al. (2016). Los medios de cultivo fueron colectados al día 7 (Experiemnto 1) y al día 9 (Experimento 2) para ser luego conservados en microtubos cónicos a -80°C para realizar el aislamiento de las vesículas.

3) Aislamiento y Caracterización de las vesículas extracelulares embrionarias

Para el aislamiento de EVs provenientes de medio de cultivo embrionario, se seleccionaron únicamente los medios de cultivo de embriones de calidad 1 y 2 según los criterios de calidad establecidos por la IETS (sociedad internacional de tecnología de embriones) tanto para embriones producidos *in vitro* e *in vivo*.

Para ello, las EVs fueron aisladas utilizando el kit de aislamiento de exosomas (ExoLutE® Conditioned Medium) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Rosetta Exosome Inc, Korea). Este kit de aislamiento de exosomas utiliza como metodología de aislamiento el método basado en cromatografía por exclusión de tamaño, el cual provee una concentración de vesículas altamente purificadas. En breve, se realizó un paso de prelimpieza mediante centrifugación de la muestra a 400g por 10 minutos, seguido por otra centrifugación del sobrenadante a 2000g por 20 minutos. El sobrenadante fue recolectado y procesado para el enriquecimiento con EVs. Las EVs obtenidas fueron resuspendidas en la solución R para ser adicionadas a la columna L. Las EVs recuperadas fueron purificadas cargando un volumen de 50 µl de volumen de muestra en la columna S y centrifugadas a 700g por 5 minutos. Las EVs fueron almacenadas al -80°C para su posterior uso.

a. Análisis de microscopía electrónica de transmisión

Las EVs aisladas de los medios de cultivo de embriones producidos *in vitro* e *in vivo* al día 7 y 9 de desarrollo, fueron evaluadas mediante microscopia electrónica de transmisión. Para ello se utilizaron grillas de cobre recubiertas con formvar-carbón siguiendo el protocolo descrito por Raposo et al., (1996) y Théry et al., (2006). Un volumen de 50 µL de EVs aisladas fueron transferidas a las grillas de cobre por 3 minutos. Posteriormente las grillas fueron lavadas con PBS (50 µL) 3 veces y luego fijadas con 50 µL de glutaraldehído al 1% en PBS para ser contrastadas utilizando 50 µL de solución de uranil oxalato (0,5%) (Electron Microscopy Sciences, USA) (pH 7,0) durante 5 min. Posteriormente, la grilla fue transferida a una gota de 50 µL de metilcelulosa-UA (Sigma M6385) durante 10 min en superficie de hielo para luego ser secadas al aire a temperatura ambiente durante la noche. Finalmente, cada una de las grillas fue colocada 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 capturó 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).

b. Evaluación de los marcadores de superficie

Se realizó una evaluación de los principales marcadores definidos por la ISEV. Se cuantificó mediante citometría de flujo la presencia de los marcadores CD9, CD63, CD81 y CD40 los cuales son específicos para EVs (microvesículas / exosomas). El procedimiento de realizó según lo descrito por Mellisho et al., (2017). Inicialmente $4x10^8$ partículas de EVs se mezclaron con 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, CD81, CD40L) con las perlas de látex como control negativo. Para control positivo se utilizaron EVs aisladas de una línea celular comercial humana (HEK293; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) y de líquido folicular bovino. Para realizar el análisis, 100 µl del complejo de EVs + perlas de látex, se resuspendieron con 400 µL de fluido de enfoque para citometría de flujo usando el equipo Attune™ NxT Flow Cytometer (Life Technologies, Inc, USA).

c. Análisis de seguimiento de nanopartículas

Para determinar el tamaño y la concentración de las EVs provenientes tanto de embriones producidos *in vitro* como *in vivo*, se utilizó NTA NanoSight NS300; Malvern Instruments Ltd, UK). Este equipo es capaz de medir tamaño de partículas entre 10 a 2000 nm. La concentración de partículas fue ajustada entre 20 a 100 partículas por frame. El control negativo para esta determinación fue PBS. Las muestras individuales fueron cargadas a jeringas de tuberculina y conectadas a la bomba de jeringa para

NanoSight (Malvern Instruments Ltd, UK) que permite realizar análisis de muestras a una velocidad de flujo constante. Cada muestra fue analizada por triplicado con la misma configuración de cámara, tiempo de adquisición de 60 segundos y ajuste del umbral de detección de nivel 8. Asimismo, el láser de luz utilizado fue de 488 nm. Los datos fueron capturados y analizados, utilizando el software de análisis (NTA versión 3.2 Dev Build 3.2.16, Malvern Instruments Ltd, UK).

4) Producción de líneas celulares endometriales

Se utilizaron células que fueron aisladas de úteros de matadero utilizadas en el trabajo post doctoral código 3180447. Para esto se caracterizaron los niveles de progesterona y estradiol mediante radio inmunoensayo, presentes en el suero de la hembra donadora para determinar la fase del ciclo reproductivo en la que se encontraba el útero. Las líneas celulares fueron caracterizadas como células epiteliales en fase luteal, y almacenadas en nitrógeno líquido para su posterior uso.

Para determinar la pureza del cultivo, las células fueron caracterizadas utilizando citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células positivas al marcador de citoqueratina. El anticuerpo a utilizar fue pan-citoqueratina (sc-81714; Santa Cruz). Para ello se tomaron los cultivos cercanos al 80% de confluencia y se suspendieron en PBS con 0,2% de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich) y 1 mM de EDTA. Después de bloquear, las alícuotas de células ($1x10^5$ células por muestra aproximadamente) fueron incubadas con el anticuerpo primario por 30 minutos a 4°C. Cómo anticuerpo secundario se utilizó anti-mouse IgG conjugado con PE (1:500 SantaCruz Biotechnology). Las células fueron analizadas con el equipo Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer, de Life Technologies.

5) Análisis del efecto de las vesículas extracelulares embrionarias sobre células epiteliales endometriales

a. Internalización

La EVs embrionarias de las ventanas 5-7 (Experimento 1) y 7-9 (Experimento 2) se marcaron utilizando la tinción SIGMA-ALDRICH PKH67 para exosomas, siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. A la muestra se le agregó 1 ml de diluyente C y 6 µL de PKH67 y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. posteriormente se añadió 10% de BSA y se filtró utilizando un Amicon® Ultra-15 (10 kDa), centrifugando a 3000 rpm por 15 minutos. Luego se realizaron 3 lavados con PBS centrifugando a la misma velocidad por el mismo tiempo recuperando el contenido del filtro Amicon.

b. Análisis transcriptómico

La extracción del ARN total a partir de los cultivos celulares expuestos o no a EVs embrionarias se llevó a cabo utilizando el kit E.Z.N.A Total RNA Kit I (OMEGA, Atlanta, EEUU), según las indicaciones del fabricante. Se retiró el medio de cultivo y se procedió al lavado del cultivo con PBS. Posteriormente se adicionó buffer TKR de lisis y se mezcló mediante vórtex. Se añadió etanol al 70% y se procedió a la transferencia del contenido a una mini columna HiBind® RNA ubicada previamente en el tubo de colección de 2ml. Se transfirieron a esta columna 700 µL y se centrifugó a 10,000 x g for 1 minuto hasta transferir el volumen total de la muestra descartando el contenido que pasa a través de la columna. Se transfirieron 500 µL RNA Wash Buffer I a la mini columna HiBind® RNA y se centrifugó a 10,000 x g por 30 segundos. Se descartó nuevamente el contenido que pasó a través de la columna y luego se añadieron 500µL RNA Wash Buffer II. Se realizó una centrifugación a 10,000 x g por 1 minuto y se descartó nuevamente lo que quedó en el tubo colector posterior a la centrifugación. Se repitió el paso del lavado con RNA Wash Buffer II y luego se realizó una centrifugación a velocidad máxima por 2 minutos para el sacado de la columna. Por último, lacolumna se transfirió a un nuevo tubo colector y se añadieron 40-70 µL de agua libre de nucleasas. Se centrifugó a velocidad máxima por 2 minutos y el ARN

total se colectó en el tubo y se almacenó a -80°C para su posterior uso.

Una vez obtenido el RNA total, se procedió al control de calidad y cuantificación mediante el uso del kit Agilent RNA Pico chip. Para el experimento 1 se realizó un análisis de secuenciacipón global. Para ello el ARNm fue obtenido mediante el uso del módulo NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation. Posteriormente el ARNm fue fragmentado y el cADN fue sintetizado, reparado y ligado utilizando NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit. Las librerías fueron secuenciadas utilizando el kit NextSeq 500/550 High Output V2 en el equipo Illumina NextSeq 500, De esta forma se obtuvieron lecturas individuales de 150 pares de bases de longitud. Este procedimiento fue realizado por la empresa CD Genomics (EE.UU). Para ello, el ARN total extraído de las células epiteliales endometriales fue transportado con 8 kg de hielo seco hasta los Estados Unidos.

El análisis transcriptómico del experimento 2 se realizó mediante el análisis de la expresión de genes específicos mediante PCR Tiempo Real utilizando el método 2 - ΔΔCT. Inicialmente se realizó un tratamiento con DNAsa I de cada muestra de ARN, RNase-free para digerir cualquier contaminación con ADN genómico. En el tratamiento con DNAsa, se utilizó buffer cloruro de magnesio 10X, 1µl y DNAsa 1 µl y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó 1 µl de EDTA a cada muestra y se incubó a 65°C por 10 minutos. Se añadió 1 µl de random primers y dNTPs. La incubación fue realizada a 65°C por 5 minutos. Luego se incorporó 4 µl de M-MLV RT buffer (5x first strand buffer) de vitrogen™, 2 µl de ditiotreitol (DTT) y 1µl del inhibidor de las RNAsas (RNAsa out), incubando a 37°C por dos minutos. Posteriormente se adicionó 1 µl de la enzima M MLV RT de Thermo Scientific y se incubó a 25°C por 10 minutos, luego a 37°C por 50 minutos y por último a 70°C por 15 minutos. Los ADNc obtenidos se congelaron a -20°C hasta su uso. Cada muestra fue cargada por duplicado (réplicas técnicas). La reacción de qPCR fue realizada con 2 µl de ADNc, 0,5µl de primers (10 pM de cada uno, forward y reverse) 5 µl de Kicq Start Syber green qPCR (Sigma) y completado con 2.5 µl de H_2O para un volumen final de 8 µl. Se utilizó el equipo MX3000P Real-Time PCR (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Como se

describió previamente para la evaluación de genes embrionarios. Se realizaron dos réplicas de cada muestra por cada gen, las cuales fueron consideradas como réplicas técnicas. Para este análisis la expresión de cada gen se normalizó utilizando los niveles de expresión de GAPDH y ACTB y se evaluaron los genes IGS15, OAS1Y, MX2, MMP14, PTGES, MUC1 (Tabla 1) y receptores de interferón IFNAR1 e IFNAR2 cuyos partidores están descritos en la Tabla 1.

c. Análisis bioinformático de los datos de RNAseq (Experimento 2)

Se evaluó la calidad de las librerías resultantes utilizando el programa FastQC en combinación con la plataforma VEC screen para determinar la presencia de posibles secuencias del adaptador en las lecturas. El software RNAQC chain se utilizó para evaluar secuencias remanentes de posible contaminación de ARN de procariontes. Las lecturas fueron cortadas y filtradas utilizando el software Trimmomatic. Se seleccionaron las secuencias con un valor sobre 30 Phreads. La longitud para los ARNm fue aceptada por sobre los 75 nucleótidos. Las secuencias fueron mapeadas contra el genoma de referencia Bos Taurus (ARS-VCD1.2) utilizando el programa HISAT2. Los archivos SAM obtenidos fueron convertidos a archivos BAM los cuales fueron ordenados e indexados utilizando SAM tools. La identificación del transcripto y la cuantificación se realizó utilizando StringTie package y las lecturas se expresaron como kilobase por millón (RPKM).

El análisis de expresión diferencial se realizó usando el paquete de R, EdgeR, teniendo como criterio un filtro de mínimo 5 cuentas de CPM. La evaluación del diferencial de expresión se realizó a partir de las cuentas normalizadas utilizando el método TMM y ajustándose al modelo linear binomial generalizado, considerándose estadísticamente significativo un valor de p ajustado menor a 0,05. Estos resultados fueron graficados usando el visualizador ggplot en los gráficos de calor, análisis de componentes principales (PCA) y volcano plot. Con los genes diferencialmente expresados se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas moleculares basadas en la base de datos KEEG y visualizadas mediante el paquete ClusterView.

d. Validación de los datos de secuenciación mediante RT-qPCR

Para esto se evaluó la expresión de genes seleccionados a partir de los datos de RNAseq. El análisis se realizó mediante PCR tiempo Real utilizando el método 2 - ΔΔCT como se describió previamente. El nivel de expresión de cada transcripto fue normalizado con GAPDH y ACTB (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y beta actina). La normalización se realizó utilizando los niveles de expresión de GAPDH y ACTB como cociente de los valores obtenidos para cada gen. Los genes que se evaluaron fueron genes vinculados a la activación de IFNT (IGS15, OAS1Y, MX2), remodelamiento matriz extracelular (MMP14), metabolismo de eicosanoides (PTGES) y adhesión celular (MUC1) (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de partidores específicos para evaluar expresión génica de células endometriales expuestas a vesículas extracelulares provenientes de embriones bovinos pre-implantatorios producidos in vitro e in vivo (Experimento1 y 2). *Fuente: elaboración propia.*

Gen	Secuencia del partidor (5´–3´)	Tamaño del producto (bp)	Temperatura de alineamiento	Número de acceso (NCBI)
MX2	F: AAGTATGAGGAGAAGGTGCGGC R: AGCTCTGGTCCCCGATAACG	112	57°C	XM_015473641.2
OXTR	F: ACAAGCACTCGCGCCTCTTCT R: GCGGAACGTGATGTCCCACAGA	107	56°C	XR_003031707.1
MUC1	F: ACATCCAGGCCCCTTTCCTC R: GTGGAAACTGGCGTAGTTCTGC	118	55°C	NM_174115.3
OAS1Y	F: AGCACCGTGATGGAGCTCAG R: GTCGATGGCTTCTTTGACCTGC	111	55°C	NM_001040606.1
CTSL	F: CCTCGCCACAGGTTTTTGAAC R: TGTGGTCAAATTTTGGAGCAGC	91	55°C	NM_001083686.2
WNT7A	F: ATGGTCTACCTCCGGATCGGTG R: GCCAGGCCTGGGATCTTGTTAC	83	57°C	NM_001192788.1

ISG15	F: ACCTGACGGTGAAGATGCTAGG R: GATCTTCTGGGCGATGAACTGC	98	57°C	NM_174366.1
ESR1	R: CCAACAGGTGCCCTATTACCTG R: CCACCTTGGCGTCGATTATCTG	108	55°C	NM_001001443.1
HPGD	F: AAGGTAGCGCTGGTCGATTGG R: TTGTTCCTGATCGGCCACATCG	120	54°C	NM_001034419.2
PTGES	F: ATGTACGTGGTGGCCGTCATC R: GTCGTTCCGGCAATACTGGAGG	108	56°C	NM_174443.2
MMP14	F: AGTCCCTCTCAGCTGCCATTG R: CATGGCCTTCATGGTGTCTGC	89	56°C	NM_174390,2
MX1	F: AGGCAGGAGACCATCAACTTGG R: ACCTTTGTCCACCAGATCGGG	144	56°C	XM_015473623.2
CST6	F: GTGTCCCTGTAGAGACCCCT R: TGCCGTAGATACGGTCCAAG	113	55°C	NM_001012764.3
IFNAR1	F: TCAGGGGAAGCAAATCTGAAGC R: TTCTTGACAGACTCACTGCTGC	98	53°C	NM_174552.2
IFNAR2	F: AGGCCACACTGCCAAGATGTG R: ACGAGGCTGATGTGCACCATG	124	54°C	NM_174553.2
MX2	F: AAGTATGAGGAGAAGGTGCGGC R: AGCTCTGGTCCCCGATAACG	112	57°C	NM_173941.2
ACTB	F: TGCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: TTGGCGTAGAGGTCCTTGCG	119	55°C	NM_173979.3
GAPDH	F: AGGTCGGAGTGAACGGATTC R: ATGGCGACGATGTCCACTTT	85	55°C	NM_001034034.2

6) Métodos asociados al experimento 3

a. Aislamiento de vesículas extracelulares provenientes de fluido uterino y medio de cultivo celular

El fluido uterino se obtuvo mediante lavados de útero de hembras bovinas en fase luteal temprana. Para ello las hembras recibieron anestesia epidural con lidocaína (2%) y se realizó un lavado de la región ano-vulvar. Un catéter de globo de punta redonda de dos vías fue utilizado para los lavados (sonda Foley Fr16). Los labios

vulvares se separaron y se insertó el catéter con el estilete en la vagina y se avanzó hacia la luz del cérvix. Una vez que el balón de la sonda Foley se situó en la base del cuerno uterino, se insufló con una jeringa de 20 ml. El lavado se realizó con PBS (solución salina tamponada con fosfato) sin ninguna adición de fuente proteica. Cada lavado fue efectuado con 30 ml de PBS por cuerno uterino y repetido hasta alcanzar 150 ml de PBS colectado post lavado. El mismo procedimiento se realizó en el otro cuerno uterino obteniéndose un volumen total de 300 ml por lavado. Respecto al aislamiento de EVs povenientes de medio de cultivo de células epiteliales endometriales, se obtuvo un total de 30 ml de medio de cultivo. El medio se recolectó de un total de tres placas de cultivo de 100 mm de diámetro, cada placa de cultivo con 10 ml de medio de cultivo suplementado con progesterona y estrógeno de acuerdo con la concentración plasmática fisiológica de la fase lútea temprana.

Tanto para el fluido uterino, como para el medio de cultivo de células endometriales, el aislamiento de las EVs se realizó utilizando la técnica de aislamiento de Evs que fue publicada por Thery et al. (2006) y estandarizada en nuestro laboratorio por Mellisho et al. (2017). Para ello, se realizaron centrifugaciones seriadas; la primera centrifugación se realizó a 300xg/10 min, para eliminar detritos del medio. Posteriormente se procedió con la segunda centrifugación 2000xg/ 10 minutos para la eliminación de cuerpos apoptóticos. La tercera centrifugación se realizó a 10000-12000xg/ 30 min. El sobrenadante fue colectado para realizar la última centrifugación 100000-120000xg/120 min. De esta última centrifugación, el pellet es la porción rica en vesículas extracelulares, por lo tanto, el sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 100 µL de PBS. Las EVs aisladas fueron caracterizadas utilizando los tres criterios descritos anteriormente (tamaño y concentración mediante NTA, morfología mediante TEM y marcadores de superficie mediante citometría de flujo) y almacenadas a -80°C para su posterior uso.

b. Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares de células endometriales en embriones bovinos producidos in vitro

La producción de embriones *in vitro* fue similar a la descrita para el experimento 1 y 2

salvo algunas diferencias. Al día 5 de cultivo (considerando día 0 la fecundación *in vitro*) los embriones fueron seleccionados y solo mórulas calidad 1 y 2 fueron cultivadas en grupos de 10 embriones en medio SOF hasta el día 9 de desarrollo. Para determinar la internalización de las EVs endometriales por parte del embrión producido in vitro, las EVs fueron teñidas previamente con PKH67 y luego administradas al mediode cultivo embrionario. Para la tinción de las EVs con PKH67, se utilizaron 20 µl de muestra de EVs de fluido uterino y de cultivo de células endometriales (UF/EVC) las cuales fueron marcadas con 2 µl de PKH67 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 300 µl de diluyente C durante 5 min en la oscuridad a temperatura ambiente según las indicaciones del fabricante. La reacción fue bloqueada utilizando una solución de PBS con BSA al 10% para luego lavar la muestra 3 veces con PBS utilizando ultrafiltración (0,5 mL centrifugal filter device 100 kDa, Amicon, Merck, Darmstadt, Germany) por 20 minutos a 2500g. Para el control negativo se realizó el mismo procedimiento descrito previamente utilizando PBS incubado con PKH67. Tanto el control negativo como las muestras de EVs fueron administrados en 500 µl de SOF. Una vez transcurridas las 24 horas se realizó la tinción con Hoechst para la visualización del núcleo y la fijación con glutaraldehído al 3% durante 72 horas.

La internalización fue evaluada en dos periodos distintos del desarrollo embrionario. Al día 5 (imágenes tomadas al día 6 de desarrollo) y al día 7 (imágenes tomadas al día 8 del desarrollo). Se añadió una cantidad de 2.4×10^8 partículas por cada pozo de 500 µl en medio SOF (Lopera-Vasquez et al., 2016; Fu et al., 2021). El control negativo se sometió a las mismas condiciones. Para el control negativo se utilizó PBS el cual fue incubado con PKH67 para luego ser añadido al medio de cultivo de embriones bajo las mismas condiciones. Se incluyeron tres replicas biológicas por tratamiento. Cada replica tuvo 10 embriones cultivados bajo la condición respectiva. La toma de imágenes se realizó en el equipo de microscopia fluorescente EVOS.

c. Evaluación de la calidad embrionaria en base a morfología y expresión génica

Se determinó la tasa de blastocistos al día 7 y protruidos al día 9 de desarrollo

considerando solo embriones calidad 1 y 2. Los embriones fueron clasificados utilizando los criterios de la IETS mencionados anteriormente, considerando 2 variables: etapa de desarrollo (5- blastocisto temprano; 6- blastocito; 7- blastocisto expandido; 8- blastocisto en eclosión y 9- blastocisto eclosionado) y calidad de embriones (1- bueno; 2- regular; 3- pobre; 4- degenerado).

