



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

“Definición del origen y potencial uso diagnóstico del ADN identificado en el medio de cultivo de embriones bovinos producidos *in vitro*”

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

DIEGO ANDRÉS CAAMAÑO ESCOBAR
CHILLÁN-CHILE
2025

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

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

Profesor Guía

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

Comisión Evaluadora:

Dr. Claudio Aguayo Tapia
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. María Elena Arias Cea
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Universidad de La Frontera

Director de Programa

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

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis fue producto del cariño, palabras de apoyo y consuelo de múltiples personas que de alguna u otra manera estuvieron involucradas en mi pronta formación científica, personal y hasta emocional.

Parto dándole gracias a la Dra. Rodríguez quién confió en mí para la ejecución de este proyecto, brindándome su total apoyo académico, al traspasar su conocimiento adquirido luego de años de profundo trabajo, además del amor por la laboriosa y precisa tarea que es la embriología. Además, agradecer a la Universidad de Concepción, la gloriosa alma mater que siempre llevaré con orgullo, con la cual desarrollé mi espíritu libre.

Darle gracias también al Dr. Castro, quién en tiempos de indecisión vocacional me inspiró a reencontrarme con la ciencia, aun cuando ya había perdido el camino.

Darles gracias a las personas que conocí durante todo el trayecto del doctorado, a personas con las que compartí todos estos duros años de mi vida. Personas con las cuales pasé horas enteras hablando, sufriendo y riendo en el laboratorio. A Lídice, con quien descubrí el caribe, al igual que Ioanna. A Joel, a quien aprendí a conocer acorde pasaba el tiempo, dándome cuenta que lo único rudo cercano a su corazón son sus poleras. A Yat y Constanza, que los incluyo ya juntos porque finalmente lo están, los que me apoyaron y creyeron en mí sobre todo en los últimos momentos de este proceso.

Finalmente darle las gracias a Dany, a la que amo profundamente desde lo más onírico a lo racional, quien conocí durante el desarrollo de esta tesis, presenciando todo este proceso desde cerca, soportando mis altibajos y siempre dándome su apoyo y profundo amor incondicional, el cual fue fundamental en muchas ocasiones para mantenerme en pie, estoico. Darle gracias a Kilian y Rayen, quienes sin emitir ninguna palabra de sus bocas, me hicieron sentir en familia y con un motivo constante de seguir estando acá, aunque no puedan leer esto, es para ustedes.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por: FONDECYT REGULAR 1210334 (Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico).

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| INDICE DE TABLAS | VI |
| INDICE DE FIGURAS | VII |
| RESUMEN..... | X |
| ABSTRACT..... | XII |
| I. INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1. VESÍCULAS EXTRACELULARES | 14 |
| 1.1 CLASIFICACIÓN DE LAS EVs..... | 15 |
| 1.2 FUNCIÓN DE LAS EVs..... | 19 |
| 1.3 PARTICIPACIÓN DE LAS EVs EN PROCESOS REPRODUCTIVOS..... | 22 |
| 2. USO DE EVs PARA DIAGNÓSTICO | 27 |
| 2.1. DIAGNÓSTICO GENÉTICO BASADO EN EVs | 29 |
| 2.2. EVs PARA DIAGNÓSTICO GENÉTICO EMBRIONARIO | 32 |
| 3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EVs..... | 36 |
| <i>Centrifugación diferencial o seriada</i> | 36 |
| <i>Gradiente de densidad</i> | 37 |
| <i>Aislamiento por microfiltración</i> | 37 |
| <i>Aislamiento por anticuerpos y perlas magnéticas</i> | 38 |
| <i>ExoQuick TM</i> | 38 |
| 4. CONCLUSIONES GENERALES DE LA REVISIÓN DE LA LITERATURA..... | 39 |
| II. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA | 40 |
| III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS | 43 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 44 |
| 1. DISEÑO EXPERIMENTAL | 44 |
| 2. MÉTODOS GENERALES..... | 47 |
| V. RESULTADOS | 57 |
| 1. RESULTADOS ASOCIADOS AL OBJETIVO ESPECÍFICO N.º 1 | 57 |
| <i>Comparación de 3 distintos protocolos para el aislamiento de vesículas extracelulares derivadas de embriones bovinos cultivados in vitro</i> | 57 |
| <i>Caracterización de EVs derivadas de medios de embriones Pre-implantatorios cultivados individualmente mediante los protocolos P2 y P3</i> | 60 |
| <i>Determinación de la presencia de ADN en vesículas extracelulares liberadas por embriones bovinos pre-implantatorios cultivados individualmente</i> | 63 |
| <i>Diagnóstico genético pre implantatorio mediante el uso de vesículas extracelulares liberadas por embriones bovinos producidos in vitro individualmente</i> | 66 |
| 2. RESULTADOS ASOCIADOS A LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS N.º 2 Y 3: | 72 |
| <i>Determinación de la tasa de apoptosis embrionaria</i> | 72 |
| <i>Caracterización de vesículas extracelulares para el análisis de ADN mediante espectrofotometría y NTA</i> | 74 |
| <i>Análisis de contenido de ADN al interior de vesículas extracelulares mediante espectrofotometría y NTA</i> | 75 |
| <i>Determinación de la correlación entre la tasa de apoptosis embrionaria y contenido de ADN al interior de vesículas extracelulares</i> | 78 |
| VI. DISCUSIÓN | 80 |
| VII. CONCLUSIONES | 84 |
| VIII. REFERENCIAS..... | 85 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Detalle de primers utilizados para PCR en tiempo real en EVs aisladas por gradiente de densidad en embriones bovinos pre implantatorios..... | 45 |
| Tabla 2. Detalle de primers utilizados para PCR en tiempo real en EVs aisladas por Amicon en embriones bovinos pre implantatorios..... | 46 |
| Tabla 3. Promedio y moda de tamaños de partículas (nm) y concentración (partículas/mL) para cada protocolo distinto, incluido el control negativo (Ctrl; PBS1x) de EVs derivadas de embriones bovinos pre-implantatorios cultivados individualmente..... | 58 |
| Tabla 4. Mediana del tamaño y concentración de distintas poblaciones de EVs secretadas por embriones producidos por fecundación in vitro y por partenogénesis durante la blastulación. EVs totales y EVs positivas a la tinción de ADN..... | 76 |

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Biogénesis de los exosomas. (Fuente: van Niel et al., 2018). 17
- Figura 2.** Biogénesis de las microvesículas (van Niel et al., 2018). 18
- Figura 3.** Proceso de formación de los cuerpos apoptóticos (Akers et al., 2013). 19
- Figura 4.** Esquema de liberación de ADN celular al espacio extracelular (extraído de Malkin y Bratman, 2020). 31
- Figura 5.** Diseño experimental para los objetivos específicos 2 y 3. Flechas azules corresponden al flujo de trabajo. 47
- Figura 6.** Imagen representativa del protocolo de ultracentrifugación acoplada a gradiente de densidad (Optiprep). Los porcentajes expuestos en la gráfica representan el porcentaje del polímero sintético iodixanol, el cual fue usado para generar distintas densidades. F0: Optiprep fracción 0 con menor densidad (entre 1,065 g/cm³ y 1,097 g/cm³); P2 F1: Optiprep con densidad similar a exosomas (entre 1,097 g/m³ y 1,150 g/cm³); P2 F2: Optiprep fase 2 con densidad similar a cuerpos apoptóticos (entre 1,150 g/cm³ y 1,255 g/cm³). 57
- Figura 7.** Gráfico de barras representando la concentración de partículas (Partículas/mL) de cada protocolo de aislamiento de EVs derivadas de embriones bovinos Pre-implantatorios cultivados individualmente; Ctrl: Control negativo (PBS1x); P1: Ultracentrifugación; P2 F0: Optiprep fracción 0 con menor densidad (entre 1,065 g/cm³ y 1,097 g/cm³); P2 F1: Optiprep con densidad similar a exosomas (entre 1,097 g/m³ y 1,150 g/cm³); P2 F2: Optiprep fase 2 con densidad similar a cuerpos apoptóticos (entre 1,150 g/cm³ y 1,255 g/cm³); P3: Ultrafiltración con filtro Amicon (100kDa, 500 µL). Letras distintas representan diferencias significativas entre los protocolos (p<0,05). 59
- Figura 8.** Gráfico de barras del tamaño promedio (nm) de partículas aisladas con cada protocolo a partir del medio de cultivo de embriones bovinos producidos *in vitro* y cultivados de forma individual desde mórula hasta estadio de blastocisto. P1: Ultracentrifugación; P2 F0: Optiprep fracción 0 con menor densidad (entre 1,065 g/cm³ y 1,097 g/cm³); P2 F1: Optiprep con densidad similar a exosomas (entre 1,097 g/m³ y 1,150 g/cm³); P2 F2: Optiprep fase 2 con densidad similar a cuerpos apoptóticos (entre 1,150 g/cm³ y 1,255 g/cm³); P3: ultrafiltración con filtro Amicon (100 kDa, 500 µL). Letras distintas representan diferencias significativas entre los protocolos, utilizando la prueba post hoc de Dunn (p<0,05). 60
- Figura 9.** Caracterización de las EVs derivadas de embriones bovinos aisladas por Optiprep (P2, F1). a) Concentración, tamaño y distribución promedio de las nanopartículas (EVs). b) Caracterización morfológica por microscopia electrónica de transmisión, visualizando una forma típica correspondiente a vesículas extracelulares. En azul se observan dos vesículas separadas y en rojo una EV aumentando la magnitud óptica. c) Western blot de EVs aisladas desde el medio de cultivo de embriones bovinos mostrando la identificación de marcadores de EVs como CD9 (arriba) y ALIX (Abajo). A la izquierda se observa el patrón de peso molecular (Ladder). 61

Figura 10. Caracterización de EVs aisladas mediante el P3. (A) Microscopía electrónica de transmisión. En la parte superior se muestran las EVs en aumento menor, señaladas por flechas azules, que luego fueron magnificadas en la imagen inferior. (B) Análisis de proteína mediante Western Blot (Alix, CD9 y TSG101) con sus respectivos pesos moleculares. 1: Peso molecular (Ladder), 2: EVs aisladas mediante P3 desde embriones bovinos, 3: Control positivo (EVs aisladas desde sobrenadante de cultivo de fibroblastos equinos). (C) Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), mostrando la distribución del promedio de 3 réplicas técnicas. El área de la curva de color rojo representa el error estándar de las réplicas. 62

Figura 11. Análisis de ADN mediante sistema Bioanalyzer TapeStation correspondiente a las fracciones F1 y F2 del protocolo P2. En la primera imagen (izquierda) se muestran las concentraciones de ADN para cada una de las muestras (Eje X: Ladder, tamaño en bp; pares de bases) mientras que en la siguiente imagen (derecha) se ve el histograma de tamaños para cada una de las muestras (Eje Y: Intensidad de fluorescencia, eje X: tamaño de las muestras en pares de bases; bp). 63

Figura 12. Detección de ADN mediante citometría de flujo de EVs teñidas con yoduro de propidio (PI) a través del acoplamiento con beads de látex. a) Citometría de flujo de beads de látex sin tinción con PI y sin EVs. b) EVs acopladas a beads sin tinción con PI. c) Muestra de EVs acopladas a beads de látex tratadas con tinción de PI por 30 min. 64

Figura 13. Gráfico de dispersión de un análisis de seguimiento de nanopartículas de vesículas extracelulares derivadas de embriones bovinos. a) El primer gráfico representa la disminución de partículas al ser teñidas para la detección de ADN, con yoduro de propidio, además del claro aumento de tamaño (>400nm; flecha roja), en comparación con b) las partículas que no fueron teñidas con la fluorescencia, que presentaron una distribución normal en cuanto a concentración y tamaño. 65

Figura 14. Gel de agarosa al 2% en el cual se observa el producto de la amplificación del gen SAT1 (123 bp) en cada muestra de EVs de 11 embriones las cuales fueron tratadas (+ADNase) o no con ADNasa I (-ADNase). NTC: Control negativo sin templado. 66

Figura 15. Geles de agarosa al 2% en los cuales se visualiza la amplificación mediante PCR de los genes: a) SRY (232 pb) en EVs (abajo) y sus respectivos embriones (arriba), además de los genes; b) MCM4 (101 pb) y c) CSN3 (240 pb) solo en EVs. CTL: Control positivo (ADN de ovario bovino). NTC: Control negativo sin templado. M: Control positivo de macho (ADN de testículos bovinos) y H: Control positivo de hembra (ADN de ovario bovino). 67

Figura 16. Umbral de amplificación (Ct) y positividad de acuerdo a la temperatura de melting (A,C) y curva de disociación (B,D) de los genes IL17RC (arriba) y RREB (abajo) en 29 muestras de EVs obtenidas desde medios de cultivo individuales de embriones bovinos pre implantatorios. 70

Figura 17. Umbrales de corte (Cts) y su positividad (A) mediante la comparación con la curva de disociación del control positivo (B) del gen ADAM12 en 29 muestras de EVs derivadas de

medios de embriones bovinos cultivados individualmente. La flecha roja esquematiza la discordancia entre una de las muestras y el control positivo. La flecha azul apunta hacia la concordancia entre el control positivo y 7 muestras de EVs. 71

Figura 18. Umbral de ciclo (Ct) y la correspondiente positividad al compararse las muestras con el control positivo, en términos de temperatura de melting (A) y la respectiva curva de disociación (B) del gen USP9Y en 29 muestras de EVs obtenidas a partir de cultivo individual de embriones bovinos pre implantatorios. La flecha roja indica la diferencia de curvas entre una muestra y el control positivo, mientras que la flecha azul apunta hacia las 3 muestras de EVs positivas en conjunto con el control positivo. 72

Figura 19. Imagen representativa de embriones bovinos con 7 días de desarrollo marcados con tinción final de corte de dUTP Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL), evidenciando células embrionarias en apoptosis. IVF: embriones fecundados *in vitro* (A-C), P: Embriones partenogénéticos (D-F). (A,D,G) Tinción Hoechst. (B,E,H) Tinción TUNEL. (C,F,I) Combinación (Merge) de la tinción TUNEL y Hoechst. Control positivo con ADNasa I (H,I). Las barras de color blanco representan 400 μm de tamaño. 73

Figura 20. Gráfico de barras esquematizando la tasa de apoptosis embrionaria de los 4 diferentes grupos: P: Mórulas y blastocistos producidos por partenogénesis, e IVF: mórulas y blastocistos producidos por fecundación *in vitro*. Letras distintas representan diferencias significativas entre los grupos, utilizando la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$). 74

Figura 21. (A,B) Las imágenes superiores corresponden a EVs aisladas desde medios de cultivo de embriones producidos por partenogénesis (izquierda) e IVF (derecha), en un aumento menor, donde son apuntadas con flechas y magnificadas en las imágenes inferiores. (C) Western Blot de marcadores proteicos de EVs (ALIX, CD9 y TSG101) y de pureza (ausencia de APOA1), en ambos tipos de producción de embriones; P: Partenogénesis y IVF: Fecundación *in vitro*. 75

Figura 22. Tamaño, distribución y concentración de EVs liberadas por embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro* y por partenogénesis sin tinción de ADN (A) y con tinción de ADN (B). El gráfico representa el promedio de 3 replicas técnicas, basadas en el diámetro y distribución de la concentración de las nanopartículas. 76

Figura 23. Gráfico de barras del promedio de concentración de ADN ($\text{pg}/\mu\text{L}$) en embriones de 4 diferentes grupos: P: Mórulas y blastocistos producidos por partenogénesis, e IVF: mórulas y blastocistos producidos por IVF. Letras distintas representan diferencias significativas entre los grupos, utilizando la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$). 77

Figura 24. Matriz de correlación de Spearman con todas las variables estudiadas desde los experimentos de embriones bovinos independiente del tipo de producción. El gráfico muestra una relación positiva o negativa entre las variables. Círculos azules representan una correlación positiva, mientras que los círculos rojos representan correlaciones negativas. Para cada intersección el coeficiente de correlación (r) y el valor de p fueron incluidos en los recuadros correspondientes. 79

RESUMEN

El término vesícula extracelular (EVs) se refiere a cualquier tipo de nanopartícula rodeada por una bicapa lipídica. Estas vesículas son incapaces de replicarse debido a la ausencia de núcleo y son liberadas por todas las células. Las EVs son clasificadas según distintos criterios, como el tamaño, el órgano de origen o su biogénesis. Dependiendo de su proceso de formación, las células liberan tres tipos principales de EVs: exosomas, que derivan de cuerpos multivesiculares; microvesículas, que se generan por evaginación de la membrana plasmática; y cuerpos apoptóticos, que se producen durante la apoptosis. Las EVs desempeñan un papel crucial en la comunicación intercelular, determinado por su contenido molecular. Estas vesículas pueden transportar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Este mensaje es protegido al interior de las EVs y es transferido a otra célula, modificando su función, participando en diversos procesos fisiopatológicos, incluidos trastornos neurodegenerativos, inmunológicos, vasculares, así como en el cáncer. Además, las EVs contribuyen a procesos biológicos normales, como la proliferación celular, la diferenciación celular y el desarrollo embrionario. Además, las EVs han estado implicadas en la diferenciación de ovocitos y espermatozoides, la maduración ovocitaria, la fertilización y la implantación embrionaria.

Los embriones preimplantatorios, al igual que otras células, pueden liberar EVs. Estas EVs embrionarias contienen cargo y participan en el diálogo materno-embionario. Las características de las EVs, como su tamaño, concentración o contenido, varían en función de la competencia, calidad o estadio de desarrollo del embrión. Se ha identificado gDNA embrionario en medios de cultivo como herramienta para el diagnóstico genético, aunque su concordancia con el ADN embrionario ha mostrado una concordancia solo del 30-90%. Esta discordancia puede explicarse por la presencia de contaminantes de ADN derivados de células del cúmulo, espermatozoides y/o proteínas del medio de cultivo. Se ha reportado la presencia de gDNA y mtDNA en el interior de EVs liberadas por embriones humanos, murinos y porcinos, lo que sugiere un posible uso de estas vesículas como herramienta para la genotipificación embrionaria. Por esta razón, el objetivo general de este estudio fue determinar la presencia de gDNA dentro de EVs liberadas por embriones bovinos Pre-implantatorios y su potencial uso para el diagnóstico genético.

Para ello, se produjeron embriones bovinos mediante fertilización *in vitro* o partenogénesis (según el experimento específico) y cultivados en grupos hasta el día 5 (estadio de mórula). Posteriormente, las mórulas fueron cultivadas individualmente hasta el día 7 (estadio de blastocisto), momento en el cual fueron recolectadas junto con su medio de cultivo correspondiente. El medio condicionado fue utilizado para la obtención de EVs mediante tres protocolos diferentes de aislamiento con el fin de evaluar la eficiencia de cada método. Las EVs aisladas fueron caracterizadas mediante análisis de seguimiento de nanopartículas, microscopía electrónica de transmisión y Western blot para la detección de proteínas específicas. La presencia de ADN fue determinada mediante múltiples técnicas, y la genotipificación embrionaria se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real. Además, algunas muestras fueron secuenciadas y analizadas para evaluar la representación génica. Finalmente, se determinó la tasa de apoptosis y la concentración total de ADN mediante espectrofotometría y análisis por NTA para evaluar la correlación entre ambas variables.

No se encontraron diferencias significativas entre los tres protocolos de aislamiento en cuanto a las características poblacionales de las EVs, aunque sí en el tiempo requerido. Se logró detectar la presencia de ADN en el interior de las EVs mediante distintas técnicas, confirmando su existencia. El análisis de secuenciación reveló la presencia de 5,664 genes, incluyendo algunos involucrados en el desarrollo embrionario. El análisis por PCR confirmó la presencia e identificación de múltiples genes, incluyendo genes ligados al sexo (SRY y USP9Y). Todos los embriones presentaron al menos una célula en apoptosis. Las mórulas bloqueadas mostraron una mayor tasa de apoptosis, y los embriones derivados de partenogénesis presentaron una mayor concentración de ADN. No se encontró correlación entre la tasa de apoptosis y la concentración de ADN en las EVs.

Los resultados confirman que los embriones bovinos preimplantacionales liberan EVs que contienen ADN en su interior, independientemente de su calidad. Además, se demostró que este ADN puede utilizarse para la genotipificación embrionaria mediante PCR en tiempo real, aunque con ciertas limitaciones en función de la cantidad de ADN disponible. Finalmente, se determinó que la concentración de ADN en las EVs es independiente de la tasa de apoptosis embrionaria y la cantidad detectada y genes identificado puede variar según la competencia o calidad del embrión.

ABSTRACT

The term extracellular vesicle refers to any type of nanoparticle surrounded by a lipid bilayer. They cannot replicate itself due to the lack of nucleus and are released by all cells. These vesicles are classified according to multiple criteria, such as, size, origin organ and biogenesis. Depending on their formation process, cells release three types of EVs: exosomes, derived from multivesicular bodies; microvesicles, formed by plasma membrane evagination; and apoptotic bodies, produced during apoptosis. EVs play a crucial role in intercellular communication, largely depending on their cargo. The EVs can carry proteins, lipids, and nucleic acids. The message protected by these vesicles is loaded to another cell and it is capable to change their function, participating in several pathological processes, including neurodegenerative, immune, and vascular diseases, as well as cancer. Additionally, they contribute to normal biological processes, including cell proliferation, cell differentiation and embryo development. Besides, EVs participate in oocyte/sperm differentiation, oocyte maturation, fertilization, and embryo implantation.

Pre-implantation embryos, likewise other cells, can release EVs. These embryo-derived EVs also can contain cargo and are implicate in the embryo-maternal crosstalk. The EVs characteristics, such a size, concentration, or content, vary according to embryo competence, quality, or stage of development. Embryo gDNA has been used to genetic diagnosis, found in culture media, but their concordance with the embryo DNA is only of 30-90%. This discordance can be explained for the presence of DNA contaminants, derivative of cumulus cell, sperm and/or DNA from culture media proteins. It has been found gDNA and mtDNA inside of EVs released by human, murine, and porcine embryos, suggesting a potential tool to embryo genotyping. This is why, the general aim of this study was determinate the presence of gDNA inside of EVs released by pre implantation bovine embryos and their potential to genetic diagnosis.

To do this, bovine embryos were produced by *in vitro* fertilization or parthenogenesis (according to the specific experiment) on groups until day 5 (morula stage). After that, morula were transferred to individual culture until day 7 (blastocyst stage), and they were collected with their respective media. The conditioned media was used to the EVs isolation by, initially, three different types of isolation to determinate the EVs efficiency. The isolated EVs were characterized using nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy, and Western blotting for EV-specific proteins. The DNA presence was measure using multiple techniques and the embryo

genetic testing was performed by real time PCR. Also, a few samples were sequencing and analyzed to evaluate all the genes representation. Finally, it was conducted the determination of the apoptotic rate and the total DNA concentration using spectrophotometers and NTA analysis to determinate the correlation between them.

There is not a huge different between the three isolation protocols in terms of EVs characteristics population, only in the time of whole process of the samples. We were capable to measure the DNA inside of EVs with different techniques, ensuring their presence. The sequencing analysis showed the presence of 5.664 genes, including genes involved on embryo development. The PCR analysis validate the presence and gene identification in the EVs, in many different genes, even in the sex-linked genes (SRY and USP9Y). All the embryos had almost one cell on apoptosis. The arrested morulae had a higher apoptotic rate and there was produced by parthenogenesis the higher DNA concentration. The apoptotic rate showed no correlation with the DNA concentration in the EVs.

Our results confirm that pre implantation bovine embryos can releases EVs with DNA inside them independent of their quality. Furthermore, we demonstrate this DNA can be used to embryo genotyping by a simple real time PCR, with certain limitation according to their quantity. Finally, we found the DNA concentration was independent of the apoptotic rate and can vary according to the embryo competence or quality.

I. INTRODUCCIÓN

1. Vesículas extracelulares

El término vesícula extracelular (EVs, por su nombre en inglés) se utiliza para referirse a una variedad heterogénea de partículas de pequeño tamaño que son secretadas por las células bajo condiciones fisiológicas o patológicas. Estas tienen como característica en común que están delimitadas por una bicapa lipídica y son incapaces de replicarse ya que no poseen un núcleo (Théry et al., 2018). Los primeros reportes sobre vesículas extracelulares fueron publicados en 1981, correspondientes a un estudio analítico sobre líneas celulares normales y neoplásicas. En este estudio se demostró la existencia de nanopartículas de 40 nm de diámetro que eran liberadas constitutivamente por las células y que poseían actividad 5'-nucleotidasa y ATPasa (Trams et al., 1981). Posteriormente en 1983, se describieron a las EVs en una investigación relacionada con el cáncer, en específico, un tipo de melanoma murino (Taylor et al., 1983). En esta investigación, describían a las vesículas como “fragmentos de membrana”, los que fueron aislados a través de ultracentrifugación y cromatografía (Taylor et al., 1983). El término “Exosoma” fue posteriormente ocupado en vesículas de entre 40-100 nm liberadas durante la diferenciación de los reticulocitos, lo cual ocurría a través de la fusión de los endosomas multivesiculares con la membrana plasmática (C. Harding et al., 1984; Pan et al., 1985). Alrededor de los 90's, se identificaron exosomas liberados por linfocitos B y células dendríticas, de manera similar que en los reticulocitos, actuando como vehículo de desechos celulares según sus autores (Raposo et al., 1996; Zitvogel et al., 1998).

Actualmente se ha demostrado que las EVs son secretadas por células de diferentes tejidos y órganos, y pueden ser encontradas en casi todos los fluidos biológicos, tales como sangre (Caby et al., 2005), orina (Pisitkun et al., 2004), saliva (Ogawa et al., 2011), leche (Admyre et al., 2007), fluido amniótico (Asea et al., 2008), fluido ascítico (Mittra et al., 2021), fluido cerebro espinal (Vella et al., 2008), bilis (Masyuk et al., 2010), fluido endometrial (C. Liu et al., 2020) y semen (K. G. Ronquist et al., 2013). Adicionalmente se ha demostrado que las células y embriones cultivados *in vitro*, también liberan vesículas extracelulares y estas pueden ser aisladas a partir del medio de cultivo (Abramowicz et al., 2019; Saadeldin et al., 2014a).

Durante los últimos años se han incrementado significativamente los estudios relacionados con vesículas extracelulares pudiendo identificar casi 30 mil reportes en pubmed

(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=extracellular+vesicles+>). Estos estudios se enfocan en la caracterización de estas vesículas, identificación de su origen y función biológica. Como consenso, se plantea que las EVs representan un mecanismo de comunicación celular participando en diversos procesos biológicos. En este sentido, la identificación y caracterización de las EVs permite comprender e identificar las señales que están involucradas en el control de dichos procesos y su efecto sobre el entorno. Adicionalmente, la función de las EVs se ha relacionado con la capacidad de inducir cambios en las células receptoras, a través del cargo molecular que estas posean. Este cargo de las EVs varía en relación con el origen y estatus celular lo cual las ha convertido en un interesante marcador para diagnóstico.

El presente documento describe las características generales y función de las vesículas extracelulares enfocando la lectura a los eventos reproductivos en mamíferos. Finalmente se enfocará en las EVs secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios y su uso para diagnóstico embrionario.

1.1 Clasificación de las EVs

La nomenclatura de las vesículas extracelulares ha evolucionado en función de su origen celular, sistema biológico, función, entre otras características. Sin embargo, esta nomenclatura no consensuada no permitía comparaciones entre experimentos o definiciones concretas de la función biológica. En este sentido la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) elaboró una guía de criterios básicos para establecer un consenso con respecto a su nomenclatura y clasificación. Hasta la fecha la ISEV ha publicado dos guías para la clasificación de vesículas extracelulares (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018). La última clasificación establece subtipos de EVs, dependiendo de 1) características físicas, como tamaño (“small vesicles”; <100nm o <200nm y “large/médium vesicles” >200nm, 2) composición bioquímica (CD63+/CD81+- EVs, Annexin A5-stained EVs, etc.) y 3) descripción de una condición o célula de origen (podocito EVs, EVs hipóxica, cuerpo apoptótico, etc.) (Théry et al., 2018). La nomenclatura más utilizada referida a exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos está basada en la biogénesis de estas vesículas (Abels y Breakefield, 2016).

Los exosomas (Exos) poseen una bicapa lipídica al igual que el resto de las EVs, obtenida desde la membrana plasmática celular a través de la vía clásica endocítica (Anand et al., 2019).

Este proceso de formación del exosoma comienza cuando una pequeña porción de la membrana plasmática se invagina hacia el espacio intracelular, produciendo lo que se denomina “endosoma”. El endosoma temprano se origina en zonas de la membrana plasmática que presentan abundancia de clatrina, una proteína que se relaciona directamente con la formación de vesículas intracelulares desde la membrana plasmática, el aparato de Golgi y endosomas tempranos y tardíos (Lakadamyali et al., 2006). Además, esta proteína está ligada con otras denominadas proteínas adaptadoras (AP; adaptor protein), las que en conjunto crean un sitio selectivo en la membrana para su posterior gemación. Existen diferentes AP, tales como AP-2, AP-1A, Ap-3A y AP-4 (Ohno, 2006). Luego de localizar el lugar de la membrana la cual será invaginada, una GTPasa rodea el cuello de la vesícula que se formará, ayudando a que se fusione la membrana para separar la porción desde la membrana plasmática culminando en la formación del endosoma (Muralidharan-Chari et al., 2009). Luego, pequeñas porciones de la membrana de este endosoma se invaginan nuevamente, en múltiples zonas, formando en su interior vesículas de menor tamaño denominadas “vesículas intraluminales” (ILV). Para la formación de las ILVs, primero, las proteínas endosomales son reorganizadas con alta abundancia de proteínas de membrana, tales como CD9, CD63 y CD81 (Tetraspaninas comúnmente ocupadas como marcadores de Exos)(Akers et al., 2013). Luego, es usada la maquinaria molecular del ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), la cual incluye ESCRT 0, I, II y III (Tamai et al., 2010). El proceso comienza con la unión de ESCRT-0 con PI3P (fosfatidilinositol 3-fosfato), seguido del reclutamiento de ESCRT-I hacia la membrana del endosoma, formando el complejo ESCRT-0/I. Después, ESCRT-I recluta a ESCRT-II, oligomerizando al complejo ESCRT-III. ESCRT-I y II comienzan a invaginar la membrana del endosoma formando las vesículas intraluminales en el interior (Colombo et al., 2014). Otras proteínas están involucradas, como Alix y TSG101, familia de las ESCRT (Proteínas que también son ocupadas como marcadores) (Théry et al., 2018). Si bien esta es la vía de formación de las ILVs más aceptada, también se ha descrito que existen otras vías independientes de ESCRT (Van Niel et al., 2018)(Figura 1).