El diámetro de los blastocistos fue medido utilizando el software Micrometrics, el cual permite generar mediciones de las fotos tomadas por una cámara acoplada al esteromicroscopio. Se realizó la medición de diámetro de cada uno de los embriones que se encuentren dentro del grupo conformado por 10 embriones y las mediciones se realizaron al día 5 (diámetro inicial), 7 y 9 del desarrollo embrionario.

d. Extracción de ARN y transcripción reversa de embriones bovinos pre-implantatorios

La extracción de ARN a partir de los embriones y la generación de ADNc se realizó utilizando el kit Ambion Cell to cDNA II (AM1723; Life Technologies) siguiendo las instrucciones descritas. Para la extracción de ARN, las muestras fueron lavadas una vez con PBS 1X a 4°C. Después de esto, se adicionaron 50 µl de buffer de lisis a cada muestra y se incubaron a 75ºC por 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con DNasa I (0,04 U/µl) incubándolas primero a 37ºC por 15 minutos y luegoa 75ºC por 5 minutos, para la degradación del ADN genómico. La reacción de RT para la generación del ADNc, se llevó a cabo con 10 µl del ARN total para una reacción de un volumen final de 20 µl que consiste en 5 µM random primers, 10mM de cada dNTP, 2 µl first strand buffer (10X), 10 U de RNase inhibitor, y 200 U/mL M-MuLV (AmbionCo., Austin, TX, USA). Los parámetros de incubación fueron 70°C por 3 min, 42°C por 60 min, y 92°C por 10 min. El ADNc fue almacenado a -20ºC hasta el momento de la realización de los PCRs.

e. Análisis de expresión génica de blastocistos bovinos pre-implantatorios, mediante qPCR

Se realizó el análisis de expresión génica a partir del ANDc obtenido y mediante PCR

tiempo real utilizando el método 2 -ΔΔCT. Se utilizó como gen normalizador GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) (Saadeldin et al 2014). La reacción de qPCR fue realizada utilizando el mismo protocolo y condicionados mencionadas anteriormente. Los genes utilizados para evaluar la calidad de los embriones fueron genes vinculados al metabolismo (GLUT1; facilitador del transporte de glucosa; G6PD: glucosa 6 fosfato deshidrigenasa), gen vinculado al estrés oxidativo (GPX1: glutatión peroxidasa 1), IFNT y por último, genes asociados a pluripotencia (OCT4, NANOG y SOX2). La secuencia de los cebadores se escribe en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los partidores que se utilizaron para determinar calidad de los embriones pre-implantatorios bovinos expuestos a vesículas extracelulares de células endometriales en un modelo in vitro e in vivo. *Fuente: elaboración propia.*

Gen	Secuencia del partidor	Tamaño delproducto (bp)	Temperaturade alineamiento	Número de acceso (NCBI)
PAG1	F: CACAGTGGGGACCATGAGAACC R: TGAGTGCTCCGTTCTGCTCG	95	54°C	NM_174411.2
SOD1	F: CCATCCACTTCGAGGCAAAG R: TCTCCAAACTGATGGACGTGG	100	54°C	NM_174615.2
G6PD	F: TTCCACGAGGACCAGATCTACC R: TGAGAATGACGCAGGCGATGTT	136	55°C	NM_001244135.2
NANOG	F: CCCGAAGCATCCAACTCTAGGG R: AGACAGTGTCCGTGTCGAGG	100	56°C	NM_001025344.1
OCT4	F: TCGAGAACCGAGTGAGAGGC R: ACACTCGGACCACGTCTTT	120	55°C	NM_174580,3
IFNT	F: ATGCTCCAGCAGTGCCTCAAC R: TGTTGGAGCCCAGTGCAGAG	95	57°C	NM_001015511.4
GPX1	F: GCAACCAGTTTGGGCATCAG R: AGCATAAAGTTGGGCTCGAA	100	55°C	NM_174076.3
BCL2	F: TGTGGAGCTGTATGGCCCTAGC R: AGATAGGCACCCAGGGTGATGC	114	56°C	NM_001166486.1
BAX	F: CGGGTTGTCGCCCTTTTCTAC R: CAGCCGCTCTCGAAGGAAGT	120	55°C	NM_173894.1
SOX2	F: CGCCCTGCAGTACAACTCTAT R: GCCCTGCTGAGAATAGGACA	85	55°C	NM_001105463.2

ACTB	F: TGCCCTGAGGCTCTCTTCCA R: TTGGCGTAGAGGTCCTTGCG	119	55°C	NM_173979.3
GAPDH	F: AGGTCGGAGTGAACGGATTC R: ATGGCGACGATGTCCACTTT	85	55°C	NM_001034034.2

3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos de PCR se utilizó la plataforma R usando el paquete Rstatix y la prueba Kruskal unidireccional seguida de la comparación de pares de Wilcoxon. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos conun valor de $p<0,05$.

Para la evaluación de la tasa de blastocistos expandidos y protruidos, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis y como post hoc la prueba de wilcoxon. $P<0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Para la evaluación del diámetro de los embriones se realizaron análisis estadísticos utilizando ANOVA anidado con dos factores independientes (tratamiento y tiempo) y un factor dependiente (diámetro). Para el análisis post hoc se realizó un test de Tuckey. Se consideró un $p<0,05$ como estadísticamente significativo.

Los resultados se graficaron usando el paquete ggpubr en formatos de gráficos de barras y mostrando el error estándar.

VI. RESULTADOS

Experimento 1: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones producidos in vitro e in vivo, en células endometriales en un modelo in vitro.

Para este experimento, se produjeron embriones in vivo e in vitro los cuales fueron seleccionados en estadio de mórula (D5), cultivados individualmente por 48 horas (D7). En el caso de los embriones producidos in vivo, se obtuvieron 107 estructuras a partir de las hembras superestimuladas de las cuales 89 fueron mórulas (83,2%) y 82 se desarrollaron hasta estadio de blastocisto (76,6%). Para la producción de embriones in vitro, se maduraron 612 ovocitos, de los cuales se cultivaron 505 presuntos cigotos (82,5%), 227 alcanzaron en el estadio mórula (44.9%) y 125 estadio de blastocisto (24,7%).

Caracterización de nanopartículas colectadas de medios de cultivo embrionario

La distribución de las nanopartículas fue evaluada para determinar la concentración y el tamaño (promedio y moda) de partículas aisladas de grupos de medios de cultivo de embriones bovinos producidos in vitro e in vivo. Los descriptores estadísticos y la representación gráfica de la data están representados en la Figura 4 y Tabla 3. Las nanopartículas aisladas de medio de cultivo de embriones producidos in vivo o in vitro, así como EVs provenientes de suero sanguíneo bovino (control positivo) fueron positivas para los marcadores de EVs CD9, CD63, CD81 y CD40 (Tabla 4) (Thery et al., 2018). Sin embargo, los controles negativos (SOFdep: fluido sintético oviductal depletado) muestran valores de positividad cercanos a cero. Adicionalmente, las nanopartículas fueron visualizadas mediante TEM, mostrando la morfología clásica con una bicapa lipídica (Figura 5).

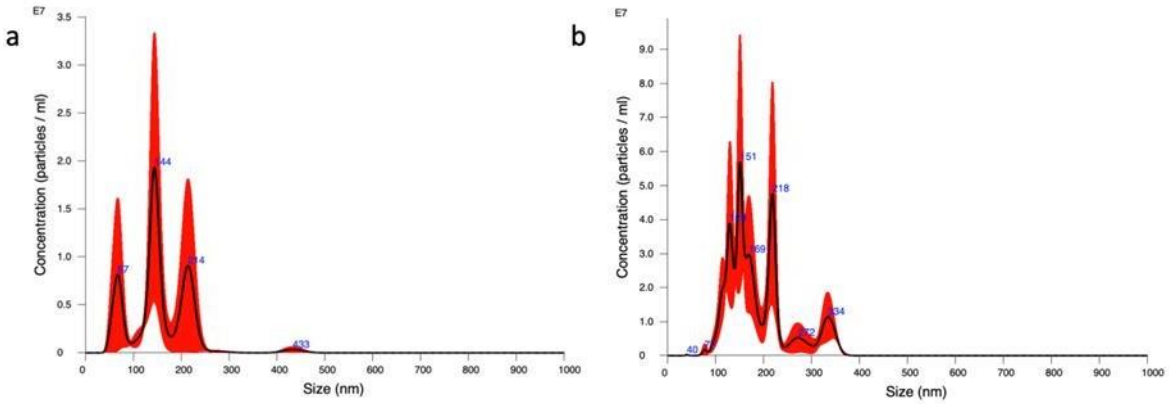


Figura 4. Distribución de nanopartículas de EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro (A) o in vivo (B) durante el periodo de blastulación (mórula-blastocisto). El gráfico representa un promedio de replicados técnicos, basados en el diámetro, concentración y distribución de nanopartículas.

Tabla 3. Tamaño y concentración de la población de EVs secretadas durante la blastulación (días 5-7 de desarrollo embrionario) por embriones producidos in vitro e in vivo.

Descriptores estadísticos	**EVs provenientes de embriones producidos in vivo (D5-7)**	**EVs provenientes de embriones producidos in vitro (D5-7)**
Media, nm (x +/- sd)	186,4 +/- 62,9 nm	168,9 +/- 80,4 nm
Moda, nm (x +/- sd)	149,2 +/- 11,2 nm	133,7 +/- 10,0 nm
Concentración	$4{,}24 \times 10^{9}$ +/- $4{,}36 \times 10^{8}$ partículas/ml	$1{,}14 \times 10^{9}$ +/- $8{,}62 \times 10^{8}$ partículas/ml

Tabla 4. Evaluación de los marcadores de superficie CD63, CD40, CD9 y CD81 en EVs secretadas durante la blastulación de embriones bovinos producidos in vitro o in vivo.

Muestras	CD63	CD81	CD40	CD9
EVs-IVV	3%	9,40%	25,70%	9,80%
EVs-IVP	7,10%	5,40%	55%	9,50%
Bovine blood serum (Positive control)	5,60%	8,10%	14%	15,40%
Beads (negative control)	0%	0%	0%	0%
Beads + anticuerpo (negative control)	0%	0%	0%	0%
SOFdep	0,78%	1,98%	0,74%	0,92%

EVs-IVV; EVs-IVP: Vesículas extracelulares secretadas por embriones producidos in vivo e in vitro respectivamente.

SOFdep: Siglas en inglés para Fluido Sintético Oviductal depletado de vesículas extracelulares. Este medio fue utilizado para el cultivo de los embriones. El porcentaje de positividad es bajo comparado con las EVs aisladas del medio proveniente de los embriones.

Beads: perlas de 4 µm de diámetro (Life Technologies, Santiago, Chile).

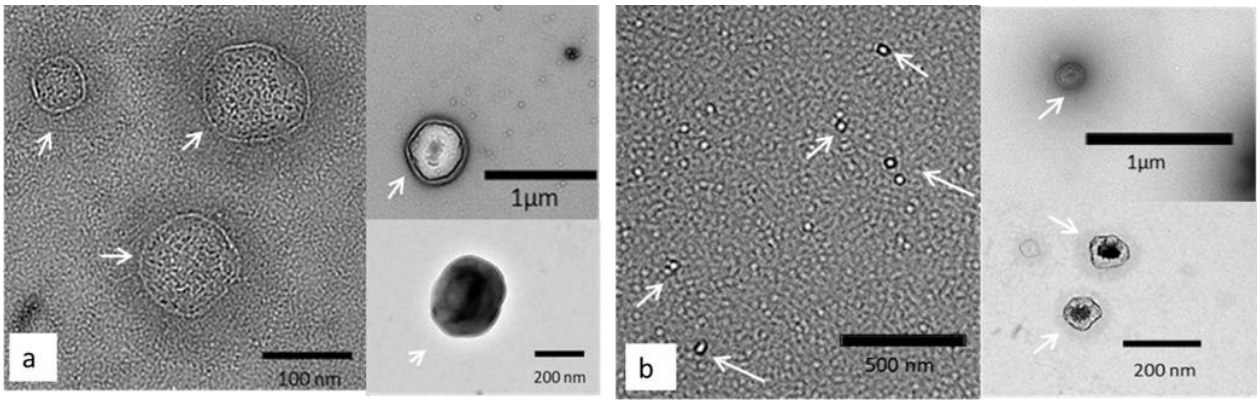


Figura 5. EVs secretadas por embriones bovinos durante el periodo de blastulación (mórula a blastocisto). a: imágenes representativas de EVs aisladas de medio de cultivo de embriones producidos in vivo. b: imágenes de EVs aisladas de medios de cultivo de embriones producidos in vitro.

Evaluacion de la Internalización de vesículas extracelulares

Las células epiteliales endometriales bovinas (bEECs) fueron incubadas con EVs previamente marcadas con PKH67, secretadas por embriones bovinos producidos in vitro e in vivo durante la blastulación. Se observaron puntos verdes en el citoplasma celular, alrededor del núcleo, cuando las EVs provenientes de embriones IVP o IVV fueron adicionados al medio de cultivo (Figura 6a y b). Sin embrago, no se observó ninguna señal fluorescente cuando se añadió PBS/PKH67 a las células (Figura 6c). Estos resultados muestran una asociación de las EVs con las células epiteliales endometriales en regiones cercanas al nucleo celular, lo que sugiere que estas EVs embrionarias podrían haber sido internalizadas por las células epiteliales endometriales.

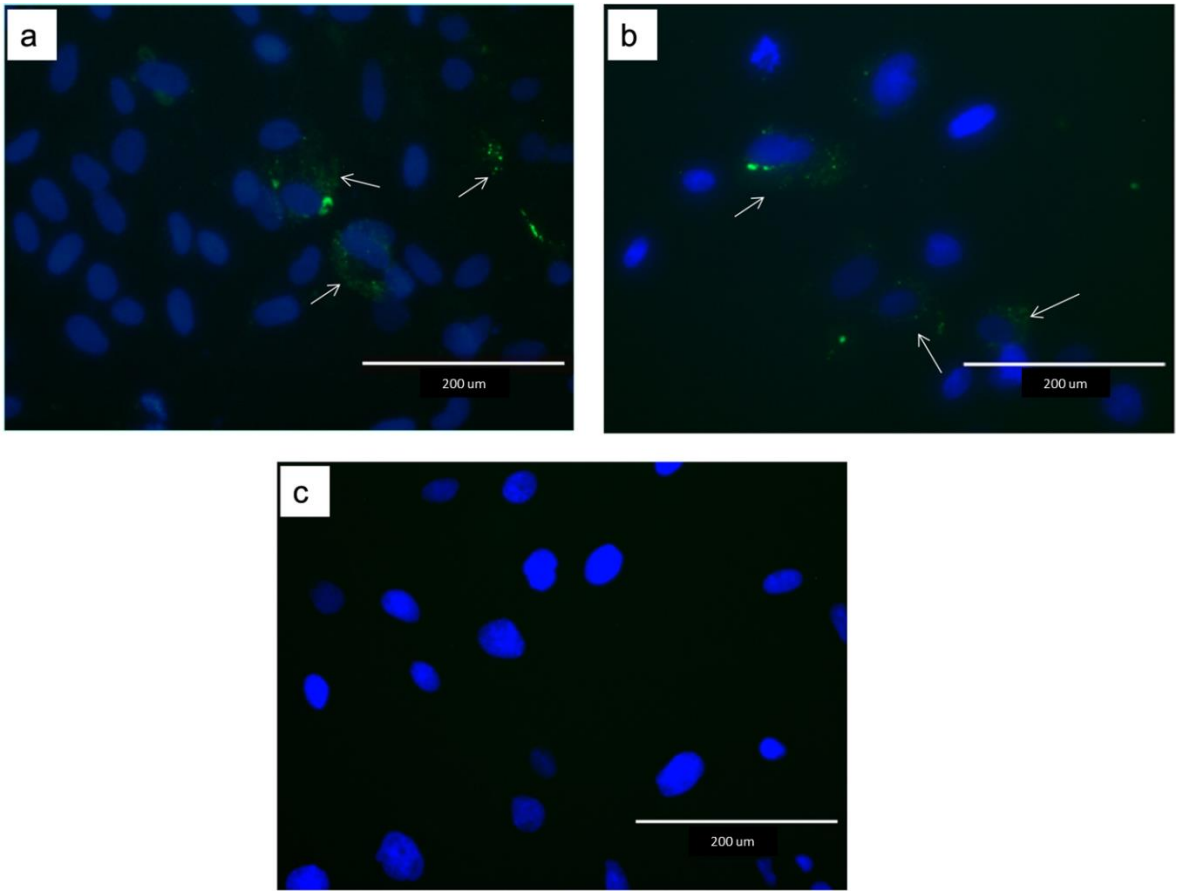


Figura 6. Imágenes fluorescentes de células epiteliales endometriales incubadas con EVs secretadas durante la blastulación (días 5-7) por embriones bovinos producidos in vivo (EVs-IVV) o in vitro (EVs-IVP). A) EVs secretadas por embriones producidos in vitro. B) Evs secretadas por embriones producidos in vivo. C) control negativo (PBS / PHK67). Las células fueron incubadas con vesículas teñidas durante 24 horas. Flechas destacan los puntos verdes en el citoplasma celular, indicando EVs internalizadas.

Análisis de la transcriptómica en células epiteliales endometriales

Se realizó la secuenciación del ARNm derivado de las células endometriales para determinar el efecto de las EVs provenientes de embriones sobre el perfil transcriptómico de las células. Se realizó el análisis de componentes principales (PCA) para evaluar la variabilidad entre las muestras (grupos tratados) de acuerdo a los genes expresados diferencialmente (Figura 7). Este análisis mostró menor

variabilidad entre las muestras de los grupos experimentales expuestos a EVs, mientras que hubo mayor variabilidad en el grupo control.

Se detectaron 14987 genes en las muestras. Se realizó un análisis de diferencial de expresión y los genes fueron considerados diferencialmente expresados con un log2 fold change (log2FC) > 0,5 o < -0,5 y FDR < 0,05 (Figure 8A-B). El efecto de las EVs provenientes de embriones producidos in vivo (EVs-IVV) o in vitro (EVs-IVP) fue independientemente evaluado comparando con el tratamiento con PBS (control negativo). En este análisis se identificó que las EVs liberadas por los embriones IVP indujeron casi el doble (3552) de genes diferencialmente te expresados en relación al control que las liberadas por los embriones IVV (1839) (Figura 8B). Independientemente del origen embrionario, se identificó un mayor número de genes regulados al alta en las células expuestas a las EVs. El análisis de superposición muestra que el 29,6% de los genes están desregulados cuando las células son incubadas con EVs independientemente del origen del embrión, mientras que el 55,8 y 14,6% de los genes desregulados se encuentran presentes exclusivamente en los grupos EVs-IVP/control y EVs-IVV/control respectivamente (Figura 8D).

Entre los genes desregulado, varios genes clásicos y no clásicos estimulados por interferón tau (IGSs), así como genes asociados a función endometrial se afectaron afectados de la misma manera (expresión a la alta o baja) en células cultivas con EVs de embriones IVV o IVP (Tabla 5). Sin embargo, se identificó una tendencia mostrada por el fold change de la expresión génica, que EVs provenientes de embriones IVP tienen un efecto más fuerte en la inducción y represión de la expresión génica en las células. Adicionalmente se realizó un mapa de calor para evidenciar las diferencias en el perfil de expresión de cada grupo utilizando grupos de genes vinculados a la función endometrial y activación por IFNT (Figura 9). Las diferencias principales radican en la expresión de genes IGSs clásicos y no clásicos los cuales están fuertemente inducidos por EVs-IVP como se evidencia en la Figura 9. Otros genes asociados con función endometrial tienen diferente perfil de expresión según el grupo de tratamiento. Genes relacionados con actividad secretora, proliferación, adhesión y señalización esteroidal son más inducidos por EVs-IVP.

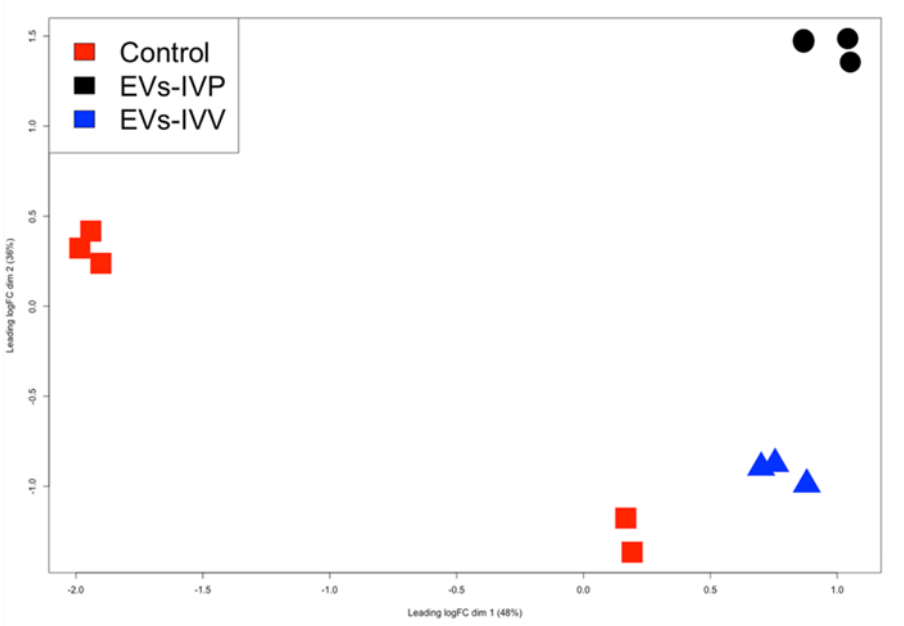


Figura 7. Análisis de componentes principales (PCA) de células epiteliales endometriales (bEECs) de los diferentes grupos de tratamientos (EVs-IVP, EVs-IVV y control). PCA fue construido utilizando el progama R, construido en base al log de Fold change de la expresion génica. Dos principales componentes fueron graficados, utilizando los 3 tratamientos (EVs-IVP, EVs-IVV y control) indicados con diferentes colores y formas. Los procentajes de varianza explicados por el componente principal 1 (48%) y componente principal 2 (36%).

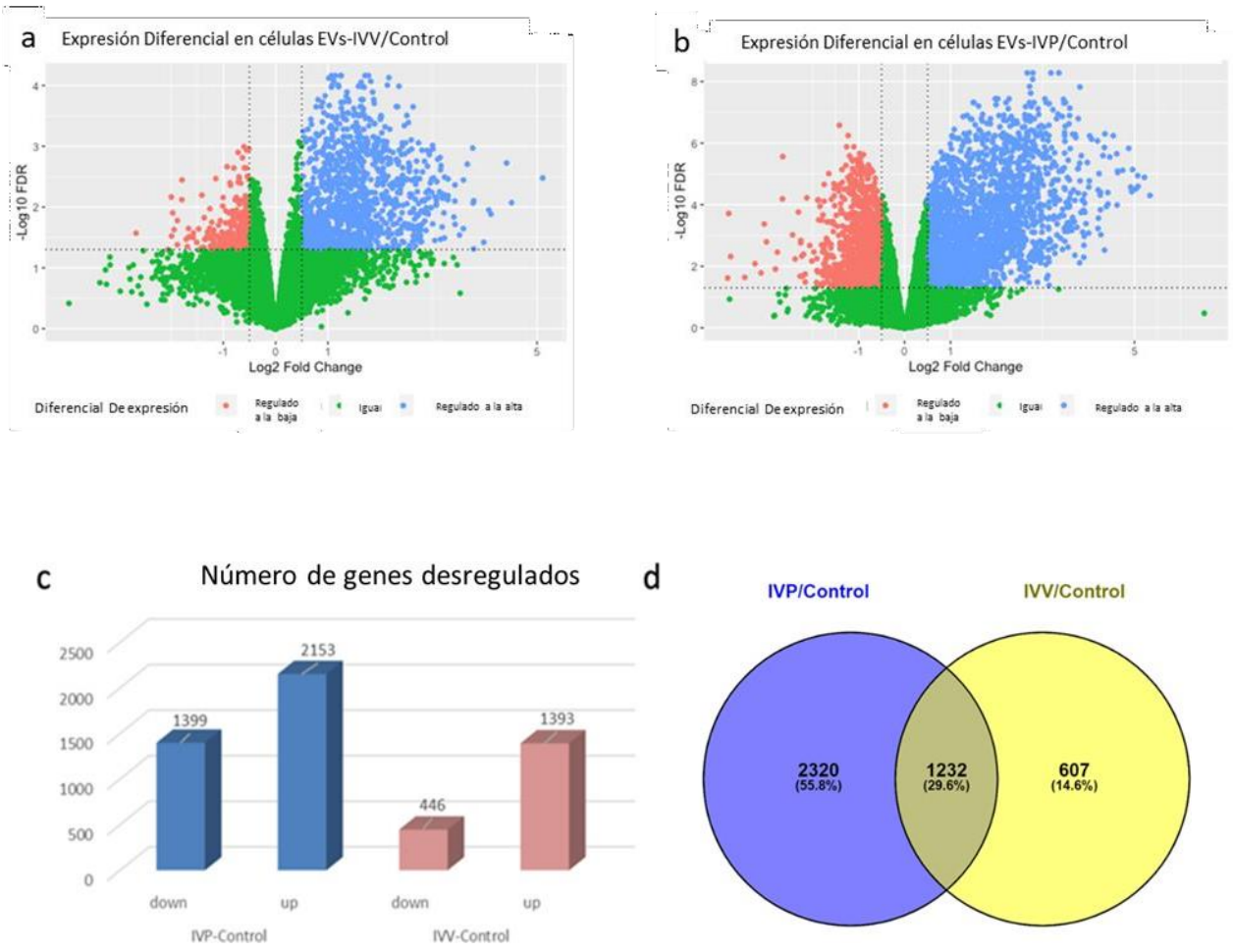


Figura 8. A y B: Volcano plot mostrando el efecto de vesículas extracelulares provenientes de embriones bovinos en el patrón de expresión génico de células epiteliales endometriales. A: volcano plot con la compración EVs-IVV/control. B: Volcano plot con la comparación EVs-IVP/control. C: Número de genes desregulados (regulados a la alta o baja) mediante comparación EVs-IVP/control y EVs-IVV. D: Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados de los tres analsis. El diagrama de Venn fue construido utilizando Venny 2.1 https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/.

Tabla 5. Genes asociados a la señalización de IFNT o función endometrial que están significativamente desregulados en las células epiteliales endometriales debido al efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos producidos in vivo (EVs- EVs-IVV) o in vitro (EVs-IVP). log2FC: log2 de las razones medias de expresión (Fold Change). Los genes se consideraron diferencialmente expresados cuando log2FC > 0,5 o < -0,5 y FDR < 0,05.

Nombre del Gen	Estimulación y/o función	Log2FC EVs-IVV/control	Log2FC EVs-IVP /control	Referencia
OAS1Y	INFT	1,4	2,55	Passaro et al., 2018
MX1	INFT	0,7	2,48	Passaro et al., 2018
ISG15	INFT	0,68	1,23	Passaro et al., 2018
MX2	INFT	4,79	2,62	Passaro et al., 2018
IRF6	INFT	1,42	2,28	Fleming et al., 2009
IFIH1	INFT	1,02	1,53	Song et al., 2007
HSD11B1	INFT	1,12	2,51	Dorniak et al., 2011
CTSL	INFT	1,68	2,64	Dorniak et al., 2011
CST6	INFT	1,87	2,12	Dorniak et al., 2011
MUC1	Adhesión Celular	1,37	2,47	Sponchiado et al., 2017
LGALS9	Adhesión Celular	1,25	3,77	Schmaltz-Panneau et al., 2014
WNT7B	Desarrollo embrionario temprano y función endometrial	2,05	2,39	Cooke et al., 2013
WNT7A	Desarrollo embrionario temprano y función endometrial	2,14	1,81	Irwin et al., 1999
WNT5A	Desarrollo embrionario temprano y función endometrial	-0,7	-0,95	Kemp et al., 2005, Atli et al., 2011
WNT3A	Desarrollo embrionario temprano y función endometrial	2,81	3,15	Kemp et al., 2005
PTGS2	Función endometrial	0,58	1,06	Dorniak et al., 2011
PTGS1	Función endometrial	2,72	2,77	Ashworth et al., 2006
MMP19	Remodelamiento de la matriz extracelular	-0,61	-0,5	Sponchiado et al., 2017
GRB7	Señalización de factores de crecimiento	1,49	1,86	Chankeaw et al., 2021
IGF2BP3	Señalización de factores de crecimiento	1,14	1,77	Deutsch et al., 2019
IGFBP3	Señalización de factores de crecimiento	1,08	1,15	Robinson et al., 2000
IFIT2	Respuesta inmune	1,43	2,47	Schmaltz-Panneau et al., 2014
EPSTI1	Respuesta inmune	0,8	0,7	Schmaltz-Panneau et al., 2014
SPP1	Actividad secretora	0,58	1,91	Dorniak et al., 2012a, b
PIP	Actividad secretora	2,27	3,25	Forde et al., 2013
LTF	Actividad secretora	0,95	3,16	Forde et al., 2010
OXTR	Señalización hormona esteroidal	1,64	3,43	Ulbrich et al., 2009
PAQR8	Señalización hormona esteroidal	0,89	1,78	Kowalik et al., 2019
AKR1C4	Señalización hormona esteroidal	0,59	4,14	Sponchiado et al., 2017

ESR1	Señalización hormona esteroidal	-0,34	0,77	Sponchiado et al., 2017

De los análisis previos se detectó un efecto diferente de EVs dependiendo del origen del embrión. El impacto de este efecto fue evaluado mediante el análisis de diferencial de expresión génica entre los grupos EVs-IVV y EVs-IVP, detectando 3968 genes desregulados (Figura 10). De los genes desregulados, 24 estaban involucrados en la vía de señalización de IFNT o función endometrial (Tabla 6).

Tabla 6. Genes relacionados con función endometrial y señalización de Interferón tau con diferencias significativas entre los tratamientos EVs liberadas por embriones producidos in vivo (IVV) o in vitro (IVP). log2FC: log2 de las razones medias de expresión. Los genes se consideraron diferencialmente expresados cuando log2FC > 0,5 o < -0,5 y FDR < 0,05.

Nombre del Gen	Categoría	Log2FC IVV/IVP	Referencia
BATF2	Endometrio Bovino	1,1	Chaney et al., 2021
CTSL	Estimulado por IFNtau en Endometrio Ovino	-0,95	Dorniak et al., 2012a,b
GRP	Estimulado por IFNtau en Endometrio Ovino	2,19	Song et al., 2008
HSD11B1	Estimulado por IFNtau en Endometrio Ovino	-1,39	Dorniak et al., 2012a,b
ICAM1	Endometrio Bovino	-1,5	Sponchiado et al., 2017
IFI6	Estimulado por IFNtau en Útero Bovino	0,87	Schmaltz-Panneau et al., 2014
IRF1	Endometrio Bovino	1,07	Chaney et al., 2021
IRF6	Estimulado por IFNtau en Endometrio Ovino	-0,85	Fleming et al., 2009
LGALS9	Endometrio bovino	-2,51	Schmaltz-Panneau et al., 2014
LTF	Endometrio Bovino	-2,2	Forde et al., 2010
MCOLN3	Endometrio Bovino	-1,4	Sponchiado et al., 2017
MUC1	Endometrio Bovino	-1,09	Sponchiado et al., 2017
PAQR8	Endometrio Bovino	-0,68	Kowalik et al., 2019
PIP	Endometrio Bovino	-0,97	Forde et al., 2013
PTGES	Cuerpo lúteo y función endometrial	0,95	Arosh et al., 2016
SLC2A1	Estimulado por IFNtau en endometrio	-0,93	Dorniak et al., 2012a,b
SPP1	Estimulado por IFNtau en endometrio	-1,33	Dorniak et al., 2012a,b
STAT2	Utero Ovino	0,52	Choi et al., 2001

Figura 9. Mapa de calor del patrón de expresión en genes relacionados con la señalización de Interferón tau (FNT) y función endometrial en células epiteliales de endometrio bovino incubadas con vesículas extracelulares (EVs) liberadas durante el periodo de blastulación por embriones bovinos producidos in vivo (IVV) o in vitro (IVP). Control, células incubas con PBS.

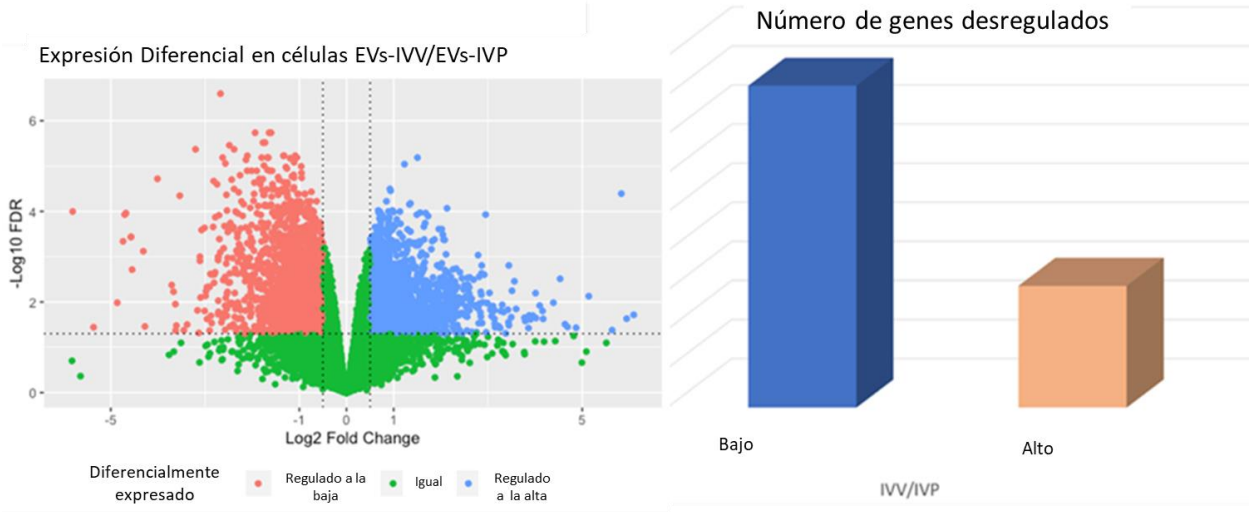


Figura 10. Efecto de las vesículas extracelulares (EVs) secretadas por embriones bovinos producidos in vivo (IVV) o in vitro (IVP) en el patrón de expresión génico de células epiteliales endometriales. A la derecha, volcano plot mostrando el efecto de EVs-IVV en comparación con las EVs-IVP en términos de genes desregulados en las células epiteliales endometriales. A la izquerda, Número de genes desregulados (regulados a la alta o baja) mediante comparación EVs-IVV/EVs-IVP.

Validación de los datos la secuenciación de RNA utilizando el análisis de transcripción reversa PCR

Para validar los resultados de la secuenciación de RNAm, se determinó el nivel de expresión relativa de 13 genes utilizando PCR en tiempo real. Se seleccionaron genes que se encontraron desregulados cuando las células endometriales fueron expuestas a las EVs de embriones IVV e IVP. Estos genes fueron seleccionados también por su relevancia biológica (regulados a la baja: ESR1, HPGD, MMP14, PTGES; regulados al alta: CST6, CTSL, MUC1, MX1, MX2, OAS1Y, OXTR, WNT7A, ISG15). Todos los genes, excepto MX2 en el grupo EVs-IVP/Control, tuvieron un comportamiento similar al comparar el patrón de expresión obtenido mediante RNAseq y el análisis de PCR (Figura 11). Se realizó un análisis de correlación de Pearson, obteniéndose correlaciónsignificativa para cada grupo de tratamiento (r: 0,88, p=0,00018 en EVs-IVP y r: 0,73, p= 0,005 en EVs-IVV). El análisis de PCR confirma la regulación a la alta de

los genes inducidos por interferón (CST6, CTSL, MX1, MX2, ISG15, WNT7A y OAS1Y) y a la baja de los genes PTGES y MMP14 en las células incubadas con EVs liberadas por embriones IVV e IVP. Esté análisis también permitió confirmar la diferencia en la regulación de los genes HGPD y ESR1, donde las EVs de embriones IVP inducen su expresión mientras que las EVs liberadas por los embriones IVV reducen la expresión.

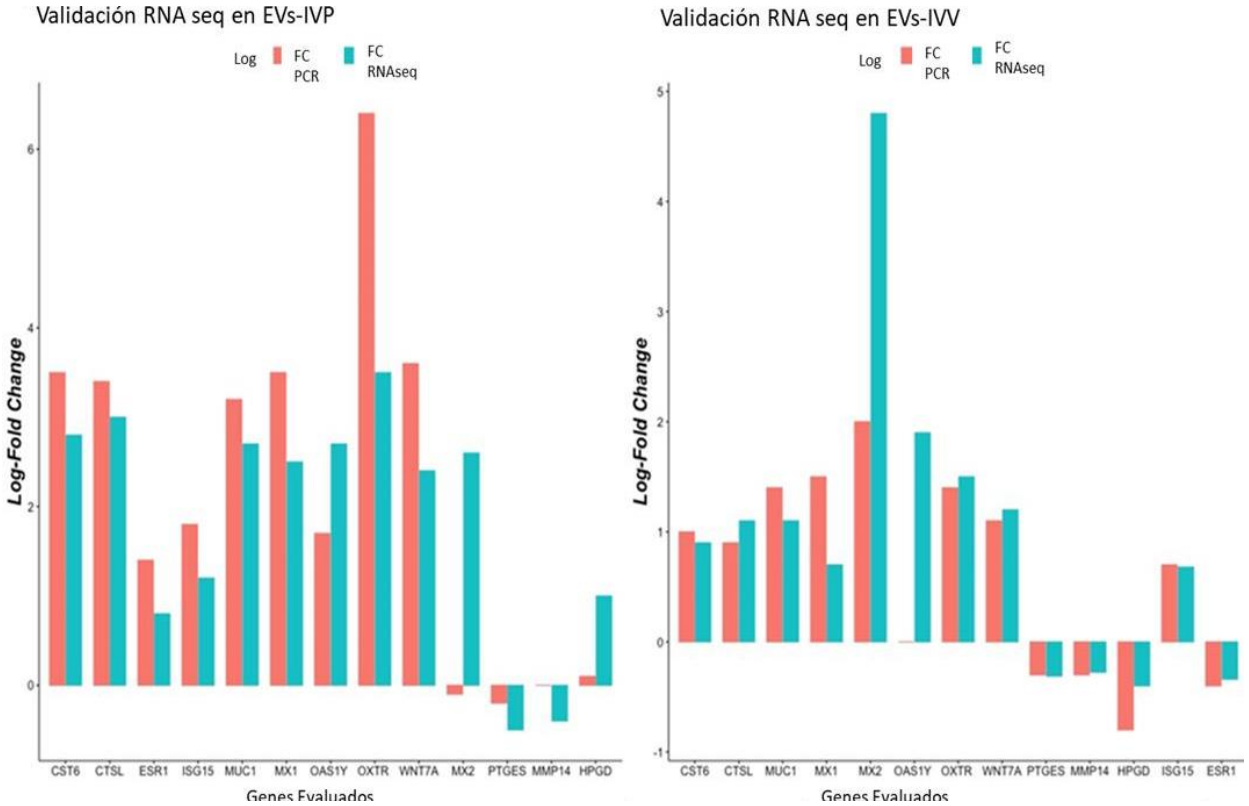
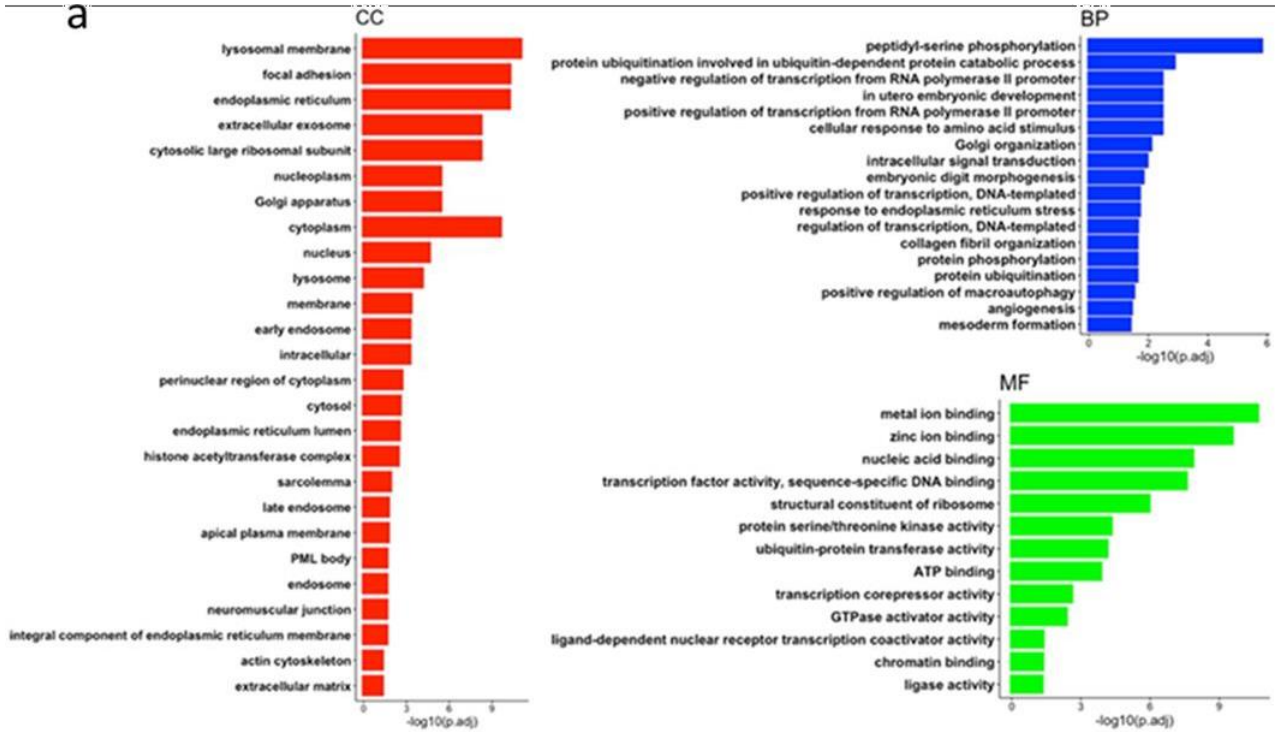


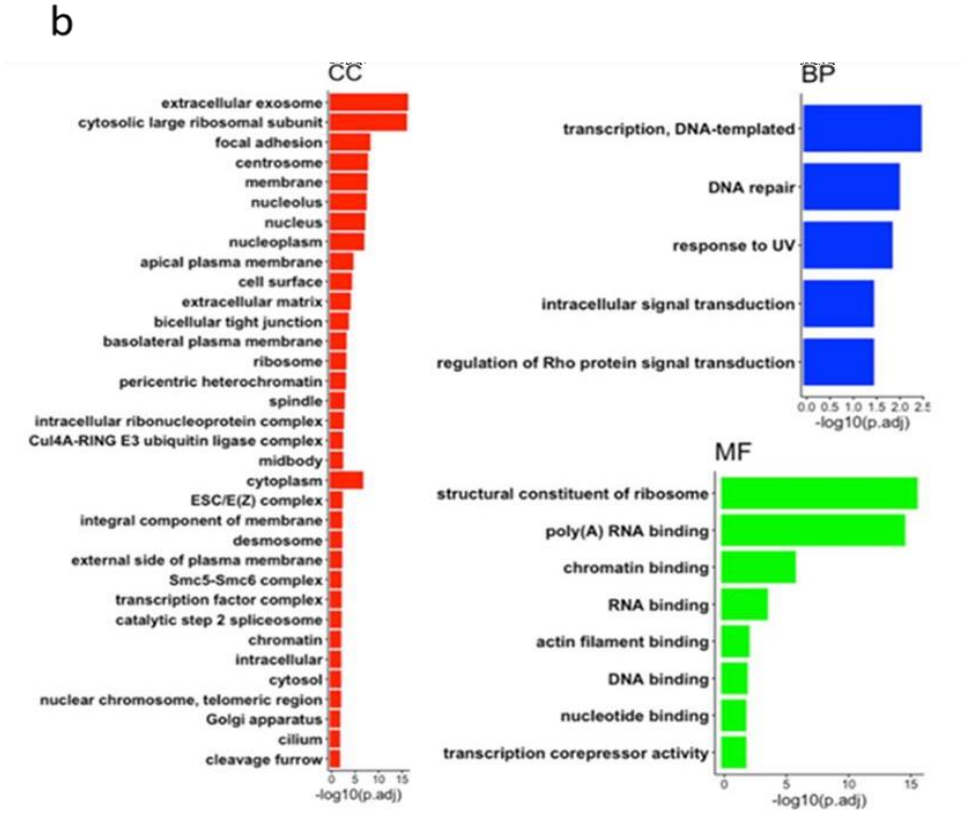
Figura 11. Gráfico de análisis de correlación entre el valor de ARNseq y RTqPCR de cada gen evaluado. Se observa una tendencia similar para el valor de expresión génica detectado por la secuenciación (ARNseq) y RT-qPCR en las células tratadas con EVs-IVP y EVs-IVV Para evaluar correlación entre los valores de expresión génica se realizó como prueba estadística una correlación de Pearson.

Ontología de genes

Se realizó un análisis de ontología de genes (G.O) para evaluar las vías reguladas al alta usando los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre EVs-IVV/control y EVs-IVP/control. Se utilizó -log10(P-valor) como medición de la magnitud para determinar diferencias estadísticas entre grupos (Figura 20). Las vías de señalización significativas fueron clasificadas como Procesos Biológicos (BP), Componentes Celulares (CC) y Función Molecular (MF).

El número de procesos biológicos activados por EVs-IVV/control es mayor que los activados por EVs-IVP/control. Los resultados indican que las EVs-IVV inducen significativamente procesos biológicos vinculados a modificación de proteínas, regulación de la expresión de genes, respuesta celular ante estímulos, desarrollo embrionario, organización de componentes celulares, regulación de procesos metabólicos celulares y desarrollo de vasos sanguíneos (Figura 12A). Con respecto a las vías de señalización activadas por EVs-IVP/control se identificaron vías involucradas con procesos biológicos como regulación de la expresión génica, respuesta celular al daño de DNA, respuesta a UV o estímulo luminoso y regulación de la comunicación intercelular (Figura 12B). Con respecto a la comparación entre EVs-IVV y EVs-IVP, se detectaron diferencias en la expresión de vías asociadas a componentes celulares como organelos extracelulares rodeados de membrana celular, organelos intracelulares rodeados de membrana celular y entidad anatómica celular (Figura 12C). Respecto a las funciones moleculares, las diferencias se presentan en la activación por parte de las EVs-IVP en vías como actividad estructural molecular y función de unión.


a
CC
lysosomal membrane
focal adhesion
endoplasmic reticulum
extracellular exosome
cytosolic large ribosomal subunit
nucleoplasm
Golgi apparatus
cytoplasm
nucleus
lysosome
membrane
early endosome
intracellular
perinuclear region of cytoplasm
cytosol
endoplasmic reticulum lumen
histone acetyltransferase complex
sarcolemma
late endosome
apical plasma membrane
PML body
endosome
neuromuscular junction
integral component of endoplasmic reticulum membrane
actin cytoskeleton
extracellular matrix
0 3 6 9
-log10(p.adj)
BP
peptidyl-serine phosphorylation
protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
in utero embryonic development
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
cellular response to amino acid stimulus
Golgi organization
intracellular signal transduction
embryonic digit morphogenesis
positive regulation of transcription, DNA-templated
response to endoplasmic reticulum stress
regulation of transcription, DNA-templated
collagen fibril organization
protein phosphorylation
protein ubiquitination
positive regulation of macroautophagy
angiogenesis
mesoderm formation
0 2 4 6
-log10(p.adj)
MF
metal ion binding
zinc ion binding
nucleic acid binding
transcription factor activity, sequence-specific DNA binding
structural constituent of ribosome
protein serine/threonine kinase activity
ubiquitin-protein transferase activity
ATP binding
transcription corepressor activity
GTPase activator activity
ligand-dependent nuclear receptor transcription coactivator activity
chromatin binding
ligase activity
0 3 6 9
-log10(p.adj)


b
CC
extracellular exosome
cytosolic large ribosomal subunit
focal adhesion
centrosome
membrane
nucleolus
nucleus
nucleoplasm
apical plasma membrane
cell surface
extracellular matrix
bicellular tight junction
basolateral plasma membrane
ribosome
pericentric heterochromatin
spindle
intracellular ribonucleoprotein complex
Cul4A-RING E3 ubiquitin ligase complex
midbody
cytoplasm
ESC/E(Z) complex
integral component of membrane
desmosome
external side of plasma membrane
Smc5-Smc6 complex
transcription factor complex
catalytic step 2 spliceosome
chromatin
intracellular
cytosol
nuclear chromosome, telomeric region
Golgi apparatus
cilium
cleavage furrow
0 5 10 15
-log10(p.adj)
BP
transcription, DNA-templated
DNA repair
response to UV
intracellular signal transduction
regulation of Rho protein signal transduction
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5
-log10(p.adj)
MF
structural constituent of ribosome
poly(A) RNA binding
chromatin binding
RNA binding
actin filament binding
DNA binding
nucleotide binding
transcription corepressor activity
0 5 10 15
-log10(p.adj)

C

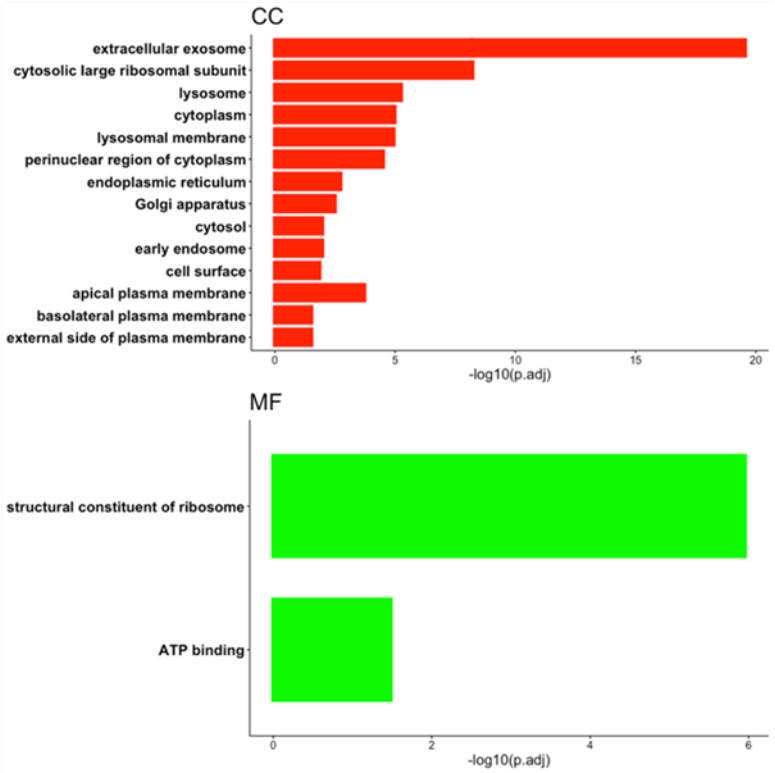


Figura 12. Análisis de ontología de genes (G.O) basado en los genes diferencialmente expresados (DEGs) entre los tres grupos de tratamiento EVs-IVV /control (a), EVs-IVP/control (b) y EVs-IVP / EVs-IVV (c). Las vías de señalización significativas fueron clasificadas como procesos biológicos 8BP), componentes celulares (CC) y función molecular (MF).