El endosoma que contiene ILVs es denominado cuerpo multivesicular (MVB), el cual cuando se fusiona con la membrana plasmática de la célula libera las ILVs hacia el espacio extracelular (Keller et al., 2006). Estas vesículas liberadas a partir del MVB reciben el nombre de exosomas. Además de la fusión de los MVB con la membrana plasmática, estos pueden sufrir otro destino

hacia la degradación lisosomal (Kalra et al., 2016). Si bien no está claro el mecanismo de definición del destino de los MVB se considera la participación de las proteínas RAB27A, RAB27B y RAB11 (Hsu et al., 2010; Ostrowski et al., 2010). Sin embargo, el mecanismo de formación dentro de la célula está mejor estudiado (Abels y Breakefield, 2016).

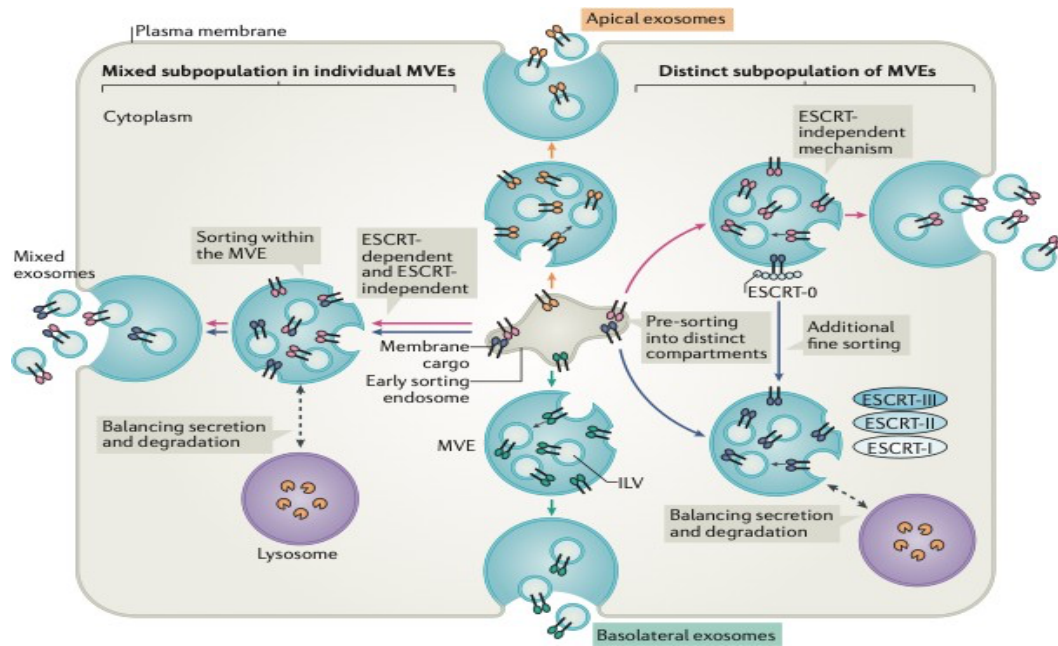


Figura 1. Biogénesis de los exosomas. (Fuente: van Niel et al., 2018).

A diferencia de los exosomas, las microvesículas (MVs) se originan directamente desde la membrana plasmática. La biogénesis de las microvesículas comienza con la activación de la célula en respuesta a factores de crecimiento o citoquinas (Bucki et al., 1998). Las dos fases esenciales para la formación de las microvesículas son 1) el aumento de la concentración de Ca^{2+} y 2) la reformación del citoesqueleto, ya que lo que hace que la membrana se protruya desde la superficie celular es el desequilibrio que produce el ión calcio sobre los fosfolípidos, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina de la membrana plasmática, externalizando la fosfatidilserina (Pasquet et al., 1996). Todo este desequilibrio en la membrana plasmática estructuralmente produce que el citoesqueleto la excrete al espacio extracelular. Un posible mecanismo de regulación de las microvesículas, al igual que en los exosomas, es una pequeña GTPasa (RhoA), y otras proteínas como ARF6 (Anand et al., 2019), como se muestra en la figura 2.

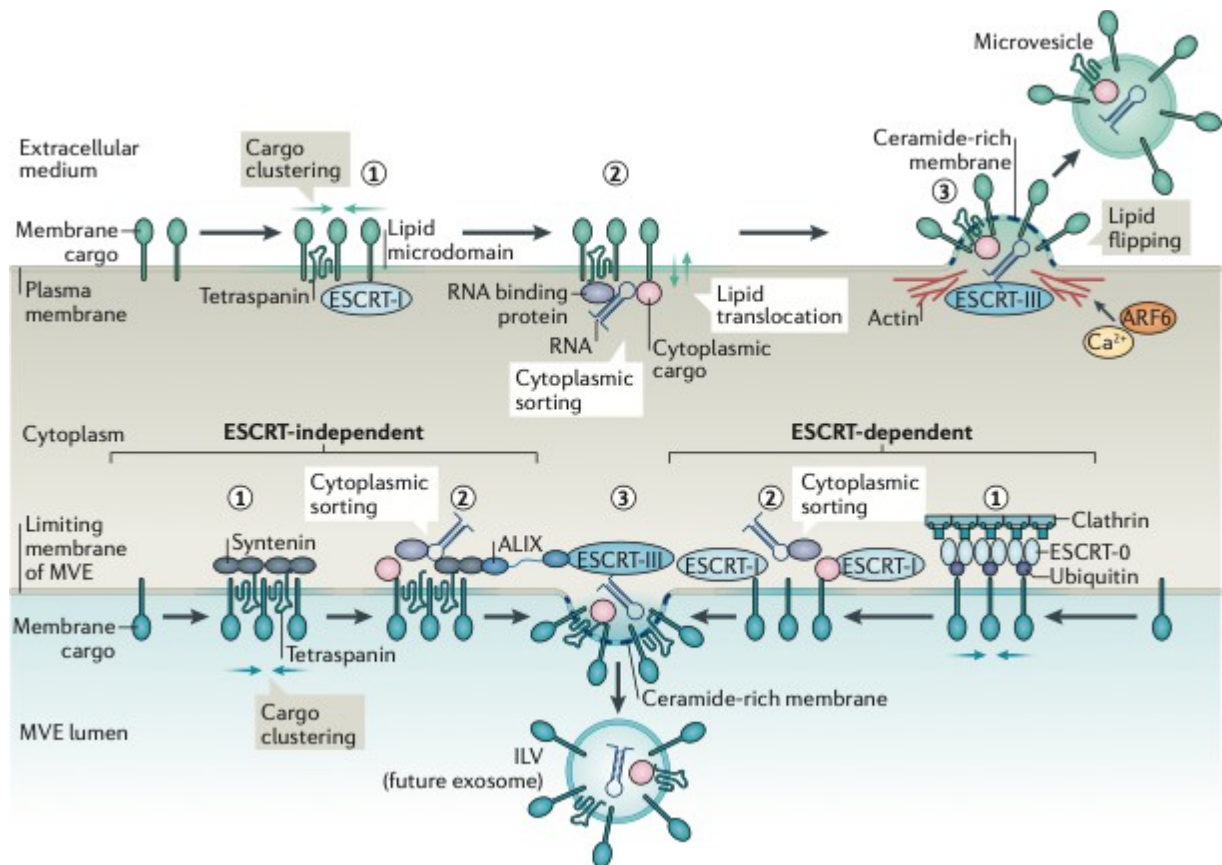


Figura 2. Biogénesis de las microvesículas (van Niel et al., 2018).

Los cuerpos apoptóticos son incluidos dentro de la clasificación de EVs, pero hasta mi entendimiento no hay muchos estudios sobre análisis de estas vesículas y sus funciones con respecto a comunicación hacia otras células. Los cuerpos apoptóticos son generados como consecuencia de la activación de la ruta apoptótica en la célula. La presencia de cuerpos apoptóticos en el espacio extracelular está asociada con muerte celular a diferencia de los Exos y MVs que son secretadas tanto por células “sanas” o con alguna condición patológica.

El mecanismo apoptótico involucra la fragmentación del núcleo y de todos los componentes celulares siendo englobados en vesículas (ABs), evitando el daño de células vecinas (Anand et al., 2019; Atkin-Smith et al., 2015; Caruso & Poon, 2018). Los ABs son producidos por la fragmentación de la membrana plasmática, lo que posiblemente estaría mediado por la maquinaria celular actina- miosina (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). Por su origen, los ABs se caracterizan por tener marcadores de membrana de la célula de origen (anexina V) y en su contenido se puede identificar fragmentos de cromatina (Caruso & Poon, 2018).

Las poblaciones de ABs son más heterogéneas, ya que a pesar de tener en promedio un tamaño de >500nm, hay otros ABs que poseen menor tamaño, llegándose a solapar con otras vesículas (Exos y MVs) (Hristov et al., 2004; Ihara et al., 1998).

Durante el proceso apoptótico, la mayoría de los ABs son fagocitados por los macrófagos (Elmore, 2007), como se muestra en la figura 3. Este proceso es mediado por interacciones específicas entre el reconocimiento de receptores en las células fagocíticas y en cambios específicos de la composición de la membrana de las células apoptóticas (Takizawa et al., 1996). Estos cambios en la membrana de los ABs corresponden a 1) la translocación de la fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana, lo cual en células vivas se encuentra al interior de la membrana. Esta translocación está unida a la Anexina V, la cual es reconocida por macrófagos (Fadok et al., 1998) y 2) la oxidación de moléculas de la superficie de la membrana, las cuales crean sitios de unión a la trombospondina o proteínas del complemento (C3b) (Takizawa et al., 1996), como se indica en la figura 3.

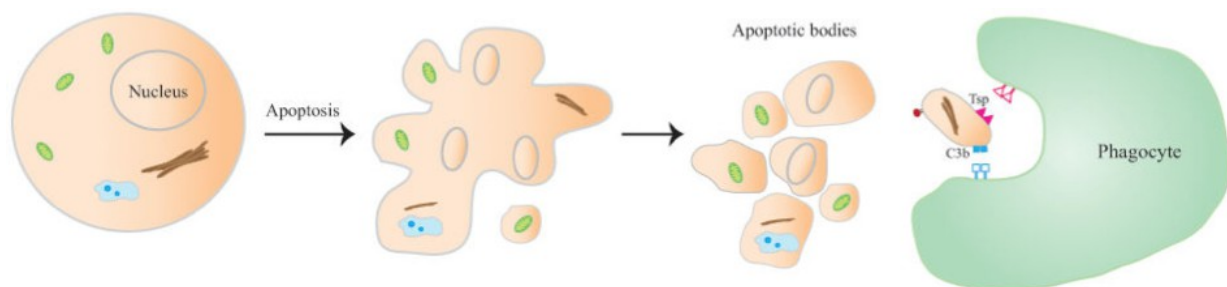


Figura 3. Proceso de formación de los cuerpos apoptóticos (Akers et al., 2013).

1.2 Función de las EVs

Se ha descrito la participación de las EVs en diversos procesos y funciones celulares, que van desde la eliminación de moléculas ya obsoletas (C. V. Harding et al., 2013). hasta el rol que cumplen como presentadoras de antígeno en la respuesta inmune (Bobrie et al., 2011; Iraci et al., 2016), aunque el rol más relevante que se les atribuye es su participación en la comunicación intercelular. Durante la biogénesis, las EVs son cargadas con diferentes moléculas incluyendo lípidos, proteínas, mRNAs, microRNAs y ADN (Anand et al., 2019).

Según mi entendimiento, la composición de las EVs comienza con los estudios de Thery et al., (1999), los que realizaron análisis proteómicos sobre el contenido de las EVs derivadas de células dendríticas. Los autores confirmaron la existencia de proteínas citosólicas incluyendo Annexina II, proteínas heat shock y proteína G heteromérica Gi2a, en el lumen exosomal. Además, otros grupos empezaron a caracterizar también el contenido de las EVs luego de este estudio.

El contenido de las EVs varía según el tipo de vesícula, la célula secretora y la condición fisiológica en la que esta célula se encuentre (Abels y Breakefield, 2016). En cuanto al contenido proteico que es encontrado en las EVs comúnmente se asocia al mecanismo de biogénesis, incluyendo proteínas de la vía endosomal. Los Exos, son ricos en proteínas de la maquinaria ESCRT, tales como ALIX, TSG101 y proteínas responsables de la formación de las vesículas y su liberación, tales como RAB27A, RAB11B y ARF6 (Van Niel et al., 2018). Además, contienen proteínas transmembrana como tetraspaninas CD63, CD81 y CD9, proteínas involucradas en la transducción de señales (EGFR), proteínas involucradas en la presentación de antígenos (MHCI y MHCII) y LAMP1 y TFR (Théry et al., 2001). Si bien, en general, proteínas nucleares no son encontradas en EVs (Théry et al., 2001), ciertos factores de transcripción sí son encontrados en el lumen de EVs, tales como Notch, Wnt, los que son normalmente encontrados en el núcleo (Kalra et al., 2012).

Además del contenido proteico una amplia variedad de lípidos han sido encontrados en Evs (Carayon et al., 2011; Llorente et al., 2013; van Blitterswijk et al., 1982). En general, las EVs son ricas en esfingomielina, colesterol, gangliósido GM3, lípidos desaturados, fosfatidilserina y ceramida, siendo estos lípidos encontrados en la membrana vesicular (Llorente et al., 2013)(Llorente et al., 2013). Otros lípidos de membrana como fosfatidilcolina y diacilglicerol depende de la composición de la membrana plasmática de la célula de origen, aunque se presentan en menor cantidad (Laulagnier et al., 2004). Si bien la mayoría de los lípidos de EVs son encontrados en la membrana vesicular, ciertas vesículas contienen lípidos como cargo, las que son excluidas por los métodos de aislamiento (Wei et al., 2021).

Las EVs también son ricas en ácidos nucleicos, pudiendo identificar RNAm, pequeños RNAs y ADN mitocondrial y genómico (Balaj et al., 2011; Guescini et al., 2010; Waldenström et al., 2012). De esta forma se ha identificado microRNAs, snoRNAs, derivados desde la porción ribosomal 18S y 28S rRNAs y tRNAs (Abels & Breakefield, 2016). Se han propuesto diferentes mecanismos para la selección del cargo de RNA en EVs. El primer mecanismo corresponde al empaquetamiento de los RNAs a través de un k-mero de 4 nucleótidos (GGAG) el cual ha sido encontrado comúnmente

en miRNAs en Exos (Villarroya-Beltri et al., 2013). Este k-mero en conjunto con la ribonucleoproteína (RNP) hnRNPA2B1 parecieran estar involucrados en el empaquetamiento al interior de MVBs (Villarroya-Beltri et al., 2013). Esta RNP está también involucrada en el transporte de RNAs en oligodendrocitos y puede llevar modificaciones post-traduccionales (sumoilación) garantizando la carga de miRNAs al interior de EVs (Munro et al., 1999). El segundo, corresponde a modificaciones post-transcripcionales de miRNAs, en la uridilación del extremo 3', lo que pareciera contribuir directamente al empaquetamiento de miRNAs en EVs (Koppers-Lalic et al., 2014). El tercero, corresponde a la sobre expresión de nSMase2, lo que se refleja al incremento de miRNAs como cargo en EVs (Kosaka et al., 2010).

El cuarto y último mecanismo, corresponde a AGO2, una proteína asociada del complejo RISC involucrada en el silenciamiento de RNAs, lo que se piensa que controla el cargo de miRNAs en EVs (Guduric-Fuchs et al., 2012) y RNPs (Arroyo et al., 2011). Esto se ve reflejado en que cuando se realiza un knockout de AGO2 disminuye la cantidad miRNAs específicos en EVs, los que normalmente son enriquecidos en esta fracción. Aunque el rol de AGO2 en el empaquetamiento de miRNAs permanece siendo un hecho poco claro, ya que algunos estudios reportan que esta proteína estaría ausente en Exos, solo presentándose en MVBs y endosomas al interior de las células (Gibbings et al., 2009), mientras que otros reportan que AGO2 estaría en las EVs (Li et al., 2012). Por lo que el mecanismo de carga de RNAs en EVs es un tema poco entendido, y con muchas suposiciones.

Adicionalmente, se ha descrito la presencia de ADN en EVs. Tanto la presencia como la cantidad de ADN en las EVs depende de la célula secretora. Se ha descrito la presencia de ADN (de multiples tipos) en EVs derivadas de diferentes tipos celulares, como por ejemplo: células de glioblastoma (Guescini et al., 2010), células tumorales (Balaj et al., 2011), encardiomocitos humanos (Waldenström et al., 2012), células de mastocitos humanos (Shelke et al., 2016) y células embrionarias murinas (Simon et al., 2020). La presencia de ADN en las EVs será un tema del que se profundizará más adelante.

De esta forma las EVs pueden ser portadoras de moléculas de señalización capaces de modificar la función celular cuando son internalizadas por una célula diana. Estas moléculas son protegidas por la membrana lipídica una vez que las EVs son liberadas al espacio extracelular por lo que pueden afectar tanto células cercanas como distantes (Maas et al., 2017). Esta función en la comunicación celular ha sido descrita tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Se ha

descrito la participación de las EVs incluyendo mecanismos de metástasis y enfermedades cardíacas, neurodegenerativas, entre otras (Iraci et al., 2016). Por otra parte, por el hecho que las características y contenido de las EVs varían de acuerdo con el tipo y función celular, se han convertido en marcadores importantes para el diagnóstico de diferentes patologías. Sin embargo, en esta revisión nos centraremos en el papel de las EVs en procesos reproductivos.

1.3 Participación de las EVs en procesos reproductivos

En reproducción, se ha descrito la participación de las EVs en el desarrollo de gametos y embriones, así como en los mecanismos de comunicación embrio-maternos durante y posterior a la implantación (Machtinger et al., 2015). Se han identificado EVs en fluido seminal, siendo llamadas originalmente “prostatosomas” (P-EVs) (Ronquist & Brody, 1985; Ronquist et al., 2012a). Las EVs provenientes de la próstata (P-EVs) transportan alrededor de 140 proteínas distintas, lo que incluye a proteínas específicas de la próstata (como PSA y PAP), antígenos de células madre prostáticas, proteínas estructurales, proteínas de transducción, GTP y ATP (Ronquist et al., 2012b; Utleg et al., 2003). Las P-EVs participan en procesos de maduración y protección espermática, así como en la interacción con el ovocito (Arienti et al., 1998; Arvidson et al., 1989; Carlsson et al., 2003; Fabiani & Ronquist, 1995; Kravets et al., 2000; Pons-Rejraji et al., 2011).

En bovinos, además se han descrito EVs provenientes del epidídimo (epididosomas), los cuales contienen una serie de proteínas que participan en la motilidad espermática, la capacidad que tiene el espermatozoide de fecundar al ovocito y la protección contra las especies reactivas de oxígeno (Frenette, Girouard, et al., 2006; Frenette, Thabet, et al., 2006; Vernet et al., 2004). Entre las proteínas cargadas en los epididosomas se encuentran aldo-keto reductasa familia I, grupo B I (reductasa aldosa) (AKRIBI), proteína I unificante fosfatidiletanolamina (PEBPI), factor inhibidor de migración macrofágica (MIF), enzimas de la vía poliol, HE5/CD52, peroxidasa glutamina tipo 5 (GPX5), ubiquitina, molécula de adhesión espermática I (SPAMI)/PH-20 y P25b/P26h. Todas estas proteínas están involucradas en la maduración espermática y en la capacidad fecundante (Berube & Sullivan, 1994; H. Chen et al., 2006; Frenette et al., 2004; Frenette, Girouard, et al., 2006; Frenette, Thabet, et al., 2006; Kimura et al., 2009; Rejraji et al., 2002; Sullivan et al., 2007; H. Zhang & Martin-DeLeon, 2003). Además de poseer proteínas como cargo, los epididosomas

contiene distintos miRNAs, los cuales son diferencialmente expresados de acuerdo con la región del epidídimo de la cual son excretados, tales como: miR-145, miR-143, miR-214, miR-199, miR-654, miR-1224, miR-395 y miR-449 (Belleannée et al., 2013).

En la hembra, el desarrollo y maduración ovocitaria depende de la estrecha comunicación entre el ovocito y las células del folículo. Esta comunicación se produce por mecanismos de comunicación yuxtacrina y paracrina, sin embargo, se ha descrito la participación de las EVs en esta comunicación. Las EVs tienen un papel importante, como transmisores y controladores de elementos claves en el desarrollo folicular y maduración ovocitaria, a través de su contenido de miRNAs (Machtlinger et al., 2016). Estos miRNAs modulan vías de señalización como wntless (WNT) y el factor de crecimiento transformador beta (TGF β) que a su vez incluye moléculas como inhibina, activina, BMP15 (bone morphogenic protein 15) y GDF9 (Growth/differentiation factor 9). Estas rutas y moléculas de señalización son responsables del crecimiento folicular y la maduración ovocitaria (Boyer et al., 2010; da Silveira et al., 2012; Knight & Glister, 2003, 2006). Las EVs también modula la vía MAPK la cual estimula la proliferación de las células de la granulosa y hace que las células del cúmulo se expandan durante la maduración ovocitaria (Conti et al., 2011; M. Zhang et al., 2009). La activación de MAPK conjuntamente con la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (ERbB) promueve la reanudación de la meiosis en el ovocito (Conti et al., 2011; M. Zhang et al., 2009). En bovinos, el cargo presente en EVs provenientes de folículos de ovocitos inmaduros poseen un mayor número de miRNAs involucrados en vías de ubiquitinas, neurotropinas, MAPK, entre otras, lo que se relaciona estrictamente con el desarrollo folicular y las divisiones meióticas de los embriones pre- implantatorios (Sohel et al., 2013).

El proceso de la fecundación conlleva una serie de sucesos, los cuales incluye el paso del espermatozoide a través de las células del cúmulo y la unión de éste con la zona pelúcida (Jin et al., 2011). Luego de la unión con la zona pelúcida, esta es capaz de influir una serie de cambios bioquímicos en la cabeza del espermatozoide, al unirse con la glicoproteína ZP3, lo que finalmente produce la liberación de hialuronidasa y proteasas, facilitando que el espermatozoide reconozca la zona pelúcida y logre entrar al espacio peri-vitelino, lo que se conoce como “reacción acrosomal” (Aitken & Nixon, 2013; AUSTIN, 1952; Chang, 1951; Kirchhoff et al., 1997). Bajo este contexto, las EVs parecieran estar involucradas. *In vitro*, en un modelo porcino, EVs derivadas de la próstata son capaces de unirse con los espermatozoides e inducir la reacción acrosomal (Siciliano et al., 2008).

Por otra parte, las EVs provenientes del útero y del oviducto también previenen la capacitación prematura de los espermatozoides al cargar PMCA4a, proteína encargada de mantener el equilibrio de Ca^{2+} (Al-Dossary et al., 2013).

En el proceso de la reacción acrosomal, el espermatozoide expone la parte interna de la membrana acrosomal, la cual se adhiere al ovocito y posteriormente se fusiona con la membrana ovocitaria (Kaji et al., 2000). La membrana ovocitaria está recubierta por microvellosidades (Kaji et al., 2000) las que presentan la proteína CD9, marcador de superficie de Exos (Runge et al., 2007). Además, se han identificado EVs positivas a CD9 en la membrana plasmática de ovocitos, especialmente en el sitio de unión del espermatozoide (Runge et al., 2007). La ausencia de CD9 en la membrana ovocitaria está relacionado con alteraciones en las microvellosidades, lo que impide la fusión con el espermatozoide (Runge et al., 2007). Esto evidencia la participación de las EVs y en particular Exosomas en la fusión entre ambos gametos (Miyado et al., 2008).

Por otra parte, se ha demostrado la secreción de EVs por embriones pre-implantatorios de diferentes especies (Machtinger et al., 2015). Las características (tamaño, concentración y carga) de las poblaciones de EVs embrionarias varían a lo largo del desarrollo pre-implantatorio y en función de la calidad embrionaria (Mellisho et al., 2017, 2019a; Melo-Baez et al., 2020). En este sentido, se puede mencionar que los embriones bovinos de mayor calidad secretan durante la formación del blastocisto, menor cantidad de EVs pero de mayor tamaño, con un contenido de miRNA también diferente (Mellisho et al., 2019b). Esta información lleva a la hipótesis que las EVs participan en la comunicación embrio-materna y en los procesos de reconocimiento de la gestación. Bajo este contexto, nuestro grupo de trabajo ha investigado la secreción de EVs en embriones bovinos, contemplando distintas ventanas de desarrollo, como la blastulación (Mellisho et al., 2017, 2019b) y la compactación (Melo-Baez et al., 2020). Para el caso de la compactación, se utilizaron 1228 presuntos cigotos, los cuales fueron cultivados en grupo. El medio de cultivo fue colectado para el aislamiento de EVs. El método de aislamiento ocupado por el grupo es a través de centrifugaciones seriadas, luego pasando por un sistema de filtro de 10kDa (0.5 mL, 10 kDa, Amicon, Merck, Darmstadt, Germany), lo cual comprende un método eficaz y rápido de aislar EVs secretadas por embriones bovinos tempranos. Para el desarrollo de este experimento, se obtuvieron 2 grupos distintos de EVs, 1) los que eran originados a partir de embriones que eran

arrestados en el periodo de 8-16 células y 2) EVs aisladas desde el medio de embriones que eran capaces de llegar hasta el estadio de blastocisto.

Ambos grupos de EVs fueron analizadas a través de NTA (Nano track analyzing). El grupo 1 tuvo mayor cantidad de EVs con respecto al grupo 2, sugiriendo que embriones sanos, dentro del periodo de compactación, liberan menor cantidad de EVs hacia el medio de cultivo. Además, se realizó un análisis de expresión de miRNAs provenientes de estas EVs. Se encontraron 95 miRNAs expresados en ambas muestras, 8 miRNAs fueron diferencialmente expresados entre los grupos. 4 miRNAs (bta-miR-103, bta-miR-100, bta-miR-5021 y bta-miR-1) fueron sobreexpresados en EVs provenientes de embriones del grupo 1, mientras que 4 miRNAs fueron infra expresados (bta-miR-92a, bta-miR-140, bta-miR-2285av, y bta-miR-222). Los miRNAs que fueron encontrados sobre expresados en las EVs provenientes de embriones arrestados están involucrados en la potenciación, la vía de señalización Wnt, regulación del citoesqueleto, meiosis, etc. Concluyendo que las EVs derivadas de embriones bovinos pre implantatorios pueden ser ocupadas como biomarcadores de competencia embrionaria, en este estadio (Melo-Baez et al., 2020).

Para el caso de la blastulación, se produjeron 1371 mórulas que fueron cultivadas en grupo. Las EVs fueron recolectadas desde 4 grupos distintos: 1) embriones viables de blastulación temprana (V-EB), 2) Embriones no viables de blastulación temprana, 3) embriones viables de blastulación tardía y 4) embriones no viables de blastulación tardía. Todos los grupos fueron analizados por NTA, encontrando diferencias en la concentración y tamaño de partículas. El grupo de EVs con mayor tamaño fue el grupo 1, aunque no hubo diferencias significativas cuando se comparaban embriones viables y no viables en la blastulación tardía. La mayor concentración de partículas fue del grupo 2. Además, se analizó el contenido de RNAs de los 4 grupos distintos, encontrando, en los embriones viables, 8 miRNAs específicos (bta-miR-1, bta-miR-125b, bta-miR-184, bta-miR-2368-3p, bta-miR-2417, bta-miR-2889, p-bta-miR-124 y p-bta-miR-71), así como también 2 snoRNAs específicos para el mismo grupo (SNORD110 y SNORD81). También, se encontraron miRNAs sobreexpresados solo en los grupos viables de EVs embrionarias, involucrados en procesos metabólicos, respuestas a estímulos y procesos de señalización. Lo que concluye que las EVs derivadas de embriones bovinos en blastulación son reflejo de viabilidad embrionaria (Mellisho et al., 2019a).

Los trabajos presentados son ejemplos concretos que demuestran que es posible estandarizar las metodologías para aislar y caracterizar EVs secretadas por embriones individuales. Los resultados

muestran cómo las poblaciones de EVs varían en morfología y carga dependiendo del estadio y competencia del embrión, convirtiéndose en un material biológico interesante para la caracterización o clasificación de embriones producidos *in vitro*. Por otra parte, la variación en las poblaciones de EVs en función de la competencia embrionaria podría provocar cambios en la interacción embrio-materna y en parte explicar la reducida tasa de implantación de los embriones producidos *in vitro* aun cuando tengan una morfología que concuerda con excelente calidad (Mellisho et al., 2017).

La comunicación embrio-materna comienza durante el paso del embrión a través del oviducto, hasta la formación final de la placenta (Capra y Lange-Consiglio, 2020). Las EVs obtenidas *in vivo* desde lavados oviductales de bovino son internalizadas por los embriones producidos *in vitro* teniendo un efecto positivo en el desarrollo y calidad embrionaria (Almiñana et al., 2017). Las EVs que son aisladas desde cultivos de células epiteliales del oviducto tienen un efecto similar (Lopera-Vasquez et al., 2016). En cabras, las EVs derivadas de fluido uterino son internalizadas por el trofoectodermo y el epitelio uterino (Burns et al., 2016). Por otra parte, en ovinos, las EVs obtenidas de fluido uterino de hembras preñadas, contienen IFN- τ y son capaces de modular la expresión génica cuando son adicionadas a cultivos de células epiteliales endometriales bovinas (Nakamura et al., 2016). Las EVs derivadas de células del trofoectodermo porcino son capaces de inducir la proliferación de células endoteliales aórticas, estimulando la angiogénesis (Bidarimath et al., 2017).

En humanos, la placenta secreta EVs en las que están presente proteínas involucradas en la inmuno-modulación durante el embarazo (Kshirsagar et al., 2012). Además, secretan EVs que contienen moléculas pro-inflamatorias que median la respuesta inmune local, generando la inmuno tolerancia necesaria para que el embrión evada efectivamente el sistema inmune de la madre para una correcta implantación y mantención del embarazo (Kshirsagar et al., 2012). Es por esto que cuando hay una desregulación en el estado pro-inflamatorio de la madre, las vesículas provenientes de la placenta también se desregulan, lo cual es observado en casos de preclampsia (Pillay et al., 2017). Adicionalmente, las EVs aisladas desde pacientes con preclamsia han sido reportadas como inhibidoras de angiogénesis de las células humanas endoteliales (O'Brien et al., 2017).

Por otra parte, para mi conocimiento, hasta la fecha no existen reportes sobre el efecto de EVs secretadas por embriones pre-implantatorios sobre el ambiente materno. Esto probablemente está dado por la imposibilidad de separar las EVs embrionarias y maternas en un sistema *in vivo*.

Mientras que en sistemas *in vitro*, el número de EVs secretadas por embriones en estadios tempranos es bajo, limitando los ensayos de interacción con células maternas. No obstante, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que las EVs secretadas durante la blastulación de embriones bovinos producidos *in vitro* e *in vivo* son internalizadas por células endometriales en cultivo, modificando la expresión génica de éstas células. Las EVs embrionarias son capaces de producir cambios en los patrones de expresión de genes inducidos por interferón tau (Aguilera et al., 2023). Esto representa una evidencia del papel de las EVs embrionarias en la comunicación embrio-materna antes de la señal principal de reconocimiento de la gestión.

2. Uso de EVs para diagnóstico

El uso de EVs para análisis diagnóstico conforman una serie de avances en comparación con otras formas tradicionales de diagnóstico molecular, especialmente en moléculas como hormonas y citoquinas (Revenfeld et al., 2014). El mayor uso de las EVs para diagnóstico está dado por el hecho que las moléculas en su interior están protegidas de la degradación una vez en el espacio extracelular y por tanto se conserva “el mensaje” emitido por la célula de origen (Skog et al., 2008). Las moléculas (proteínas y RNA) libres en fluidos como la sangre pueden ser rápidamente degradadas (Vlassov et al., 2012). Por otra parte, los miRNAs se han convertido en una de las moléculas en el interior de las EVs con mayor interés diagnóstico debido a su papel en la regulación de múltiples vías de señalización y a su vez en múltiples procesos biológicos (Vlassov et al., 2012). Otro punto importante del uso de EVs para diagnóstico radica en que al utilizar EVs se excluye la realización de biopsias a distintos órganos o tejidos, siendo un método menos invasivo y riesgoso (Revenfeld et al., 2014). Además, al aislar EVs disminuye la cantidad de otras moléculas que se encuentran libres en los fluidos y probablemente no posean valor diagnóstico (Anderson y Anderson, 2002; Hortin y Sviridov, 2010). Es probable que las moléculas libres no sean producto de una liberación o secreción celular sino el producto de lisis o ruptura celular.

La mayoría de los reportes de uso de EVs para diagnóstico son en cáncer, probablemente por su papel en procesos de metástasis. No obstante, también se plantea el uso de las EVs como potencial diagnóstico de otras enfermedades, como Alzheimer, esclerosis amiotrófica lateral, Parkinson y Huntington (Wang y Zhang, 2020). La proteína neurogranina, expresada principalmente en el

cerebro, está regulada a la baja en EVs provenientes de plasma de pacientes con Alzheimer, y sus niveles se correlacionan con biomarcadores cognitivos (Liu et al., 2020). Los niveles de alfa-sinucleína en EVs derivadas de plasma es significativamente mayor en pacientes con un estado temprano de Parkinson, con respecto a los controles, y estos niveles altos parecieran estar relacionado con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad hacia síntomas motores (Niu et al., 2020). Por lo que estas EVs con la molécula alfa-sinucleína, podrían ser útiles como diagnóstico y pronóstico de la enfermedad del Parkinson.

Los niveles del RNA long noncoding SOCS2-AS1 en EVs derivadas desde plasma son altos en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria, comparados al grupo control (Liang et al., 2020). Los niveles de miR-1915-3p, miR-4507 y miR3656 en EVs derivadas desde suero son significativamente menores en pacientes que sufren infartos agudos al miocardio, con respecto al grupo control. Lo que sugiere también un método de diagnóstico para enfermedades cardiovasculares.

Además de utilizar EVs provenientes de sangre, se ocupan otras fuentes de EVs, provenientes de fluidos como la orina y la saliva (Liu et al., 2021). Desde el descubrimiento de que las células renales liberan EVs, el análisis de las EVs derivadas de orina podrían ser analizadas para tratar de dilucidar el estado general de salud del riñón (J. Liu et al., 2021). De hecho, los niveles de ciertas proteínas al interior de EVs derivadas de orina, como gelatinasa y ceruloplasmina proveen un mejor método de diagnóstico de salud renal en pacientes con nefropatía diabética comparado con análisis de proteínas totales de orina (Gudehithlu et al., 2015; Soetikno et al., 2014). Además, los niveles del receptor C-megalina incrementa en EVs derivadas desde orina de pacientes con nefropatías diabéticas (De et al., 2017), mientras que el factor de transcripción Elf3 es detectado en estos mismos pacientes diabéticos, y no en las EVs del grupo control (Sakurai et al., 2019). Aunque generalmente las EVs derivadas de orina reflejan enfermedades renales, también podrían ser utilizadas para otros tipos de enfermedades, como por ejemplo Alzheimer (Sun et al., 2019). Para el caso de las EVs provenientes de saliva, estas pueden tener potencial diagnóstico para diversas enfermedades (J. Liu et al., 2021).

En el liquen plano oral, una enfermedad crónica inflamatoria, los niveles de miR-4484 en EVs derivadas de saliva podrían ayudar como método diagnóstico (Byun et al., 2015). Niveles altos de mRNA PD-L1, en EVs de saliva, han sido asociados con periodontitis. El síndrome de Sjödren, una enfermedad autoinmune, ha sido asociada con niveles elevados de proteínas en EVs

salivales (Aqrawi et al., 2017). La apoptosis de las glándulas salivales, lo que sucede con la edad, ha sido asociado con los niveles de miR-24-3p en EVs salivales. Así como estas enfermedades, se encuentran un sinnúmero de otras condiciones, las cuales se podrían diagnosticar con el análisis de EVs, provenientes de varios fluidos corporales (J. Liu et al., 2021).

Como hemos visto anteriormente en esta revisión, se ha demostrado que las EVs tienen un papel importante en la regulación de eventos reproductivos; cambios en las condiciones fisiológicas provocan cambios en las poblaciones de EVs secretadas (Giacomini et al., 2020). De esta forma se ha propuesto el uso de las EVs como marcador para el diagnóstico de calidad ovocitaria, capacidad reproductiva del macho o calidad/estado de la gestación. En reproducción asistida, las EVs han ganado importancia ya que se han convertido en una valiosa herramienta para predecir el éxito de la tecnología tanto en su aplicación en humanos como en animales (Giacomini et al., 2020; Mellisho et al., 2019b).

Anteriormente describimos cómo las poblaciones de EVs varían dependiendo de la calidad y competencia embrionaria, llegando a proponerlas como una variable interesante para la selección de embriones bovinos producidos *in vitro*. En este sentido se ha propuesto un modelo de predicción de competencia embrionaria que combina las variables para la clasificación morfológica del embrión y las características poblacionales de las EVs secretadas al medio de cultivo durante el desarrollo *in vitro* (Mellisho et al., 2019b). Usando un modelo *in vitro*, se determinó que este modelo selecciona correctamente más del 75 % de los embriones lo cual es superior en un 25 % al método tradicional (morfológico) de selección embrionaria (Mellisho et al., 2019b). Este modelo, sin lugar a duda representa una alternativa no invasiva y rápida, interesante para la selección de embriones bovinos antes de la transferencia.

2.1. Diagnóstico genético basado en EVs

Aunque la búsqueda de ADN en EVs como potenciales marcadores de enfermedades ha sido intensa en los últimos años, el estudio del ADN como tal, en toda su estructura, al interior de las EVs permanece poco claro. Ya que comúnmente los estudios del contenido de las EVs se centran en su contenido de RNA. Esto, es representado, por ejemplo, en 2 recientes publicaciones de bases de datos con cientos de documentos acerca del contenido proteico, lipídico y RNAs de diversas

fuentes de EVs. A pesar de esto, es aceptado que las EVs pueden poseer ADN como carga, aunque su origen, localización y propiedades funcionales/fisiológicas aún se desconoce.

Muchos trabajos han reportado que las EVs que contienen ADN permiten la detección de mutaciones, y que éstas reflejan el estado actual de los tumores de origen (García-Romero et al., 2019; García-Silva et al., 2019; Kahlert et al., 2014; Kunz et al., 2019; Thakur et al., 2014; Vagner et al., 2018). Los primeros estudios fueron hechos en EVs derivadas de plasma de pacientes con cáncer, enfocándose en el análisis del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), especialmente en anglioblastomas y cáncer de pulmón (Castellanos-Rizaldos et al., 2018; Figueroa et al., 2017; Krug et al., 2018) y en el marcador KRAS en cáncer pancreático (Allenson et al., 2017; S. Yang et al., 2017). Este ADN contenido en EVs ha sido ocupado para la búsqueda de otros marcadores en múltiples cánceres humanos, y otras enfermedades (J. Liu et al., 2021).

Una pregunta fundamental es qué vesículas contienen el ADN celular. La primera hipótesis estaría enfocada en los ABs, ya que, durante la apoptosis, se encapsula el contenido citoplasmático y nuclear. Sin embargo, parece ser que las vesículas de menor tamaño (Exo y MVs) también contendrían ADN. En el caso de las MVs el mecanismo exacto de cómo el ADN es empaquetado al interior de éstas se desconoce, pero se propone que estuviera mediado por proteínas como ARF6 y RhoA (Willms et al., 2018). Por otra parte, la vía de origen de los Exos sugiere que el ADN se estaría empaquetando en este tipo de vesículas por la maquinaria ESCRT, aunque no se ha especificado vías o proteínas implicadas en el cargo de ADN (Bakhom et al., 2018; S. M. Harding et al., 2017). La teoría más aceptada es que el ADN dañado que queda en micronúcleos celulares estaría siendo empaquetado por la vía endosomal, siendo secretados como Exos al espacio extracelular (Yokoi et al., 2019).

Cuando la membrana de los micronúcleos es dañada, el ADN es liberado al citosol. Los marcadores de micronúcleo han sido aislados en conjunto con tetraspaninas marcadoras de Exos, lo que confirmaría esta hipótesis (Yokoi et al., 2019). Se ha demostrado que cuando las células se inducen a la inestabilidad genómica hay un incremento en la formación de micronúcleos, y a su vez, un aumento de EVs con contenido de ADN (Yokoi et al., 2019). No obstante, en este estudio solo una pequeña porción de las vesículas aisladas contenía ADN genómico. Esto explicaría el empaquetamiento del ADN genómico en EVs, pero no explica cómo el ADN mitocondrial es cargado en las vesículas. Pérez-Trevino et al (2020) teoriza que el mtADN generado por el estrés

oxidativo de las mitocondrias sigue la vía endosomal celular, siendo liberado como Exos. Ambos mecanismos, ya sea la liberación de ADN por Exos o por MVs, son graficados en la figura 4.

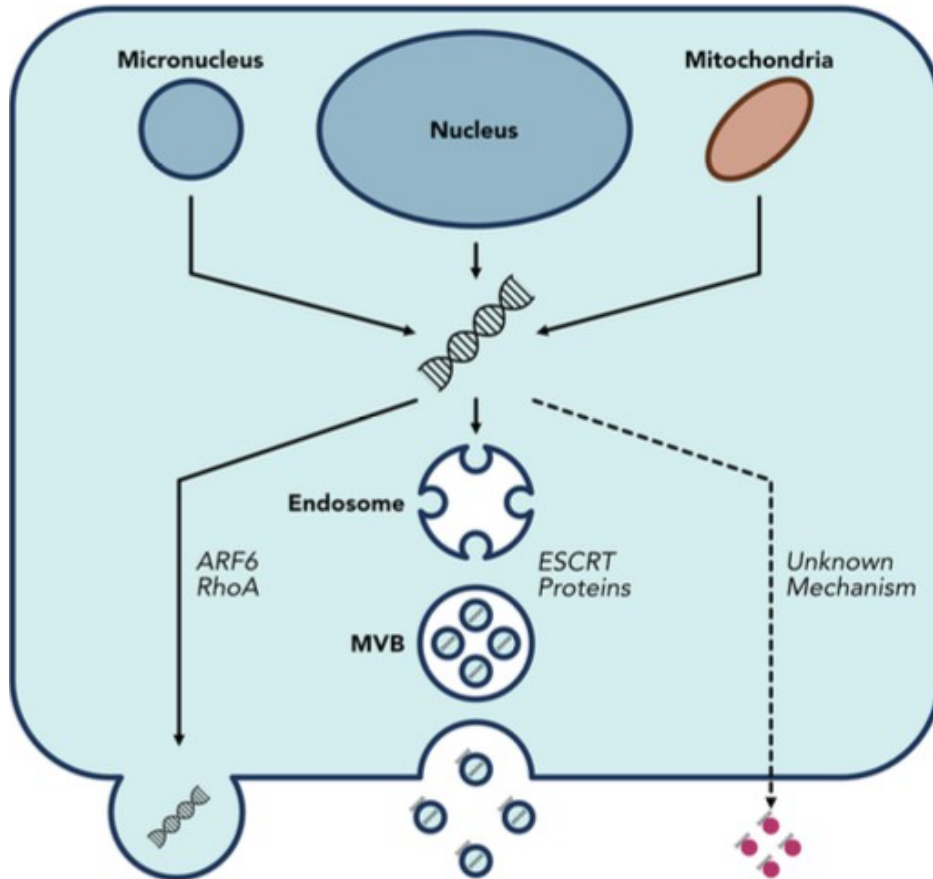


Figura 4. Esquema de liberación de ADN celular al espacio extracelular (extraído de Malkin y Bratman, 2020).

Algunos trabajos sugieren que esta liberación de ADN al espacio extracelular, al interior de EVs es un mecanismo integral para la eliminación de ADN del citosol, como un método de homeostasis celular (Takahashi et al., 2017). Aunque otros grupos sugieren que el ADN es una señal secretada por células en apoptosis como un método pro-inflamatorio y de respuesta inmune, o antitumoral (en el caso del cáncer) (Kitai et al., 2017). Para el caso embrionario, en el trabajo de nuestro grupo, se ha demostrado que hay una correlación entre la calidad embrionaria y la cantidad de EVs secretadas (Mellisho et al., 2019b), sugiriendo que quizás la cantidad de EVs derivadas de embriones están correlacionadas con el grado de apoptosis embrionario.

2.2. EVs para diagnóstico genético embrionario

De forma general, para establecer la calidad del embrión bovino previo a la transferencia embrionaria, en la producción de embriones *in vitro* o *in vivo*, se realiza una visualización del embrión a través de un estereomicroscopio, clasificando morfológicamente al embrión en desarrollo (Bó et al., 2013). El problema de este tipo de diagnóstico es que es subjetivo, ya que depende netamente de la experiencia del evaluador, volviéndolo un método de baja precisión diagnóstica (Zacchini et al., 2017). Incluso, cuando distintos evaluadores clasifican a un mismo embrión, puede ser clasificado de manera distinta (F. Chen et al., 2016; Farin et al., 1995). Adicionalmente, este tipo de diagnóstico es usado para establecer solo calidad del embrión, no incluyendo diagnóstico genético.

En la clínica humana, las bajas tasas de éxito de la transferencia de embriones *in vitro* se han asociado a aneuploidías o anomalías cromosómicas. Estos problemas están a su vez causados por los sistemas *in vitro* o la calidad de los gametos, principalmente la calidad de ovocitos de madres mayores a 35 años (Mikwar et al., 2020). Las anomalías cromosómicas están fuertemente relacionadas con menor capacidad de desarrollo de los embriones y por tanto mayores pérdidas de gestaciones. En este sentido el diagnóstico genético pre-implantatorio (PGD) se ha convertido en una herramienta ampliamente usada en la clínica humana para seleccionar embriones con mayor potencial de desarrollo a término (Zacchini et al., 2017). En humanos el PGD permite detectar anomalías cromosómicas, como por ejemplo, trisomías, monosomías, triploidías o cualquier tipo de aneuploidía (Fesahat et al., 2020a), o poder analizar otros marcadores genéticos de importancia, generalmente asociados a enfermedades genéticas, como β -talasemia, fibrosis quística, Huntington, distrofia miotónica y otras patologías mitocondriales o ligadas al cromosoma sexual (Geraedts & De Wert, 2009).

El PGD es realizado a través de una pequeña biopsia directa sobre los embriones, ya sea producidos por ICSI o fertilización *in vitro*, los cuales son posteriormente transferidos al útero, garantizando la ausencia de anomalías cromosómicas. Esta biopsia se realiza removiendo una o 2 blastómeras desde un embrión de 8 células, o en estado de blastocisto, a partir de células del trofoectodermo (De Rycke et al., 2015; Harper et al., 2012; Moutou et al., 2014).

Se han reportado varios problemas que se generan al realizar una biopsia embrionaria. Por ejemplo, con estas técnicas, se aumenta el tamaño fetal de los individuos (en embriones murinos) concebidos, incrementando con ello el riesgo de enfermedades cardiovasculares posteriores, se incrementan las alteraciones en el metabolismo esteroideal materno-fetal, se ve afectado el rendimiento reproductivo de las crías producidas y otros tipos de problemas, como el incremento del riesgo de desórdenes neurológicos (Sampino et al., 2014; Sato et al., 2014; Sugawara et al., 2012; Thornburg et al., 2010; Wu et al., 2014; Y. Yang et al., 2012; Yao et al., 2016; Yu et al., 2009; Zeng et al., 2013; Zhao et al., 2013). Es por esto, que se hace imprescindible la posibilidad de realizar diagnóstico embrionario de maneras no invasivas, reduciendo de manera considerable la manipulación del embrión o evitando de lleno cualquier daño mecánico (Fesahat et al., 2020b). Además, muchas veces el diagnóstico a través de biopsia de blastómeras, no refleja el ADN del embrión completo, ya que la biopsia podría corresponder a embriones mosaicos, con aneuploidías (Vera-Rodriguez et al., 2018).

La solución a este problema tecnológico es planteada a través del uso de ADN libre en los medios de cultivos (Kuznyetsov et al., 2020). Al día de hoy, se reconocen 3 grandes agrupaciones de estas tecnologías, 1) la aspiración del fluido blastocélico usando una pipeta ICSI, 2) la colecta del medio de cultivo de embriones y 3) la combinación de la técnica 1 y 2 (Kuznyetsov et al., 2020). En el primer caso, se sugiere la aspiración del líquido blastocélico como una fuente rica de ADN, con el fin posterior de ser usado para PGD. La utilización de esta técnica es descrita como una manera menos invasiva para el embrión, comparada con las técnicas de biopsias de células del trofoectodermo o blastómeras (Capalbo et al., 2018). Se describe que la aspiración de este fluido no afecta la arquitectura del embrión, por lo que no afecta a la tasa de supervivencia embrionaria (Capalbo et al., 2018).

Para el segundo caso, se ha reportado la presencia de ADN en los medios de cultivo provenientes de embriones, tanto humanos (Vera-Rodriguez et al., 2018) como en otras especies, como, por ejemplo, bovino (Hammond et al., 2017). Este ADN presente en el medio se ha ocupado frecuentemente para implementar alternativas de diagnóstico genético que no sean invasivas, ni mínimamente invasivas (como es el caso de la aspiración del fluido blastocélico).

El ADN que es encontrado en los medios de cultivo embrionarios podría tener varios orígenes, uno de ellos siendo embrionario, pero también podría ser proveniente de las células del cúmulus,

no representando ADN embrionario. Además, la contaminación podría provenir desde el medio comercial (Hammond et al., 2017). Hammond y colaboradores (2017), demostraron la contaminación de ADN en 3 medios de cultivo comerciales, los cuales, hipotéticamente, estarían siendo contaminados a través de los agregados séricos, que actuarían como acarreadores de ADN. Aunque los autores lograron demostrar la contaminación de los medios, la cantidad de ADN fue significativamente menor en comparación a los medios de cultivo que poseían embrión, por lo que demuestra que este ADN presente corresponde mayoritariamente al embrión. Además, lograron analizar genes de importancia productiva, como TSPY1, el cual está ligado al sexo, por lo que corresponde a una tecnología importante, sobre todo a la industria ganadera, donde la materia prima, o unidad funcional productiva, corresponde a la hembra bovina. Aunque lograron la detección de este gen en los medios con cultivos embrionarios, también fue encontrado, en menor medida, en los medios de cultivo sin embriones, por lo que se hace imperativo el refinamiento de estas tecnologías a futuro para descartar y poder discernir el origen exacto de este ADN.

El hecho de que un embrión bovino, de buena calidad (grado 1), tenga alrededor de 100-120 células limita la recuperación de EVs, ya que la liberación de vesículas está directamente ligada con la cantidad de células que la producen, mientras más células haya, más vesículas habrán. Los protocolos que generalmente se usan para el aislamiento de las EVs permiten una alta tasa de recuperación de EVs, pero con un bajo nivel de pureza o especificidad (Théry et al., 2018). Estos protocolos se basan en centrifugaciones seriadas, culminando en una ultracentrifugación por lo que solo logran concentrar las EVs, pero no representa un método exacto de aislamiento de las diferentes poblaciones (Théry et al., 2018). Otro punto importante, más allá de la identificación o correcto aislamiento de cada población de EVs, es que, en conjunto con las EVs, en estos métodos tradicionales de aislamiento (como la ultracentrifugación), se incluye además una alta contaminación con otras nanopartículas, como proteínas, fragmentos de cromatina, fragmentos de membrana plasmática, etc (Jeppesen et al., 2019; Melo-Báez et al., 2021; Théry et al., 2018).

Nuestro grupo de investigación ha sido capaz de separar distintas poblaciones enriquecidas de EVs de pequeño tamaño (Exos y MVs) con vesículas de gran tamaño (ABs) desde embriones pre implantacionales cultivados individualmente (Mellisho et al., 2017, 2019a). Además, otros grupos de investigación también han sido capaces de aislar vesículas a partir de cultivos individuales de embriones (Dissanayake et al., 2020; Pavani et al., 2018; B. Simon et al., 2020).

En los estudios humanos, los resultados de los análisis genéticos muestran un 30 a 80% de concordancia entre los medios de cultivos y las biopsias embrionarias (Belandres et al., 2019), mostrando que hay una discordancia con los cultivos. Hecho que pudiese ser demostrado por las diversas contaminaciones en los medios de cultivos (Hammond et al., 2017).

Por lo que este problema podría ser evitado con el aislamiento de EVs, las que contendrían ADN desde los embriones sin contaminantes. Por otra parte, la única forma de determinar si el ADN embrionario es secretado a través de EVs, de manera fisiológica y no patológica, es que este ADN esté al interior de pequeñas vesículas que se secretan normalmente del embrión (Exos y MVs), y no al interior de vesículas en un contexto patológico (ABs). Para esto es importante establecer un protocolo adecuado de separación de las distintas fracciones de EVs, para poder distinguir de donde proviene el gADN.

La relación que tienen las EVs con el diagnóstico genético, en especial el embrionario, ha sido ampliamente demostrada. Múltiple evidencia existe en la literatura, empezando por tan solo la asociación que tienen las características poblacionales (en cuanto a tamaño y concentración) de las nanopartículas con la predicción de parámetros reproductivos. Por ejemplo, se ha demostrado que las vesículas que poseen mayor tamaño guardan una gran relación con su liberación desde embriones de mejor calidad. Además, se ha determinado que aquellos embriones que liberan menos EVs (menor concentración de partículas) poseen mayores tasas de embarazo en mujeres (Abu-Halima et al., 2017).

También, se ha visto una relación entre las EVs y el efecto del estrés oxidativo producido en embriones (ya sea con bajos o altos niveles de oxígeno; 5% o 20% O₂), y las diferencias dimórficas que hay en el cargo de estas cuando son liberadas por embriones macho y hembras. Además, aparte de la diferencia de transcriptoma, los embriones machos sometidos a estrés oxidativo resultaron liberar una mayor concentración de EVs, así como también una mayor expresión de genes relacionados a la biogénesis de estas vesículas (Abu-Halima et al., 2017).

Primordialmente, el cargo de las EVs, y el uso de estas para diagnóstico está enfocado en la carga de RNAs, ya sean mRNAs o miRNAs, ya que una gran variedad de estas moléculas han sido asociadas con aspectos reproductivos o fallas en los mismos. Un alto nivel de miR-645, por ejemplo, ha sido demostrado que lleva a una baja tasa de embarazo, así como también, una mayor tasa de fallo en técnicas de reproducción asistida como ICSI (Inyección espermática

intracitoplasmática), por lo que el uso de este miRNA podría resultar en buen marcador negativo de eventos reproductivos (Rosenbluth et al., 2014). Un ejemplo específico del potencial uso diagnóstico de EVs en embriones es la evaluación del miRNA mir-634, el cual está ampliamente relacionado con altas tasas de embarazos (Abu-Halima et al., 2017).

3. Métodos de aislamiento de EVs

La purificación absoluta o completo aislamiento de EVs es una meta poco realista considerando las comparaciones que ha realizado la ISEV (Théry et al., 2018). Es por esto que en general se ocupan los términos de “separación” y “concentración”. Para el caso de la separación, se refiere a la purificación o aislamiento de EVs de otros componentes de la matriz de la cual se obtiene la muestra (fluidos, medio, tejidos, etc). La concentración se refiere al incremento de números de EVs por unidad de volumen, con o sin separación. El término “enriquecido” puede referirse al incremento en concentración relativa a otros componentes (Théry et al., 2018).

El método más usado corresponde a centrifugaciones seriadas, el cual separa las EVs por precipitación, siendo una técnica más de separación que de concentración (Gardiner et al., 2016). Esta técnica ampliamente usada permite recuperar una alta cantidad de nanopartículas desde la muestra prima, aunque la especificidad de la muestra final no es del todo pura, ya que en conjunto con EVs, precipitan otras nanopartículas como pequeñas proteínas (de un peso similar a la de las EVs), lípidos, etc (Théry et al., 2018).

Centrifugación diferencial o seriada

La centrifugación seriada o diferencial es considerado como el método más común para aislar EVs sin embargo el protocolo varía entre los reportes ya que se consideran distintos tiempos de centrifugación y distintas velocidades, dependiendo de las muestras. Este método en general consiste en múltiples pasos: Primero, una centrifugación corta (10 min) a velocidad baja de 300g, la cual elimina células muertas y partículas de debris celular. Luego, le sigue otra centrifugación un poco más rápida, de 1000g a 20000g, lo que elimina vesículas más grandes y debris. Finalmente, una ultracentrifugación a 100000g para precipitar las EVs. Estas EVs precipitadas son luego resuspendidas, generalmente en PBS (phosphate buffered saline). Algunos autores, antes de la

resuspensión en PBS añaden otra centrifugación a alta velocidad (100000g), para la eliminación de contaminantes. Aunque añadir este paso más al protocolo representa un aumento del tiempo total de aislamiento y disminuye la cantidad de EVs aisladas (Momen-Heravi et al., 2012).

Un factor importante dentro de este protocolo, que contempla la precipitación de las EVs, es la eficiencia de sedimentación, la cual es producto del factor-k del rotor ocupado. El factor-k corresponde a una escala de tiempo, lo que representa el tiempo en que una partícula logra sedimentarse en un medio en particular. Este factor se calcula por la velocidad angular máxima (en rads/s) y el radio mínimo y máximo del rotor, por lo que la eficiencia de la precipitación estaría dada por la ultracentrífuga utilizada (Langer et al., 2003). Por otra parte, la viscosidad del medio en donde se encuentran originalmente las EVs tiene una relación significativa con su recuperación (Momen-Heravi et al., 2012). Hay menos eficiencia de precipitación o sedimentación cuando las EVs se aíslan de fluidos más viscosos, como por ejemplo plasma o suero (Momen-Heravi et al., 2013).

Gradiente de densidad

Una de las limitaciones que tiene el aislamiento por centrifugaciones seriadas, método expuesto anteriormente, es la co-precipitación de otro tipo de partículas, como agregados proteicos, cuerpos apoptóticos, fragmentos de nucleosomas, entre otras, lo que genera menor pureza. Una manera de generar un aislamiento más puro es a través de la utilización de gradientes de densidad, ya sea de sucrosa o de iodixanol, lo que logra una separación de fracciones por sus densidades específicas (Cantin et al., 2008). Esto logra separar efectivamente vesículas pequeñas, como exosomas y microvesículas, las que tienen densidades de 1.08 a 1.22 g/mL, de vesículas más grandes como ABs, los que tienen densidades más altas, de más de 1.22 g/mL (Théry et al., 2018). Incluso, se ha propuesto que el uso del iodixanol logra separar efectivamente EVs y virus con el mismo tamaño (Cantin et al., 2008). Este método de aislamiento y purificación ha sido utilizado en la actualidad para obtener fracciones puras de EVs en leche bovina, aunque también el método de exclusión por tamaño, por lo que ambos métodos podrían ser usados con este propósito (Vaswani et al., 2017).

Aislamiento por microfiltración

Este método es comúnmente utilizado antes de una ultracentrifugación, sin pasar por las centrifugaciones previas típicas de la centrifugación seriada, con el propósito de eliminar células

muertas, ABs, y debris de gran tamaño, solo dejando EVs. Si bien este método logra eliminar contaminantes y otras nanopartículas no EVs, algunas proteínas marcadoras de EVs, como TSG101 logra pasar la microfiltración, imposibilitando muchas veces la caracterización (Cheruvanky et al., 2007). Dado este problema, se propuso un método que considera un filtro de exclusión por tamaño de unión a proteína para el aislamiento de EVs provenientes de orina (Lozano-Ramos et al., 2015). Este método logra una gran pureza de EVs, evitando la ausencia de proteínas individuales que pudieran confundir la caracterización. Este tipo de tecnologías de aislamiento ha crecido a lo largo del tiempo, aunque siguen representando contaminantes en las EVs aisladas, ya que solo excluyen por tamaño, no considerando otras características de las EVs, como la densidad.