Experimento 2: Evaluación del efecto de las vesículas extracelulares secretadas por embriones durante los días 7-9 sobre las células epiteliales endometriales

Con respecto a la producción de embriones in vivo durante la ventana 7-9 de desarrollo, 89 estructuras fueron colectadas de las hembras superestimuladas. De estas estructuras se seleccionaron 52 blastocistos (58.4%) y 45 alcanzaron el estadio de blastocisto protruido (50%). En cuanto a la producción de embriones in vitro de la misma ventana de desarrollo, se maduraron un total de 488 ovocitos, de los cuales un

94% se consideraron presuntos cigotos, un 25% llegaron a mórula, 20 % blastocistos y un 15% alcanzaron el estadio de blastocisto protruido.

Caracterización de las vesículas extracelulares de embriones producidos in vivo e in vitro al día 7-9 de desarrollo

Se realizó un análisis de NTA para evaluar concentración y diámetro (media y moda) de las partículas aisladas de medios de cultivos de embriones producidos in vitro e in vivo. La representación gráfica y los descriptores estadísticos están representados por las Figura 13 y Tabla 7 respectivamente. Las EVs fueron positivas a los marcadores CD9, CD63, CD81 y CD40 (Tabla 8) (Thery et al., 2018). Como control negativo se utilizó fluido sintético oviductal depletado (SOFdep), el cual mostró un 0% de positividad a los marcadores mencionados anteriormente (Tabla 8). Posteriormente, las nanopartículas aisladas fueron visualizadas mediante TEM, evidenciando una morfología clásica de EV con presencia de bicapa lipídica (Figura 14).

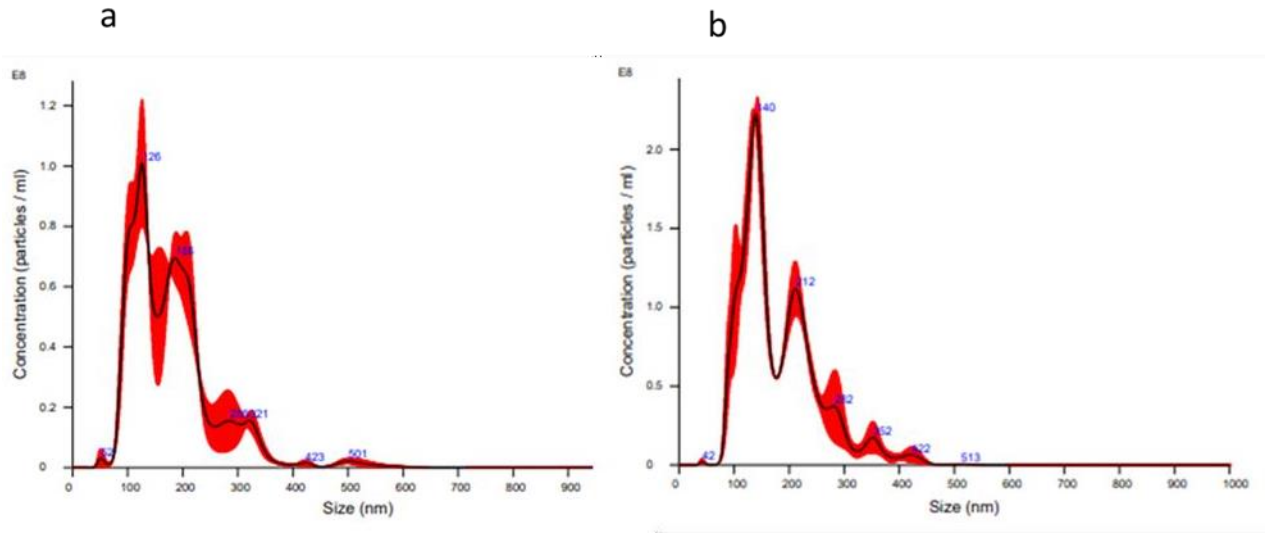


Figura 13. Representación gráfica de la distribución de nano partículas según su concentración y diámetro. A) Nano partículas provenientes de embriones producidos in vitro durante los días 7-9 de desarrollo, B) Nano partículas provenientes de embriones producidos in vivo durante los días 7-9 de desarrollo.

Tabla 7. Descriptores estadísticos de nanopartículas provenientes de medio de cultivo de embriones producidos in vivo e in vitro durante los días 7-9 de desarrollo.

Embriones	EVs-IVV 7-9	EVs-IVP 7-9
Media Diámetro, nm (x +/- sd)	180,5 +/- 3,8 nm	179,7 +/- 7,7 nm
Moda Diametro, nm (x +/- sd)	138,7 +/- 3,0 nm	135,4 +/- 10,5 nm
Concentración (x10^10) partículas/ml (x +/- sd)	2,12 +/- 1,28	1,18 +/- 3,42

Tabla 8. Evaluación de los marcadores de superficie CD9, CD63, CD81 y CD40 en EVs secretadas por embriones producidos in vitro e in vivo durante los días 7-9 de desarrollo.

Muestra	CD63	CD81	CD40	CD9
EVs-IVP 7-9	1,50%	4,60%	10,80%	9,30%
EVs-IVV 7-9	9,30%	3,50%	19,60%	6,10%
SFB (control positivo)	5,60%	8,10%	14%	15,40%
Perlas (control negativo)	0%	0%	0%	0%
Perlas y anticuerpos (control negativo)	0%	0%	0%	0%
SOFdep	0,78%	1,98%	0,74%	0,92%

SFB: Suero fetal bovino; SOFdep: fluido sintético oviductal depletado de vesículasextracelulares

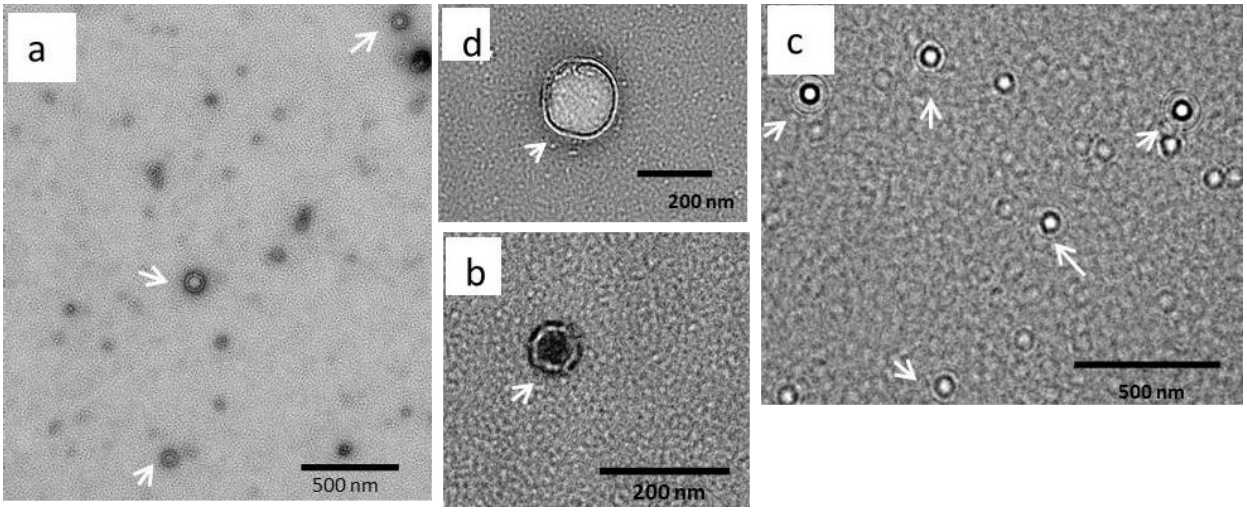


Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro e in vivo durante los días 7-9 de desarrollo. a-b EVs aisladas de medio de cultivo de embriones bovinos producidos in vivo. c-d EVs aisladas de medio de cultivo embriones producidos in vitro.

Evaluacion de la internalización de vesículas extracelulares provenientes de embriones bovinos producidos in vitro e in vivo, por parte de las células epiteliales endometriales bovinas en cultivo

Las células epiteliales endometriales bovinas fueron incubadas con EVs secretadas por embriones bovinos, previamente teñidas con PKH67. Se observaron puntos verdes en el citoplasma de células cultivadas con EVs secretadas durante los días 7-9 de desarrollo, por embriones producidos in vitro como in vivo (Figura 15a y b). No se detectaron señales fluorescentes en las células expuestas a PBS incubado con PKH67 (control negativo) (Figura 15c). Se observa una localización de las EVs cercanas al núcleo celular lo que podría sugerir una internalización de las EVs embrionarias por parte de las células epiteliales endometriales.

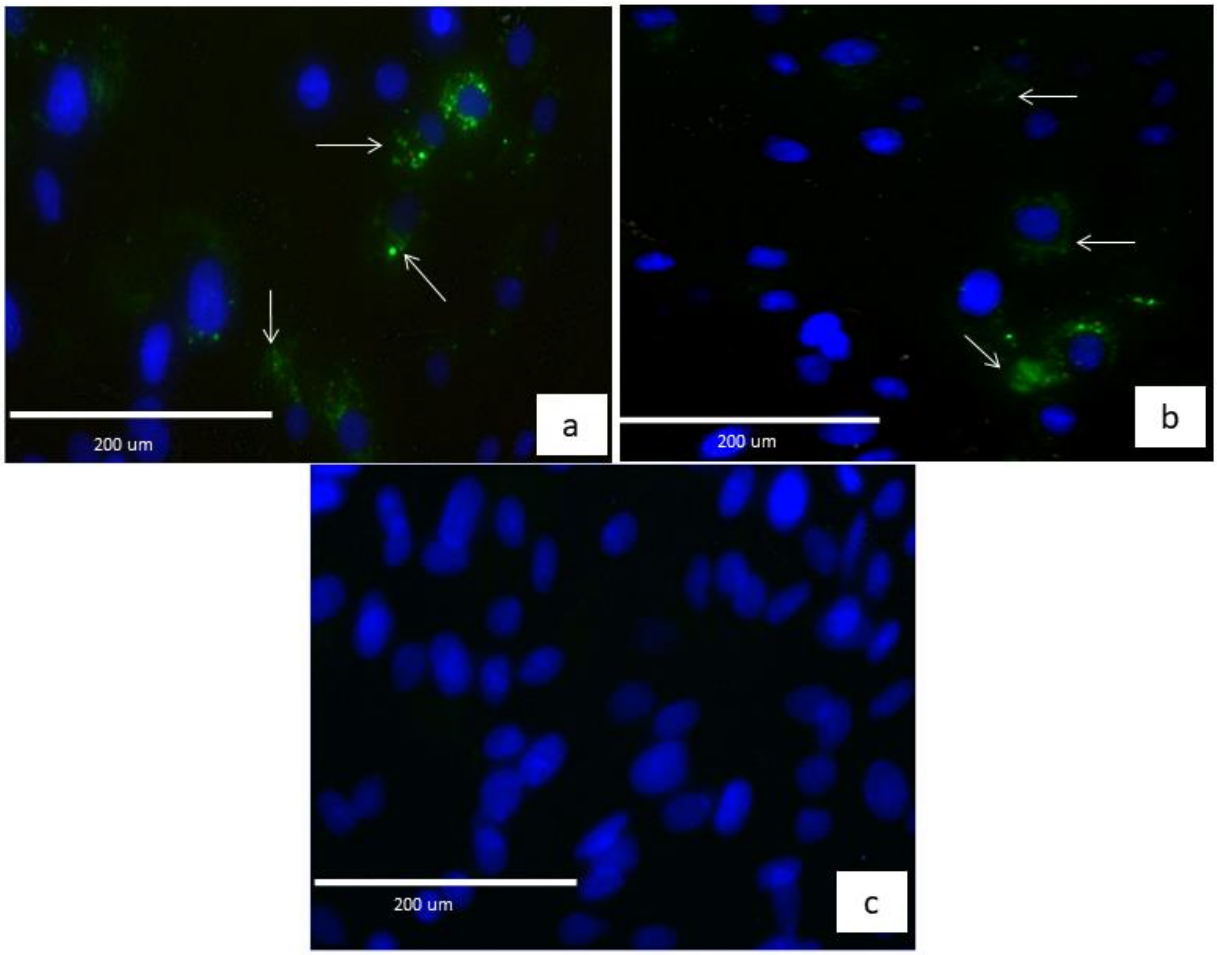


Figura 15. Imágenes fluorescentes de células epiteliales endometriales cultivas con EVs previamente teñidas con PKH67 que fueron liberadas al medio de cultivo por embriones bovinos producidos in vitro (EVs-IVP 7-9) e in vivo (EVs-IVV 7-9) durante los días 7-9 de desarrollo. a) EVs de embriones producidos in vivo. b) EVs de embriones producidos in vitro. c) control (PBS / PKH67).

Análisis de expresión génica de células endometriales expuestas a EVs de embriones bovinos producidos in vitro (EVs-IVP) e in vivo (EVs-IVV) durante los días 7-9 de desarrollo

El efecto de las EVs secretadas entre los días 7-9 de desarrollo por embriones IVV e IVP fue evaluado 48 horas posteriores a la adición de las vesículas. En este caso se analizaron mediante RT-PCR, genes individuales que fueron seleccionados por su significancia biológica (Figura 16). Las EVs de los embriones IVP activaron la

expresión de genes no clásicos estimulados por interferón (ISGs). Los genes activados por estos embriones a través de sus EVs fueron CST6 (p=0,015), y WNT7A (p=0,019), con una tendencia al aumento en la expresión de CTSL (p=0.053). Junto con ello, las

EVs provenientes de embriones producidos in vitro lograron incrementar significativamente la expresión del receptor de oxitocina (OXTR) en las células epiteliales endometriales (p=0,0043).

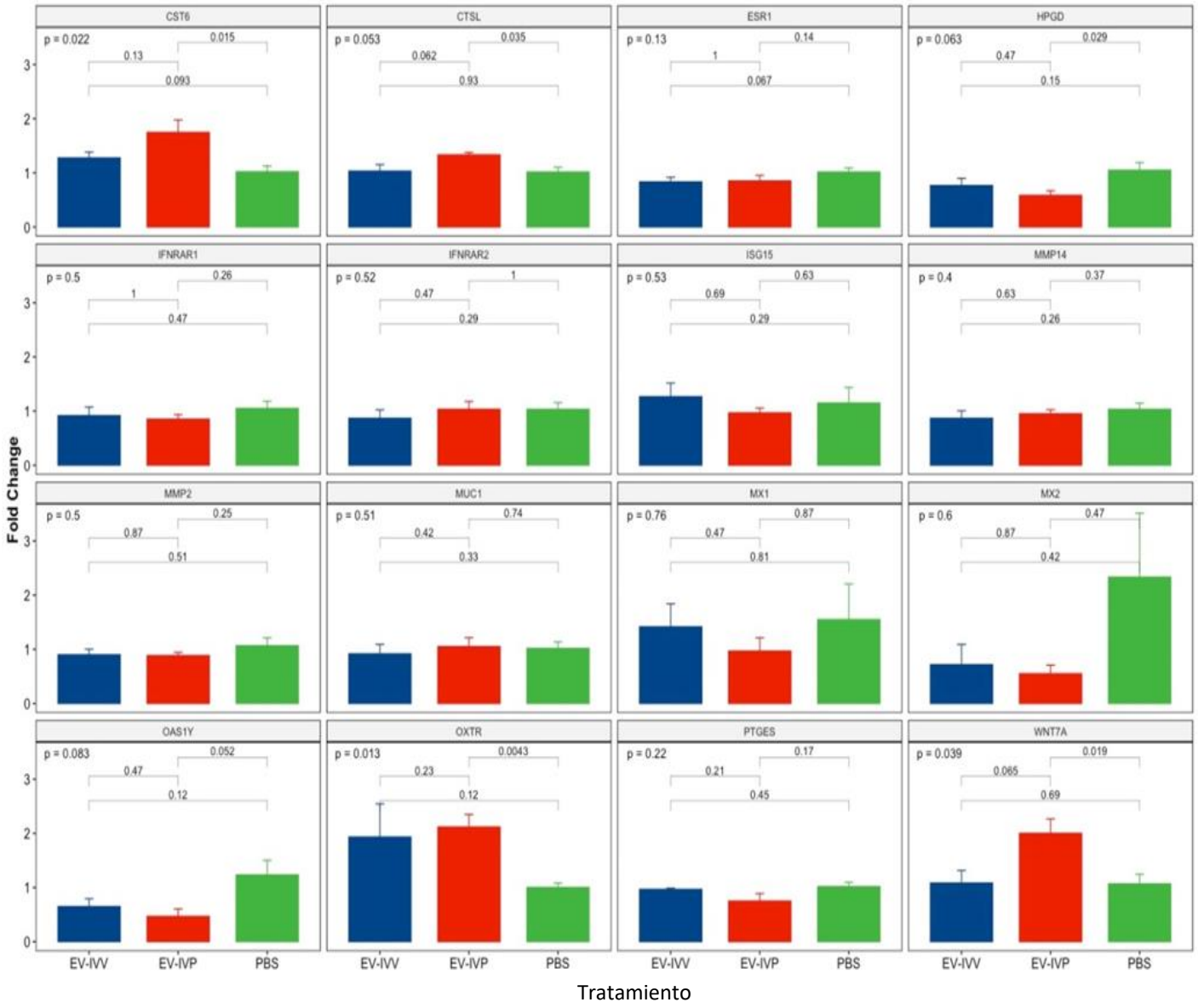


Figura 16. Expresión relativa de ARNm de genes vinculados a función endometrial y respuesta a interferón tau. Se utilizó el test Kruskall wallis para determinar diferencias significativas entre los grupos. Se considera diferencia estadísticamente significativa con valor de p<0,05, graficado con asteriscos, estableciendo diferencias estadísticamente significativas respecto al control (PBS).

Experimento 3: Evaluación de la internalización y el efecto de las EVs provenientes de células epiteliales endometriales in vitro e in vivo sobre el desarrollo y calidad embrionaria.

Caracterización de las EVs provenientes de fluido uterino y células epiteliales endometriales

Para la caracterización de EVs provenientes tanto de fluido uterino (EV-UF) bovino como de cultivo de células epiteliales endometriales (EVC), se realizó un análisis de seguimiento de partículas (NTA) para evaluar la distribución de las partículas en base a su diámetro y concentración (Figura 17). Los descriptores estadísticos están resumidos en la Tabla 9. Adicionalmente, las imágenes de TEM permitieron la identificación de nanopartículas con una morfología clásica de EVs (Figura 18). Posteriormente, como parte de la caracterización, se evaluó la presencia de los principales marcadores asociados a EVs, siendo positivas para CD9, CD81, CD63 y CD40 (Tabla 10).

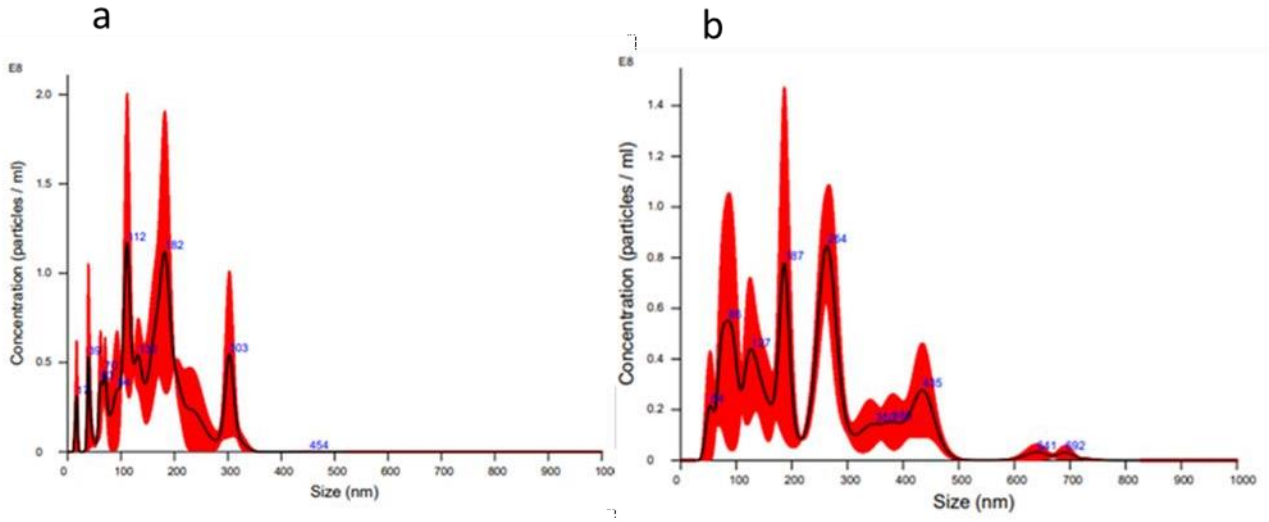


Figura 17. Análisis del seguimiento de partículas provenientes tanto de fluido uterino como de medio de cultivo de células endometriales. a) Distribución de nanopartículas provenientes de fluido uterino, b) Distribución de nanopartículas provenientes de cultivo de células endometriales.

Tabla 9. Descriptores estadísticos del análisis de seguimiento de partículas (NTA) para EVs provenientes de fluido uterino y medio de cultivo de células endometriales.

Descriptores	Fluido uterino/fase luteal día 7	Evs de cultivo células endometriales
Media Diámetro, nm (x +/- sd)	154,9 +/- 20,8 nm	236,7 +/- 22,5 nm
Moda, nm (x +/- sd)	104,2 +/- 35,8 nm	189.2 +/- 38,4 nm
Concentración (x +/- sd)	1,20e+010 +/- 2,94e+009 partículas/ml	1,32e+010 +/- 3,02e+009 partículas/ml

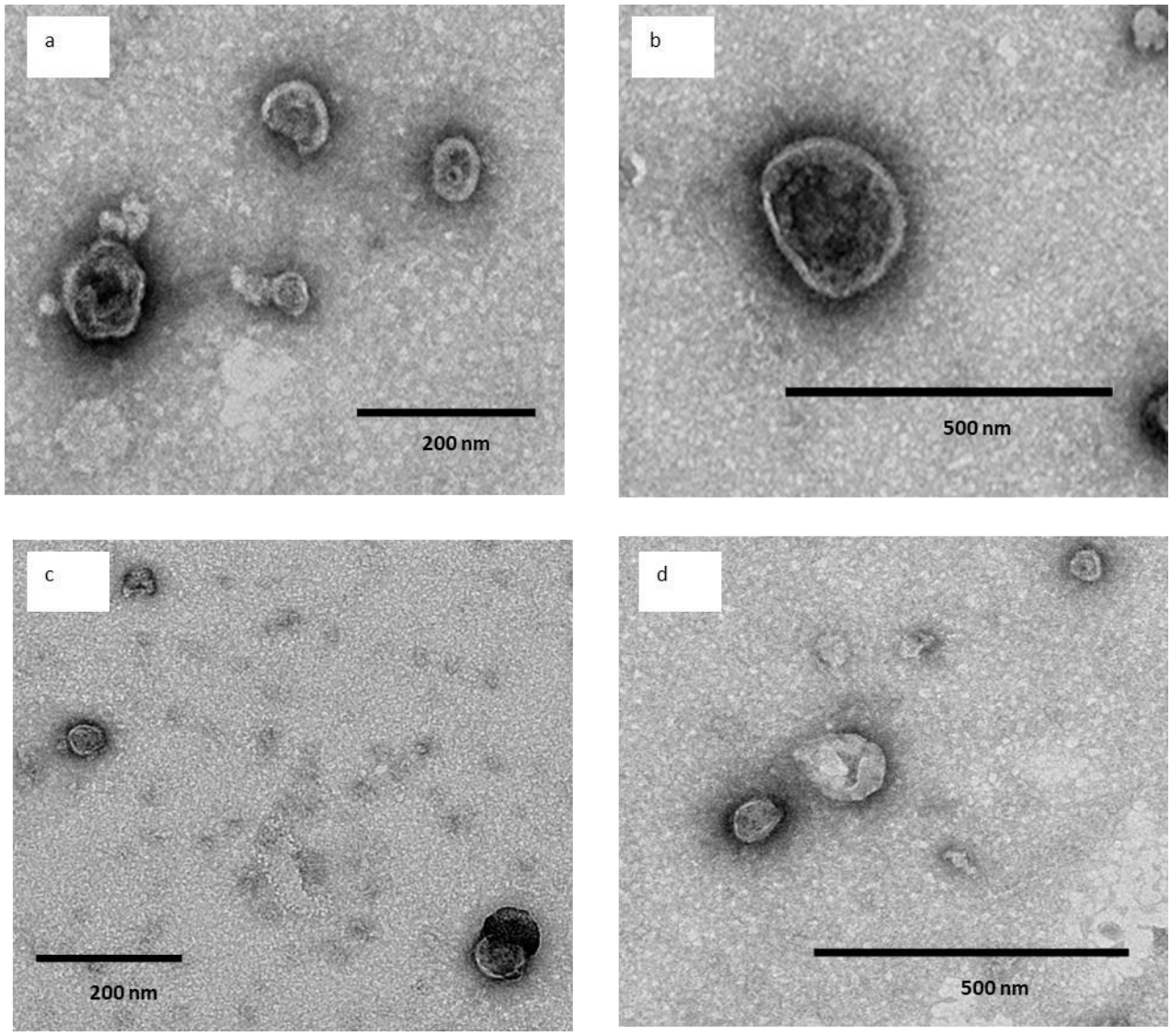


Figura 18. Imágenes de microscopia electrónica de transmisión para evaluar morfología en los aislados de EVs provenientes de fluido uterino (EV-UF) (a y b) y medio de cultivo de células endometriales (EVC) (c y d).

Tabla 10. Evaluación de los marcadores de superficie mediante citometría de flujo en vesículas extracelulares aisladas a partir de fluido uterino (EV-UF) y medio de cultivo de células endometriales bovinas (EVC).

Muestra	CD63	CD81	CD40	CD9
EVs cultivo células (EVC)	16,60%	15,70%	8,12%	25,05%
EVs Fluido uterino (EV-UF)	4,90%	2,14%	0,50%	24,78%
Control experimental (PBS 1x)	0,21%	0,27%	0,76%	1,50%

Evaluación de la internalización de las EVs provenientes de fluido uterino y células epiteliales endometrialespor parte de embriones bovinos producidos in vitro.

Las EV-UF y las EVC fueron teñidas con PKH67 para luego evaluar su internalización por parte de los embriones bovinos producidos in vitro. Para esto se adicionaron las EVs al día 5 y 7 de desarrollo embrionario, evaluando la internalización 24 horas más tarde (días 6 y 8 respectivamente). Los resultados sugieren la internalización de las EVs por parte de los embriones bovinos pre-implantatorios, dada la disposición de estas nanoparticulas en torno a las células del embrión, las cuales son observadas como puntos verdes fluorecentes en el citoplasma de las blastomeras (Figura 19). No se detectó señal fluorescente verde en los embriones incubados con PBS y PKH67 (control negativo).

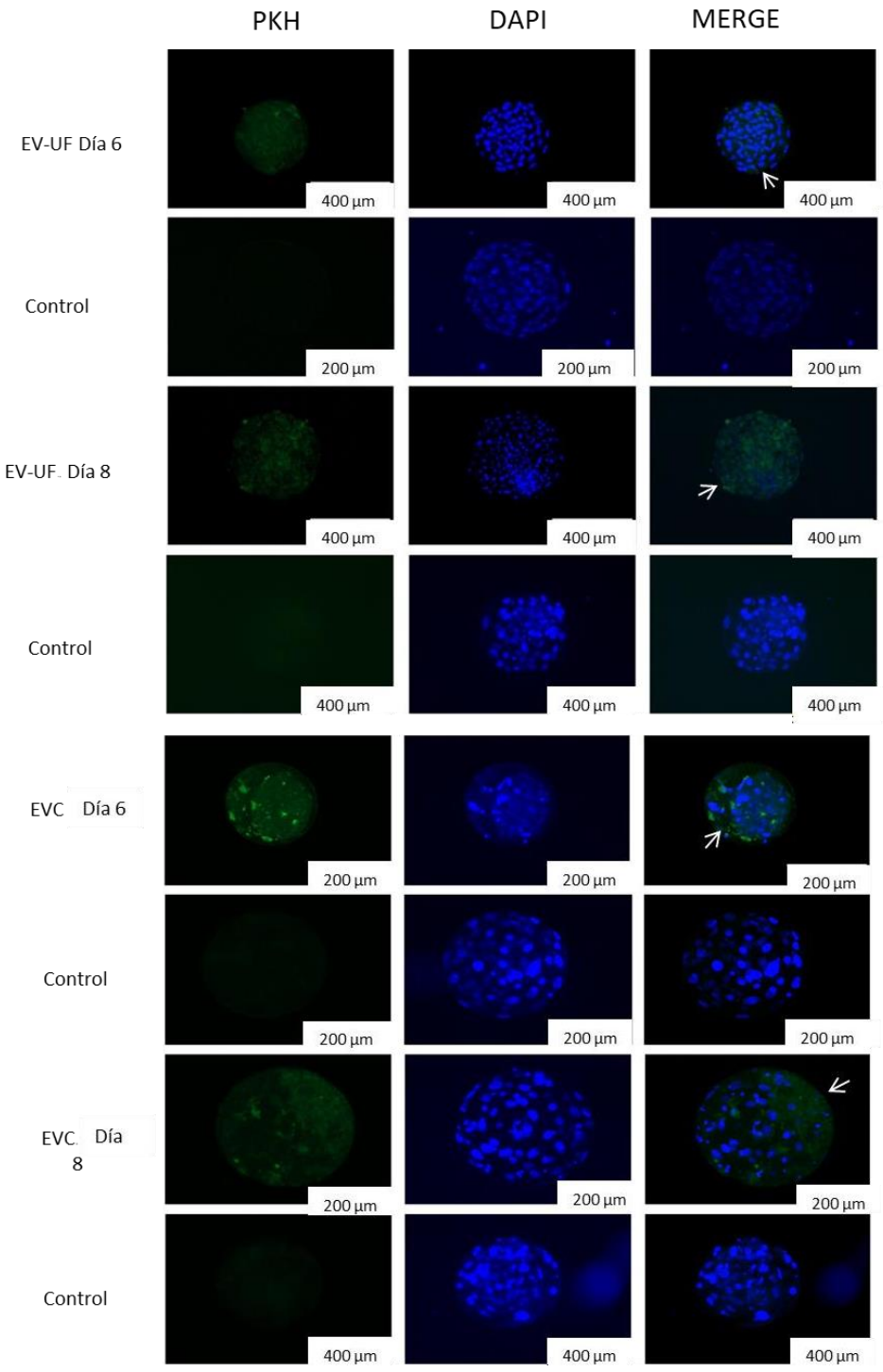


Figura 19. Evaluacion de la internalización de EVs provenientes de fluido uterino (EV-UF) y cultivo de células endometriales (EVC) por parte de embriones bovinos producidos in vitro al día 6 y 8 de desarrollo embrionario. Los embriones fueron cultivados durante 24 horas con

EVs teñidas previamente con PKH67. Control negativo, embriones cultivados con PBS/PKH67.

Análisis del potencial de desarrollo in vitro y calidad embrionaria de embriones tratados con EVs derivadas de células endometriales y fluido uterino

El efecto del tratamiento con EVs derivadas de células endometriales (EVC) y fluido uterino (EV-UF) sobre el desarrollo embrionario in vitro se determinó mediante la calidad de los embriones en términos morfológicos, cinética de crecimiento y expresión génica al estadio de blastocisto. La tasa de desarrollo de los embriones producidos in vitro se encuentra en la tabla 11.

Tabla 11. Desarrollo de embriones producidos in vitro (experimento 3).

Tratamiento	Nº Réplicas	Nº COCs IVM	Nº de cigotos	Nº Mórulas*	% Mórula seleccionadas	Nº blastocistos D7 (%)	Nº Protruidos (%)
EV-UF	3	482	472	30	6,4	21 (70,0)	12 (40)
EVC	3	385	353	30	8,5	20 (66.7)	9 (30)
Control	3	406	386	30	7,8	16 (53.3)	6 (20)

*Número de mórulas seleccionadas para este experimento

Para cada tratamiento se contabilizaron únicamente aquellos blastocistos expandidos (día 7) y blastocistos protruidos (día 9) de calidad 1 y 2 según los criterios de la IETS. Se identificó una tendencia a un mayor porcentaje de blastocistos expandidos al día 7 y de blastocistos protruidos al día 9 en el grupo tratado con UF en comparación con el grupo control (p=0,059) (Figura 20). No se observaron diferencias significativas ni tendencias estadísticas en los embriones del grupo EVC con respecto al control o al tratamiento UF.

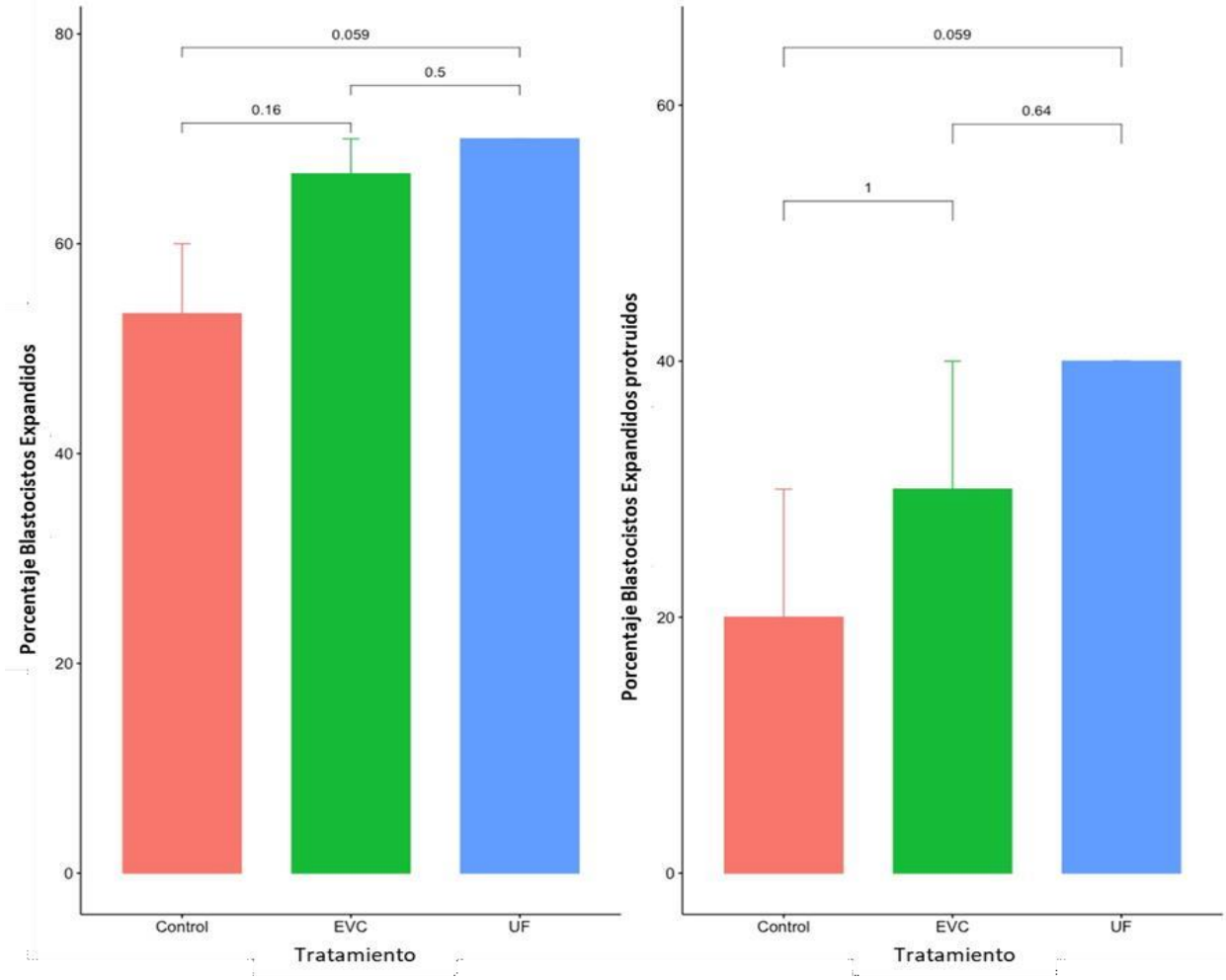


Figura 20. Porcentaje de blastocistos expandidos (panel izquerdo) y protruidos (panel derecho) en relación al tratamiento a los días 7 y 9 de desarrollo in vitro. Análisis estadístico mediante prueba de Kruskall Wallis, post hoc Wilcoxon. Se consideró P<0,05 para establecer diferencias estadísticamente significativas.

Para evaluar la cinética de crecimiento se consideró el diámetro de los embriones (de calidad 1, 2 y 3 según los criterios de la IETS) como variable de referencia en relación al tiempo y tratamiento administrado (Figura 21). Los descriptivos estadísticos del análisis de Anova anidado se presentan en la Tabla 12. Tanto el factor tratamiento como la interacción tratamientos-tiempo (días) generaron diferencias significativas en la magnitud de los diámetros, siendo más significativa la diferencia de diámetros en la interacción tratamiento-tiempo (Tabla 13). La descripción de las comparaciones de

todos los términos con sus respectivos valores de p se encuentran en la tabla 1 suplementaria.

Tanto el tratamiento con EV-UF y EVC generan un incremento significativo en los diámetros al día 9 del desarrollo, siendo el tratamiento EV-UF el que induce de forma sostenida diferencias significativas a lo largo del desarrollo pre-implantatorio (Figura 22).

Tabla 12. Descriptivo estadístico de los diámetros de embriones bovinos pre-implantatorios según el tratamiento y los respectivos días.

Días	Tratamientos	Promedio en µm	SD	Prueba post hoc Tuckey
5	Control	112,69	13,84	cd
5	EV-UF	106,01	6,5	d
5	EVC	139,71	8,51	bc
7	Control	133,56	37,73	bcd
7	EV-UF	157,56	44,99	ab
7	EVC	149,8	42,16	ab
9	Control	157,16	60,55	ab
9	EV-UF	178,81	50,75	a
9	EVC	180,25	60,98	a

SD= desviación estándar.

Tabla 13. Análisis de anova anidado entre las variables tratamiento y tiempo anidado en tratamiento (tratamiento: factor (día)) que determinan diferencias en el diámetro de embriones pre-implantatorios bovinos.

Análisis de anova anidado SV (Fuente de variación)	**Df**	**valor F**	**Significancia de P**
Tratamiento	2	7,21	0,001
Tratamiento:factor (Día)	6	14,17	<,001

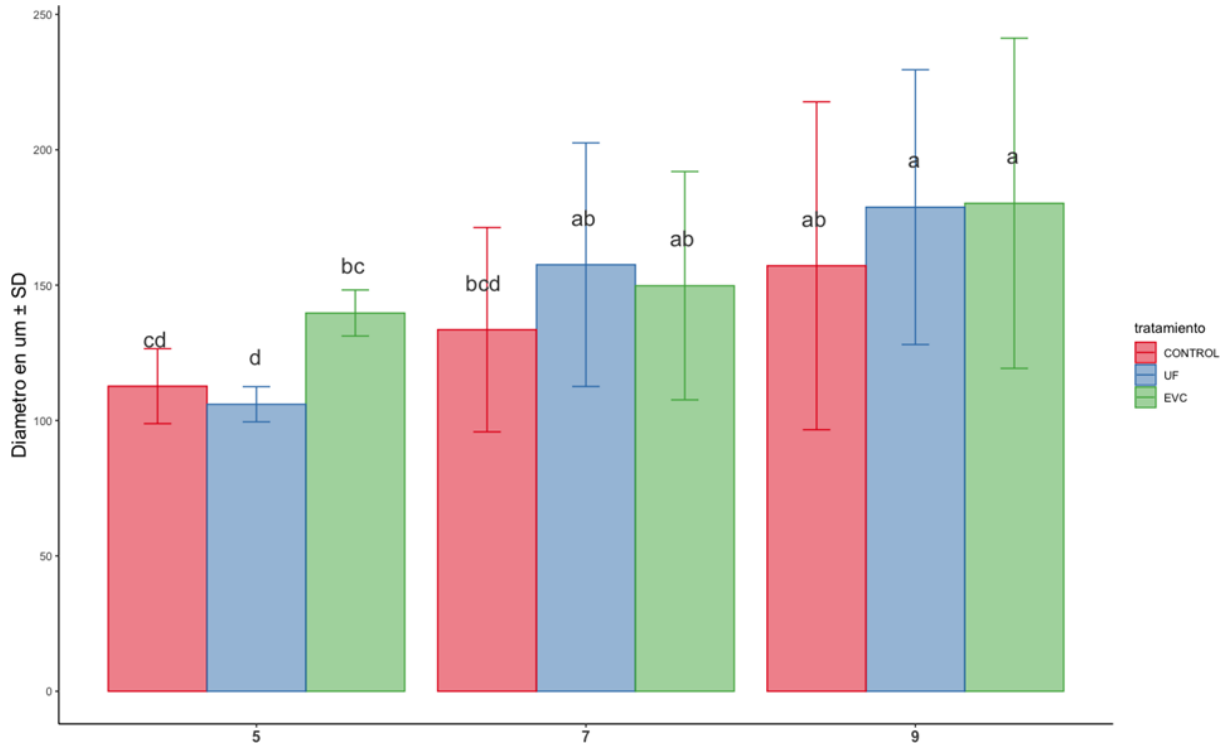
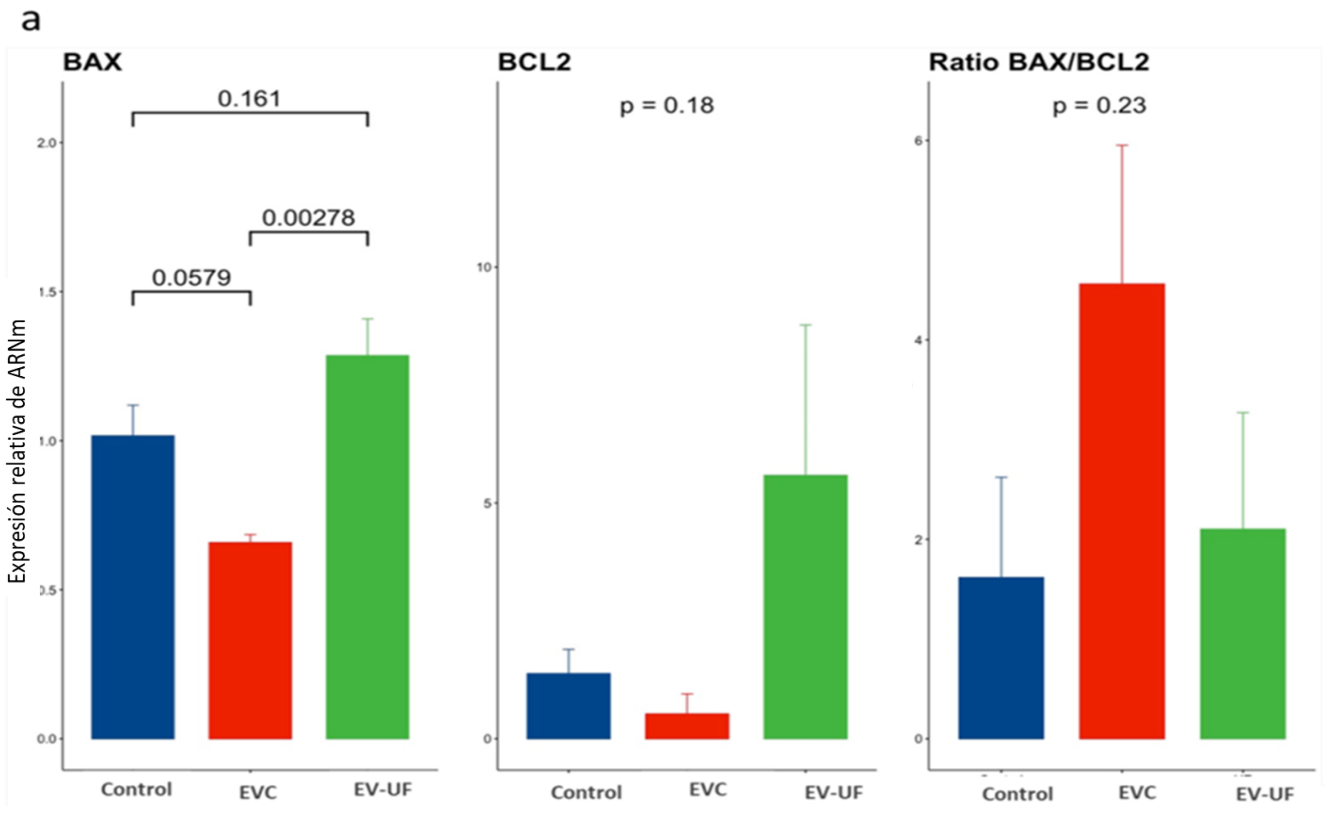
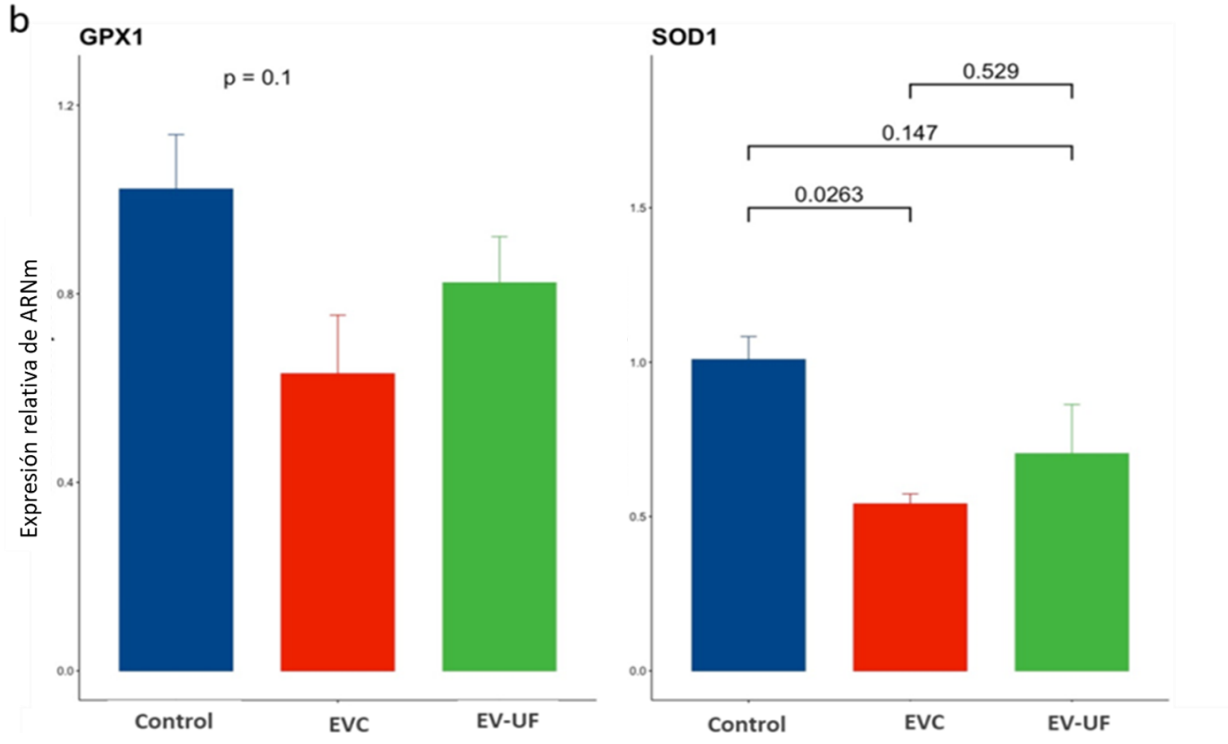


Figura 21. Representación de los diámetros de embriones pre-implanatatorios bovinos producidos in vitro en relación a los días de desarrollo y tratamientos. EV-UF: Vesículas extracelulares derivadas de líquido folicular o de medio de cultivo de células endometriales: EVC. Contro: PBS. El eje X representa los días del desarrollo embrionario en los que se adicionaron las vesículas o PBS al medio de cultivo.