Aislamiento por anticuerpos y perlas magnéticas

Este tipo de aislamiento toma en cuenta la naturaleza proteica de las EVs, en especial las proteínas de membrana que poseen, que son usadas como marcadores. Las proteínas más utilizadas para este propósito son: CD9, CD63, CD81 y CD82 (Théry et al., 2002). Además de aislar EVs específicas, este tipo de aislamiento, el cual une las EVs con perlas específicas para un marcador, tiene como ventaja que puede ser utilizado para ser medido en citometría de flujo, inmuno blot y microscopía electrónica (Théry et al., 2006). Si bien pareciera un buen método de aislamiento, estas EVs aisladas por este método pierden funcionalidad, lo que se refiere como la capacidad de tener un efecto sobre un sistema biológico (Théry et al., 2006). Además, este método no permite aislar EVs de grandes cantidades de muestra, por lo que una centrifugación previa podría ser considerada para reducir el tamaño de la muestra. Por último, este método, hasta mi entendimiento, no ha sido utilizado para muestras de baja cantidad de nanopartículas, como es el caso de medios de embriones bovinos individuales (60 μ L).

ExoQuick TM

Durante los últimos años y por la importancia del campo de las EVs, muchas compañías, han trabajado para realizar maneras rápidas y fáciles de aislamiento de las EVs, como el caso del kit comercial ExoQuick (System Biosciences, Mountain View, CA, USA). Este método consiste en el aislamiento de las EVs por precipitación. La precipitación a través de ExoQuick resulta en una

manera de aislar EVs con contenido de miRNAs más puro y en mayor cantidad, en comparación con otros métodos (Taylor et al., 2011). Otros autores también han combinado el ExoQuick con un paso previo de ultracentrifugación, logrando que la morfología de las EVs permanezca intacta (Yamada et al., 2012). En nuestro grupo y como parte del trabajo que posteriormente se presentará, se ha evaluado este sistema para el aislamiento de EVs de embriones bovinos pre-implantatorios. De esta forma se ha logrado separar poblaciones de EVs grandes y pequeñas positivas a CD9 (Datos no publicados).

4. Conclusiones Generales de la revisión de la literatura

La información revisada en este trabajo representa una evidencia de la importancia de las vesículas extracelulares para entender los mecanismos de comunicación celular en diferentes sistemas. En reproducción, las EVs participan desde la ovogénesis hasta la interacción embrio-materna. Es un hecho que las células secretan EVs ya sea de forma “intencional” para emitir señales a la vecindad o para eliminar moléculas de desecho. Ninguna de estas hipótesis ha sido probada ni descartada pero no es intención de este trabajo responder a estas preguntas. Pero sí es evidente que las EVs pueden darnos mucha información sobre la célula secretora, lo que nos permite entender su estado funcional y adelantarnos al efecto que podría tener sobre las células receptoras. De esta forma las EVs son probablemente uno de los marcadores biológicos más importantes que se han identificado. Hemos visto que la posibilidad de aislar y caracterizar poblaciones de EVs secretadas por embriones pre-implantatorios ha revolucionado los métodos de diagnóstico embrionario, logrando más información molecular sin necesidad de una biopsia celular. Por otra parte, la presencia de ADN en las EVs ha sido un tema muy discutido debido a la imposibilidad de responder a la pregunta de por qué una célula “saludable” está liberando ADN al medio extracelular. Esto aun no lo podemos responder, pero es muy probable que efectivamente se esté liberando ADN genómico contenido en las EVs el cual podría ser utilizado para diagnóstico genético. La respuesta a esto tiene impacto tanto en la clínica humana como en animales.

II. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA

El desarrollo actual de la industria ganadera requiere la selección de animales que respondan a las demandas del mercado en condiciones naturales cada vez más exigentes debido a la restricción de fuentes de agua (Ferré et al., 2020). Las tecnologías de reproducción asistida apoyan los programas genéticos, acelerando la reproducción de los animales élite y acortando los intervalos generacionales (Berglund, 2008; Granleese et al., 2015). El desarrollo de las técnicas de diagnóstico molecular y la identificación de marcadores genéticos asociados a rasgos productivos, salud y reproductivos ha permitido una mejor selección de los animales y un avance significativo en la calidad de los rebaños (Scheffers et al., 2012).

Por su parte, la transferencia de embriones, especialmente producidos *in vitro*, ha demostrado ser una tecnología efectiva para la rápida propagación del valor genético (Granleese et al., 2015). La producción de embriones *in vitro* garantiza un mayor aprovechamiento de los gametos de ambos parentales, incrementando significativamente el número de individuos producidos y de sexo deseado, asociado al uso de semen sexado. Sin embargo, el uso de semen sexado para fecundación *in vitro* (FIV) tiene limitaciones importantes y en la mayoría de los casos solo se logra un 10 % de embriones transferibles (Ferré et al., 2020). El incremento de la sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares permite el diagnóstico genético en muestras de hasta una célula lo que ha permitido el sexado molecular de los embriones sin necesidad de uso de semen sexado (Scott et al., 2013). El diagnóstico genético de embriones pre-implantatorios está bien establecido en la clínica humana, sin embargo, es limitado en animales (Cimadomo et al., 2016; Sullivan-Pyke and Dokras, 2018; Chen et al., 2018). Esta situación está dada porque la toma de biopsia en embriones es técnicamente compleja, se requiere mayor especialización del laboratorio y personal y puede afectar la calidad y viabilidad de los embriones, con ello las tasas de gestación y nacimientos, siendo poco atractivo para los sistemas productivos (Scott et al., 2013).

Durante los últimos años se han propuesto sistemas no invasivos que pudieran reemplazar la toma de biopsia. Estos trabajos, mayormente representados por la clínica humana, se han enfocado en el uso del medio de cultivo embrionario como un tipo de biopsia líquida (Bracewell-Milnes et al., 2017; Li et al., 2018; Ñomm et al., 2019). Durante el cultivo *in vitro*, los embriones secretan y liberan al medio moléculas como proteínas y RNAs, las cuales pueden reflejar las características

del embrión, su calidad y competencia (Mellisho et al., 2019; Dissanayake et al., 2020). En el medio colectado de los embriones también se ha identificado ADN (Vera-Rodriguez et al., 2018; Belandres et al., 2019). Los estudios en embriones humanos demuestran que hay cerca de un 80% de concordancia entre el análisis genético realizado en la biopsia embrionaria y ADN extracelular (en medio de cultivo) (Vera-Rodriguez et al., 2018; Capalbo et al., 2018). Sin embargo, la presencia de ADN en el medio de cultivo ha sido un tema controversial ya que no se ha podido responder por qué los embriones “sanos” liberarían ADN durante su desarrollo. Por otra parte, la baja concordancia en algunos casos ha estado explicada por la presencia de ADN contaminante, proveniente de las células del cumulo e incluso de la fuente proteica adicionada a los medios de cultivo (Hammond et al., 2017). No obstante, se ha confirmado la presencia de ADN embrionario en el medio de cultivo, con representación de todos los cromosomas (Veraguas et al., 2020). Adicionalmente se ha observado un aumento de la concentración de ADN en el medio de cultivo a medida que avanza el desarrollo embrionario; mayor en estadio de blastocisto (Saadeldin et al., 2014; Pavani et al., 2018). Esto se podría justificar por el aumento del número de células embrionarias. No obstante, es posible que a medida que avanza el desarrollo embrionario y este responda a los factores estresantes del sistema in vitro, se activen mecanismos de muerte celular y con ello la liberación de cuerpos apoptóticos, lo cual también podría justificar el aumento de ADN en el medio de cultivo. De ser así, un aumento en la concentración de ADN en el medio de cultivo estaría relacionado con una menor calidad embrionaria. Sin embargo, también se ha demostrado que los embriones pre-implantatorios, además de los cuerpos apoptóticos, liberan otros tipos de vesículas extracelulares (EVs) como exosomas y microvesículas (Mellisho et al., 2017; 2018; 2019).

Hasta el momento se ha descrito que todos los tipos celulares secretan vesículas extracelulares y y esta secreción no necesariamente indica una situación patológica en la célula de origen (Yoon et al., 2014). Durante su biogénesis, las EVs son cargadas con diferentes moléculas, dependiendo de la función de la célula de origen, que pueden modificar el fenotipo de la célula receptora (Ritter et al., 2017). De esta forma, el estudio de las EVs secretadas permitiría identificar o caracterizar las células o tejido de origen además de entender el posible impacto en el tejido diana. Nuestro grupo de trabajo ha identificado que los embriones bovinos secretan diferentes poblaciones de EVs durante el periodo pre-implantatorio y que hay una relación entre las características morfológicas y contenido molecular de las EVs y la calidad embrionaria (Mellisho et al., 2017; 2018; 2019;

Melo-Baez et al., 2020). Embriones bovinos de mayor calidad, secretan durante la formación del blastocisto, menor cantidad de EVs pero de mayor tamaño con un contenido de miRNA también diferente (Mellisho et al., 2019).

Además de proteínas, lípidos y RNAs, se ha demostrado que en general las EVs pueden contener ADN genómico y mitocondrial, pero se desconoce el origen de este y si está relacionado con una condición patológica o de muerte celular. En nuestro laboratorio hemos demostrado que las EVs secretadas por embriones producidos in vitro también contienen ADN. Este ADN ha sido utilizado para diagnóstico de aneuploidías en embriones humanos o sexado de embriones bovinos, en ambos casos con una coincidencia con el embrión de hasta el 80% (Veraguas et al., 2020; datos no publicados). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros grupos de investigación, analizando el medio de cultivo en su totalidad (Esmaeili et al., 2020; Zacchini et al., 2017).

No obstante, aún existe un 20% de no concordancia que podría estar explicada por el co-aislamiento de EVs y cuerpos apoptóticos, especialmente en embriones con mayor número de células en apoptosis. El grado de apoptosis es una medida de la calidad embrionaria; un mayor grado de apoptosis se relaciona con menor calidad y viceversa. Por tanto, una de las preguntas a resolver en el presente proyecto es cómo se correlaciona la sensibilidad de la detección de ADN en las EVs y la calidad y competencia embrionaria. Por otra parte, también se trabajará en definir el origen del ADN en el medio de cultivo; si este proviene del embrión en desarrollo, de fuentes externas o de ambos. Para esto se propone un método de separación de poblaciones de vesículas extracelulares lo cual permitiría identificar el origen del ADN en el medio de cultivo. Las respuestas a estas preguntas podrían definir si el ADN presente en el medio de cultivo de embriones producidos in vitro puede ser utilizado para análisis genómico. En el caso de animales, el uso de EVs para diagnóstico genético nos permitiría revolucionar el diagnóstico embrionario ya que eliminaríamos la manipulación invasiva de la biopsia y los embriones podrían ser clasificados por sexo y otros marcadores genéticos de interés.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los embriones bovinos de excelente calidad (grado I) producidos *in vitro* liberan al medio de cultivo vesículas extracelulares de pequeño tamaño (Exos y MVs) que contienen ADN embrionario suficiente para diagnóstico genético.

Objetivo general

Demostrar que los embriones bovinos liberan ADN al medio de cultivo en vesículas extracelulares de pequeño tamaño (Exos y MVs) independientemente de su calidad al estadio de blastocisto.

Objetivos específicos

1. Identificar la presencia de ADN embrionario a través de distintas técnicas de identificación en vesículas extracelulares secretadas (o liberadas) por embriones bovinos producidos *in vitro*, al día 7 de desarrollo y evaluar su utilización en diagnóstico genético preimplantacional mediante PCR.
2. Determinar la relación entre la cantidad de ADN embrionario aislado desde EVs y la tasa de apoptosis en el embrión correspondiente.
3. Determinar la relación entre la cantidad de ADN en vesículas extracelulares y la competencia del embrión.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

Los siguientes experimentos fueron dirigidos hacia el objetivo n°1:

Inicialmente se definió qué protocolo de aislamiento de EVs poseía mayor cantidad de partículas, para lo que se realizó un análisis de seguimiento de partículas (NTA) que evaluó la variable mencionada, así como también su tamaño en 3 protocolos o métodos distintos; ultracentrifugación (P1), ultracentrifugación acoplada a un gradiente de densidad (P2) y filtros tangenciales Amicon (P3). Además, P2 fue separado en 3 poblaciones distintas de acuerdo a la densidad específica de EVs. Una primera población (F0) que contendría EVs de menor tamaño contenidas en la fase específica de entre $1,065 \text{ g/cm}^3$ y $1,097 \text{ g/cm}^3$, una segunda población (F1) de densidad similar a un exosoma de entre $1,097 \text{ g/m}^3$ y $1,150 \text{ g/cm}^3$ y una última población (F2) más densa de entre $1,150 \text{ g/cm}^3$ y $1,255 \text{ g/cm}^3$.

Luego, se produjeron embriones bovinos por FIV, los que fueron cultivados en grupo hasta el día 5 (estadio de mórula). Más adelante, los embriones fueron cultivados individualmente hasta el día 7 de desarrollo (blastocisto) en medio depletado de EVs. Ambos, medios y respectivos embriones fueron colectados y procesados inmediatamente para su posterior análisis. Para aislar las EVs se utilizó el protocolo P2. Para la caracterización de las EVs, éstas fueron analizadas por tamaño y concentración a través de NTA, por su morfología a través de TEM y por su presencia de marcadores proteicos a través de WB.

Para identificar el ADN presente en las EVs, se realizaron las siguientes actividades: 1) Detección de ADN a través de sistema Bioanalyzer (Agilent), el cual detecta bajas concentraciones de ADN a partir de una electroforesis de tipo capilar, 2) Tinción de ADN a través de la afinidad del yoduro de propidio (PI) con cadenas dobles de ADN visualizado por citometría de flujo. 3) Cuantificación promedio de ADN a través de un kit comercial capaz de medir cantidades del orden de picogramos (Quant-iT™ PicoGreen® dsADN Assay Kit, Invitrogen™) y 4) Tinción de ADN y lectura en NTA; para lo cual fue usado el kit Biotracker 488 green nuclear dye, cell membrane permeable (Sigma), en donde se procedió a analizar la fluorescencia de las muestras marcadas a través del equipo de NTA (NanoSight NS300, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) usando una configuración adecuada en donde se pudieran analizar bajas lecturas y la emisión de fluorescencia precisa.

Con la finalidad de establecer si el ADN estaba presente al interior o externamente a las EVs, el medio de 11 embriones fueron tratados con y sin ADNasa I. El tratamiento con ADNasa I se llevó a cabo incubando las muestras con 1 U de ADNse I (Invitrogen, Waltham, CA, USA) por 30 min a 37 °C. Para la extracción del ADN fue utilizado un buffer de lisis comercial del kit celular Cellsto-cADN™ II (AM8723, ThermoFisher). Posteriormente, se realizó una PCR en tiempo real para determinar la presencia de fragmentos de ADN, utilizando los siguientes genes: SAT1 (gen multicopia), MCM4 (un gen altamente confirmado), CSN3 (kappa caseína) y SRY (un gen específico ligado al cromosoma Y) los cuales están detallados en la Tabla 1. ADN de macho y hembra, extraído de testículos y ovarios de bovino, fueron utilizados como controles positivos, mientras que una muestra de agua sin templado como control negativo. La especificidad de la PCR fue confirmada a través de la curva de melting y el tamaño del producto fue observado en un gel de agarosa al 2%.

Tabla 1. Detalle de primers utilizados para PCR en tiempo real en EVs aisladas por gradiente de densidad en embriones bovinos pre implantatorios.

| Gen | Secuencia del primer (5' - 3') | Tamaño del producto (pb) | Temperatura de annealing (°C) | Número de acceso (NCBI) |
|------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| SAT1 | Fp: AAGCCAGGTTGCAATGAAAGT | 123 | 57 | NM_001034333.2 |
| | Rp: CATCCCTCTTCGCTGGATAG | | | |
| MCM4 | Fp: TTCTACAAGTTGTGCGCTCT | 101 | 50 | NC_037341.1 |
| | Rp: TCGGTGAGGCTGCTAATACT | | | |
| CSN3 | Fp: GGCCATTCCACCAAAGAAAAATC | 240 | 59 | NC_037333.1 |
| | Rp: TTTGCTTATTTACCTGCGTTGTCT | | | |
| SRY | Fp: GTCCAGCTGTGGTACAGCAA | 232 | 59 | NM_001014385 |
| | Rp: AGCTGCTTGCTGATGTCTGA | | | |

Abreviación: Fp: Forward, Rp: Reverse, pb: pares de bases.

Finalmente, para determinar exactamente el contenido de ADN de las EVs derivadas de embriones bovinos, dos pools fueron analizados y sometidos a secuenciación (NGS), obtenidos a partir de 3 medios de cultivo individuales, un pool derivado desde mórulas que no alcanzaron el desarrollo a blastocisto al día 7 y otro de embriones que si alcanzaron el estadio de blastocisto al mismo día antes mencionado. Luego, se escogieron los siguientes genes: IL17RC (Receptor de interleuquina

17), RREB1 (proteína de unión a elementos sensibles a Ras 1), USP9Y (Ubiquitina peptidasa específica 9; gen ligado al cromosoma Y) y ADAM12 (Metalopeptidasa dominio12), obtenidos a partir de los resultados de la secuenciación, los que fueron elegidos por su interés productivo o su relación con el desarrollo embrionario para ser identificados mediante PCR en tiempo real. El detalle de los primers fue detallado en la Tabla 2, los que fueron diseñados mediante el programa Amplifx y la base de datos del NCBI en conjunto con su herramienta online Primer-BLAST.

Tabla 2. Detalle de primers utilizados para PCR en tiempo real en EVs aisladas por Amicon en embriones bovinos pre implantatorios.

| Gen | Secuencia del primer (5' - 3') | Tamaño del producto (pb) | Temperatura de annealing (°C) | Número de acceso (NCBI) |
|--------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| IL17RC | Fp: GTGTTTCAGGGCATGCACAAG | 220 | 55 | NC_037349.1 |
| | Rp: CACAGACTGGACCACAGACC | | | |
| ADAM12 | Fp: CTTGGGAAGCCAGTTTGTGC'3 | 121 | 55 | NM_001001156.1 |
| | Rp: TGCAGTCTTCATTGGGTTCCA | | | |
| RREB1 | Fp: ATCGAGCAGAGATGCAAACCTTGT | 72 | 55 | XM_010818623.4 |
| | Rp: TTGATGAACTTTGCACATCCAGAA | | | |
| USP9Y | Fp: CTGATTCTGGAAGGGGGTCTC | 107 | 55 | XM_059883965.1 |
| | Rp: TTTCTGTTTTGAGTATGACAGCCAC | | | |

Abreviación: Fp: Forward, Rp: Reverse, pb: pares de bases.

Para el objetivo específico número 2 y 3, el diseño experimental fue el siguiente:

Los embriones fueron producidos mediante fecundación *in vitro* y partenogénesis hasta el día 5 de desarrollo (mórula compacta) y los que fueron cultivados individualmente en medio depletado de vesículas hasta el día 7 de desarrollo (blastocisto), asumiendo como día 0 el día de la fecundación o partenogénesis, según sea el caso. Posteriormente se recolectó el medio de cultivo de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto y además los que quedaron bloqueados en estadio de mórula. Luego, se aislaron las EVs embrionarias mediante ultrafiltración por filtros tangenciales Amicon (15mL, Amicon, Merck, Darmstadt, Germany). Las EVs fueron procesadas individualmente mediante NTA (Nanotracking analysis) para determinar concentración y tamaño de las partículas. Además, se determinó la cantidad de partículas con ADN utilizando una tinción específica permeable a membranas (Green nuclear dye Biotracker 488, Merck, Darmstadt, Germany) similar a lo realizado en el trabajo de Pallinger et al., 2017. Para establecer otra medida

de cantidad de ADN en las EVs, se cuantificó la cantidad total de ADN en cada muestra de EVs aisladas desde medios individuales mediante un kit de medición de picógramos de ADN (Quant-iT™ PicoGreen® dsADN Assay Kit, Invitrogen™ Waltham, MA, USA), utilizando un espectrofotómetro (BioTek Sinergy H1 microplate reader, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Para el caso de los embriones, estos fueron analizados mediante una tinción específica para establecer células en apoptosis (TUNEL, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche® Life Science Products; Merck, Darmstadt, Germany) para determinar el grado de apoptosis embrionaria calculando la tasa de apoptosis, proveniente del resultado del cociente entre las células en apoptosis y las células totales, las cuales fueron teñidas mediante Hoescht. El diseño experimental fue esquematizado en la Figura 5.

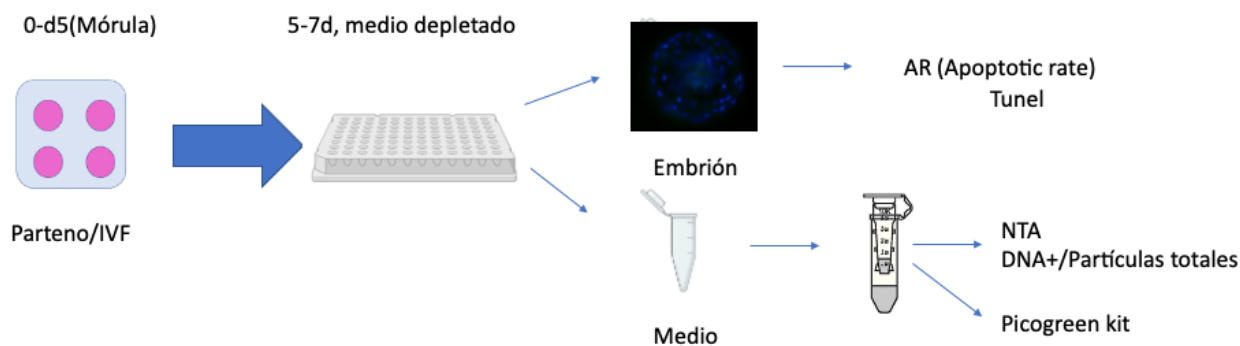


Figura 5. Diseño experimental para los objetivos específicos 2 y 3. Flechas azules corresponden al flujo de trabajo.

2. Métodos generales

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Campus Chillán.

Producción in vitro de embriones bovinos

Los embriones bovinos fueron producidos mediante fecundación *in vitro* (FIV) siguiendo los protocolos establecidos en nuestro laboratorio (Rodríguez-Alvarez et al., 2013; Velasquez et al.,

2016). Se utilizaron ovocitos madurados *in vitro* (IVM) para lo cual se obtuvieron ovarios provenientes de vacas y vaquillas sacrificadas en planta faenadora Frigosur, Chillán. Los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina isotónica más antibiótico/antimicótico a una temperatura entre 33-35 °C. En laboratorio los ovarios se lavaron con solución salina fresca previo a la punción folicular para reducir la contaminación.

Se puncionaron folículos de 3 a 8 mm para la obtención de los complejos cúmulo-ovocitos (COC's), a través de la aspiración del fluido folicular con una jeringa y aguja hipodérmica de 19G. El líquido folicular colectado se depositó en tubos de 15 mL los cuales se mantuvieron en baño maría con una temperatura de 37 °C durante 10 min aproximadamente para posteriormente proceder a la búsqueda y colecta de los COC's. Posteriormente se eliminó el líquido folicular manteniendo el sedimento que contuvo a los COC's. El sedimento colectado se mezcló con medio de manipulación (TCM199 con 4 mM de bicarbonato de sodio, 18 mM de HEPES, 10% de suero fetal bovino (SFB) y 50 µg/mL de gentamicina). La búsqueda de los COC's se realizó en placas de 100 mL bajo un estereomicroscopio con platina temperada a 37 °C, seleccionando solo aquellos de grado I y II (Citoplasma oscuro y homogéneo con al menos dos capas compactas de células del cúmulo). La maduración *in vitro* de los COC's se realizó en placas de 4 pocillos (Nunc, Rochester, NY, USA) en medio TCM199 suplementado con 0,6 mM de glutamina, 0,2 mM de piruvato, 0,2 U/mL de FSH/LH, 1µg/mL de estradiol, 50 µg/mL de gentamicina, 10 ng/mL de EGF (epidermal growth factor) y 10% de SFB. En cada pocillo se maduraron 25-30 COC's durante 24 h a 39 °C y atmósfera de 5% CO₂ en aire. Luego de las 24 h se observó la expansión de las células del cúmulo como indicador indirecto de la calidad de la maduración ovocitaria.

Posterior a la IVM, se colectaron los COC's los cuales fueron fecundados con semen comercial previamente utilizado en otras fecundaciones *in vitro* con buena producción de blastocistos. El semen contenido en pajuelas de 0,25 mL (almacenado en nitrógeno líquido) se descongeló en agua a 37 °C. La obtención de espermatozoides móviles se realizó mediante una gradiente de percoll (de 45% y 90% de percoll). El semen descongelado se depositó en la parte superior de la gradiente y se centrifugó a 4500 RPM por 6 min. El pellet obtenido se lavó en 500 µL de medio de fecundación (TALP-FIV suplementado con 0,01 mg/mL de heparina, 2 mM de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina y 6 mg/mL de BSA) y se centrifugó a 3000 RPM por 3 min. La concentración de espermatozoides móviles se evaluó mediante el conteo a través de una cámara de Neubauer y la evaluación de la motilidad en cámara de Makler.

La fecundación se realizó en grupos de 25-30 COC's y una concentración de espermatozoides de 1×10^6 / mL. La incubación se realizó durante 18-20 horas en placas de 4 pocillos, en 500 μ L de medio de TALP-FIV en atmósfera controlada con 5% de CO₂. Al transcurrir el periodo de fecundación, se desprendieron las células del cúmulo de los presuntos cigotos en una solución de 0,3 mg/mL de hialurodinasa en medio TCM199-Hepes sin SFB, aplicando 4 minutos de vórtex a temperatura ambiente (25 °C). Los presuntos cigotos, libres de cúmulo se seleccionaron bajo estereomicroscopio, eliminando las estructuras que mostraron signos de lisis o degeneración.

Cultivo Embrionario (IVC)

El sistema de cultivo seleccionado para el estudio de las poblaciones de EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* ha sido desarrollado por nuestro grupo y probado por Mellisho et al. (2017, 2019b). Este sistema de cultivo optimiza la producción de embriones viables mientras que garantiza una mayor recuperación de poblaciones de EVs secretadas por el embrión. El cultivo de los presuntos cigotos se realizó en medio SOFaa (fluído oviductal sintético), suplementado con 0,4 mM piruvato de sodio, 0,2 mM de L-glutamina, 1X de aminoácidos esenciales y no esenciales, 10 ng/mL de EGF, 2% de SFB, 0,1 mg/mL de ácido cítrico, 0,5 mg/mL de myo-Inositol y 0,3% de albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos en placas de 4 pozos, 500 μ L por pocillo (Mellisho et al., 2017). Los presuntos cigotos se distribuyeron de forma aleatoria formando grupos de 25-30 por pocillo. Las placas de cultivo se mantuvieron en una atmósfera con 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, en la incubadora a 39°C hasta el día 5 post-IVF.

Al día 5 post-IVF, los embriones que alcanzaron el estado de mórula compacta se seleccionaron para cultivo individual en medio SOFaa depletado de EVs (SOFd) (Mellisho et al., 2019b). El medio de cultivo se depletó mediante ultrafiltración a 3000 g por 15 minutos en filtros Amicon® (100 kDa, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) (Melo-Baez et al., 2020). Este sistema permite depletar el medio reteniendo las EVs. Se verificó la ausencia de EVs en el medio de cultivo mediante NTA (NanoSight NS300; Malvern Instruments Ltd, UK). El medio depletado se conservó a -80°C para el cultivo embrionario.

Las mórulas seleccionadas, se lavaron en SOFd de forma grupal, con la finalidad de eliminar EVs provenientes del cultivo previo. Se ubicó una mórula por pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc,

Rochester, NY, USA) en un volumen de 80 μ L de SOFd previamente equilibrado en atmósfera controlada con 5% de CO₂ a 39°C. Las mórulas se mantuvieron en cultivo durante 48 horas hasta el día 7 de desarrollo embrionario. En este momento se evaluó el estadio de desarrollo y la calidad de los embriones considerando los criterios morfológicos de la IETS (Stringfellow & Givens, 2013). La evaluación de los blastocistos se basa en la presencia y tamaño del blastocele, y la calidad morfológica considerando las características del trofoblasto y del macizo celular interno. Se colectó el medio de cultivo solo de los blastocistos grado I (7.1 según criterios de la IETS). Los medios de cultivos se almacenaron a -80°C de forma individual en tubos eppendorff los que se identificaron con el embrión correspondiente. En el experimento 1 los embriones fueron identificados y almacenados a -80 °C para posibles análisis genéticos posteriores.

Para el caso de los experimentos que comprendieron la producción de embriones a través de la partenogénesis, el protocolo que se usó fue el siguiente:

Luego de la maduración ovocitaria, los COC's fueron desnudados con 0,3 mg/mL de hialuronidasa para la remoción de las células del cúmulus. Luego, la activación fue llevada a cabo con la incubación con etanol al 7% por 5 min y luego incubados en 5 μ g/mL de citocalasina B y 10 μ g/mL de cicloheximida por 5 h. EL cultivo embrionario fue realizado de la misma manera que en la producción de embriones por IVF.

Concentración y caracterización de EVs

Grupos de muestras independientes fueron realizadas para la caracterización. Para esto, un grupo de 100 embriones fueron producidos para extraer su medio de cultivo, y caracterización morfológica, tamaño y concentración y marcadores proteicos.

Para el caso del aislamiento con Optiprep, se utilizó un gradiente de densidad con el polímero Optiprep TM (D1556, Sigma-Aldrich) y con una posterior ultracentrifugación (ODG-UC), según el protocolo establecido por Asaadí et al. (2021) y modificado para nuestros propósitos. Se mezclaron cantidades apropiadas de tampón de homogeneización (Tris-HCl 10-mM, EDTA 1mM y sacarosa 0,25 M (pH 7,4)) y solución de trabajo de iodixanol para preparar gradientes de 5%, 10%, 20% y soluciones de yodixanol al 40%. La solución de trabajo de iodixanol se preparó añadiendo un tampón de solución (Tris-HCl 60 mM, EDTA 6 mM y sacarosa 0,25 M (pH 7,4)) a una solución stock de OptiPrep TM (60% (peso/volumen) solución acuosa de yodixanol). El

gradiente se preparó en un tubo de polialómero de tapa abierta de 15 mL adecuado para la ultracentrifugación, depositando en capas de 1 mL de 40%, 4 mL de 20%, 4 mL de 10% y 1 mL de 5% de la gradiente. Luego, la muestra de 80 μ L total de medio de los embriones se depositó arriba en la gradiente. Posteriormente se centrifugó a 4°C durante 18 h a 100.000 g en una ultracentrífuga (UC) (Hitachi CP100NX). Se colectó la fracción entre el 10 y 20% de la gradiente las cuales se resuspendieron en 10 mL de PBS y fueron centrifugadas a 4°C x 4h a 100.000 x g, el pellet fue resuspendido en 100 μ L de PBS.