En relación a los genes vinculados a estrés oxidativo y apoptosis, SOD1 está mayormente expresado en el grupo control en comparación al tratamiento con EVC (Figura 22) (p= 0,002). La expresión de BAX tiende a ser mayor en el grupo control que en el tratamiento con EVC (p= 0,057), sin embargo, su expresión aumenta significativamente en el grupo con UF comparado con el tratamiento con EVC (p= 0,002).

Por otra parte se detectó mayor expresión de IFNT en el grupo tratado con EV-UF en comparación al control y al grupo EVC (p=0,0085; p=0,0003 respectivamente). En cuanto a los genes de regulación de la pluripotencia, SOX2 estuvo sobre expresado en el grupo EVC en comparación al tratamiento EV-UF y al control (p=0,04; p=0,04 respectivamente), mientras que la expresión de NANOG tiene tendencia a un incremento en el grupo EVC en comparación al tratamiento EV-UF y control (p= 0,073; p=0,077 respectivamente). No se detectó diferencias significativas en la expresión de OCT4 entre los grupos, probablemente debido a la alta variabilidad entre las muestras.


a
BAX
0.161
0.00278
0.0579
Expresión relativa de ARNm
Control
EVC
EV-UF
BCL2
p = 0.18
Control
EVC
EV-UF
Ratio BAX/BCL2
p = 0.23
Control
EVC
EV-UF


b
GPX1
p = 0.1
Expresión relativa de ARNm
Control
EVC
EV-UF
SOD1
0.529
0.147
0.0263
Control
EVC
EV-UF

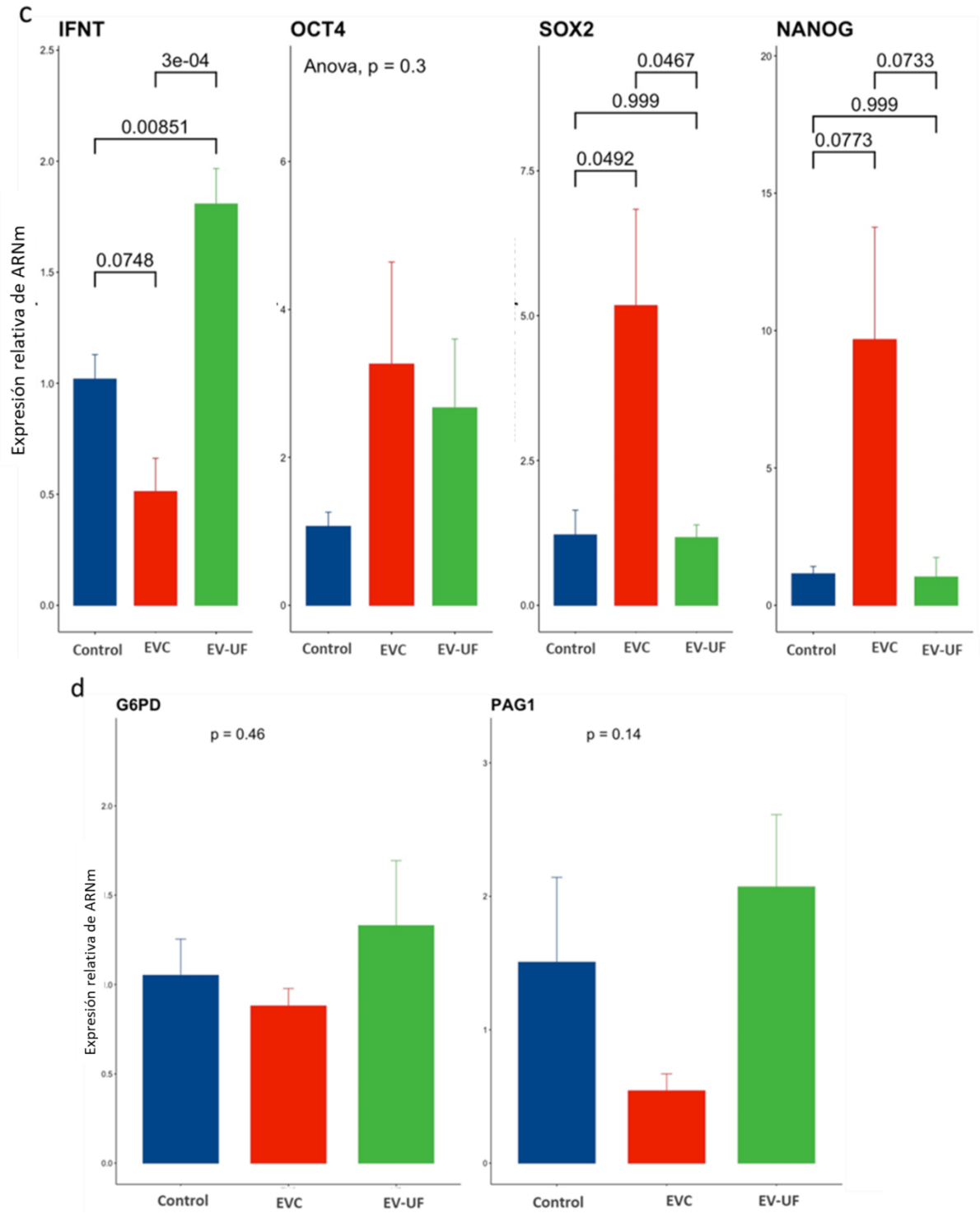


Figura 22. Expresión relativa de ARNm de genes vinculados a a) apoptosis, b) estrés oxidativo, c) calidad embrionaria, d) metabolismo de la glucosa e implantación en embriones bovinos pre-implantatorios producidos in vitro. Prueba estadística anova y post hoc tuckey, diferencias significativas fueron consideradas con un valor de $p<0,05$.

VII. DISCUSION

En rumiantes, posterior a la formación del blastocisto el embrión inicia el proceso de elongación alcanzando cerca de 30 cm en bovinos y 25 cm en ovinos (Degrelle et al., 2005; Johnson et al., 2018). Durante esta etapa la elongación del embrión se produce por un incremento significativo de las células trofoblásticas lo cual contribuye al aumento de la señal molecular emitida por el embrión para el reconocimiento de la gestación. En bovinos, IFNT es la principal señal embrionaria para prolongar la duración de vida del CL, manteniéndose la secreción de progesterona necesaria para garatizar las condiciones endometriales para la implantación (Bazer et al., 1991).

En bovinos, el peak de secreción de IFNT se produce al día 16 del desarrollo (Betteridge et al., 1978; Guillomot et al., 1990). El IFNT induce la expresión de genes en células endometriales produciendo diferenciación celular y desarrollo del conceptus lo que garantiza la correcta implantación (Hansen et al., 1999; Spencer et al., 2008). Los embriones producidos in vivo secretan IFNT desde el estadio de blastocisto, el cual estimula los genes IGSs clásicos en las células endometriales tanto en modelos in vitro como in vivo, y modula la respuesta inmunitaria en el útero (Johnson et al., 2006; Talukder et al., 2017; Sponchiado et al., 2017; Rashid et al., 2018).

En este estudio, se ha demostrado que los IGSs clásicos (OAS1Y, MX1, MX2 y ISG15) están incrementados en su expresión en las células epiteliales endometriales debido al efecto de las EVs provenientes de embriones en estadios tempranos de desarrollo, incluso previos a la formación del blastocisto. Este efecto se observa tanto en EVs liberadas por embriones producidos in vivo como in vitro. La vía Jak/Stat activa los elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE) que inducen la expresión de los IGSs (Bazer 1997). En este trabajo, los componentes de la vía de señalización JAK-STAT SAR1, STAT2, IRF9 fueron detectados en todos los grupos de tratamiento, en las células epiteliales endometriales, sin embargo, su expresión no se modificó por la presencia de EVs secretadas por los embriones bovinos. Sin embargo, se han descrito vías de señalización alternativas para la inducción de IGSs. Tal es el caso en ovinos, donde los componentes de la vía de señalización JAK-STAT están ausentes

en las células epiteliales luminales en el endometrio, y otras son las vías encargadas de la expresión de IGSs (Choi et al 2001; Banu et al., 2010). Otros reportes han demostrado que el embrión bovino induce ISGs en células epiteliales endometriales (Passaro et al., 2018, Talukder et al., 2019), por lo que otros mecanismos moleculares podrían mediar la expresión de los ISGs en bovinos. Tal podría ser el caso del factor regulador de interferón IRF6, regulado a la alta por ambos tipos deEVs. Este factor está presente en las células epiteliales endometriales ovinas, y puede activar por sí mismo promotores que contienen ISRE (Fleming et al., 2009), permitiendo la expresión de genes IGSs. IRF6 podría inducir una activación alternativa al factor regulador de interferón IRF1, el cual es el más descrito para la activación de los IGSs en ovinos (Spencer et al.,2008).

Por otra parte, las prostaglandinas son reguladores importantes durante la elongación e implantación del conceptus (Dorniak et al., 2011). Las ciclooxigenasas 1 y 2 (PTGS) se expresan en células epiteliales endometriales ovinas. Sin embargo, PTGS2 es la ciclooxogenasa principal involucrada en la síntesis de prostagladinas por parte del útero (Charpigny et al., 1997) y su expresión se ve aumentada por la presencia tanto de IFNT como por la progesterona (Dorniak et al., 2011). En este trabajo, PTGS1 y PTGS2 fueron reguladas a la alta en bEECs expuestas a ambas EVs secretadas por embriones IVP e IVV. Sin embargo, las EVs-IVP indujeron un mayor aumento de PTGS2 en las células. En este trabajo no se realizó evaluación del cargo de las EVs, pero se ha identificado un reporte que indica que las EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro, contienen miR29 el cual puede inducir la expresión de PTGS2 a través de la supresión de la actividad de la ADN metiltransferasa (DNMT) (Fang et al., 2012).

Las EVs de los embriones también indujeron la expresión de AKR1C4, enzima a cargo de la expresión de PGF2α (Arosh et al., 2016), MUC1, proteína asociada a la receptividad endometrial, OXTR (receptor de oxitocina) y PAQR8 (progestina y receptor de la familia adipoQ número 8). En bovinos, MUC1 está regulada a la alta en el endometrio de hembras preñadas al día 7 y sus propiedades de anti-adhesión pueden promover el movimiento del embrión temprano a través del tracto reproductivo

previo a la implantación (Meseguer et al., 1998; Sponchiado et al., 2017). AKR1C4 es una enzima responsable de la producción de PGF2α, la cual tiene un potente efecto luteolítico (Arosh et al., 2016) y fue más inducida por EVs-IVP. Zhou et al (1014) menciona que los blastocistos porcinos generados mediante clonación y activación partenogenética son embriones menos competentes e inducen mayor expresión de AKR1C4 en el endometrio comparado con los embriones producidos in vivo. En correlación con lo mencionado anteriormente, se ha reportado que blastocistos bovinos producidos in vitro liberan EVs que contienen miR-221 (Melo- Baez et al., 2020). Este microARN está involucrado en la inducción de AKR1C4 tanto a nivel de proteína como ARNm en cultivo celular (Meerson et al., 2013).

OXTR fue también inducido por EVs-IVV y EVs-IVP. El co-cultivo de embriones bovinos con explantes endometriales activa en estos últimos, la expresión de miRNAs asociados a la expresión del receptor de oxitocina (Bridi, 2021). Más aún, el origen del embrión determina la magnitud de la expresión de OXTR en los explantes endometriales durante el co-cultivo, siendo mayor la magnitud de expresión en presencia de embriones producidos in vitro (Bridi, 2021). Resultados similares se observan en este trabajo, donde las EVs-IVP inducen mayor expresión de OXTR en las células endometriales.

El nivel de ARNm de ESR1 es alto entre los días 5 y 7 posterior a la ovulación, pero decrece cercano al momento de la implantación (Bazer et al., 2008, Okumu et al., 2010). En rumiantes, IFNT silencia la expresión de ESR1 y, en consecuencia, la expresión de OXTR en el endometrio para prevenir los mecanismos luteolítico (Bazer, 2013). En este trabajo tanto la expresión de ESR1 como OXTR se vió incrementada en las células expuestas a EVs provenientes de embriones IVP. Estas diferencias en la respuesta de células endometriales entre EVs-IVP y EVs-IVV podrían ser explicadas por una carga molecular de las vesículas que difiere según el origen de los embriones, pudiendo ser una consecuencia de la competencia embrionaria.

HPGD es una enzima involucrada en el catabolismo de PGF2alfa (Costine et al., 2007) y su transcripción se inhibe en hembras bovinas al día 7 de preñez (Sponchiado et al.,

2017). De forma similar, en este estudio se observó que la expresión de HPGD se inhibe mediante la acción de las EVs provenientes únicamente de embriones IVV. Respecto a prostaglandina E sintetasa (PTGES), las EVs-IVV inducen una mayor expresión que las EVs-IVP en las células endometriales. La expresión de PGE2 es crucial para la protección del cuerpo lúteo y mantención de la preñez (Arosh et al., 2016). Posiblemente, esta falta de inducción por parte de las EVs-IVP puede afectar la competencia de los embriones al compararlo con los embriones IVV.

Otro gen regulado al alta por ambos tipos de EVs fue PAQR8 (miembro de la familia de receptor adipoQ y progestina). Este receptor está involucrado en un mecanismo diferente a los convencionales de respuesta a progesterona. Este mecanismo se denomina acción no genómica, la cual es más rápida que la acción genómica (mecanismo convencional) utilizada por los receptores de progesterona (PGR). Esto probablemente debido a la ubicación de estos recetores (PAQR8), los cuales se encuentran en la membrana celular y pueden ser activados en minutos una vez expuestos a progesterona (Cato et al., 2002; Kasubuchi et al., 2017). Incluso, la disminución de la expresión de PAQR8 en humanos está asociada con resistencia a los efectos de la progesterona durante la endometriosis (Vázquez-Martínez et al., 2020). Esto sugiere que las EVs estarían sensibilizando el endometrio a la acción de la progesterona, a través de este receptor de progesterona de membrana. Algunos miRNAs que han sido descritos en EVs provenientes de embriones bovinos pre-implantatorios pueden regular la expresión de diferentes receptores de progesterona incluyendo los receptores de membrana como PAQR8 (Melo-Baez et al., 2020, Nothnick, 2022). Mas investigación es necesaria para comprender los mecanismos involucrados en la regulación al alta de este tipo de receptores a través de la acción de EVs.

Genes relacionados con señalización de factores de crecimiento (IGF2BP3, GRB7 y IGFBP3) fueron regulados al alta por las EVs de los embriones pre-implantatorios. Estos resultados difieren de lo reportado en modelos in vivo donde los factores de crecimiento se ven disminuidos en bovinos al día 7 de preñez (Sponchiado et al., 2017). Sin embargo, los factores similares a la insulina son necesarios para el

establecimiento de la comunicación embrio-materna ya que los efectos paracrinos y autocrinos pueden ser mediados por receptores tipo I IGF y proteínas de unión IGF (IGFBPs) (Simmons et al., 2009). Los resultados de este estudio sugieren que los embriones pueden utilizar sus EVs para incrementar la expresión de estos factores de crecimiento y así condicionar el endometrio para el desarrollo del conceptus.

Respecto a la comparación entre los efectos de las EVs provenienes de embriones IVV o IVP, es evidente que hay un efecto diferencial sobre la respuesta endometrial. La literatura demuestra que el endometrio puede modificar su transcriptómica dependiendo de algunas características del embrión como la tecnología de producción de embriones, tamaño y sexo del conceptus (Bauersachs et al., 2009; Mathew et al., 2019; Sánchez et al., 2019). Incluso, las vías de señalización activadas en el endometrio pueden modificarse ante la presencia de embriones IVP o IVV (Mansouri-Attia et al., 2009). Por otra parte, diferentes estudios mencionan que la producción de IFNT es mayor en embriones producidos in vitro hay resultados que contradicen esta afirmación (Stojkovic et al., 1999; Kubisch et al., 2001). Adicionalmente, existe evidenciademostrando que el tamaño, concentración y contenido molecular de las EVs embrionarias son modificadas por la competencia y origen del embrión (Saadeldin et al., 2014; Mellisho et al., 2017; Mellisho et al., 2019).

Recientemente, un estudio demostró las diferencias en el cargo de miRNA de EVs liberadas entre embriones pre-implantatorios producidos in vitro e in vivo (Bridi et al., 2021). El mismo estudio indica que el origen del embrión tendría un efecto sobre la señalización molecular que media la comunicación con el endometrio y el cuerpo lúteo. Este hecho puede explicar las diferencias entre los genes desregulados inducidos por EVs-IVV y EVs-IVP en células epiteliales endometriales.

Finalmente, respecto al análisis de ontología génica, los resultados indican que se activan diferentes vías en las células endometriales expuestas a EVs-IVP o EVs IVV. Las EVs-IVV inducen procesos biológicos en las células epiteliales endometriales, que están relacionados a regulación de proteínas y activación de vías moleculares, junto con la activación de la transcripción génica, a diferencia de las EVs-IVP, las cuales

inducen una menor cantidad de procesos biológicos y algunos de estos procesos se asocian con repacion del ADN y respuesta a estimulación ultravioleta, evidenciando un efecto dañino por parte de las EVs-IVP. Estos efectos distintos estarían asociados al origen de las EVs, y por lo tanto, del embrión. Estos resultados están en concordancia con lo mencionado por Mansouri- Attia et al. (2009), el cual menciona las diferentes vías que se expresan en explantes endometriales cultivados con embriones producidos con diferentes tecnologías. Sin embargo, independiente del origen de las EVs, ambas inducen componentes celulares asociados a biogénesis de exosomas en las células endometriales. Este efecto de las EVs embrionarias, podría sugerir un mecanismo alternativo para establecer comunicación mediante EVs.

Por otra parte, existen diferencias en el efecto de las EVs provenientes de embriones bovinos durante la ventana 5-7 con respecto a la ventana 7-9 de desarrollo. Un efecto similar se reporta con respecto al efecto de las EVs provenientes de fluido uterino, el cual se ve modificado según el día de preñez en que las EVs son aisladas, produciendo diferentes efectos en células endometriales cultivadas in vitro (Kusama et al., 2018). Esto debido posiblemente a una modificación en el cargo de estas EVs, en particular, al cargo de miRNAs, que se ha demostrado cambia según el estadio del ciclo estral (Hamdi et al., 2021). Por lo tanto, se sugiere que las EVs embrionarias difieren en su efecto y cargo según su estadio de desarrollo ya que la comunicación es un proceso dinámico.

Similar a la ventana 5-7, los embriones de la ventana 7-9 inducen una mayor expresión de OXTR (receptor de oxitocina) en las células epiteliales endometriales expuestas a sus EVs. La expresión de este receptor fue inducida únicamente por las EVs-IVP de la ventana 7-9 de desarrollo, sin ser inducida por las EVs-IVV. Se ha sugerido que la regulación del receptor OXTR está determinada por el origen de los embriones (producción in vitro/in vivo) ya que los embriones tienen diferentes cargos de miRNAs según la tecnología con la que son producidos y algunos de estos miRNAs están vinculados con la expresión de ARNm del gen OXTR en células endometriales (Bridi et al., 2021). Por otra parte, las EVs de los embriones IVP indujeron los genes ISGs no clásicos, efecto que no se evidencio por las EVs provenientes de embriones IVV. La

expresion única de genes ISGs no clásicos, podría obedecer a la presencia de células epiteliales endometriales mixtas (gladulares superficiales y profundas) en el cultivo, las cuales condicionan la expresion de estos factores, dada la presencia o ausencia del factor IRF2, el cual esta presente de forma selectiva en células epiteliales superficiales y que reprimen la expresion de genes ISGs clásicos, permitiendo solo la expresion de genes ISGs no clásicos (Spencer et al., 2008; Hansen et al., 2017).

Con respecto al efecto de las EVs maternas provenientes de modelos in vivo e in vitro sobre el desarrollo y calidad de embriones bovinos producidos in vitro, se sugiere que los embriones posiblemente internalizan las EVs provenientes fluido uterino y de cultivo de células endometriales, similar a lo descrito por otros autores (Evans et al., 2019; Leal et al., 2022). Las EVs provenientes de cultivo celular, indujeron mayor expresión de SOX2, y una tendencia a la mayor expresión de NANOG en embriones bovinos cultivados in vitro durante el periodo pre-implantatorio, mientras que disminuyeron la expresión de la enzima SOD1 asociada a estrés oxidativo y del gen proapoptótico BAX. Estos efectos dirigidos a mejorar la calidad embrionaria y disminuir el estrés oxidativo podrían deberse al cargo presente en las EVs de células endometriales.

En humanos, las EVs provenientes de células epiteliales endometriales cultivadas in vitro presentan un cargo de proteínas vinculadas al desarrollo embrionario temprano como proteínas asociadas a la adhesión, diferenciación y comunicación celular (Segura-Benítez et al., 2022). Las EVs liberadas por células endometriales en cultivo modifican la transcriptómica de las células del trofoectodermo induciendo la expresión de proteínas vinculadas con la adhesión y la diferenciación celular (Evans et al., 2019). También se ha reportado que las EVs provenientes de células epiteliales oviductales cultivadas in vitro, mejoran la calidad de embriones bovinos producidos in vitro, incrementando la expresión de genes asociados a calidad embrionaria (Lopera-Vasquez et al., 2016).