Para el caso del aislamiento con Amicon, fue utilizado un protocolo establecido por Thery et al., (2018), con pequeñas modificaciones. Se llevaron las muestras a 15 mL de volumen con PBS1x. Siguiendo varias centrifugaciones seriadas; 700x g por 10min; 2000x g por 10 min; 10000x g por 70 min. Las nanopartículas fueron concentradas en 20 μ L utilizando filtros tangenciales (0,5 mL, 10kDa, Amicon, Merck, Darmstadt, Germany) y fueron centrifugados por 30 min a 4000 x g.

Nanotracking análisis (NTA)

Para este análisis, fue usado el equipo NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK), equipado con un láser de 488 nm y una cámara sCMOS, siguiendo los procedimientos descritos por Mellisho et al., (Mellisho et al., 2017). Una muestra de medio depletado de EVs fue usada como control negativo. Las características de las nanopartículas, concentración y tamaño fueron grabadas de 20 a 100 partículas por frame bajo un flujo constante, a temperatura ambiente, usando un infusor constante.

En el caso de la tinción de ADN de las nanopartículas, se utilizó la tinción de membrana permeable green nuclear dye 488 (Merck, Darmstadt, Germany), siguiendo un protocolo adaptado desde Pallinger et al., (2017). El software fue configurado para la detección de pocas cantidades de partículas y la emisión exacta de luminiscencia utilizando filtros. Este kit ha sido utilizado en otros estudios como un marcador de núcleo en células, ya que es específico para la tinción de ADN y es capaz de atravesar la membrana plasmática, la cual es similar a la membrana de las EVs. La tinción fue excitada por un láser de 488 nm de longitud y fue grabada la emisión utilizando un filtro de 500 nm, dejando solo partículas que emitan 532 nm de longitud de onda.

Western Blot (WB)

Las muestras fueron resuspendidas en un buffer reductor (0,005% bromophenol blue, 3% 2-mercaptoethanol, 9,2% SDS, 40% glycerol, y 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)) por 5 min a 95 °C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis usando un gel SDS de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Luego, la membrana fue bloqueada por 45 min a temperatura ambiente con 5% de albúmina con TBST. Luego, las membranas fueron incubadas con TSG101 rabbit (1:200 en 5% BSA + 0,5% Tween PBS E6V1X, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), Alix mouse (1:1000 en 5% milk + 0,5% Tween PBS, mAb 2171, Santa Cruz, CA, USA), CD9 rabbit (1:1000 en 5% BSA + 0,5% Tween PBS, CST- D3H4P, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) and APOA1 (1:1000 en 5% milk + 0,5% Tween PBS, sc-7964, Santa Cruz, CA, USA) a 4 °C. Luego de una incubación por toda la noche, las membranas fueron incubadas a temperatura ambiente por 1h con un anticuerpo policlonal anti-rabbit IGG HRP conjugado (7074, Cell Signaling Technology™) y un anticuerpo policlonal anti-mouse IGG HRP conjugado (7076, Cell Signaling Technology™) dependiendo del caso. Finalmente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST y la señal proteica fue detectada usando el reactivo Westar Antares ECL substrate (XLS0142, Cyanagen™, Bologna, Italy) en un sistema GeneGnome XRQ (Syngene™, Cambridge, UK).

Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La TEM fue utilizada para identificar la morfología de las EVs. Para la preparación de las muestras, estas fueron depositadas en Formvar/películas de carbono recubiertas por rejillas de cobre y dispuestas para el análisis. El protocolo utilizado fue el de Thery et al., (2018) con modificaciones. Brevemente, 10 µL de las muestras fueron descongeladas y mezcladas con el mismo volumen de 4% de paraformaldehído. Para cada grupo, se preparó una grilla independiente. Las grillas fueron lavadas y fijadas con 1% de glutaraldehído y finalmente contrastadas con una solución de oxalato de uranilo (pH 7) y 4% de acetato de uranilo.

Las grillas fueron observadas con un microscopio JEOL JEM 1200 EXII equipado con una cámara Gatan 782 en el “Centro de espectroscopia y microscopia” (CESMI), de la Universidad de Concepción, Concepción, Chile. El microscopio tuvo una resolución de 5Å y fue operado a 80kV. Las imágenes fueron obtenidas usando el software del mismo equipo.

Análisis de detección y presencia de ADN en EVs bajo distintos métodos

1) El análisis de ADN mediante electroforesis capilar no solo entrega datos sobre la cuantificación de ADN en las muestras de EVs, sino que también sobre su tamaño medido en pares de bases. Para ello, las muestras fueron aisladas a partir de medios condicionados individuales utilizando el protocolo P2, para las fases F1 y F2, reuniendo 6 muestras para cada grupo distinto. La cuantificación se realizó mediante el equipo TapeStation 2200 (Agilent Technologies, Inc.). Para la electroforesis se ocuparon los reactivos y dispositivos Agilent D1000 Screen Tape System. 1 μ L de las muestras y el Ladder fueron cargadas en conjunto con 3 μ L del buffer proporcionado por el kit al interior de cada carril. Luego del procesamiento automático de las muestras en el equipo los resultados fueron analizados mediante el software proporcionado por los mismos fabricantes.

2) Otro método utilizado fue la tinción con PI y posterior análisis por citometría, dada a sus propiedades intercalantes. Se ocuparon 25 μ L de EVs derivadas de embriones cultivados individualmente, el cual fue incubado por 15 min a temperatura ambiente con 100 μ L de formaldehído al 4%. Luego de la incubación, 150 μ L de PBS 1x filtrado y 1 μ L de PI (a la concentración inicial de 50 μ g/mL) y 50 μ L de perlas de látex (Beads) (Life Technologies, Santiago, Chile) fueron añadidas a la muestra. Las lecturas de fluorescencia fueron leídas luego de 30 min de incubación final usando un equipo de citometría. Para determinar la fluorescencia real del ADN contenido en las EVs se realizaron las siguientes combinaciones y controles: 1) Beads sin EVs y sin PI, 2) Beads con EVs sin PI, 3) Beads con EVs y PI.

3) Con la finalidad de cuantificar el ADN presente en las EVs de solo un embrión, producido individualmente, se utilizó el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsADN Assay Kit (Invitrogen™ Waltham, MA, USA) capaz de cuantificar cantidades del orden de picogramos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, fue producida una curva estándar de ADN del propio kit (25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 250 pg/mL, y 0 pg/mL) para determinar la fluorescencia emitida por cada cantidad de ADN, lo que permitió realizar una regresión logística para la determinación posterior del ADN de las muestras, las que finalmente fueron medidas mediante el equipo BioTek Sinergy H1 microplate reader (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

4) Para la cuantificación mediante NTA, se utilizó el equipo NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) el cual estuvo equipado con un láser de emisión de 488 nm y una

cámara sCMOs. Los datos fueron obtenidos grabando entre 20 a 100 partículas por frame a través de un flujo continuo a temperatura ambiente. Las partículas fueron teñidas para la determinación de ADN mediante la tinción comercial green nuclear dye Biotracker 488 (Merck, Darmstadt, Germany), siguiendo el protocolo de Pallinger et al., 2017 adaptado para nuestros propósitos. Luego, la emisión de las partículas positivas fue censada utilizando un filtro de 500 nm del mismo equipo de NTA, dejando solo partículas de 532 nm de emisión.

Determinación de genes presentes en EVs embrionarias mediante Next generation sequencing (NGS)

Se utilizaron dos grupos distintos de medios de 3 embriones cultivados individualmente cada uno. El primero, estuvo solo compuesto de medios derivados de embriones que no alcanzaron el estadio de blastocisto quedándose desarrollados solo en mórulas al día 7 de desarrollo, mientras que el segundo grupo estuvo compuesto por blastocistos al mismo día de desarrollo. Ambos grupos, por la baja cantidad de ADN por muestra, fueron sometidos a una amplificación completa de ADN con el kit comercial Picoplex (Single cell WGA kit, Takara Bio USA, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación como tal fue realizada por la empresa externa Novogene Co, Ltd, USA, la que utilizó el equipo NovaSeq X Plus (PE150) para el procesamiento de las muestras, lo que generó 150 bp paired-ends reads en un formato Fastq. Los archivos generados por la empresa fueron analizados ocupando el software FASTP, determinando la cantidad y calidad de reads, así como también la presencia de adaptadores y errores en las bases, realizando el proceso conocido como “trimming”. Luego, los archivos nuevos se analizaron con el software BWA con el genoma de referencia de código ARS-UCD1.2 bovino, terminando en archivos en formato SAM, los que posteriormente fueron convertidos a BAM para la inspección mediante el programa QualiMAP BAMQC. Finalmente, se eliminaron los reads duplicados utilizando el software MarkDuplicates software, lo que resultó en una lista completa de genes para ambos grupos.

Genotipificación de embriones bovinos Pre-implantatorios mediante el análisis por PCR en tiempo real desde sus EVs

Todas las muestras de EVs antes de realizar el PCR fueron tratadas con ADNasa I, para evadir la contaminación de ADN externo a la EV. Para esto, se utilizó la enzima ADNasa I (Invitrogen, Waltham, CA, USA) la que fue incubada en conjunto con las muestras por 30 min a 37 °C, reacción que fue inactivada añadiendo 25-mM de EDTA (1µL) por cada muestra e incubada a 65°C por 10 min.

Para la reacción de PCR fueron utilizados 2 µL de ADN por muestra, 10 pmol de primer (forward y reverse) y 5 µL de la solución masterMix del kit Kicq Start Syber green qPCR (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las temperaturas de annealing para cada primer fueron determinadas mediante el software Amplifx. Las curvas de temperatura cíclicas para la reacción fueron determinadas de acuerdo con el kit y a la determinación de la eficiencia de cada primer.

Determinación de la tasa de apoptosis embrionaria

Para determinar la tasa de apoptosis embrionaria se realizó el marcaje fluorescente de cortes en el ADN, lo que correspondió a una medición de apoptosis efectiva. Para esto, fue utilizado el kit comercial In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche® Life Science Products), el cual originalmente es usado para determinar apoptosis en cultivos celulares, pero que fue adaptado para determinar apoptosis en células embrionarias. Para esto, cada embrión individualmente en una placa de 96 pocillos fue fijado con paraformaldehído al 4% por 1h a temperatura ambiente, para luego ser lavados con PBS1x-PVP con la finalidad de remover la solución fijadora y fortalecer la arquitectura de los embriones. Para permeabilizar la membrana se utilizó tritón X100 al 0,5% en 0,1% de citrato de sodio por alrededor de 30 min, albergándolos en un ambiente húmedo. Además, se utilizaron controles de la técnica, un control negativo sin tinción TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) y un control positivo con tinción y tratamiento con ADNasa I para inducir la apoptosis y por consecuente cortes en el ADN. Ambos controles fueron tratados al igual que todas las demás muestras.

Todas las muestras, y el control positivo, fueron incubadas con la tinción TUNEL por 1h a 37°C en humedad. Por último, las muestras fueron teñidas con Hoechst por 15min para la tinción de

todas las células embrionarias, las que fueron visualizadas en un microscopio fluorescente para contar las células totales y las células en apoptosis.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa R studio. Todas las variables fueron analizadas mediante la prueba de Shapiro Wilks para determinar su normalidad. El efecto de la tecnología de la producción de embriones fue evaluado utilizando la prueba de Chi cuadrado. Para identificar las diferencias entre grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Para el análisis post hoc y la identificación de los grupos se realizó el test de Duncan. Para el análisis de la correlación entre variables se realizó un test de Spearman. Las diferencias significativas entre grupos fueron consideradas utilizando un $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

1. Resultados asociados al objetivo específico N.º 1

Comparación de 3 distintos protocolos para el aislamiento de vesículas extracelulares derivadas de embriones bovinos cultivados in vitro

Para determinar que protocolo resultaba más eficiente al momento de aislar EVs y posteriormente analizar su contenido, se procedió a comparar 3 protocolos distintos. P1: Ultracentrifugación. P2: Ultracentrifugación acoplada a un gradiente de densidad (F0: baja densidad, F1: Densidad exosoma (Figura 6) y F2: Densidad cuerpos apoptóticos. P3: Filtros tangenciales Amicon.

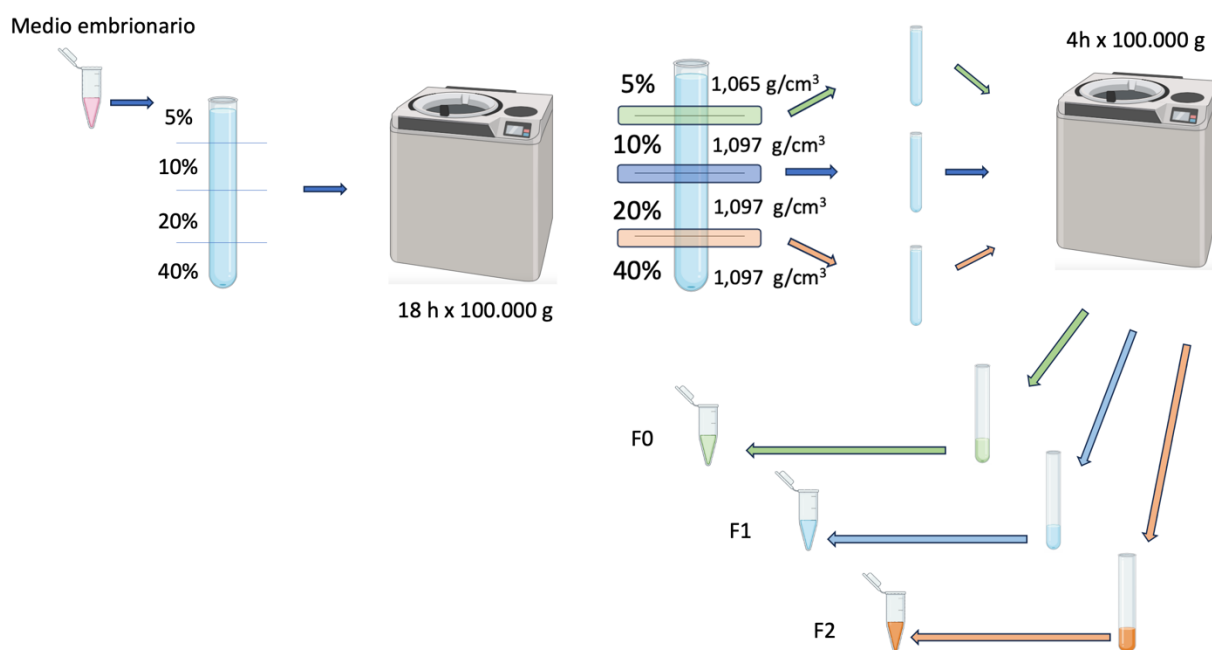


Figura 6. Imagen representativa del protocolo de ultracentrifugación acoplada a gradiente de densidad (Optiprep). Los porcentajes expuestos en la gráfica representan el porcentaje del polímero sintético iodixanol, el cual fue usado para generar distintas densidades. F0: Optiprep fracción 0 con menor densidad (entre 1,065 g/cm³ y 1,097 g/cm³); P2 F1: Optiprep con densidad similar a exosomas (entre 1,097 g/cm³ y 1,150 g/cm³); P2 F2: Optiprep fase 2 con densidad similar a cuerpos apoptóticos (entre 1,150 g/cm³ y 1,255 g/cm³).

Para la comparación de los distintos protocolos de aislamiento de EVs se utilizaron 2.481 ovocitos, los cuales fueron fecundados *in vitro*, en donde 1.077 alcanzaron el estadio de mórula (43,4%), de

las que 240 (23,2%) alcanzaron el estadio de blastocisto al día 7 de desarrollo. Se utilizaron medios de cultivo de 50 embriones cultivados individualmente para el aislamiento de EVs mediante el protocolo P1 y 50 medios para el P3. En el caso del P2, se utilizaron 47 medios tanto como para la fase F0 como para la F1 y 46 medios de cultivo para la F2. Junto con esto, el experimento se llevó a cabo utilizando PBS1x como control negativo.

Se identificó una mayor concentración de partículas en la F2 utilizando el P2, siendo esta de $4,11 \times 10^{11} \pm 4,38 \times 10^{10}$ partículas/mL, siendo estadísticamente mayor a todos los protocolos a excepción de la F1 (Tabla 3). Todos los protocolos tuvieron mayor cantidad de partículas en comparación con el control, a excepción de la F0 del P2 (Figura 7).

Tabla 3. Promedio y moda de tamaños de partículas (nm) y concentración (partículas/mL) para cada protocolo distinto, incluido el control negativo (Ctrl; PBS1x) de EVs derivadas de embriones bovinos pre-implantatorios cultivados individualmente.

| Protocolo | Tamaño (nm) | | Concentración (Partículas/mL) |
|-----------|------------------|----------------|--|
| | Promedio +/- SE | Moda +/- SE | Promedio +/- SE |
| P1 | 173,2 +/- 2,3 c | 129,2 +/- 9,8 | $2,81 \times 10^{11} \pm 5,91 \times 10^{10}$ bc |
| P2 F0 | 141,5 +/- 3,5 a | 106,7 +/- 3,0 | $1,62 \times 10^{11} \pm 1,83 \times 10^9$ a |
| P2 F1 | 146,0 +/- 5,5 ab | 121,6 +/- 14,4 | $3,35 \times 10^{11} \pm 3,87 \times 10^9$ cd |
| P2 F2 | 160,9 +/- 0,8 bc | 130,6 +/- 12,0 | $4,11 \times 10^{11} \pm 4,38 \times 10^{10}$ d |
| P3 | 175,5 +/- 4,7 c | 122,9 +/- 22,7 | $2,02 \times 10^{11} \pm 1,10 \times 10^{10}$ b |

SE: Error estándar. P1: Ultracentrifugación. P2: Ultracentrifugación acoplada a un gradiente de densidad (F0: baja densidad, F1: Densidad exosoma y F2: Densidad cuerpos apoptóticos. P3: Filtros tangenciales Amicon.

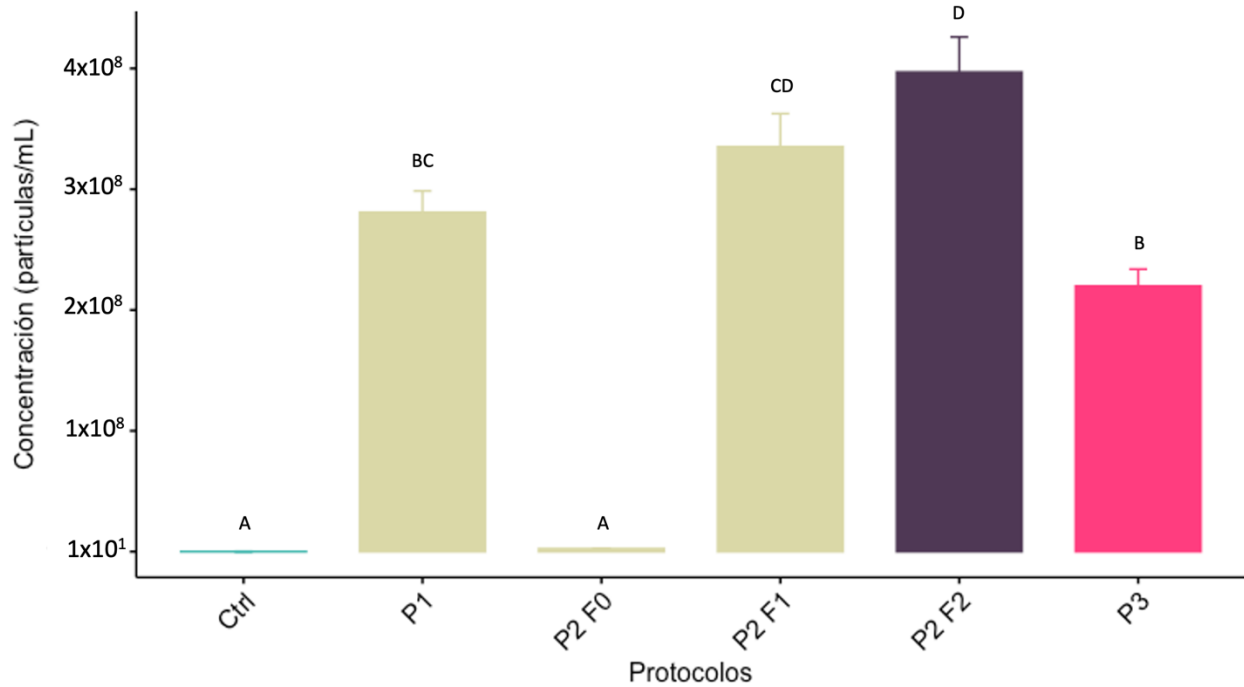


Figura 7. Gráfico de barras representando la concentración de partículas (Partículas/mL) de cada protocolo de aislamiento de EVs derivadas de embriones bovinos Pre-implantatorios cultivados individualmente; Ctrl: Control negativo (PBS1x); P1: Ultracentrifugación; P2 F0: Optiprep fracción 0 con menor densidad (entre 1,065 g/cm³ y 1,097 g/cm³); P2 F1: Optiprep con densidad similar a exosomas (entre 1,097 g/cm³ y 1,150 g/cm³); P2 F2: Optiprep fase 2 con densidad similar a cuerpos apoptóticos (entre 1,150 g/cm³ y 1,255 g/cm³); P3: Ultrafiltración con filtro Amicon (100kDa, 500 µL). Letras distintas representan diferencias significativas entre los protocolos (p<0,05).

Los protocolos P1 y P3 permitieron el aislamiento de poblaciones de vesículas con un tamaño promedio mayor (173,2 +/- 2,3 y 175,5 +/- 4,7 nm, respectivamente), mientras que el menor tamaño de partícula fue observado en el P2, en la fase F0 y F1 (141,5 +/- 3,5 y 146,0 +/- 5,5 nm, respectivamente). En cuanto al protocolo 2, se observó un aumento en el tamaño de las vesículas a medida que aumentó la densidad de las fases (Figura 8) (p<0,05).

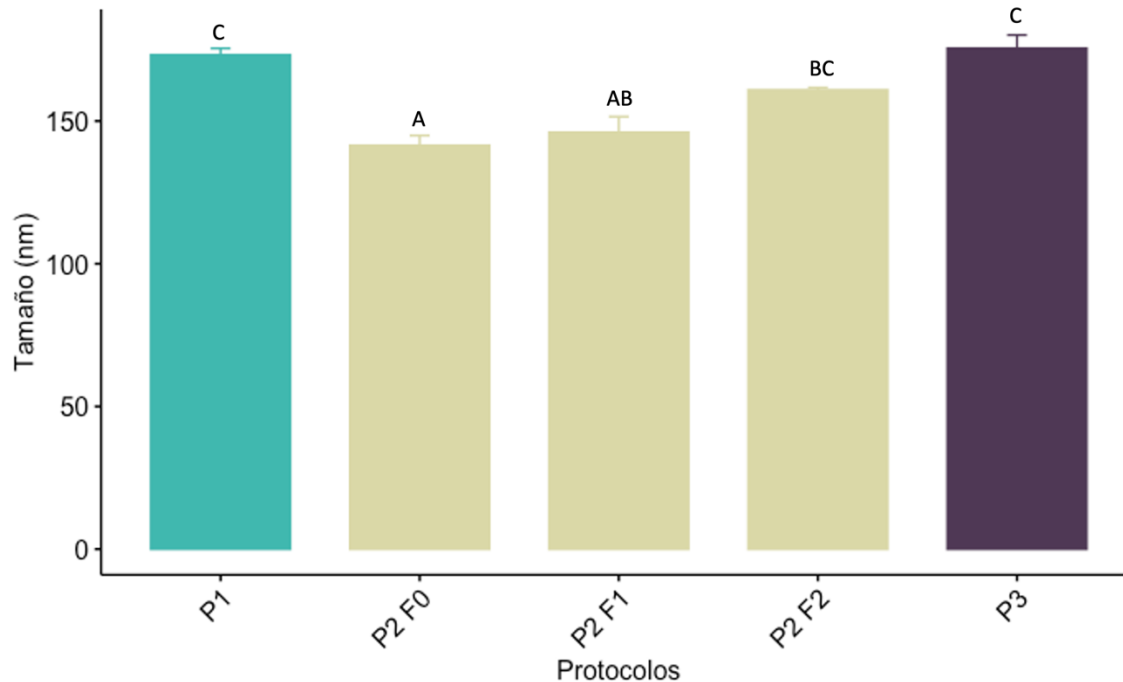


Figura 8. Gráfico de barras del tamaño promedio (nm) de partículas aisladas con cada protocolo a partir del medio de cultivo de embriones bovinos producidos *in vitro* y cultivados de forma individual desde mórula hasta estadio de blastocisto. P1: Ultracentrifugación; P2 F0: Optiprep fracción 0 con menor densidad (entre 1,065 g/cm³ y 1,097 g/cm³); P2 F1: Optiprep con densidad similar a exosomas (entre 1,097 g/cm³ y 1,150 g/cm³); P2 F2: Optiprep fase 2 con densidad similar a cuerpos apoptóticos (entre 1,150 g/cm³ y 1,255 g/cm³); P3: ultrafiltración con filtro Amicon (100 kDa, 500 µL). Letras distintas representan diferencias significativas entre los protocolos, utilizando la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Caracterización de EVs derivadas de medios de embriones Pre-implantatorios cultivados individualmente mediante los protocolos P2 y P3

Dado que el P2 presentó la mayor cantidad de partículas en la F1 y F2, y la densidad correspondiente a exosomas está en la F1, se procedió a caracterizar esta fracción del protocolo 2. Para esto se fecundaron 963 ovocitos. Los presuntos cigotos fueron cultivados hasta el día 5 de desarrollo *in vitro*, momento en el que se seleccionaron los embriones en estadio de mórula. La eficiencia de desarrollo hasta este estadio fue del 45,3%. Las mórulas colectadas fueron cultivadas individualmente en medio depletado de EVs. De las mórulas seleccionadas el 34,4% (n=150) se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto. Los blastocistos y sus respectivos medios fueron

individualmente colectados para posteriores análisis. Se aislaron las nanopartículas de los medios de cultivos, las cuales fueron caracterizadas mediante NTA, TEM y presencia de marcadores proteicos tanto de superficie como de membrana.

Los resultados de NTA mostraron que las nanopartículas aisladas del medio de cultivo de los embriones tuvieron un tamaño promedio de 171,4 +/- 12,6 nm y una concentración promedio de $2,39 \times 10^9$ +/- $2,05 \times 10^8$ (partículas/mL) (Figura 9a). Las imágenes de TEM permitieron la identificación de nanopartículas con una morfología correspondiente a vesículas extracelulares, donde se identifica la presencia de una membrana lipídica (Figura 9b). La identificación de marcadores proteicos CD9 y ALIX mediante WB permitió la confirmación de la presencia de EVs en el medio de cultivo embrionario (Figura 9c).

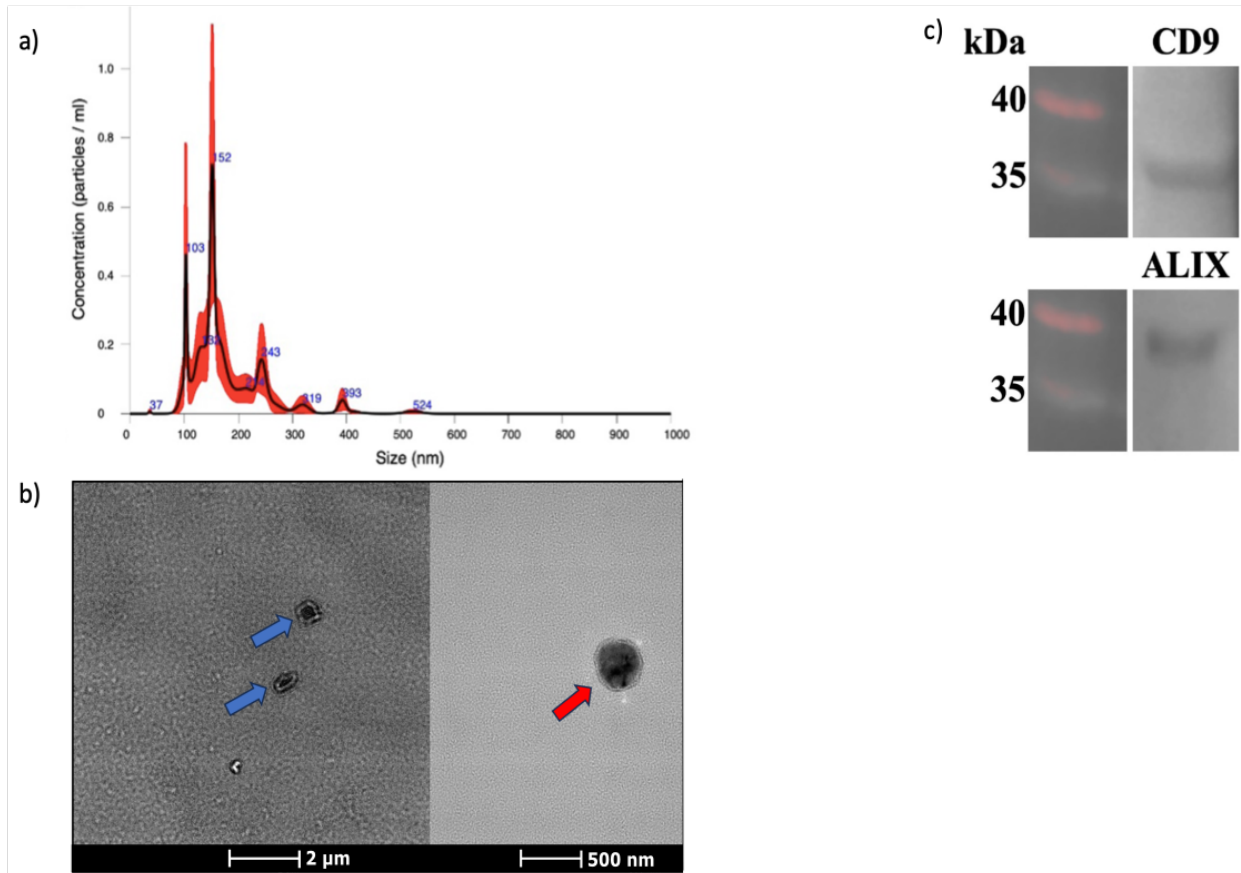


Figura 9. Caracterización de las EVs derivadas de embriones bovinos aisladas por Optiprep (P2, F1). a) Concentración, tamaño y distribución promedio de las nanopartículas (EVs). b) Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión, visualizando una forma típica correspondiente a vesículas extracelulares. En azul se observan dos vesículas separadas y en rojo una EV aumentando la magnitud óptica. c) Western blot de EVs aisladas desde el medio de

cultivo de embriones bovinos mostrando la identificación de marcadores de EVs como CD9 (arriba) y ALIX (Abajo). A la izquierda se observa el patrón de peso molecular (Ladder).

Las nanopartículas que fueron aisladas mediante Amicon (P3) también fueron identificadas como EVs mediante su visualización directa con TEM (Figura 10a), presentando una forma típica de vesícula rodeada por una bicapa lipídica, su composición proteica mediante WB, presentando proteínas canónicas como CD9, TSG101 y Alix (Figura 10b). Los resultados de NTA indicaron un promedio de tamaño de partículas de 158 +/- 3,6 nm y una concentración de $6,91 \times 10^9 \pm 3,84 \times 10^8$ partículas/mL (Figura 10c).

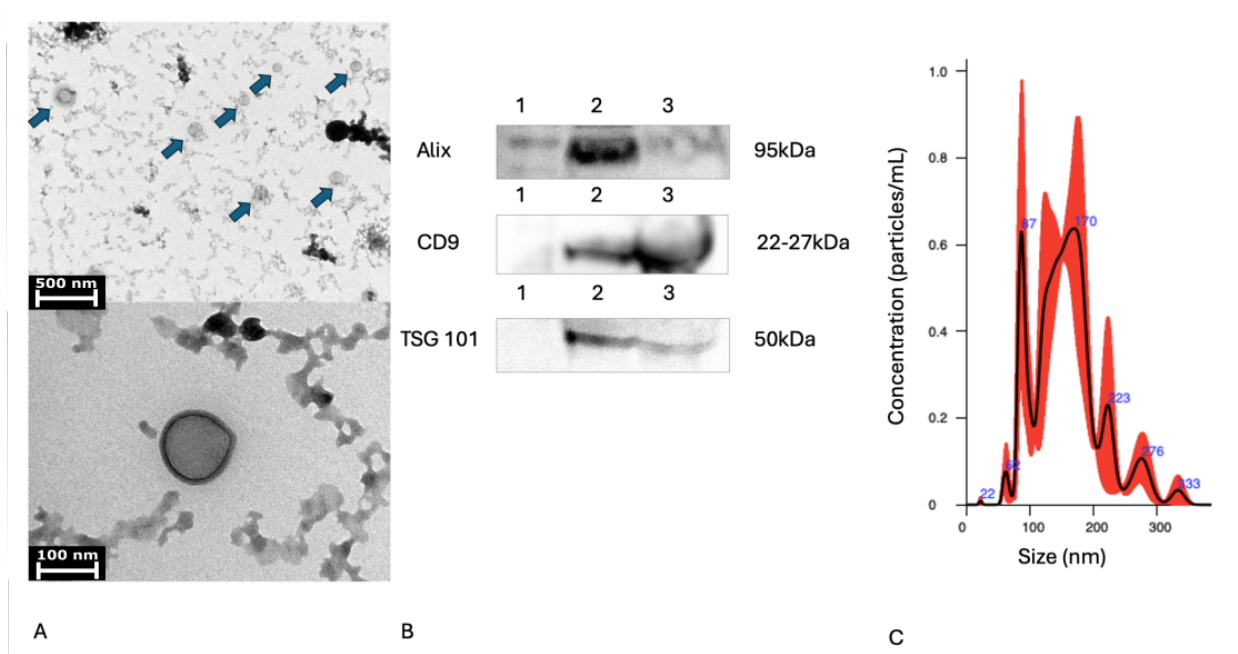


Figura 10. Caracterización de EVs aisladas mediante el P3. (A) Microscopía electrónica de transmisión. En la parte superior se muestran las EVs en aumento menor, señaladas por flechas azules, que luego fueron magnificadas en la imagen inferior. (B) Análisis de proteína mediante Western Blot (Alix, CD9 y TSG101) con sus respectivos pesos moleculares. 1: Peso molecular (Ladder), 2: EVs aisladas mediante P3 desde embriones bovinos, 3: Control positivo (EVs aisladas desde sobrenadante de cultivo de fibroblastos equinos). (C) Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), mostrando la distribución del promedio de 3 réplicas técnicas. El área de la curva de color rojo representa el error estándar de las réplicas.

Determinación de la presencia de ADN en vesículas extracelulares liberadas por embriones bovinos pre-implantatorios cultivados individualmente

Luego de la caracterización de los protocolos P2 y P3, se procedió a identificar la presencia de ADN embrionario en las EVs liberadas, llevando a cabo distintos métodos para tal propósito.

La primera manera de determinar la presencia de ADN fue mediante electroforesis capilar o sistema de TapeStation de Agilent. Para esto, se utilizaron 12 muestras de EVs derivadas de cultivo independiente, de las fracciones F1 y F2, correspondientes a la densidad específica de las poblaciones de exosomas y cuerpos apoptóticos, respectivamente, bajo el protocolo P2. De las 12 muestras, en solo 6 se logró la cuantificación por electroforesis, 4 para el caso de las F1, con un promedio de 0,117 ng/μL de concentración total de ADN, en comparación con 0,466 ng/μL de la fracción F2, con tamaños mayoritariamente entre los 100 y 400 pb, identificando una población de ADN de pequeños tamaños (Figura 11).

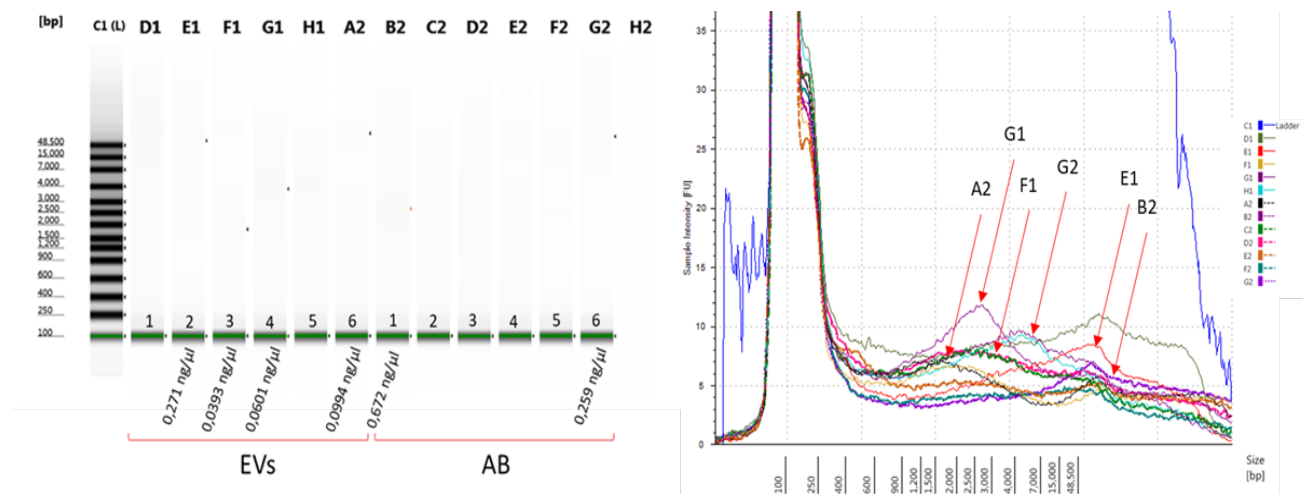


Figura 11. Análisis de ADN mediante sistema Bioanalyzer TapeStation correspondiente a las fracciones F1 y F2 del protocolo P2. En la primera imagen (izquierda) se muestran las concentraciones de ADN para cada una de las muestras (Eje X: Ladder, tamaño en bp; pares de bases) mientras que en la siguiente imagen (derecha) se ve el histograma de tamaños para cada una de las muestras (Eje Y: Intensidad de fluorescencia, eje X: tamaño de las muestras en pares de bases; bp).

Además, se utilizaron beads de látex acopladas a las EVs, las que fueron teñidas con PI, para finalmente ser evaluadas mediante citometría de flujo, como otro método para la identificación de ADN en EVs. Previo a la tinción con PI, las EVs fueron tratadas con ADNasa I para eliminar el ADN acoplado en el exterior de las vesículas. Las muestras resultaron ser positivas en un 7,4% respecto al control sin EVs, que resultó en un 1,34% de positividad. Esto representa otro indicador de la presencia de ADN al interior de las EVs (Figura 12c y b, respectivamente).

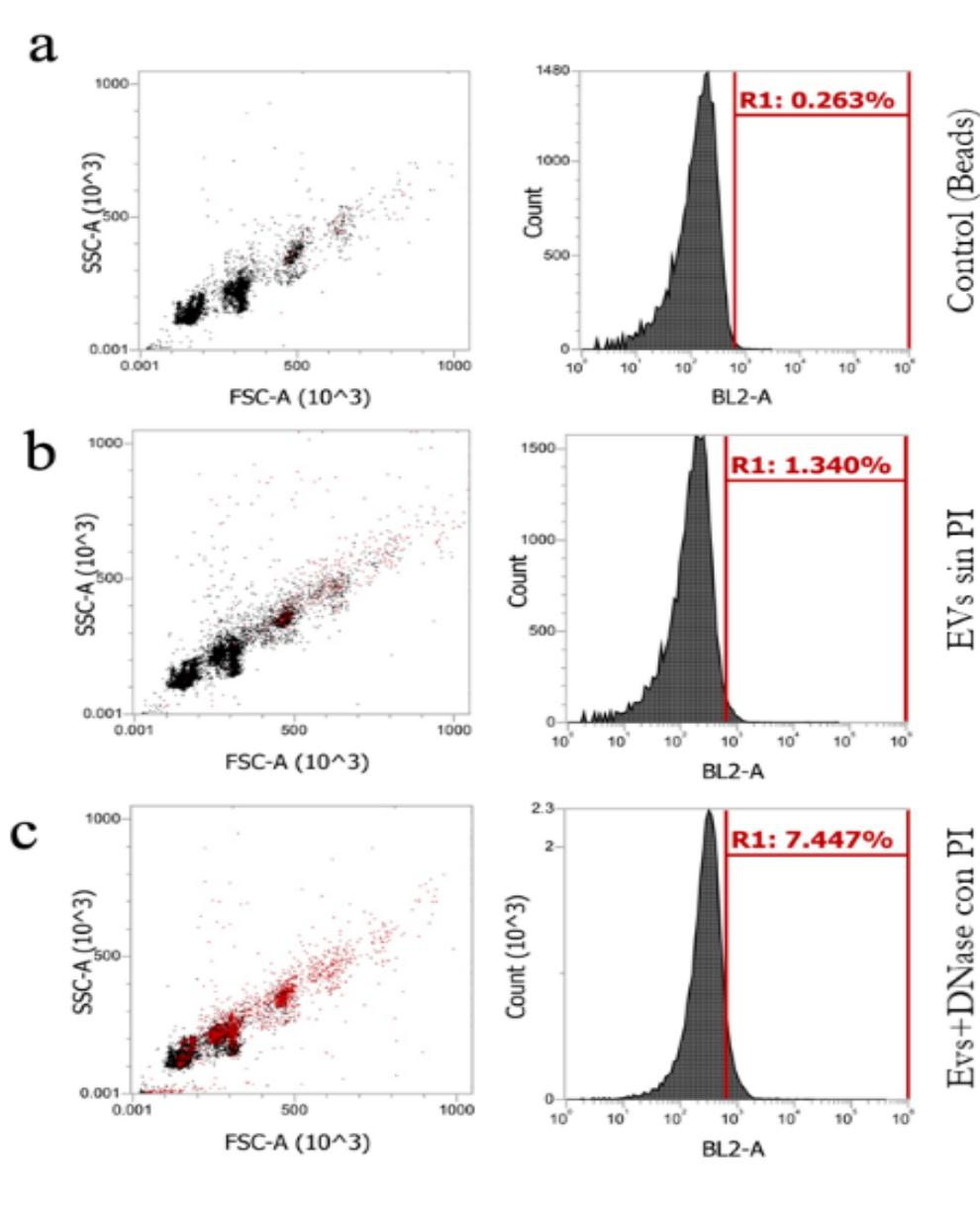


Figura 12. Detección de ADN mediante citometría de flujo de EVs teñidas con yoduro de propidio (PI) a través del acoplamiento con beads de látex. a) Citometría de flujo de beads de látex sin

tinción con PI y sin EVs. b) EVs acopladas a beads sin tinción con PI. c) Muestra de EVs acopladas a beads de látex tratadas con tinción de PI por 30 min.

Posteriormente se determinó la concentración absoluta de ADN a través de una curva de fluorescencia mediante un kit comercial. Para esto se utilizaron 14 muestras de EVs derivadas de medios de embriones cultivados individualmente. El promedio de la concentración de ADN fue de 53,51 ng/ μ L, siendo la máxima medición de 65,32 ng/ μ L, mientras que la mínima cantidad de ADN detectado en una muestra fue de 40,37 ng/ μ L. Se utilizaron como control negativo muestras de medio sin cultivo embrionario, resultando en una medición promedio de 13,64 pg/ μ L de ADN, menor a todas las mediciones de EVs.

Finalmente, otro grupo independiente de muestras fueron sometidas a un tratamiento con un marcador fluorescente específico para ADN, el cual es capaz de ser evaluado a través de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Los resultados mostraron un 4,2% (n= 50) de positividad con respecto al total de partículas analizadas sin el uso de filtro, lo que indicaría la carga de ADN en las EVs en un porcentaje de la población de partículas analizadas. La concentración total de partículas fluorescentes fue de $1,3 \times 10^7$ partículas/mL, menor a la concentración de partículas de las muestras de EVs sin tinción ($2,9 \times 10^8$ partículas/mL) ($p < 0,05$). Además, en conjunto con la positividad de las partículas, se observaron partículas de mayor tamaño (>400 nm), obteniéndose un promedio de 516,9 nm de diámetro (Figura 13a), en comparación con las partículas no tratadas con el agente fluorescente que solo midieron un promedio de 153,9 nm (Figura 13b) ($p < 0,05$).

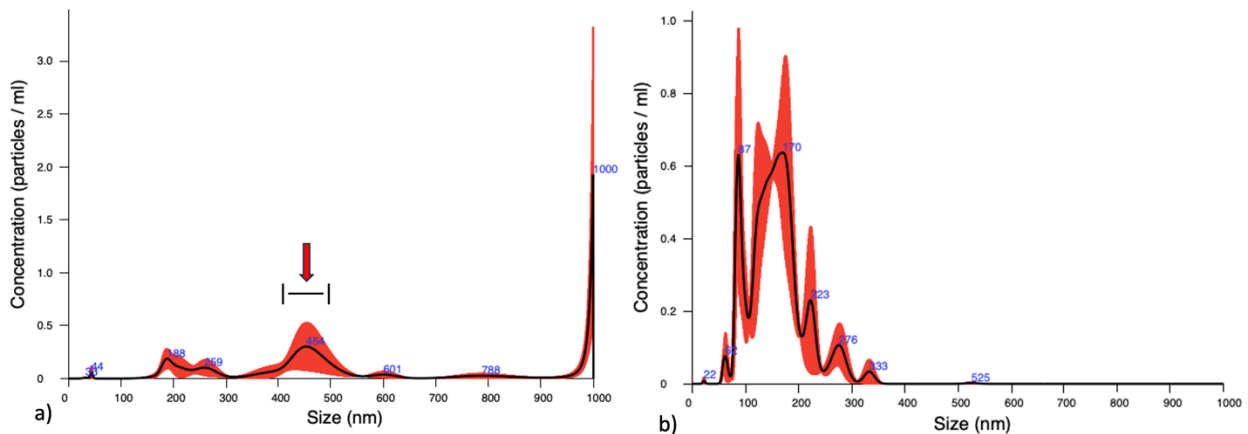


Figura 13. Gráfico de dispersión de un análisis de seguimiento de nanopartículas de vesículas extracelulares derivadas de embriones bovinos. a) El primer gráfico representa la disminución de

partículas al ser teñidas para la detección de ADN, con ioduro de propidio, además del claro aumento de tamaño (>400nm; flecha roja), en comparación con b) las partículas que no fueron teñidos con la fluorescencia, que presentaron una distribución normal en cuanto a concentración y tamaño.

Diagnóstico genético pre implantatorio mediante el uso de vesículas extracelulares liberadas por embriones bovinos producidos in vitro individualmente

Las muestras de EVs aisladas de los medios de cultivo de 11 blastocistos se dividieron en dos grupos y fueron sometidas, o no, a tratamiento con ADNsa I, con el objetivo de identificar el ADN presente exclusivamente en el interior de las vesículas y no en el exterior. En 10 de las muestras, el gen SAT1 (gen multicopia) fue amplificado con y sin el tratamiento mencionado, mientras que en la muestra número 7 la amplificación fue observada solo cuando la muestra no fue sometida a la enzima, sugiriendo que el ADN en esa muestra estaría fuera de la EV o no fue suficiente para ser detectado por este método (Figura 14). Este resultado indica la presencia de ADN en el interior de las EVs.

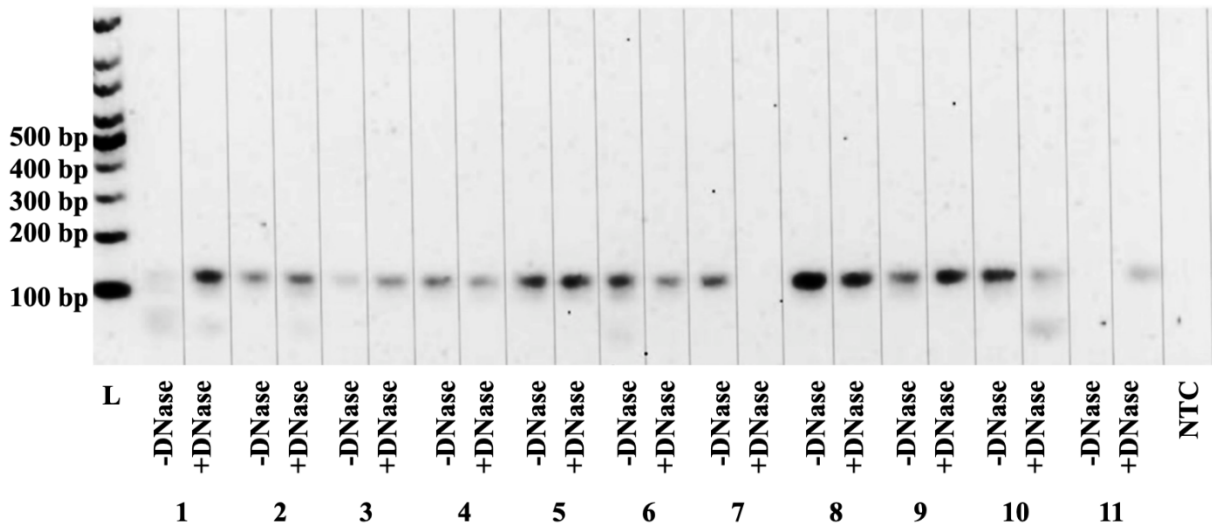


Figura 14. Gel de agarosa al 2% en el cual se observa el producto de la amplificación del gen SAT1 (123 bp) en cada muestra de EVs de 11 embriones las cuales fueron tratadas (+ADNase) o no con ADNasa I (-ADNase). NTC: Control negativo sin templado.

Adicionalmente, se realizó un análisis de 12 muestras independientes de EVs de medio de cultivo y su respectivo embrión para analizar la concordancia y la sensibilidad para la definición del sexo

mediante la amplificación del gen SRY (Figura 15a). Tres embriones fueron definidos como macho por la amplificación del gen SRY pero solo se observó amplificación en una muestra de EVs de estos embriones (Figura 15a: panel superior corresponde al embrión, panel inferior muestra de EVs). En ninguna de las muestras de EVs de embriones hembras se obtuvo amplificación de este gen ligado al cromosoma Y. Cuando se consideraron tanto las hembras como los machos, se obtuvo un 83,3% de concordancia entre embriones y sus respectivas EVs. Sin embargo, cuando se consideraron solo los embriones machos, se obtuvo un 33,3% de concordancia.

Posteriormente, se analizó la presencia de los genes MCM4 y CSN3 exclusivamente en las muestras de EVs, sin considerar las de embriones, en las mismas muestras anteriores. En este caso, se identificó amplificación inespecífica, en 8 de las 12 muestras evidenciándose una banda a la altura de 101 pb y 240 pb correspondientes a los productos esperados para MCM4 y CSN3, respectivamente (Figuras 15b y 15c, respectivamente). Las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12 fueron positivas al gen MCM4, mientras que las bandas de las demás muestras corresponden a productos inespecíficos, definido por la altura errónea de la banda. Para el caso del gen CSN3, las muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 11 fueron positivas, mientras que las demás muestras correspondieron a productos inespecíficos. Este resultado representa un 66,6% de positividad en ambos casos.

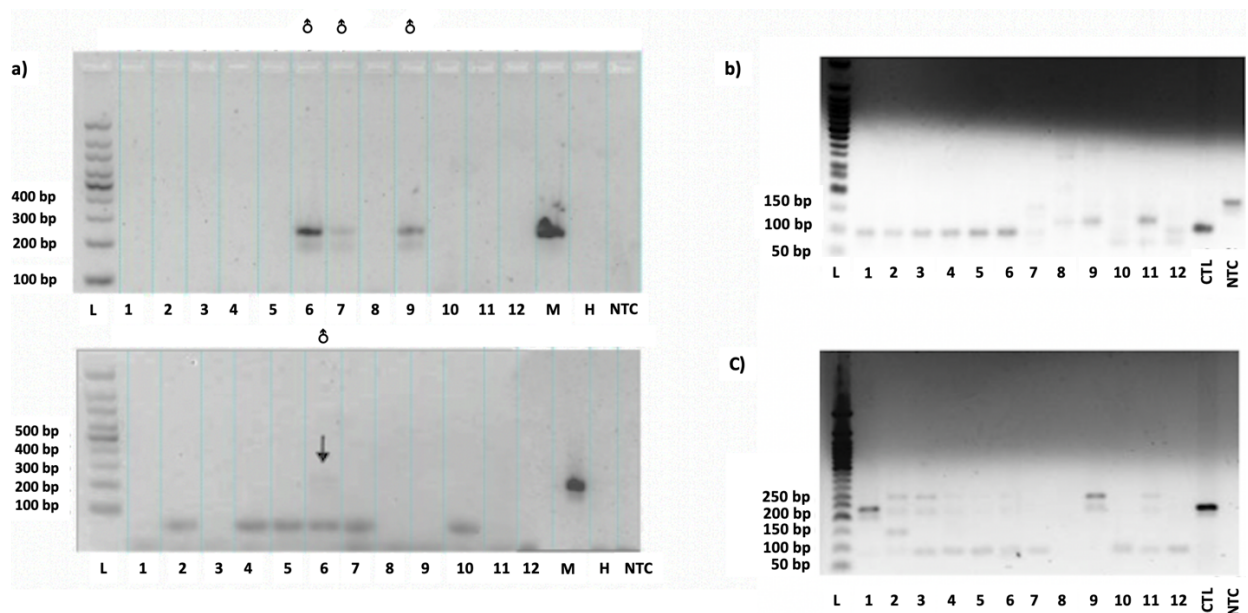


Figura 15. Geles de agarosa al 2% en los cuales se visualiza la amplificación mediante PCR de los genes: a) SRY (232 pb) en EVs (abajo) y sus respectivos embriones (arriba), además de los genes; b) MCM4 (101 pb) y c) CSN3 (240 pb) solo en EVs. CTL: Control positivo (ADN de

ovario bovino). NTC: Control negativo sin templado. M: Control positivo de macho (ADN de testículos bovinos) y H: Control positivo de hembra (ADN de ovario bovino).

El análisis de secuenciación de otro grupo de muestras independientes (n=5) permitió la identificación de 5.664 genes en total, siendo los genes más representados IL17RC (Interleukin 17 Receptor C), SEMA5B (Semaphorin 5B), ANKRD55 (Ankyrin Repeat Domain 55), DDAH1 (Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1), ADAM12 (ADAM Metallopeptidase Domain 12), LOC132344940 (Uncharacterized), PCDH15 (Protocadherin related 15), SCAF1 (SR-related CTD associated factor 1), SI (Sucrase-isomaltase) y TMEM132D (Transmembrane protein 132D). Además, se realizó un análisis de Gene Ontology para determinar genes involucrados en el desarrollo embrionario. Para la categoría de procesos biológicos, las subcategorías más significativas fueron: procesos del desarrollo, desarrollo de estructuras anatómicas y desarrollo de organismos multicelulares con un total de 674 términos en total. Para el caso de la categoría de componentes celulares, los términos más significativos fueron citoplasma, unión y proyección celulares con un total de 170 términos. La categoría función celular mostró que los términos más significativos fueron la unión proteica, unión iónica y la unión molecular pequeña con 128 términos totales.

Dentro de la categoría “Procesos biológicos” bajo el término “Desarrollo embrionario” (GO:0009790), se lograron encontrar los genes TJP1 (Tight junction protein-1) proteína encargada de la adhesión entre células endoteliales y epiteliales y PRLR (Prolactine receptor) el cual participa en la señalización de la adhesión blastocitaria, ambos genes dentro de la subcategoría “Formación del blastocisto”. Para la subcategoría “Diferenciación de células del trofoblasto”, se identificaron los genes CNOT2 (CCR4-NOT transcription complex subunit 2) involucrado en la regulación transcripcional, RBM46 (RNA binding motif protein 46) encargado de la regulación de mRNAs y la modulación de especies reactivas de oxígeno (ROS: por sus siglas en inglés), CNOT1 (CCR4-NOT transcription complex subunit 1) encargado de la regulación represiva transcripcional, y YAP1 (Yes1 associated transcriptional regulator) el cual desempeña una labor importante en el tamaño de órganos durante el desarrollo embrionario y la regeneración. Para la subcategoría “Eclosión blastocitaria” se encontraron los genes PPP4R4 (protein phosphatase 4 regulatory subunit 4) el cual desempeña un rol en los procesos de meiosis y mitosis embrionaria y el gen ST8SIA6 (ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6) el cual es expresado en

embriones y puede contribuir al desarrollo de células cancerígenas. Para la subcategoría "Especificación del patrón embrionario" se hallaron los genes MEIS2 (Meis homeobox 2) involucrado en la organogénesis, el gen MEIS1 (Meis homeobox 1) encargado del desarrollo vascular y hematopoyético, ZBTB16 (Zinc finger and BTB domain containing 16) involucrado en el desarrollo de las extremidades, sistema esquelético y neuronal, DOP1B (DOP1 leucine zipper like protein B) involucrado específicamente en patrones del desarrollo y por último el gen FGF10 (fibroblast growth factor 10) que codifica a una proteína de señalización la cual ayuda a del esqueleto, órganos y glándulas. Para la subcategoría "Desarrollo del blastocisto" se identificaron los genes N4BP2L2 (NEDD4 binding protein 2 like 2) el cual juega un rol importante en el desarrollo embrionario en el útero y el gen SPECC1 (sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1) estando presente en la formación y regulación de las uniones estrechas (tight junctions) durante la blastulación. Por último, para la categoría "gastrulación" se hallaron los genes EXT1 (exostosin glycosyltransferase 1) el cual es necesario para la formación de tejidos y comunicación celular, y el gen LMBRP1 (Limb Development Membrane Protein 1), que como su nombre lo dice, está relacionado con la formación de extremidades en varias especies animales y en el humano.

Luego de haber identificado los genes más representativos al interior de las EVs, se validaron 4 genes mediante PCR en tiempo real en EVs aisladas del medio de cultivo de 29 embriones cultivados individualmente. Los genes seleccionados fueron 1) IL17RC, el cual guarda una relación con el control de la respuesta inmune entre la comunicación embrio-materna, 2) RREB1, gen crítico para la mantención de la integridad epitelial durante la embriogénesis, 3) USP9Y, involucrado en la fertilidad masculina y la espermatogénesis, gen ligado al cromosoma Y, y por último el gen 4) ADAM12, gen involucrado en la miogénesis durante el desarrollo embrionario. Estos genes fueron utilizados dada su relación dentro del desarrollo embrionario y la alta representatividad encontrada, a excepción del gen USP9Y, el cual se observó bajamente representado y solo se utilizó con el propósito de la determinación del sexo en el diagnóstico embrionario.

Solo en el 13,79% de las muestras no se amplificó ninguno de los 4 genes, mientras que el 24,14%, 41,38%, 13,79% y el 6,90% de las muestras amplificó para uno, dos, tres o cuatro genes al mismo tiempo, respectivamente. Se amplificó el producto específico en 16 de las muestras de EVs para el gen IL17RC y 15 para RREB. Para ambos casos el Ct (Umbral de ciclo; cycle threshold) resultó

menor o igual al control positivo (Ct= 24,63 y 24,04, respectivamente), lo cual representa un 55,17% y un 51,72% de positividad respectivamente (Figura 16A y 16B).