Por otra parte, las EVs provenientes de UF indujeron una mayor expresión del gen IFNT en los embriones suplementados en comparación a la suplementación con EVs

provenientes de cultivo celular. Se ha evidenciado un resultado similar utilizando exosomas aislados de fluido uterino, los cuales, inducen una mayor expresión de ARNm de IFNT en embriones bovinos producidos por SCNT (Qiao et al., 2018).

Tanto las EVs provenientes de fluido uterino como las provenientes de células endometriales cultivadas in vitro, incrementan la expresión de moléculas de adhesión en las células receptoras (Kusama et al., 2018; Evans et al., 2019). Sin embargo, durante el periodo pre-implantatorio de embriones bovinos, no se evidenció un incremento de la proteína asociada a la implantación, PAG1 (glicoproteína asociada a la preñez), posiblemente por el estadio temprano de desarrollo en el cual se encuentran los embriones utilizados en este estudio. Modelos in vivo han determinado que al día 7 de preñez se incrementa en el endometrio la expresión de proteínas anti adhesivas, posiblemente para permitir el paso del embrión temprano a través del tracto reproductivo (Sponchiado et al., 2017).

Respecto a la cinética de crecimiento (medición de diámetros), tanto el tratamiento con EVC como con EV-UF generaron incremento significativo de los diámetros al día 9 de cultivo con respecto al control. EV-UF presento una mejora sostenida en el tiempo ya que incremento significativamente los diámetros al día 7 y al día 9 en comparación al inicio (día 5). Además, el tratamiento EV-UF produjo una tendencia al incremento del porcentaje de blastocistos expandidos y protruidos al día 7 y 9 respectivamente.

Otros reportes han indicado que las EVs obtenidas de fluido uterino mejoran algunas características asociadas a calidad en embriones bovinos pre-implantatorios como tasas de sobrevivencia posterior a la vitrificación, número total de células y genes vinculados con el metabolismo de lípidos (Leal et al., 2022).

En resumen, en este trabajo se ha demostrado que las células epiteliales endometriales internalizan tanto las EVs provenientes de embriones producidos in vitro como in vivo en diferentes estadios de desarrollo embrionario (ventana 5-7/7-9). En ambos casos, ocurren modificaciones transcripcionales en las células suplementadas con las EVs embrionarias, dichos cambios se encuentran vinculados a la activación de genes inducidos por IFNT. Además, el tipo de producción de embriones influye en el

efecto de sus EVs en las células epiteliales endometriales, siendo diferentes entre aquellos producidos in vitro en relación a los producidos in vivo. Junto con ello, la ventana de desarrollo embrionario también influye en el efecto de las EVs, siendo diferente entre la ventana 5-7 y 7-9 del desarrollo embrionario.

Por último, las EVs provenientes de fluido uterino y de cultivo de células endometriales son internalizadas por embriones pre-implantatorios bovinos producidos in vitro. El efecto de las EVs maternas en el desarrollo y calidad de embriones bovinos pre-implantatorio difiere según el origen de las EVs; modelos in vitro (cultivo de células endometriales) o in vivo (fluido uterino). Estas diferencias se evidencian en cuanto a la calidad embrionaria en términos de progresión del desarrollo, diámetro de los embriones y expresión de genes de calidad.

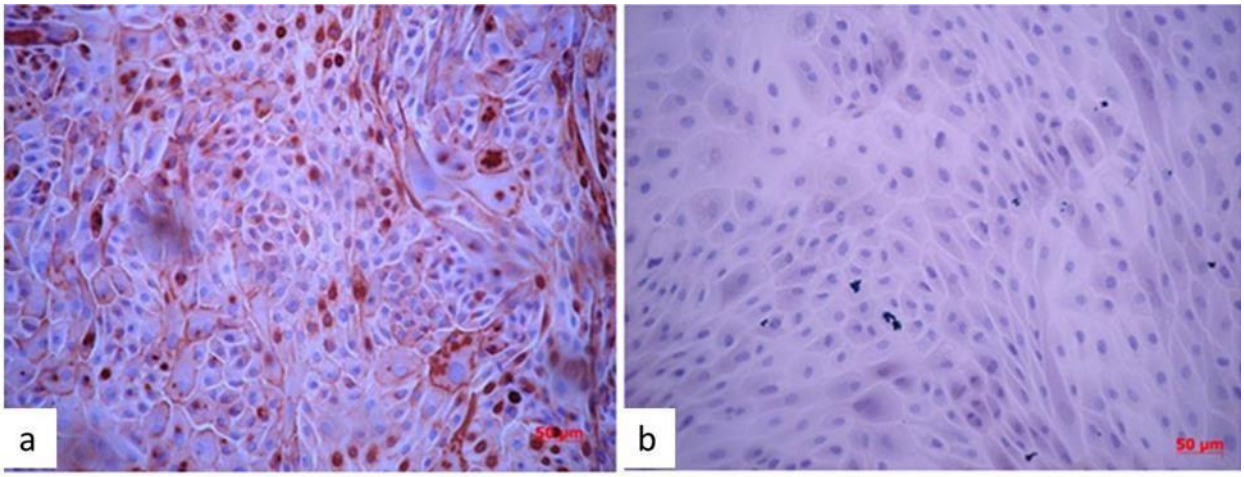
VIII. CONCLUSIONES

1. Las vesículas extracelulares secretadas por embriones pre-implantatorios (día 5-7) producidos in vitro e in vivo modifican la expresión génica global de células epiteliales endometriales, incrementando la expresión de genes clásicos y no clásicos estimulados por interferón tau.

2. Las vesículas extracelulares secretadas por blastocistos (día 7-9) producidos in vitro incrementan la expresión de genes no clásicos estimulados por interferón tau en células epiteliales endometriales, siendo diferente su efecto al de las vesículas extracelulares secretadas por blastocistos producidos in vivo.

3. Las vesículas extracelulares secretadas por células epiteliales endometriales cultivadas in vitro o aisladas de fluido uterino, son posiblemente internalizadas por embriones bovinos pre-implantatorios producidos in vitro, modificando la capacidad de desarrollo y calidad de los embriones. Las EVs provenientes de fluido uterino tienden a incrementar la tasa de desarrollo de blastocistos protruidos y expandidos, asi como un incremeto sostenido en el diámetro de los embriones cultivados durante el periodo pre-implantatorio, junto con un incremento en la expresion de interferón tau.

IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO



Anexo 1 Figura 1 Inmunocitoquímica de citoqueratina. a) células epiteliales positivas a citoqueratina, b) células negativas al marcador de células estromales vimentina.

Anexo 2 Tabla 1. Comparación de los términos mediante prueba estadística Tuckey

Terminos Comparados	Valor de p
CONTROL:9-UF:7	1
EVC:9-UF:9	0,999999999
CONTROL:7-EVC:5	0,999482474
CONTROL:9-EVC:7	0,999009582
UF:5-CONTROL:5	0,998559816
EVC:7-UF:7	0,998001347
EVC:7-EVC:5	0,987944244
EVC:7-CONTROL:7	0,815739309
CONTROL:9-EVC:5	0,767386891
UF:7-EVC:5	0,691261864
EVC:9-CONTROL:9	0,593927673
UF:9-CONTROL:9	0,574727826
EVC:9-UF:7	0,568821286
UF:9-UF:7	0,541928609
CONTROL:7-CONTROL:5	0,374858855
CONTROL:9-CONTROL:7	0,36555659
UF:7-CONTROL:7	0,277024587
EVC:9-EVC:7	0,207063571
UF:9-EVC:7	0,172955544

CONTROL:7-UF:5	0,126966176
EVC:5-CONTROL:5	0,096014371
EVC:5-UF:5	0,024020098
EVC:9-EVC:5	0,015249901
UF:9-EVC:5	0,008374942
EVC:7-CONTROL:5	0,00549391
EVC:9-CONTROL:7	0,002041837
EVC:7-UF:5	0,001118518
UF:9-CONTROL:7	0,000819397
CONTROL:9-CONTROL:5	0,000345388
UF:7-CONTROL:5	9,52E-05
CONTROL:9-UF:5	6,63E-05
UF:7-UF:5	1,80E-05
EVC:9-CONTROL:5	1,12E-07
EVC:9-UF:5	2,33E-08
UF:9-CONTROL:5	8,26E-09
UF:9-UF:5	1,92E-09

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almiñana, C., & Bauersachs, S. (2020). Extracellular vesicles: Multi-signal messengers in the gametes/embryo-oviduct cross-talk. Theriogenology. doi:10,1016/j.theriogenology.2020,01.077

2. Almiñana, C., 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, 154(3), 153–168. doi:10,1530/rep-17-0054

3. Almiñana, C., 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), e33625. doi:10,1371/journal.pone.0033625

4. 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). doi:10,1186/s12864-018-4982-5

5. Arosh, J. A., Banu, S. K., & McCracken, J. A. (2016). Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. Journal of dairy science, 99(7), 5926- 5940.

6. Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I. M., Skupski, D., & Witkin, S. S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. Journal of Reproductive Immunology, 79(1), 12–17. doi:10,1016/j.jri.2008.06.001

7. Atay, S., Gercel-Taylor, C., & Taylor, D. D. (2011). Human Trophoblast-Derived Exosomal Fibronectin Induces Pro-Inflammatory Il-1β Production by Macrophages. American Journal of Reproductive Immunology, 66(4), 259–269. doi:10,1111/j.1600-0897.2011.00995.x

8. Atay, S., Gercel-Taylor, C., Kesimer, M., & Taylor, D. D. (2011). Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells. Experimental Cell Research, 317(8), 1192–1202. doi:10,1016/j.yexcr.2011.01.014

9. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. Journal of neuro-oncology, 113, 1-11.

10. Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? MHR: Basic Science of Reproductive Medicine, 16(12), 896–906. doi:10,1093/molehr/gaq056

11. Bai, H., Sakuai, T., Godkin, J. D., & Imakawa, K. (2013). Expression and Potential Role of GATA Factors in Trophoblast Development. Journal of Reproduction and Development, 59(1), 1–6. doi:10,1262/jrd.2012-100

12. Banu, S. K., Lee, J., Stephen, S. D., Nithy, T. K., & Arosh, J. A. (2010). Interferon tau regulates PGF2α release from the ovine endometrial epithelial cells via activation of novel JAK/EGFR/ERK/EGR-1 pathways. Molecular Endocrinology, 24(12), 2315-2330.

13. Battaglia, R., Palini, S., Vento, M. E., La Ferlita, A., Lo Faro, M. J., Caroppo, E., ... & Di Pietro, C. (2019). Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid. Scientific reports, 9(1), 84.

14. Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Zakhartchenko, V., Minten, M., Reichenbach, M., Reichenbach, H. D., ... & Wolf, E. (2009). The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(14), 5681-5686.

15. Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Spencer, T. E., & Wu, G. (2008). Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. Reproductive biology, 8(3), 179-211.

16. Bazer, F. W., Song, G., & Thatcher, W. W. (2012). Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. Asian-Australas J. Anim. Sci. 25(1): 1–16. Doi: 10,5713/ajas.2011.r.08

17. Bazer, F. W., & Thatcher, W. W. (2017). Chronicling the discovery of interferon tau. Reproduction, 154(5), F11–F20, doi:10,1530/rep-17-0257

18. Bazer, F. W., Spencer, T. E., & Ott, T. L. (1997). Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. American Journal of Reproductive Immunology, 37(6), 412-420

19. Bazer, F. W., Thatcher, W. W., Hansen, P. J., Mirando, M. A., Ott, T. L., & Plante, C. (1991). Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. J. Reprod. Fertil. Suppl, 43, 39-47.

20. Bazer, F. W., Wang, X., Johnson, G. A., & Wu, G. (2015). Select nutrients and their effects on conceptus development in mammals. Animal Nutrition, 1(3), 85– 95. doi:10,1016/j.aninu.2015.07.005

21. Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: Vehicles for the Transfer of Toxic Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases? Frontiers in Physiology, 3. doi:10,3389/fphys.2012.00124

22. Berg, D. K., Smith, C. S., Pearton, D. J., Wells, D. N., Broadhurst, R., Donnison, M., & Pfeffer, P. L. (2011). Trophectoderm Lineage Determination in Cattle. Developmental Cell, 20(2), 244–255. doi:10,1016/j.devcel.2011.01.003

23. Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. (1994). Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. Theriogenology; 42:895–907.

24. Betteridge, K. J., & Mirchell, D. (1974). Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of mareI. Reproduction, 39(1), 145–148. doi:10,1530/jrf.0,0390145

25. Betteridge, K. J., M. D. Eagtesome, G. C. B. Randall, D. Mitchell and E. A. Sugden. 1978. Maternal progesterone levels as evidence of luteotrophic or antiluteolytic effects of embryos transferred to heifers 12-17 days after estrus. Theriogenology 9:86.

26. Bidarimath, M., Khalaj, K., Kridli, R. T., Kan, F. W. K., Koti, M., & Tayade, C. (2017). Extracellular vesicle mediated intercellular communication at the porcine maternal-fetal interface: A new paradigm for conceptus-endometrial cross-talk. Scientific Reports, 7(1). doi:10,1038/srep40476

27. Boriachek, K., Islam, M. N., Möller, A., Salomon, C., Nguyen, N.-T., Hossain, M.S. A., Yamauchi, Y., Shiddiky, M. J. A. (2017). Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. Small, 14(6), 1702153. doi:10,1002/smll.201702153

28. Bridi, A. (2021). Extracellular vesicles secreted by bovine embryos produced in vivo and in vitro: miRNAs content and molecular effects in endometrial and luteal tissues. Tesis Doctoral, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidad de São Paulo, Pirassununga. doi:10,11606/T.74.2021.tde- 27102021-164258. Recuperado 2022-03-10, de www.teses.usp.br

29. Bridi, A., Andrade, G. M., Del Collado, M., Sangalli, J. R., de Ávila, A. C., Motta,G., ... & 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.

30. Brooks, K., Burns, G., & Spencer, T. E. (2014). Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. Journal of Animal Science and Biotechnology, 5(1), 53. doi:10,1186/2049-1891- 5-53

31. 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). doi:10,1095/biolreprod.115.134973

32. 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. doi:10,1093/biolre/ioy011

33. 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), e90913. doi:10,1371/journal.pone.0090913

34. Cato, A. C., Nestl, A., & Mink, S. (2002). Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. Science's STKE, 2002(138), re9-re9.

35. Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J. P., Créminon, C., Martal, J., Maclouf, J., & Guillomot, M. (1997). Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. Endocrinology, 138(5), 2163-2171.

36. Choi, Y., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Berghman, L. R., Joyce, M. M., Taylor, K. M., ... & Spencer, T. E. (2001). Interferon regulatory factor-two restricts expression of interferon-stimulated genes to the endometrial stroma and glandular epithelium of the ovine uterus. Biology of Reproduction, 65(4), 1038- 1049.

37. Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M. D., Hobot, J. A., Newman, G. R., Jasani, B. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. Journal of Immunological Methods, 247(1-2), 163–174. doi:10,1016/s0022-1759(00)00321- 5

38. 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(1), 255–289. doi:10,1146/annurev-cellbio-101512-122326

39. 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. doi:10,1016/j.theriogenology.2014.01.012

40. Costine, B. A., Inskeep, E. K., Blemings, K. P., Flores, J. A., & Wilson, M. E. (2007). Mechanisms of reduced luteal sensitivity to prostaglandin F2α during maternal recognition of pregnancy in ewes. Domestic Animal Endocrinology, 32(2), 106-121.

41. 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. doi:10,1016/j.ebiom.2015.09.003

42. Daigneault, B. W., Rajput, S., Smith, G. W., & Ross, P. J. (2018). Embryonic POU5F1 is Required for Expanded Bovine Blastocyst Formation. Scientific Reports, 8(1). doi:10,1038/s41598-018-25964-x

43. Degrelle, S. A., Campion, 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 doi:10,1016/j.ydbio.2005.09.043

44. De Loos, F., Van Vliet, C., van Maurik, P. V., & Kruip, T. A. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. Gamete research, 24(2), 197-204.

45. Denicol, A. C., Dobbs, K. B., McLean, K. M., Carambula, S. F., Loureiro, B., & Hansen, P. J. (2013). Canonical WNT signaling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage. Scientific Reports, 3(1). doi:10,1038/srep01266

46. 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. doi:10,1016/j.theriogenology.2020,03.008

47. Dorniak, P., F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2011. Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. Biol. Reprod. 84:1119–1127.

48. Es-Haghi, M., Godakumara, K., Häling, A., Lättekivi, F., Lavrits, A., Viil, J., Andronowska, A., Nafee, T., James, V., Jaakma, Ü., Salumets, A., Fazeli, A. (2019). Specific trophoblast transcripts transferred by extracellular vesicles affect gene expression in endometrial epithelial cells and may have a role in embryo-maternal crosstalk. Cell Communication and Signaling, 17(1).doi:10,1186/s12964-019-0448-x

49. Evans, J., Rai, A., Nguyen, H. P., Poh, Q. H., Elglass, K., Simpson, R. J., ... & Greening, D. W. (2019). Human endometrial extracellular vesicles functionally prepare human trophectoderm model for implantation: Understanding bidirectional maternal-embryo communication. Proteomics, 19(23), 1800423.

50. Fang, J., Hao, Q., Liu, L., Li, Y., Wu, J., Huo, X., & Zhu, Y. (2012). Epigenetic changes mediated by microRNA miR29 activate cyclooxygenase 2 and lambda- 1 interferon production during viral infection. Journal of virology, 86(2), 1010- 1020.

51. Faquineli- Cavalcante, A. C., Andrade, G. M., Bridi. A., Gimenes, L. U., Vieira- Meirelles, F., Perecin, F., Coelho da Silveira, J. (2019). Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. Anim. Reprod. 1(16): 31-38. Doi: 10,21451/1984-3143-AR2018-0101

52. Farin, P. 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. doi:10,1016/j.theriogenology.2005.09.022

53. Février, B., & Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. Current Opinion in Cell Biology, 16(4), 415– 421. doi:10,1016/j.ceb.2004.06.003

54. Fleming, J. A. G., Song, G., Choi, Y., Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2009). Interferon regulatory factor 6 (IRF6) is expressed in the ovine uterus and functions as a transcriptional activator. Molecular and cellular endocrinology, 299(2), 252-260.

55. Forde, N., & Lonergan, P. (2017). Interferon-tau and fertility in ruminants. Reproduction, 154(5), F33–F43. doi:10,1530/rep-17-0432

56. Forde, N., McGettigan, P. A., Mehta, J. P., O'Hara, L., Mamo, S., Bazer, F. W., Spencer, T.E., Lonergan, P. (2014). Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. Reproduction, 147(5), 575– 587. doi:10,1530/rep-13-0010

57. Freeman, D. A., Woods, G. L., Vanderwall, D. K., & Weber, J. A. (1992). Embryo-initiated oviductal transport in mares. Reproduction, 95(2), 535–538. doi:10,1530/jrf.0,0950535

58. Fu, B., Ma, H., Zhang, D. J., Wang, L., Li, Z. Q., Guo, Z. H., ... & Liu, D. (2022). Porcine oviductal extracellular vesicles facilitate early embryonic development via relief of endoplasmic reticulum stress. Cell Biology International, 46(2), 300- 310

59. García Guerraa,1, A. Tribulob, J. Yapurac,2, G.P. Adamsc, J. Singhc,R.J. (2015). Mapletoft Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. Theriogenology 84 467–476.

60. García, E. V., Hamdi, M., Barrera, A. D., Sánchez-Calabuig, M. J., Gutiérrez- Adán, A., & Rizos, D. (2017). Bovine embryo-oviduct interaction in vitro reveals an early cross talk mediated by BMP signaling. Reproduction, 153(5), 631–643. doi:10,1530/rep-16-0654

61. 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). doi:10,1038/s41598-017-05549-w

62. Guillomot, M., Michel, C., Gaye, P., Charlier, N., Trojan, J., & Martal, J. (1990). Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. Biology of the Cell, 68(1-3), 205-211.

63. Hackett, A. J., Durnford, R., Mapletoft, R. J., & Marcus, G. J. (1993). Location and status of embryos in the genital tract of superovulated cows 4 to 6 days after insemination. Theriogenology, 40(6), 1147–1153. doi:10,1016/0093- 691x(93)90285-d

64. Hamdi, M., Cañon-Beltrán, K., Mazzarella, R., Cajas, Y. N., Leal, C. L., Gutierrez-Adan, A., ... & Rizos, D. (2021). Characterization and profiling analysis of bovine oviduct and uterine extracellular vesicles and their miRNA cargo through the estrous cycle. The FASEB Journal, 35(12)

65. Hansen, P. J., Denicol, A. C., & Dobbs, K. B. (2014). Maternal embryokines that regulate development of the bovine preimplantation embryo. Turkish journal of veterinary and animal sciences, 38, 589–598. doi:10,3906/vet-1405-96

66. Hansen, T. R., Sinedino, L. D. P., & Spencer, T. E. (2017). Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). Reproduction, 154(5), F45–F59. doi:10,1530/rep-17-0315

67. Hansen, TR., KJ, A., DJ, P., JK, P., Teixeira, M. G., & Johnson't, G. A. (1999). Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy.

68. Harris, D., Huang, B., & Oback, B. (2013). Inhibition of MAP2K and GSK3 Signaling Promotes Bovine Blastocyst Development and Epiblast-Associated Expression of Pluripotency Factors. Biology of Reproduction, 88(3). doi:10,1095/biolreprod.112.103390

69. Hashizume, K. (2007). Analysis of Uteroplacental-specific Molecules and Their Functions During Implantation and Placentation in the Bovine. Journal of Reproduction and Development, 53(1), 1–11. doi:10,1262/jrd.18123

70. Hasler, J. F. (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. Human Reproduction, 15(suppl 5), 47–58 . doi:10,1093/humrep/15.suppl_5.47

71. Hedlund, M., Stenqvist, A.-C., Nagaeva, O., Kjellberg, L., Wulff, M., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2009). Human Placenta Expresses and Secretes NKG2D Ligands via Exosomes that Down-Modulate the Cognate Receptor Expression: Evidence for Immunosuppressive Function. The Journal of Immunology, 183(1), 340–351. doi:10,4049/jimmunol.0803477

72. Hill, J. R., Burghardt, R. C., Jones, K., Long, C. R., Looney, C. R., Shin, T., Spencer, T. E., Thompson, J. A., Winger, Q. A., Westhusin, M. E. (2000). Evidence for Placental

Abnormality as the Major Cause of Mortality in First- Trimester Somatic Cell Cloned Bovine Fetuses. Biology of Reproduction, 63(6), 1787–1794. doi:10,1095/biolreprod63.6.1787

73. Hue, I., Degrelle, S. A., & Turenne, N. (2012). Conceptus elongation in cattle: Genes, models and questions. Animal Reproduction Science, 134(1-2), 19–28. doi:10,1016/j.anireprosci.2012.08.007

74. Hugel, B., Martínez, M. C., Kunzelmann, C., & Freyssinet, J.-M. (2005). Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. Physiology, 20(1), 22–27. doi:10,1152/physiol.00029.2004

75. Igwebuike, U. M. (2006). Trophoblast cells of ruminant placentas. A minireview. Animal Reproduction Science,93(3-4),185–198. doi:10,1016/j.anireprosci.2005.06.003

76. Jensen, P. L., Grøndahl, M. L., Beck, H. C., Petersen, J., Stroebech, L., Christensen, S. T., & Yding Andersen, C. (2014). Proteomic analysis of bovine blastocoel fluid and blastocyst cells. Systems Biology in Reproductive Medicine, 60(3), 127-135.

77. Jin, Y., Chen, K., Wang, Z., Wang, Y., Liu, J., Lin, L., Shao, Y., Gaou, L., Yin, H., Cui, C., Tan, Z., Liu, L., Zhao, C., Zhang, G., Jia, R., Du, L., Chen, Y., Liu, R., Xu, J., Hu, X., Wang, Y. (2016). DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions. BMC Cancer, 16(1). doi:10,1186/s12885-016-2783-2

78. Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Wu, G., Seo, H., Kramer, A. C., & McLendon, B. A. (2018). Cellular events during ovine implantation and impact for gestation. Animal Reproduction (AR), 15(Supplement 1), 843-855.