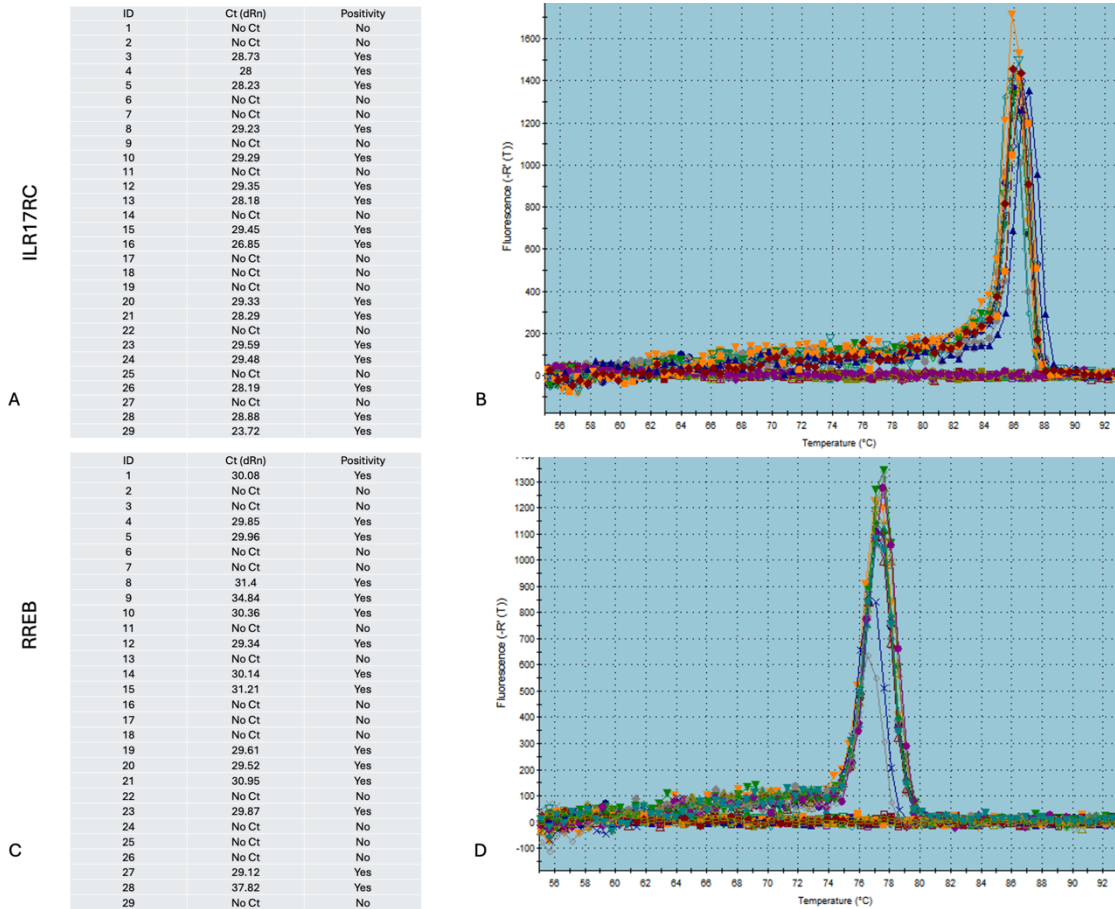
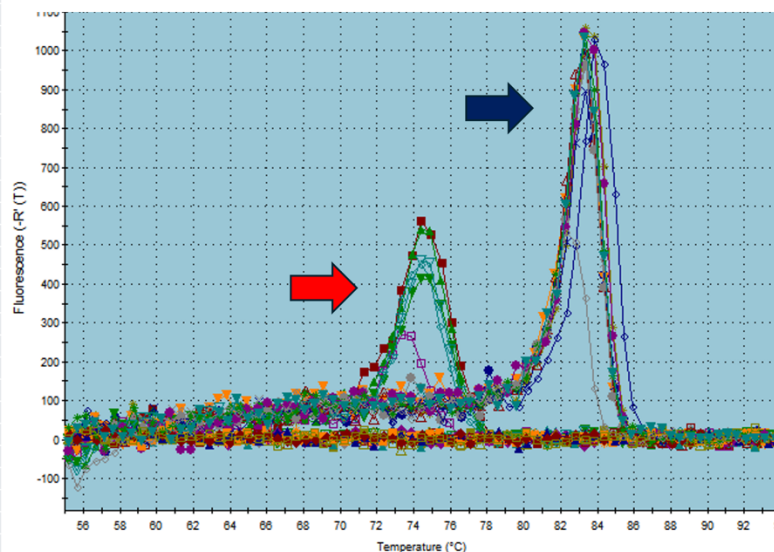


Figura 16. Umbral de amplificación (Ct) y positividad de acuerdo a la temperatura de melting (A,C) y curva de disociación (B,D) de los genes IL17RC (arriba) y RREB (abajo) en 29 muestras de EVs obtenidas desde medios de cultivo individuales de embriones bovinos pre implantatorios.

Para el caso del gen ADAM12, la amplificación de PCR en tiempo real mostró dos productos de melting distintos en ciertas muestras, aunque solo se identificó un producto específico para el caso del control positivo. 17 muestras de EVs presentaron detección de Cts, pero solo en 7 de ellas se obtuvo un producto específico similar al control positivo, representando una precisión de detección del 24,14% (Figura 17).

| ID | Ct (dRn) | Positivity |
|----|----------|------------|
| 1 | 27.88 | Yes |
| 2 | 27.6 | No |
| 3 | 26.46 | No |
| 4 | No Ct | No |
| 5 | 33.79 | Yes |
| 6 | 27.05 | No |
| 7 | No Ct | No |
| 8 | No Ct | No |
| 9 | 34.97 | Yes |
| 10 | No Ct | No |
| 11 | 37.09 | No |
| 12 | 27.27 | Yes |
| 13 | No Ct | No |
| 14 | 27.62 | No |
| 15 | 27.38 | No |
| 16 | 35.49 | No |
| 17 | 26.38 | Yes |
| 18 | No Ct | No |
| 19 | No Ct | No |
| 20 | No Ct | No |
| 21 | 37.6 | No |
| 22 | No Ct | No |
| 23 | 37.25 | Yes |
| 24 | 39.93 | No |
| 25 | No Ct | No |
| 26 | 27.13 | No |
| 27 | 27.64 | Yes |
| 28 | No Ct | No |
| 29 | No Ct | No |

A



B

Figura 17. Umbrales de corte (Cts) y su positividad (A) mediante la comparación con la curva de disociación del control positivo (B) del gen ADAM12 en 29 muestras de EVs derivadas de medios de embriones bovinos cultivados individualmente. La flecha roja esquematiza la discordancia entre una de las muestras y el control positivo. La flecha azul apunta hacia la concordancia entre el control positivo y 7 muestras de EVs.

Finalmente, se determinó la presencia del gen ligado al sexo USP9Y, dando como resultado la amplificación de 13 muestras de embriones (ID: 3, 6, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24 y 26). Cuando se analizaron las muestras de EVs correspondientes, en solo 3 (ID: 6, 9 y 12) se obtuvo amplificación específica, considerando la concordancia con el control positivo en cuanto a la curva de disociación (Figura 18). La eficiencia del PCR en detectar machos mediante las EVs fue del 23,08% (3 muestras de EVs positivas de 13 embriones machos). Sin embargo, ninguna de las muestras de EVs correspondientes a embriones hembras fue amplificada, obteniéndose un 60,52% de concordancia del sexo entre embriones y el análisis de sus respectivas EVs (19 de 29 muestras en total).

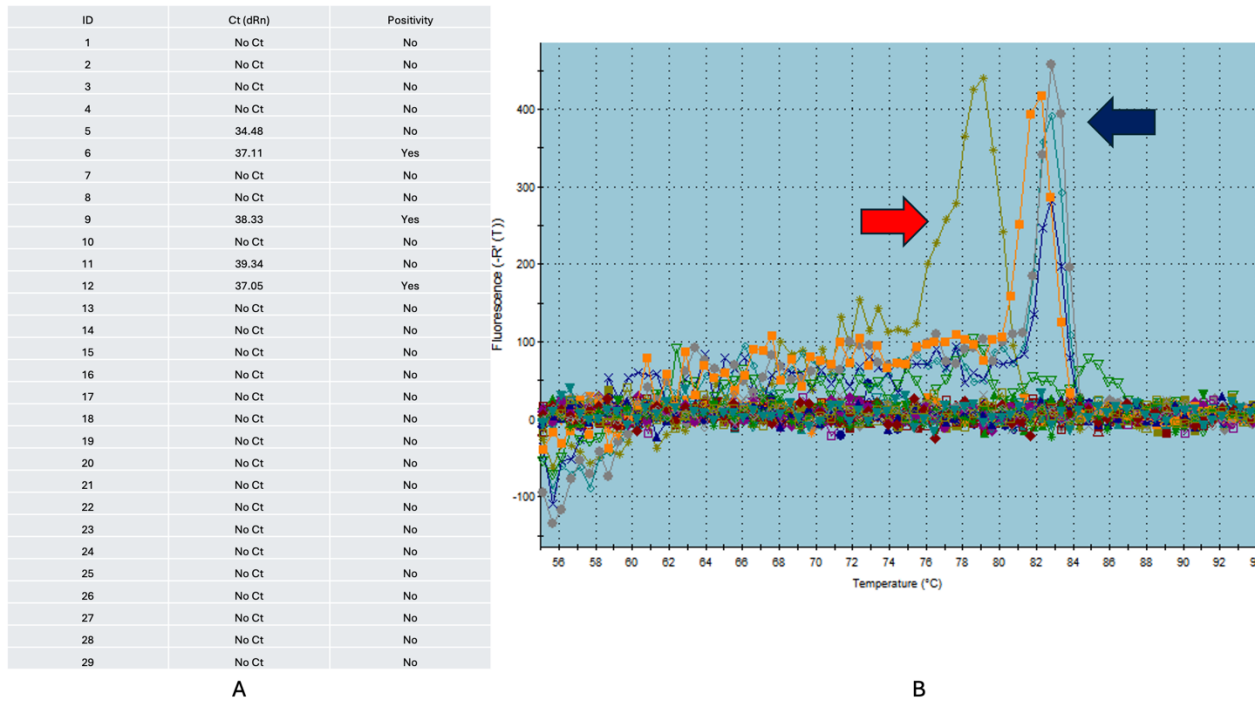


Figura 18. Umbral de ciclo (Ct) y la correspondiente positividad al compararse las muestras con el control positivo, en términos de temperatura de melting (A) y la respectiva curva de disociación (B) del gen USP9Y en 29 muestras de EVs obtenidas a partir de cultivo individual de embriones bovinos pre implantatorios. La flecha roja indica la diferencia de curvas entre una muestra y el control positivo, mientras que la flecha azul apunta hacia las 3 muestras de EVs positivas en conjunto con el control positivo.

2. Resultados asociados a los objetivos específicos N.º 2 y 3:

Determinación de la tasa de apoptosis embrionaria

Para evaluar la correlación entre la tasa de apoptosis embrionaria, como medida de competencia y viabilidad, y la cantidad de ADN, ya sea a través de su cuantificación directa por fluorescencia o indirecta por seguimiento de nanopartículas, se utilizaron 66 mórulas con sus respectivas EVs aisladas desde cultivo individual, las cuales se desarrollaron desde el día 5 al 7. En este experimento además se incluyeron dos tecnologías de producción de embriones *in vitro*: partenogénesis y fecundación *in vitro*, siendo los embriones derivados de la primera menos competentes por definición.

Para el caso de la producción por partenogénesis, solo 8 mórulas alcanzaron el desarrollo de blastocisto, representando un 10,5% de tasa de blastocisto, en comparación con los embriones producidos por FIV, tecnología que alcanzó un 12,4% de tasa de blastocisto, lo que correspondió a 22 embriones desarrollados. Si bien se observó una leve tendencia a presentar mayor tasa de blastocisto aquellos embriones que fueron producidos a través de FIV, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). En casi todos los embriones (a excepción de uno, 65/66 embriones) se visualizó al menos una célula en apoptosis mediante microscopía luego de la tinción con TUNEL (Figura 19). No existió relación entre la tecnología empleada para la producción de embriones y la tasa de apoptosis embrionaria.

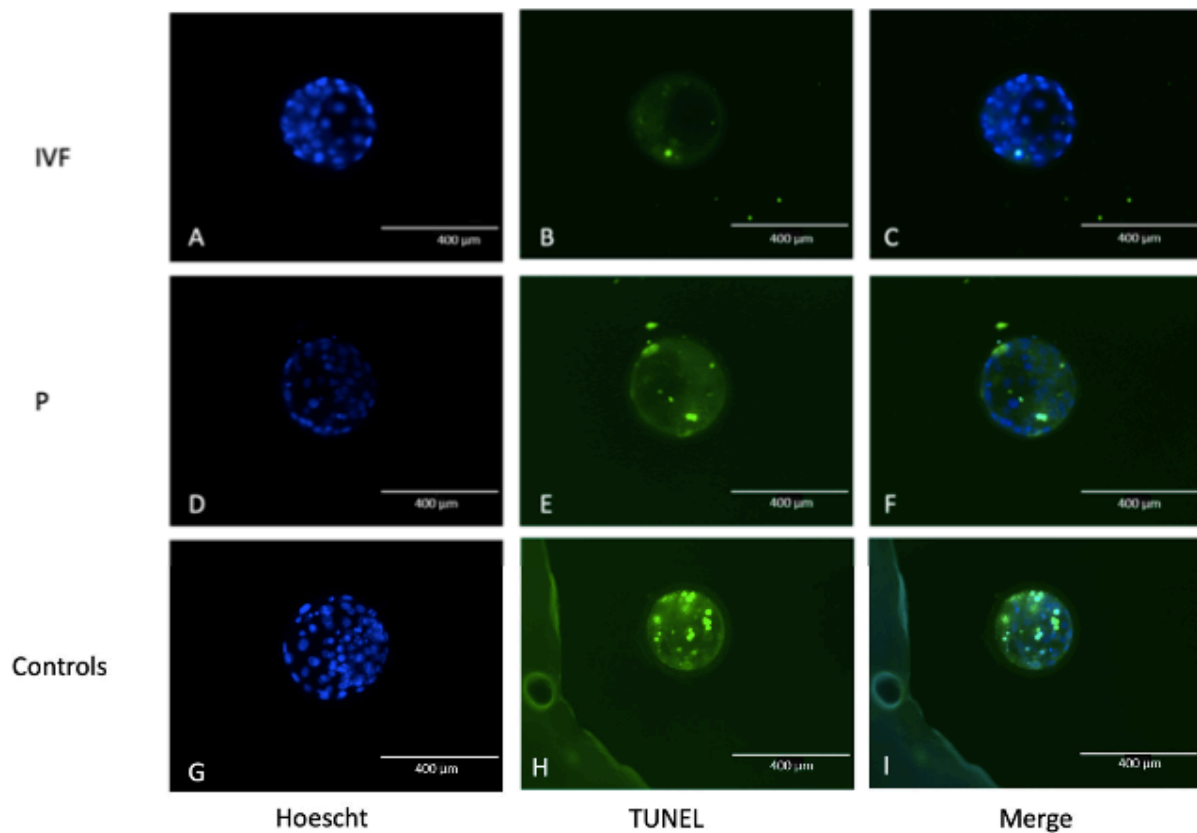


Figura 19. Imagen representativa de embriones bovinos con 7 días de desarrollo marcados con tinción final de corte de dUTP Terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL), evidenciando células embrionarias en apoptosis. IVF: embriones fecundados *in vitro* (A-C), P: Embriones partenogénéticos (D-F). (A,D,G) Tinción Hoechst. (B,E,H) Tinción TUNEL. (C,F,I) Combinación (Merge) de la tinción TUNEL y Hoechst. Control positivo con ADNasa I (H,I). Las barras de color blanco representan 400 µm de tamaño.

Independiente de la tecnología utilizada, o el desarrollo embrionario, los embriones presentaron en promedio 8,01 +/- 5,94 células en apoptosis y una tasa de apoptosis del 25,97% +/- 20,55%. Sin considerar la tecnología empleada para la producción de embriones, el grado de apoptosis embrionaria resultó ser mayor en mórulas que en blastocistos, consistente con el bloqueo del desarrollo en mórulas (Figura 20).

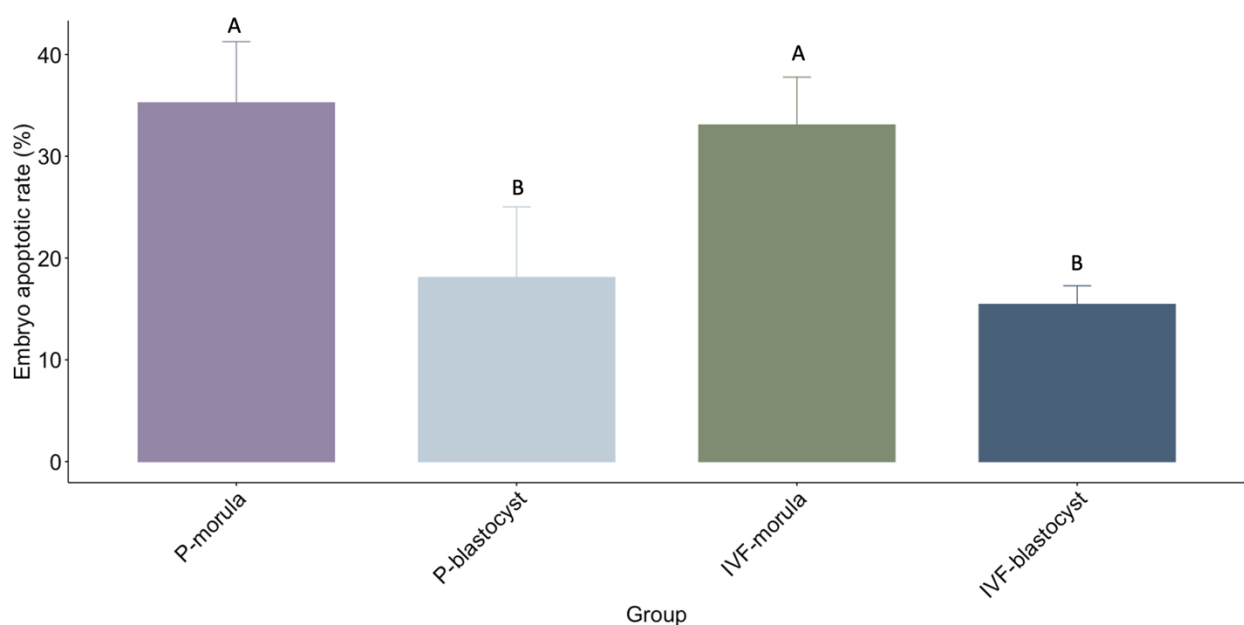


Figura 20. Gráfico de barras esquematizando la tasa de apoptosis embrionaria de los 4 diferentes grupos: P: Mórulas y blastocistos producidos por partenogénesis, e IVF: mórulas y blastocistos producidos por fecundación *in vitro*. Letras distintas representan diferencias significativas entre los grupos, utilizando la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Caracterización de vesículas extracelulares para el análisis de ADN mediante espectrofotometría y NTA

Para determinar la naturaleza de las nanopartículas aisladas, éstas fueron caracterizadas a través de la evaluación de su morfología, la presencia de marcadores proteicos clásicos y su tamaño y concentración de partículas, para su definición como EVs. Las EVs, independiente del tipo de producción del cual se aislaron, presentaron a la microscopía electrónica de transmisión una morfología típica y clásica de vesícula, visualizándose una bicapa lipídica (Figura 21A y B). En

cuanto al análisis proteico a través de Western Blot, ambos grupos mostraron la presencia de las proteínas Alix, CD9 y TSG101, marcadores canónicos de EVs, mientras que APOA1 se encontró ausente, lo que indica la pureza de las muestras y la efectividad del método de aislamiento (Figura 21C).

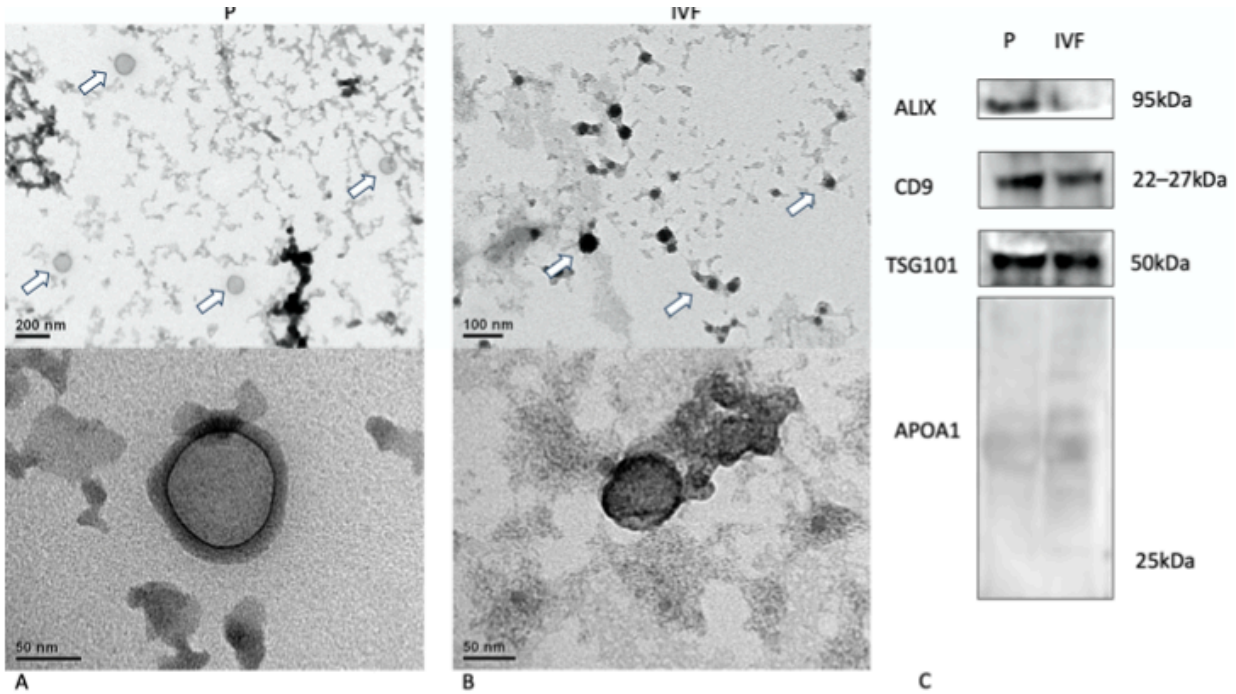


Figura 21. (A,B) Las imágenes superiores corresponden a EVs aisladas desde medios de cultivo de embriones producidos por partenogénesis (izquierda) e IVF (derecha), en un aumento menor, donde son apuntadas con flechas y magnificadas en las imágenes inferiores. (C) Western Blot de marcadores proteicos de EVs (ALIX, CD9 y TSG101) y de pureza (ausencia de APOA1), en ambos tipos de producción de embriones; P: Partenogénesis y IVF: Fecundación *in vitro*.

Análisis de contenido de ADN al interior de vesículas extracelulares mediante espectrofotometría y NTA

Cuando se consideraron todos los grupos, las EVs presentaron un tamaño promedio de partículas de 147,62 +/- 16,77 nm con una concentración promedio de 8,84 x 10⁹ +/- 4,1 x 10⁹ partículas/mL, sin ningún tipo de tinción (Figura 22A). Sin considerar el grado de desarrollo embrionario alcanzado, los embriones que fueron producidos por IVF presentaron en promedio un mayor tamaño de partículas en comparación con aquellos que fueron producidos por partenogénesis. Aquellas vesículas que fueron aisladas desde la producción a través de partenogénesis presentaron

una mayor concentración de nanopartículas, en comparación con los grupos de IVF. Todas las muestras luego de ser teñidas para la detección de ADN a través de fluorescencia por NTA mostraron un porcentaje de positividad, además, al visualizar el histograma, se logra observar una población de mayor tamaño (sobre los 400 nm de diámetro), en comparación con aquellas vesículas no teñidas (Figura 22B). Solo un pequeño porcentaje (4 +/- 2,9%) del total de nanopartículas fueron positivas a la tinción específica de ADN. No se observaron diferencias significativas para la concentración de partículas positivas a ADN entre los grupos (Tabla 4).

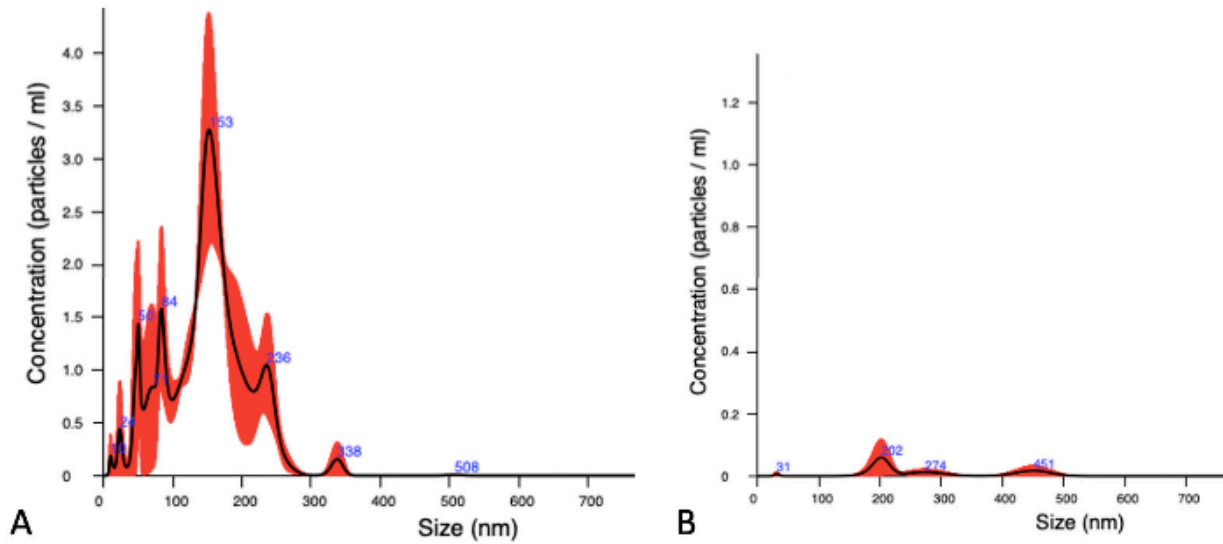


Figura 22. Tamaño, distribución y concentración de EVs liberadas por embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro* y por partenogénesis sin tinción de ADN (A) y con tinción de ADN (B). El gráfico representa el promedio de 3 replicas técnicas, basadas en el diámetro y distribución de la concentración de las nanopartículas.

Tabla 4. Mediana del tamaño y concentración de distintas poblaciones de EVs secretadas por embriones producidos por fecundación *in vitro* y por partenogénesis durante la blastulación. EVs totales y EVs positivas a la tinción de ADN.

| Group | n | EVs | | DNA-Positive EVs | |
|------------|----|-------------------|--|-------------------|--|
| | | Size, nm (x; IQR) | Concentration of Particles/mL (x; IQR) | Size, nm (x; IQR) | Concentration of Particles/mL (x; IQR) |
| Morula-P | 18 | 143.0; 28.0 a | 12.0; 4.8×10^9 a | 457.8; 96.2 | 2.8; 3.9×10^8 |
| Blasto-P | 8 | 141.0; 12.0 a | 11.1; 7.71×10^9 a | 513.2; 52.2 | 3.6; 3.4×10^8 |
| Morula-IVF | 18 | 150.6; 21.1 b | 6.0; 3.40×10^9 b | 478.7; 198.0 | 2.5; 1.7×10^8 |
| Blasto-IVF | 22 | 154.5; 18.2 b | 6.5; 3.85×10^9 b | 437.5; 169.9 | 2.3; 2.7×10^8 |

Diferentes letras (a y b) en la misma columna representan diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). Las comparaciones fueron hechas entre los grupos para cada parámetro. \bar{x} representa la mediana del diámetro de las EVs o su concentración. IQR: rango intercuartil.

Además, se determinó la concentración absoluta de ADN presente en las EVs, para ser correlacionada con la tasa de apoptosis embrionaria. En cada una de las muestras analizadas, la concentración de ADN fue mayor al ADN detectado en los medios de cultivo sin embriones, mostrando un promedio de $13,64 \text{ pg}/\mu\text{L}$. La mayor concentración de ADN fue encontrada en las mórulas que fueron producidas por partenogénesis, con un promedio de $108,27 \pm 66,82 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($p < 0,05$), mientras que en los demás grupos no hubo diferencias significativas. La mediana de la concentración de ADN y su rango intercuartil para cada grupo fue presentado en la Figura 23. La concentración de ADN para los embriones producidos por IVF fue de $62,34 \pm 14,18 \text{ pg}/\mu\text{L}$ y de $73,50 \pm 22,95 \text{ pg}/\mu\text{L}$, en mórulas y blastocistos, respectivamente. Por último, el promedio de ADN de los blastocistos producidos por partenogénesis fue de $50,66 \pm 28,28 \text{ pg}/\mu\text{L}$.

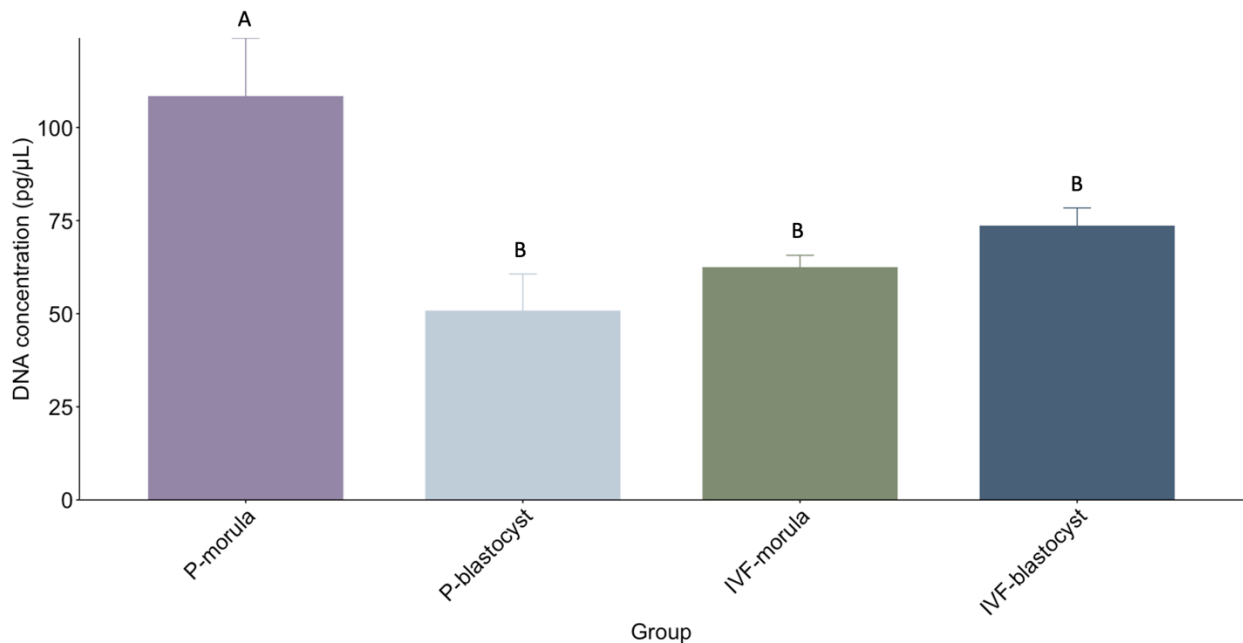


Figura 23. Gráfico de barras del promedio de concentración de ADN ($\text{pg}/\mu\text{L}$) en embriones de 4 diferentes grupos: P: Mórulas y blastocistos producidos por partenogénesis, e IVF: mórulas y blastocistos producidos por IVF. Letras distintas representan diferencias significativas entre los grupos, utilizando la prueba post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Determinación de la correlación entre la tasa de apoptosis embrionaria y contenido de ADN al interior de vesículas extracelulares

Se realizó un análisis de correlación para determinar si existía un efecto entre la tasa de apoptosis embrionaria con cualquiera de las demás variables, ya sea, las características poblacionales de las EVs sin tinción (Tamaño y concentración) o el contenido de ADN en las EVs (EVs positivas a ADN mediante tinción y concentración total de ADN). Sorprendentemente, la tasa de apoptosis embrionaria (determinada por el cociente entre las células embrionarias en apoptosis y las células totales, expresado en porcentaje) no presentó ninguna relación significativa con ninguna de las demás variables. Sin embargo, se identificó una correlación entre la concentración de EVs y la concentración de EVs con tinción de ADN, además de una relación entre la concentración de EVs no teñidas con la concentración absoluta de ADN. Por último, se observó una correlación entre las EVs positivas a ADN mediante tinción y la concentración de ADN al interior de éstas ($p < 0,05$) (Figura 24). Esto indica que el ADN en las EVs, ya sea a través de la medición por tinción en NTA o por cuantificación por espectrofotometría, aumenta acorde a la concentración de partículas. También, se identificó una leve tendencia ($p = 0,05$) en los embriones con menor tasa de apoptosis a presentar una mayor concentración de EVs positivas a ADN mediante la medición por tinción en NTA. Por último, la concentración de ADN en las EVs en blastocistos producidos por IVF fue independiente a la tasa de apoptosis.