79. Johnson, Kelly & Alvarez, Xavier & Borkhsenious, Olga & Kubisch, H. (2006). Nuclear and cytoplasmic localization of interferon-t in in vitro-produced bovine blastocysts. Reproduction, nutrition, development. 46. 97-104. 10,1051/rnd:2005060

80. Kahlert, C., Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., Kalluri, R. (2014). Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. Journal of Biological Chemistry, 289(7), 3869–3875. doi:10,1074/jbc.c113.532267

81. Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2016). Discovery of Double-Stranded Genomic DNA in Circulating Exosomes. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 81, 275–280, doi:10,1101/sqb.2016.81.030932

82. Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., Terasawa, K.,... & Kimura, I. (2017). Membrane progesterone receptor beta (mPRβ/Paqr8) promotes progesterone-

dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling. Scientific reports, 7(1), 1-12.

83. Kerby Shedden, Xue Tao Xie, Parthapratim Chandaroy, Young Tae Chang & Gustavo R. Rosania (2003) Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells. Cancer Research. 1;63(15):4331-7. DOI: Published August 2003

84. Kesimer, M., Scull, M., Brighton, B., DeMaria, G., Burns, K., O'Neal, W., Pickles, R. J., Sheehan, J. K. (2009). Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. The FASEB Journal, 23(6), 1858–1868. doi:10,1096/fj.08- 119131

85. Khan, D. R., Dubé, D., Gall, L., Peynot, N., Ruffini, S., Laffont, L., Bourhis,D. L., Degrelle, S., Jouneau, A., Duranthon, V. (2012). Expression of Pluripotency Master Regulators during Two Key Developmental Transitions: EGA and Early Lineage Specification in the Bovine Embryo. PLoS ONE, 7(3), e34110, doi:10,1371/journal.pone.0034110

86. Klumperman, J., & Raposo, G. (2014). The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6(10), a016857–a016857. doi:10,1101/cshperspect.a016857

87. Kölle, S., Dubielzig, S., Reese, S., Wehrend, A., König, P., & Kummer, W. (2009). Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow1. Biology of Reproduction, 81(2), 267–274. doi:10,1095/biolreprod.108.073874

88. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya,T. (2010). Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. Journal of Biological Chemistry, 285(23), 17442–17452. doi:10,1074/jbc.m110,107821

89. Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal- Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(8), E968–E977. doi:10,1073/pnas.1521230113

90. Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. Current Opinion in Cell Biology, 29, 116–125. doi:10,1016/j.ceb.2014.05.004

91. Kubisch, H. M., Larson, M. A., Ealy, A. D., Murphy, C. N., & Roberts, R.M. (2001). Genetic and environmental determinants of interferon-τ secretion by in vivo-and in vitro-derived bovine blastocysts. Animal reproduction science, 66(1-2), 1-13.

92. Kurian, N. K., & Modi, D. (2018). Extracellular vesicle mediated embryo- endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. doi:10,1007/s10815-018-1343-x

93. Kurosaka, S., Eckardt, S., & McLaughlin, K. J. (2004). Pluripotent Lineage Definition in Bovine Embryos by Oct4 Transcript Localization1. Biology of Reproduction, 71(5), 1578–1582. doi:10,1095/biolreprod.104.029322

94. 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. doi:10,1016/j.bbrc.2017.11.176

95. Lässer, C., Seyed Alikhani, V., Ekström, K., Eldh, M., Torregrosa Paredes, P., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötvall, J., Valadi, H.(2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. Journal of Translational Medicine, 9(1), 9. doi:10,1186/1479- 5876-9-9

96. Leal, C. L. V., Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y. N., Hamdi, M., Yaryes, A., Millán de la Blanca, M. G., ... & Rizos, D. (2022). Extracellular vesicles from oviductal and uterine fluids supplementation in sequential in vitro culture improves bovine embryo quality. Journal of Animal Science and Biotechnology, 13(1), 1-20

97. Lee, B., Saadeldin, I., & Oh, H. J. (2015). Embryonic–maternal cross-talk via exosomes: potential implications. Stem Cells and Cloning: Advances and Applications, 103. doi:10,2147/sccaa.s84991

98. Lee, H., Zhang, D., Zhu, Z., Dela Cruz, C. S., & Jin, Y. (2016). Epithelial cell-derived microvesicles activate macrophages and promote inflammation via microvesicle-containing microRNAs. Scientific Reports, 6(1). doi:10,1038/srep35250

99. Lee, K.-F., Yao, Y.-Q., Kwok, K.-L., Xu, J.-S., & Yeung, W. S. B. (2002). Early Developing Embryos Affect the Gene Expression Patterns in the Mouse Oviduct. Biochemical and Biophysical Research Communications, 292(2), 564– 570, doi:10,1006/bbrc.2002.6676

100. Lee, Y., EL Andaloussi, S., & Wood, M. J. A. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. Human Molecular Genetics, 21(R1), R125–R134. doi:10,1093/hmg/dds317

101. Lonergan, P. (2003). Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage In Vitro or In Vivo. Biology of Reproduction, 69(4), 1424–1431. doi:10,1095/biolreprod.103.018168

102. Lonergan, P., & Forde, N. (2014). Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. Animal, 8(s1), 64–69. doi:10,1017/s1751731114000470

103. Lopera-Vásquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., Calle, A., Redruello, A., López-Martín, S., Gutierrez-Adán, A., Yañez-Mó, M., Ramirez, A., Rizos, D. (2016). Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. PLOS ONE, 11(2), e0148083. doi:10,1371/journal.pone.0148083

104. Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Lloreda, V., Coy, P., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. Reproduction, Fertility and Development, 29(3), 621. doi:10,1071/rd15238

105. Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberr, 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), 26913.doi:10,3402/jev.v3.26913

106. 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 Exosomes1. Biology of Reproduction, 81(4), 717–729. doi:10,1095/biolreprod.108.075481

107. Maillo, V., 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 doi:10,1016/j.theriogenology.2016.04.060

108. Malo Estepa, I., Tinning, H., Rosas Vasconcelos, E. J., 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), 2870, doi:10,3390/ijms21082870

109. Mamo, S., Mehta, J. P., Forde, N., McGettigan, P., & Lonergan, P. (2012). Conceptus-Endometrium Crosstalk During Maternal Recognition of Pregnancy in Cattle1. Biology of Reproduction, 87(1). doi:10,1095/biolreprod.112.099945

110. Mansouri-Attia, N., Sandra, O., Aubert, J., Degrelle, S., Everts, R. E., Giraud-Delville, C., ... & Renard, J. P. (2009). Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(14), 5687-5692.

111. 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,

112. Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. Journal of Proteomics, 73(10), 1907–1920, doi:10,1016/j.jprot.2010,06.006

113. Mathivanan, S., Lim, J. W. E., Tauro, B. J., Ji, H., Moritz, R. L., & Simpson, R. J. (2009). Proteomics Analysis of A33 Immunoaffinity-purified Exosomes Released from the Human Colon Tumor Cell Line LIM1215 Reveals a Tissue-specific Protein Signature.
114. Molecular & Cellular Proteomics, 9(2), 197– 208. doi:10,1074/mcp.m900152-mcp200

115. Meerson, A., Traurig, M., Ossowski, V., Fleming, J. M., Mullins, M., & Baier, L. J. (2013). Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF-α. Diabetologia, 56(9), 1971-1979.

116. Mellisho, E. A., Velásquez, A. E., Nuñez, M. J., Cabezas, J. G., Cueto, J. A., Fader, C., Castro, C. O., Rodríguez-Álvarez, L. (2017). Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. PLOS ONE, 12(5), e0178306. doi:10,1371/journal.pone.0178306

117. Mellisho, E., Briones, M., Velásquez, A., Cabezas, J., Castro, F., & Rodríguez-Álvarez, L. (2019). Extracellular vesicles secreted during blastulation show viability of bovine embryos, Reproduction, 158(6), 477-492. doi.org/10,1530/REP-19-0233

118. Melo-Baez, B., Wong, Y. S., Aguilera, C. J., Cabezas, J., Mançanares, A. C., Riadi, G., ... & 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), 8888.

119. Meseguer, M., Pellicer, A., & Simon, C. (1998). MUC1 and endometrial receptivity. Molecular human reproduction, 4(12), 1089-1098.

120. Meyer, M. D., Hansen, P. J., Thatcher, W. W., Drost, M., Badinga, L., Roberts, R. M., ... & Bazer, F. W. (1995). Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F2α of cows in response to recombinant interferon-τ. Journal of dairy science, 78(9), 1921-1931.

121. Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., Bernard, A., Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen- presenting cells. Nature Communications, 2(1). doi:10,1038/ncomms1285

122. Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. Journal of Extracellular Vesicles, 3(1), 24641. doi:10,3402/jev.v3.24641

123. 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), e0158278. doi:10,1371/journal.pone.0158278

124. Neira, J. A., Tainturier, D., Peña, M. A., & Martal, J. (2010). Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-β1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. Theriogenology, 73(5), 595– 604. doi:10,1016/j.theriogenology.2009.10,015

125. 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), e58502. doi:10,1371/journal.pone.0058502

126. Niemann, H., Carnwath, J. W., Herrmann, D., Wieczorek, G., Lemme, E., Lucas-Hahn, A., & Olek, S. (2010). DNA Methylation Patterns Reflect Epigenetic Reprogramming in Bovine Embryos. Cellular Reprogramming, 12(1), 33–42. doi:10,1089/cell.2009.0063

127. Nothnick, W. B. (2022). MicroRNAs and Progesterone Receptor Signaling in Endometriosis Pathophysiology. Cells, 11(7), 1096.

128. Nowak-Imialek, M., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lagutina, I., Lemme, E., Lazzari, G., Galli, C., Niemann, H. (2008). Messenger RNA expression patterns of histone-associated genes in bovine preimplantation embryos derived from different origins. Molecular Reproduction and Development, 75(5), 731–743. doi:10,1002/mrd.20816

129. Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S. I., Yamaguchi, K.,

130. Mochizuki, T. (2010). Let-7 MicroRNA Family Is Selectively Secreted into the Extracellular Environment via Exosomes in a Metastatic Gastric Cancer Cell Line. PLoS ONE, 5(10), e13247. doi:10,1371/journal.pone.0013247

131. Okumu, L. A., Forde, N., Fahey, A. G., Fitzpatrick, E., Roche, J. F., Crowe, M. A., & Lonergan, P. (2010). The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. Reproduction, 140(1), 143-153.

132. Ortiz, M. E., Bedregal, P., Carvajal, M. I., & Croxatto, H. B. (1986). Fertilized and Unfertilized Ova are Transported at Different Rates by the Hamster Oviduct1. Biology of Reproduction, 34(4), 777–781. doi:10,1095/biolreprod34.4.777

133. Pan, B. T., TENG, K., WU, C., ADAM, M., y 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. doi:10,1083/jcb.101.3.942

134. Passaro, C., Tutt, D., Mathew, D. J., Sanchez, J. M., Browne, J. A., Boe- Hansen, G. B., … Lonergan, P. (2018). Blastocyst-induced changes in the bovine endometrial transcriptome. Reproduction, 156(3), 219–229. doi:10,1530/rep-18-0188

135. Pavani, K. C., Hendrix, A., Van Den Broeck, W., Couck, L., Szymanska, K., Lin, X., ... & Leemans, B. (2018). Isolation and characterization of functionally active extracellular vesicles from culture medium conditioned by bovine embryos in vitro. International journal of molecular sciences, 20(1), 38.

136. Peterson, A. & Lee, R. F. (2003). Improving successful pregnancies after embryo transfer. Theriogenology, 59(2), 687–697. doi:10,1016/s0093- 691x(02)01248-7

137. Qiao, F., Ge, H., Ma, X., Zhang, Y., Zuo, Z., Wang, M., ... & Wang, Y. (2018). Bovine uterus-derived exosomes improve developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos. Theriogenology, 114, 199-205.

138. Qu, P., Zhao, Y., Wang, R., Zhang, Y., Li, L., Fan, J., & Liu, E. (2018). Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth rates after embryo transfer in mice. Reproduction, Fertility and Development. doi:10,1071/rd18203

139. Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. The Journal of Cell Biology, 200(4), 373–383. doi:10,1083/jcb.201211138

140. Rashid, M. B., Talukder, A. K., Kusama, K., Haneda, S., Takedomi, T., Yoshino, H., Moriyasu, S., Matsui, M., Shimada, M., Imakawa, K., Miyamoto, A. (2018). Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. Biochemical and Biophysical Research Communications, 500(4), 879–884. doi:10,1016/j.bbrc.2018.04.178

141. Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1841(1), 108–120, doi:10,1016/j.bbalip.2013.10,004

142. Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de La Fuente, J., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences ofIn VitroCulture Conditions on Embryo Development and Quality. Reproduction in Domestic Animals, 43, 44–50, doi:10,1111/j.1439-0531.2008.01230,x

143. 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. doi:10,1016/j.theriogenology.2009.10,001

144. Ruiz-Gonzalez, I., Xu, J., Wang, X., Burghardt, R. C., Dunlap, K. A., & Bazer, F. W. (2014). Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes. Reproduction, 149(3), 281–291. doi:10,1530/rep-14-0538

145. Saadeldin, I. M., Kim, S. J., Choi, Y. B., & Lee, B. C. (2014). Improvement of Cloned Embryos Development by Co-Culturing with Parthenotes: A Possible Role of Exosomes/Microvesicles for Embryos Paracrine Communication. Cellular Reprogramming, 16(3), 223–234. doi:10,1089/cell.2014.0003

146. Sánchez, M. J., Simintiras, C. A., Lonergan, P. (2019) Aspects of embryo-maternal communication in establishment of pregnancy in cattle Anim. Reprod. 16(3), 376-385. Doi:10,21451/1984-3143-ar2019-0075

147. Schmaltz-Panneau, B., Cordova, A., Dhorne-Pollet, S., Hennequet-Antier, C., Uzbekova, S., Martinot, E., Doret, S., Martin, P., Mermillod, P., Locatelli, Y. (2014). Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. Animal Reproduction Science, 149(3-4), 103–116. doi:10,1016/j.anireprosci.2014.06.022

148. Schmaltz-Panneau, B., Locatelli, Y., Uzbekova, S., Perreau, C., & Mermillod, P. (2015). Bovine Oviduct Epithelial Cells Dedifferentiate Partly in Culture, While Maintaining their Ability to Improve Early Embryo Development Rate and Quality. Reproduction in Domestic Animals, 50(5), 719–729. doi:10,1111/rda.12556

149. Segura-Benítez, M., Carbajo-García, M. C., Corachán, A., Faus, A., Pellicer, A., & Ferrero, H. (2022). Proteomic analysis of extracellular vesicles secreted by primary human epithelial endometrial cells reveals key proteins related to embryo implantation. Reproductive Biology and Endocrinology, 20(1), 1-16.

150. Silva, M., Melo, A. S. (2015). Non-coding ARNs in Exosomes: New Players in Cancer Biology. Curr. Genomics. 16(5):295-303. doi: 10,2174/1389202916666150707154719.

151. 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, 115(11), 2770–2775. doi:10,1073/pnas.1718833115

152. Simmons, R. M., Erikson, D. W., Kim, J., Burghardt, R. C., Bazer, F. W., Johnson, G. A., & Spencer, T. E. (2009). Insulin-like growth factor binding protein-1 in the ruminant uterus: potential endometrial marker and regulator of conceptus elongation. Endocrinology, 150(9), 4295-4305.

153. Simon, B., Bolumar, D., Amadoz, A., Jimenez-Almazán, J., Valbuena, D., Vilella, F., & Moreno, I. (2020). Identification and characterization of extracellular vesicles and its DNA cargo secreted during murine embryo development. Genes, 11(2), 203.

154. Simpson, R. J., Jensen, S. S., & Lim, J. W. E. (2008). Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. PROTEOMICS, 8(19), 4083–4099. doi:10,1002/pmic.200800109

155. Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. (2004). A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. Theriogenology; 62:227–43.

156. Smith, L. C., Suzuki Jr, J., Goff, A. K., Filion, F., Therrien, J., Murphy, B. D., ... & Meirelles, F. V. (2012). Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. Reproduction in domestic animals, 47, 107-114.

157. Smits, K., De Coninck, D. I. M., Van Nieuwerburgh, F., Govaere, J., Van Poucke, M., Peelman, L., Deforce, D., Van Soom, A. (2016). The Equine Embryo Influences Immune-Related Gene Expression in the Oviduct1. Biology of Reproduction, 94(2). doi:10,1095/biolreprod.115.136432

158. 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), e78505. doi:10,1371/journal.pone.0078505

159. Spencer, T. E., & Hansen, T. R. (2015). Implantation and Establishment of Pregnancy in Ruminants. Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, 105–135. doi:10,1007/978-3-319-15856-3_7

160. 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. doi:10,1530/rep-07-0327

161. Sponchiado, M., Gomes, N. S., Fontes, P. K., Martins, T., del Collado, M., Pastore, A. de A., … Binelli, M. (2017). Pre-hatching embryo-dependent and - independent programming of endometrial function in cattle. PLOS ONE, 12(4), e0175954. doi:10,1371/journal.pone.0175954

162. Stojkovic, M., Büttner, M., Zakhartchenko, V., Riedl, J., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., ... & Wolf, E. (1999). Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. Animal reproduction science, 55(3-4), 151- 162.

163. Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. Journal of Lipid Research, 51(8), 2105–2120, doi:10,1194/jlr.m003657

164. Stojkovic, M., Büttner, M., Zakhartchenko, V., Riedl, J., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., ... & Wolf, E. (1999). Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. Animal reproduction science, 55(3-4), 151-162.

165. Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M.T., Obuse, C., Hara,E. (2017). Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. Nature Communications, 8, 15287. doi:10,1038/ncomms15287

166. Talukder, A. K., Rashid, M. B., Yousef, M. S., Kusama, K., Shimizu, T., Shimada, M., ... & Miyamoto, A. (2018). Oviduct epithelium induces interferon- tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. Scientific Reports, 8(1), 1-13.

167. Talukder, A. K., Rashid, M. B., Takedomi, T., Moriyasu, S., Imakawa, K., & Miyamoto, A. (2019). Day-7 embryos generate an anti-inflammatory immune response in peripheral blood immune cells in superovulated cows. American Journal of Reproductive Immunology, 81(2), e13069.

168. Talukder, A. K., Yousef, M. S., Rashid, M. B., Awai, K., Acosta, T. J., Shimizu, T., Miyamoto, A. (2017). Bovine embryo induces an anti-inflammatory response in uterine epithelial cells and immune cells in vitro: possible involvement of interferon tau as an intermediator. Journal of Reproduction and Development, 63(4), 425–434. doi:10,1262/jrd.2017-056

169. Taqi, M. O., Saeed-Zidane, M., Gebremedhn, S., Salilew-Wondim, D., Khdrawy, O., Rings, F., Neuhoff, C., Hoelker, M., Schellander, K., Tesfaye, D. (2019). Sexual dimorphic expression and release of transcription factors in bovine embryos exposed to oxidative stress. Molecular Reproduction and Development. doi:10,1002/mrd.23272

170. Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor- derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecologic Oncology, 110(1),

13–21. doi:10,1016/j.ygyno.2008.04.033

171. Taylor, D. D., Akyol, S., & Gercel-Taylor, C. (2006). Pregnancy- Associated Exosomes and Their Modulation of T Cell Signaling. The Journal of Immunology, 176(3), 1534–1542. doi:10,4049/jimmunol.176.3.1534

172. Tesfaye, D., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M., & Schellander, K. (2004). A Comparative Expression Analysis of Gene Transcripts in Post- fertilization Developmental Stages of Bovine Embryos Produced in Vitro or in Vivo. Reproduction in Domestic Animals, 39(6), 396–404. doi:10,1111/j.1439- 0531.2004.00531.x

173. Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., William, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova- Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H., Lyden, D. (2014). Double- stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. Cell Research, 24(6), 766–769. doi:10,1038/cr.2014.44

174. Thatcher, W. W., Meyer, M. D., & Danet-Desnoyers, G. (1995). Maternal recognition of pregnancy. Journal of Reproduction and Fertility-Supplements only, (49), 15-28.

175. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., … Atkin-Smith, G. 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, 8(1), 1535750, doi:10,1080/20013078.2018.1535750

176. Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. Science, 319(5867), 1244– 1247. doi:10,1126/science.1153124

177. Urrego, R., Rodriguez-Osorio, N., & Niemann, H. (2014). Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. Epigenetics, 9(6), 803–815. doi:10,4161/epi.28711

178. Valadão, L., Moreira da Silva, H., & Moreira da Silva, F. (2019). Bovine Embryonic Development to Implantation. Embryology - Theory and Practice. doi:10,5772/intechopen.80655

179. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nature Cell Biology, 9(6), 654– 659. doi:10,1038/ncb1596

180. 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. doi:10,1038/nrm.2017.125

181. 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.

182. Vázquez-Martínez, E. R., Bello-Alvarez, C., Hermenegildo-Molina, A. L., Solís-Paredes, M., Parra-Hernández, S., Cruz-Orozco, O., ... & Camacho- Arroyo, I. (2020). Expression of membrane progesterone receptors in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. BioMed Research International, 2020.

183. 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, 24(1), 18-30.

184. Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martinez, S., Marcilla, A., Simon, C. (2015). Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. Development, 142(18), 3210–3221. doi:10,1242/dev.124289

185. Waldenström, A., Gennebäck, N., Hellman, U., & Ronquist, G. (2012). Cardiomyocyte Microvesicles Contain DNA/RNA and Convey Biological Messages to Target Cells. PLoS ONE, 7(4), e34653. doi:10,1371/journal.pone.0034653

186. Wang, X., Tian, F., Chen, C., Feng, Y., Sheng, X., Guo, Y., & Ni, H. (2019). Exosome-derived uterine microRNAs isolated from cows with endometritis impede blastocyst development. Reproductive Biology, 19(2), 204– 209. doi:10,1016/j.repbio.2019.06.003

187. Weber, J. A., Freeman, D. A., Vanderwall, D. K., & Woods, G. L. (1991). Prostaglandin E2 Hastens Oviductal Transport of Equine Embryos1. Biology of Reproduction, 45(4), 544–546. doi:10,1095/biolreprod45.4.544

188. Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Gebert, C., Korsawe, K., Lemme, E., Carnwath, J. W., Niemann, H. (2005). Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 75(1), 1–9. doi:10,1002/bdrc.20035

189. 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(2), 23. doi:10,1071/rd04109

190. Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R., & Niemann, H. (2001). Nuclear Transfer Protocol Affects Messenger RNA Expression Patterns in Cloned Bovine Blastocysts. Biology of Reproduction, 65(1), 309–317. doi:10,1095/biolreprod65.1.309

191. Yang, Q., Fu, W., Wang, Y., Miao, K., Zhao, H., Wang, R., Gou, M., Wang, J. T., An, L. (2020). The proteome of IVF-induced aberrant embryo- maternal crosstalk by implantation stage in ewes. J Animal Sci Biotechnol 11, 7. doi: 10,1186/s40104-019-0405-y

192. Yuana, Y., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2013). Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. Blood Reviews, 27(1), 31–39. doi:10,1016/j.blre.2012.12.002

193. Zaitseva, I., Zaitsev, S., Alenina, N., Bader, M., & Krivokharchenko, A. (2007). Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. Molecular Reproduction and Development, 74(10), 1255–1261. doi:10,1002/mrd.20704

194. Zhou C, Dobrinsky J, Tsoi S, Foxcroft GR, Dixon WT, Stothard P, et al. Characterization of the Altered Gene Expression Profile in Early Porcine Embryos Generated from Parthenogenesis and Somatic Cell Chromatin Transfer. PLoS One [Internet]. 2014 Mar 14;9(3):e91728-. Available from: https://doi.org/10,1371/journal.pone.0091728