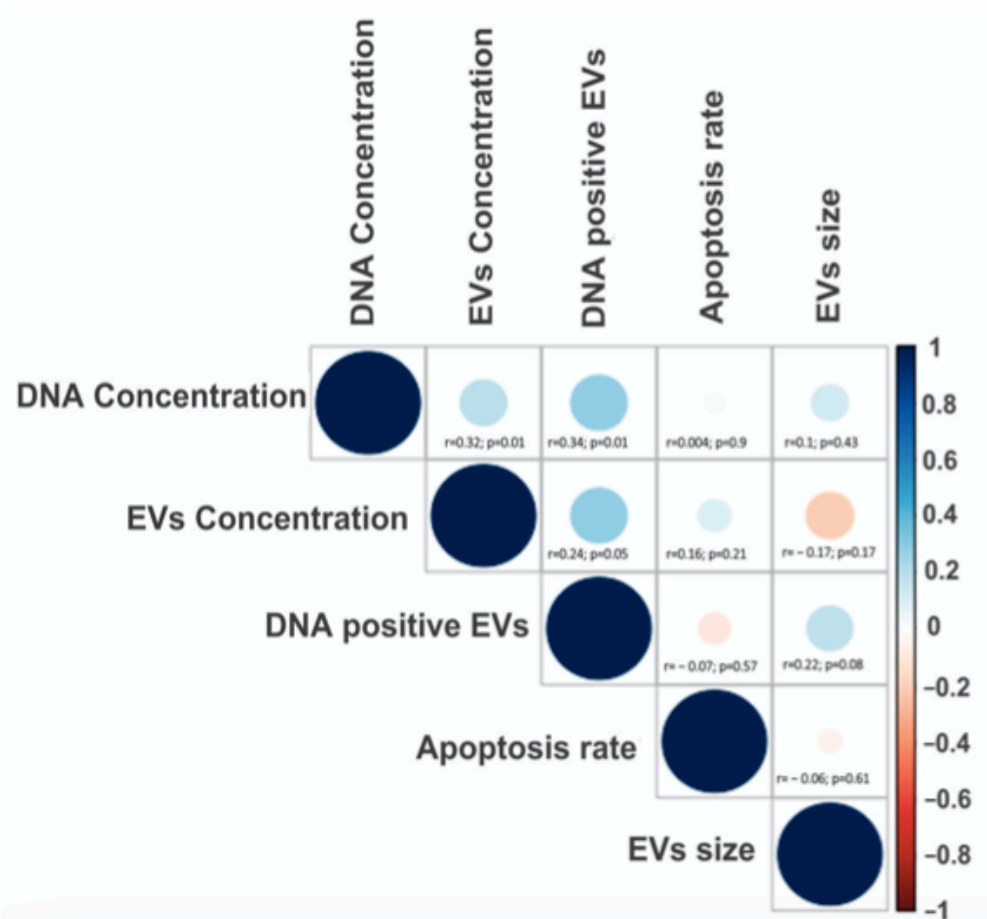


Figura 24. Matriz de correlación de Spearman con todas las variables estudiadas desde los experimentos de embriones bovinos independiente del tipo de producción. El gráfico muestra una relación positiva o negativa entre las variables. Círculos azules representan una correlación positiva, mientras que los círculos rojos representan correlaciones negativas. Para cada intersección el coeficiente de correlación (r) y el valor de p fueron incluidos en los recuadros correspondientes.

VI. DISCUSIÓN

Al realizar el aislamiento de EVs con diferentes protocolos se logró demostrar que estos poseen diferencias en cuanto a tamaño y concentración de partículas. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, por lo que, a la hora de decidir el mejor método de aislamiento vesicular, se evaluaron también otros factores como la reproducibilidad del protocolo y el tiempo total del procedimiento completo. Por ejemplo, para el caso del P1 (ultracentrifugación) y el P2 (Gradiente de densidad), estos son más demandantes en tiempo en comparación con el protocolo 3, el cual utiliza ultrafiltración con filtro Amicon. Este último método permite el aislamiento de nanopartículas en minutos, lo que reduciría el tiempo de diagnóstico genético embrionario. Investigaciones previas han demostrado que diferentes protocolos de aislamiento de EVs, conllevan a diferencias en cuanto a calidad y cantidad de ADN obtenido (Théry et al., 2018). Aunque la ultracentrifugación sigue siendo el método más utilizado a la hora de aislar EVs, algunos estudios han demostrado que la ultrafiltración con filtros de membrana tangenciales permite obtener EVs con mayor pureza (Momen-Heravi et al., 2012). Los resultados de este trabajo coinciden con este planteamiento, ya que este protocolo nos permitió aislar EVs sin contaminantes (ausencia de APOA1) y su utilización para el diagnóstico genético. Al caracterizar los protocolos P2 y P3, los resultados mostraron similitudes en cuanto a concentración, tamaño, morfología y marcadores proteicos en las EVs con otros estudios similares, ya sea en la misma especie bovina (Mellisho et al., 2017) así como también en otras especies, como en ratones (B. Simon et al., 2020), porcinos (Saadeldin et al., 2014b) e incluso humanos (Makieva et al., 2024).

El contenido molecular al interior de las EVs embrionarias ha sido estudiada durante años, el cual siempre ha sido mayormente enfocada en RNAs, dado su rol en la regulación de la expresión génica, para el caso de los miRNAs, por consecuente su rol en la comunicación entre células. Este contenido de miRNAs en embriones pre-implantatorios varía de acuerdo con la competencia embrionaria, lo que validaría el uso de EVs (y su contenido) como medida de la competencia embrionaria (Mellisho et al., 2017, 2019b; Melo-Baez et al., 2020). Sin embargo, estas EVs además de contener RNAs, contienen ADN en su interior (Kahlert et al., 2014b; Latifkar et al., 2019). Los primeros reportes sobre la liberación de ADN mediante vesículas demostraban que este era liberado al espacio extracelular como medida de desecho de ADN dañado. Es más, el ADN es

más abundante en EVs derivadas desde células cancerígenas, cuando esto es comparado con células en condiciones fisiológicas normales, representando un marcador para condiciones patológicas (Takahashi et al., 2017). Es por esto, que las EVs han estado relacionadas con procesos patológicos, también promoviendo la progresión tumoral y la metástasis (Bebelman et al., 2018; Shimoda et al., 2019).

Existe evidencia que indica que las EVs liberadas por embriones pre-implantatorios también contienen ADN. Esto justificaría la presencia de ADN en los medios de cultivo, recientemente usados para utilizarlos como métodos de diagnóstico genético en embriones humanos producidos *in vitro* (Cimadomo et al., 2016; Pallinger et al., 2017; Veraguas et al., 2020; L. Yang et al., 2017). Sin embargo, los datos publicados presentan ciertas inconsistencias en la detección y en el análisis del ADN de los medios de cultivo, asociado a la baja sensibilidad de las técnicas moleculares y a la presencia de otras fuentes de ADN contaminante, como medios de cultivo comerciales, remanentes de células del cúmulus y la calidad del embrión como tal (Caamaño et al., 2022; Hammond et al., 2017). A pesar de las limitaciones causadas por la cantidad de ADN detectado, la presencia de ADN embrionario en el medio de cultivo es muy conveniente para evadir la biopsia embrionaria para análisis genéticos, dado que el procedimiento más común para evaluar genes embrionarios es la biopsia. La biopsia embrionaria es una técnica compleja e invasiva que involucra tomar una pequeña parte del embrión, una o más blastómeras, la cual tiene un impacto significativo en la integridad del embrión (Yang et al., 2022). En animales de granja, el uso de este método aun no es justificado en las industrias o ganaderías, dado su alto costo y bajo beneficio. Los métodos no invasivos, incluyendo biopsias líquidas usando medio de cultivo embrionario han sido mejor desarrollados para embriones humanos, pero podrían ser útiles para la genotificación de animales de granja (Brouillet et al., 2020).

Se logró identificar mediante distintos métodos, que efectivamente las EVs derivadas desde cultivo embrionario contendrían ADN, coincidiendo con otros reportes en otras especies, como en ratones (Simon et al., 2020) o en humanos (Veraguas et al., 2020). Al encontrar ADN en las vesículas, se plantea la pregunta de si este ADN estaría ubicado al interior o al exterior de estas, ya que lo segundo podría interferir en el diagnóstico genético posterior, al estar posiblemente cargando ADN de contaminación desde los medios de cultivo (Hammond et al., 2017). Cuando se amplificó el gen SAT1 (gen multicopia), y se trató o no con ADNasa I, se logró determinar que incluso cuando las muestras de EVs eran tratadas con ADNasa I, estas de igual forma eran amplificadas mediante

PCR, lo que confirmaría que el ADN embrionario estaría al interior del lumen vesicular, concordando con otras investigaciones similares (Simon et al., 2020), y no en su exterior o superficie, como lo plantean otros autores (Németh et al., 2017).

Otro punto importante que se debe tomar en consideración es la participación de otros genes que no son comúnmente relacionados con el desarrollo embrionario. Si bien las citoquinas generalmente tienen un rol protectorio o están involucradas en enfermedades, generalmente inflamatorias, podrían estar además involucradas en el desarrollo embrionario (Ealy et al., 2021). Luego de la secuenciación de EVs derivadas de embriones bovinos, por el protocolo P3, el gen más representativo fue IL17RC, el que corresponde al receptor de la IL17, lo que sugiere que esta proteína podría estar involucrada en el desarrollo embrionario bovino. Otros genes también fueron encontrados, como por ejemplo SEMA5B, el cual tiene un rol en el crecimiento de axones neuronales (Browne et al., 2012), ANKRD55 (proteína autoinmune) (Ugidos et al., 2019), ADAM12, el que si bien ha sido estudiado por su rol en cáncer y otros tipos de enfermedades (Nyren-Erickson et al., 2014) también tendría una participación en el crecimiento embrionario/fetal (Andres et al., 2022), lo que indicaría un conjunto de genes que han sido poco explorados con su relación con el desarrollo embrionario, en este caso bovino.

Una de las preguntas que se podrían derivar de esta investigación sería: ¿Por qué una célula sana estaría liberando ADN? Stigliani et al., (2013) encontró una alta correlación entre el ADN mitocondrial en el medio de cultivo y la fragmentación embrionaria. Otro reporte indica que la cantidad de ADN en el medio de cultivo está negativamente correlacionada con la competencia embrionaria en embriones humanos y el embarazo clínico (Pallinger et al., 2017). Una posible explicación a esta pregunta es que el ADN está libre en el espacio extracelular o en cuerpos apoptóticos, producidos por células moribundas. La apoptosis puede ser beneficioso para el embrión durante la implantación a través de la eliminación de células con daño genético. Sin embargo, un alto grado de apoptosis puede eliminar un amplio número de células, llevando al arresto celular o bloqueo de los embriones (Haouzi & Hamamah, 2009). Nuestros resultados sugieren que la tasa de apoptosis en embriones es mayor en aquellos embriones que se bloquean en mórulas en comparación con aquellos que alcanzan el estadio de blastocisto. Estos resultados, en conjunto con otros resultados, evalúan la apoptosis celular en embriones competentes y bloqueados (Antunes et al., 2010; Veraguas et al., 2020). Si la presencia y cantidad de ADN presente en los medios de cultivo embrionarios está asociado con el proceso de la apoptosis, este

análisis podría ser útil solo para confirmar la calidad embrionaria mas no así para el diagnóstico genético, como proponen otros autores (Ly et al., 2011).

Este trabajo intentó confirmar que los embriones de buena calidad liberan ADN y que este es útil para la genotipificación embrionaria. Se hipotetiza que el ADN embrionario puede ser liberado como cargo de las EVs y que la especificidad de detección de este ADN podría incrementar cuando estas EVs son aisladas, en comparación con el análisis desde el medio total. Estudios en el contenido molecular de las EVs desde embriones pre-implantatorios son limitados, probablemente debido a la sensibilidad de las técnicas moleculares. Sin embargo, hasta nuestros conocimientos, este es el primer estudio que detecta ADN en EVs derivadas desde embriones bovinos usando diversas técnicas moleculares. Estos resultados confirman que existe un gran número de EVs que contienen ADN y que la cantidad de ADN puede ser suficiente para ser detectado por técnicas simples, como las anteriormente mencionadas, sugiriendo fuertemente el uso de este ADN para diagnóstico genético.

Además, se detectó una correlación positiva entre el número de partículas positivas a ADN y la concentración de ADN en el medio de cultivo, indicando que el ADN embrionario efectivamente estaría presente en las EVs. La más alta concentración de ADN fue detectada en las EVs derivadas de embriones partenogénéticos bloqueados en mórulas, concordando con los hallazgos de Stigliani et al., (2013). Sin embargo, la concentración de ADN en EVs de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto fue similar, independientemente del tipo de producción *in vitro* o el número de células en apoptosis. Estos resultados confirmarían que los embriones pre-implantatorios competentes de alguna manera secretan ADN en el medio de cultivo. De qué manera lo hacen y el porqué de este proceso seguirían siendo interrogantes por dilucidar.

VII. CONCLUSIONES

- I. Los embriones bovinos preimplantatorios, de buena y mala calidad, producidos mediante partenogénesis o fecundación *in vitro* al día 7 de desarrollo liberan al medio de cultivo vesículas extracelulares que contienen ADN en su interior, el cual es suficiente para diagnóstico genético.
- II. No existe relación entre la cantidad de ADN en las vesículas extracelulares derivadas de embriones bovinos preimplantatorios, cuantificada mediante diversos métodos, y la tasa de apoptosis correspondiente.
- III. No existe relación entre la cantidad de ADN en las vesículas extracelulares derivadas de embriones bovinos preimplantatorios, cuantificada mediante diversos métodos, y la competencia embrionaria.

VIII. REFERENCIAS

- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 36, Issue 3, pp. 301–312). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Abramowicz, A., Widłak, P., & Pietrowska, M. (2019). Different Types of Cellular Stress Affect the Proteome Composition of Small Extracellular Vesicles: A Mini Review. *Proteomes*, 7(2), 23. <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES7020023>
- Abu-Halima, M., Häusler, S., Backes, C., Fehlmann, T., Staib, C., Nestel, S., Nazarenko, I., Meese, E., & Keller, A. (2017). Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing In Vitro Fertilization. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13683-8>
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(3), 1969–1978. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.179.3.1969>
- Aguilera, C., Velásquez, A. E., Gutierrez-Reinoso, M. A., Wong, Y. Sen, Melo-Baez, B., Cabezas, J., Caamaño, D., Navarrete, F., Rojas, D., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodriguez-Alvarez, L. (2023). Extracellular Vesicles Secreted by Pre-Hatching Bovine Embryos Produced In Vitro and In Vivo Alter the Expression of IFNtau-Stimulated Genes in Bovine Endometrial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7438. <https://doi.org/10.3390/IJMS24087438/S1>
- Aitken, R. J., & Nixon, B. (2013). Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular Human Reproduction*, 19(12), 785–793. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAT067>
- 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), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S11060-013-1084-8>
- Al-Dossary, A. A., Strehler, E. E., & Martin-DeLeon, P. A. (2013). Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PloS One*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0080181>
- Allenson, K., Castillo, J., San Lucas, F. A., Scelo, G., Kim, D. U., Bernard, V., Davis, G., Kumar, T., Katz, M., Overman, M. J., Foretova, L., Fabianova, E., Holcatova, I., Janout, V., Meric-Bernstam, F., Gascoyne, P., Wistuba, I., Varadhachary, G., Brennan, P., ... Alvarez, H. (2017). High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(4), 741–747. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX004>

- Almiñana, C., Corbin, E., Tsikis, G., Alcântara-Neto, A. S., Labas, V., Reynaud, K., Galio, L., Uzbekov, R., Garanina, A. S., & Druart, X. (2017). Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct–embryo cross-talk. *Reproduction*, *154*(3), 253–268.
- Anand, S., Samuel, M., Kumar, S., & Mathivanan, S. (2019). Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, *1867*(12). <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2019.02.005>
- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *1*(11), 845–867. <https://doi.org/10.1074/MCP.R200007-MCP200>
- Andres, F., Wong, G. P., Walker, S. P., MacDonald, T. M., Keenan, E., Cannon, P., Nguyen, T. V., Hannan, N. J., Tong, S., & Kaitu'u-Lino, T. J. (2022). A disintegrin and metalloproteinase 12 (ADAM12) is reduced at 36 weeks' gestation in pregnancies destined to deliver small for gestational age infants. *Placenta*, *117*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2021.11.001>
- Antunes, G., Chaveiro, A., Santos, P., Marques, A., Jin, H. S., & da Silva, F. M. (2010). Influence of apoptosis in bovine embryo's development. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *45*(1), 26–32. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2008.01131.X>
- Aqrabi, L. A., Galtung, H. K., Vestad, B., Øvstebø, R., Thiede, B., Rusthen, S., Young, A., Guerreiro, E. M., Utheim, T. P., Chen, X., Utheim, Ø. A., Palm, Ø., & Jensen, J. L. (2017). Identification of potential saliva and tear biomarkers in primary Sjögren's syndrome, utilising the extraction of extracellular vesicles and proteomics analysis. *Arthritis Research & Therapy*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/S13075-017-1228-X>
- Arienti, G., Carlini, E., De Cosmo, A. M., Di Profio, P., & Palmerini, C. A. (1998). Prostate-Like Particles in Stallion Semen. *Biology of Reproduction*, *59*(2), 309–313. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD59.2.309>
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F., & Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(12), 5003–5008. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1019055108>
- Arvidson, G., Ronquist, G., Wikander, G., & Öjteg, A. C. (1989). Human prostate membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering. *Biochimica et Biophysica Acta*, *984*(2), 167–173. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90212-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90212-5)
- Asaadi, A., Dolatabad, N. A., Atashi, H., Raes, A., Damme, P. Van, Hoelker, M., Hendrix, A., Pascottini, O. B., Soom, A. Van, Kafi, M., & Pavani, K. C. (2021). Extracellular Vesicles from Follicular and Ampullary Fluid Isolated by Density Gradient Ultracentrifugation Improve Bovine Embryo Development and Quality. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/IJMS22020578>

- 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. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2008.06.001>
- Atkin-Smith, G. K., Tixeira, R., Paone, S., Mathivanan, S., Collins, C., Liem, M., Goodall, K. J., Ravichandran, K. S., Hulett, M. D., & Poon, I. K. H. (2015). A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS8439>
- AUSTIN, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170(4321), 326. <https://doi.org/10.1038/170326A0>
- Bakhoun, S. F., Ngo, B., Laughney, A. M., Cavallo, J. A., Murphy, C. J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R. K., Watkins, T. B. K., Taunk, N. K., Duran, M., Pauli, C., Shaw, C., Chadalavada, K., Rajasekhar, V. K., Genovese, G., Venkatesan, S., Birkbak, N. J., McGranahan, N., ... Cantley, L. C. (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*, 553(7689), 467–472. <https://doi.org/10.1038/NATURE25432>
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., & Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/NCOMMS1180>
- Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2018.02.013>
- Belandres, D., Shamonki, M., & Arrach, N. (2019). Current status of spent embryo media research for preimplantation genetic testing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(5), 819–826. <https://doi.org/10.1007/S10815-019-01437-6>
- Belleannée, C., Calvo, É., Caballero, J., & Sullivan, R. (2013). Epididymosomes convey different repertoires of micrnas throughout the bovine epididymis. *Biology of Reproduction*, 89(2). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.110486/2513985>
- Berglund, B. (2008). Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43 Suppl 2, 89–95. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01147.x>
- Berube, B., & Sullivan, R. (1994). Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1255–1263. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD51.6.1255>
- 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), 1–14.

- Bó, G. A., Mapletoft, R. J., Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2018). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction (AR)*, *10*(3), 344–348. <http://www.animal-reproduction.org/article/5b5a604cf7783717068b46a2>
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *12*(12), 1659–1668. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2011.01225.X>
- Boyer, A., Goff, A. K., & Boerboom, D. (2010). WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *21*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2009.08.005>
- Brouillet, S., Martinez, G., Coutton, C., & Hamamah, S. (2020). Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reproductive Biomedicine Online*, *40*(6), 779–796. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2020.02.002>
- Browne, K., Wang, W., Liu, R. Q., Piva, M., & O'Connor, T. P. (2012). Transmembrane semaphorin5B is proteolytically processed into a repulsive neural guidance cue. *Journal of Neurochemistry*, *123*(1), 135–146. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2012.07885.X>
- Bucki, R., Bachelot-Loza, C., Zachowski, A., Giraud, F., & Sulpice, J. C. (1998). Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry*, *37*(44), 15383–15391. <https://doi.org/10.1021/BI9805238>
- 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), 56, 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134973>
- Byun, J. S., Hong, S. H., Choi, J. K., Jung, J. K., & Lee, H. J. (2015). Diagnostic profiling of salivary exosomal microRNAs in oral lichen planus patients. *Oral Diseases*, *21*(8), 987–993. <https://doi.org/10.1111/ODI.12374>
- Caamaño, D., Cabezas, J., Wong, Y. S., Aguilera, C., Veraguas, D., Castro, F. O., & Rodriguez-Alvarez, L. (2022). 2 Noninvasive method for bovine embryo sexing through the analysis of DNA content in extracellular vesicles. *Reproduction, Fertility and Development*, *34*(2), 234–235. <https://doi.org/10.1071/RDv34n2Ab2>
- Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, *17*(7), 879–887. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXH267>
- Cantin, R., Diou, J., Bélanger, D., Tremblay, A. M., & Gilbert, C. (2008). Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *Journal of Immunological Methods*, *338*(1–2), 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2008.07.007>

- Capalbo, A., Romanelli, V., Patassini, C., Poli, M., Girardi, L., Giancani, A., Stoppa, M., Cimadomo, D., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2018). Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertility and Sterility*, *110*(5), 870-879.e5. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2018.05.031>
- Capra, E., & Lange-Consiglio, A. (2020). The Biological Function of Extracellular Vesicles during Fertilization, Early Embryo-Maternal Crosstalk and Their Involvement in Reproduction: Review and Overview. *Biomolecules*, *10*(11), 1–26. <https://doi.org/10.3390/BIOM10111510>
- Carayon, K., Chaoui, K., Ronzier, E., Lazar, I., Bertrand-Michel, J., Roques, V., Balor, S., Terce, F., Lopez, A., Salomé, L., & Joly, E. (2011). Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(39), 34426–34439. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.257444>
- Carlsson, L., Nilsson, O., Larsson, A., Stridsberg, M., Sahlén, G., & Ronquist, G. (2003). Characteristics of human prostasomes isolated from three different sources. *The Prostate*, *54*(4), 322–330. <https://doi.org/10.1002/PROS.10189>
- Caruso, S., & Poon, I. K. H. (2018). Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01486>
- Castellanos-Rizaldos, E., Grimm, D. G., Tadigotla, V., Hurley, J., Healy, J., Neal, P. L., Sher, M., Venkatesan, R., Karlovich, C., Raponi, M., Krug, A., Noerholm, M., Tannous, J., Tannous, B. A., Raez, L. E., & Skog, J. K. (2018). Exosome-Based Detection of EGFR T790M in Plasma from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *24*(12), 2944–2950. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3369>
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, *168*(4277), 697–698. <https://doi.org/10.1038/168697B0>
- Chen, F., De Neubourg, D., Debrock, S., Peeraer, K., D’Hooghe, T., & Spiessens, C. (2016). Selecting the embryo with the highest implantation potential using a data mining based prediction model. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, *14*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/S12958-016-0145-1>
- Chen, H., Griffiths, G., Galileo, D. S., & Martin-DeLeon, P. A. (2006). Epididymal SPAM1 is a marker for sperm maturation in the mouse. *Biology of Reproduction*, *74*(5), 923–930. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.105.048587>
- Cheruvanky, A., Zhou, H., Pisitkun, T., Kopp, J. B., Knepper, M. A., Yuen, P. S. T., & Star, R. A. (2007). Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *292*(5). <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00434.2006>

- Cimadomo, D., Capalbo, A., Ubaldi, F. M., Scarica, C., Palagiano, A., Canipari, R., & Rienzi, L. (2016). The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. In *BioMed Research International* (Vol. 2016). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/7193075>
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., & Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, 3(4), 339–345. <https://doi.org/10.1038/35070009>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Conti, M., Hsieh, M., Musa Zamah, A., & Oh, J. S. (2011). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(0), 65. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2011.11.002>
- da Silveira, J. C., Veeramachaneni, D. N. R., Winger, Q. A., Carnevale, E. M., & Bouma, G. J. (2012). Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, 86(3). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.111.093252>
- De Rycke, M., Belva, F., Goossens, V., Moutou, C., SenGupta, S. B., Traeger-Synodinos, J., & Coonen, E. (2015). ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 30(8), 1763–1789. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEV122>
- De, S., Kuwahara, S., Hosojima, M., Ishikawa, T., Kaseda, R., Sarkar, P., Yoshioka, Y., Kabasawa, H., Iida, T., Goto, S., Toba, K., Higuchi, Y., Suzuki, Y., Hara, M., Kurosawa, H., Narita, I., Hirayama, Y., Ochiya, T., & Saito, A. (2017). Exocytosis-Mediated Urinary Full-Length Megalin Excretion Is Linked With the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 66(5), 1391–1404. <https://doi.org/10.2337/DB16-1031>
- Dissanayake, K., Nõmm, M., Lättekivi, F., Ressaissi, Y., Godakumara, K., Lavrits, A., Midekessa, G., Viil, J., Bæk, R., Jørgensen, M. M., Bhattacharjee, S., Andronowska, A., Salumets, A., Jaakma, Ü., & Fazeli, A. (2020). Individually cultured bovine embryos produce extracellular vesicles that have the potential to be used as non-invasive embryo quality markers. *Theriogenology*, 149, 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.008>
- Ealy, A. D., Speckhart, S. L., & Wooldridge, L. K. (2021). Cytokines That Serve as Embryokines in Cattle. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 11(8), 2313. <https://doi.org/10.3390/ANI11082313>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

- Fabiani, R., & Ronquist, G. (1995). Association of some hydrolytic enzymes with the prostasome membrane and their differential responses to detergent and PIPLC treatment. *The Prostate*, 27(2), 95–101. <https://doi.org/10.1002/PROS.2990270206>
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L., & Henson, P. M. (1998). The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation*, 5(7), 551–562. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4400404>
- Farin, P. W., Britt, J. H., Shaw, D. W., & Slenning, B. D. (1995). Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*, 44(3), 339–349. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00189-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00189-F)
- Ferré, L. B., Kjelland, M. E., Strøbech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., & Ross, P. J. (2020). Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 14(5), 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Fesahat, F., Montazeri, F., & Hoseini, S. M. (2020a). Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 49(5). <https://doi.org/10.1016/J.JOGO.2020.101723>
- Fesahat, F., Montazeri, F., & Hoseini, S. M. (2020b). Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 49(5). <https://doi.org/10.1016/J.JOGO.2020.101723>
- Figuroa, J. M., Skog, J., Akers, J., Li, H., Komotar, R., Jensen, R., Ringel, F., Yang, I., Kalkanis, S., Thompson, R., Loguidice, L., Berghoff, E., Parsa, A., Liau, L., Curry, W., Cahill, D., Bettgowda, C., Lang, F. F., Chiocca, E. A., ... Carter, B. S. (2017). Detection of wild-type EGFR amplification and EGFRvIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients. *Neuro-Oncology*, 19(11), 1494–1502. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOX085>
- Frenette, G., Girouard, J., & Sullivan, R. (2006). Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis. *Biology of Reproduction*, 75(6), 885–890. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.106.054692>
- Frenette, G., Lessard, C., & Sullivan, R. (2004). Polyol pathway along the bovine epididymis. *Molecular Reproduction and Development*, 69(4), 448–456. <https://doi.org/10.1002/MRD.20170>
- Frenette, G., Thabet, M., & Sullivan, R. (2006). Polyol pathway in human epididymis and semen. *Journal of Andrology*, 27(2), 233–239. <https://doi.org/10.2164/JANDROL.05108>
- García-Romero, N., Carrión-Navarro, J., Areal-Hidalgo, P., de Mendivil, A. O., Asensi-Puig, A., Madurga, R., Núñez-Torres, R., González-Neira, A., Belda-Iniesta, C., González-Rumayor, V., López-Ibor, B., & Ayuso-Sacido, A. (2019). BRAF V600E Detection in Liquid Biopsies from

Pediatric Central Nervous System Tumors. *Cancers*, 12(1), 66.
<https://doi.org/10.3390/CANCERS12010066>

García-Silva, S., Benito-Martín, A., Sánchez-Redondo, S., Hernández-Barranco, A., Ximénez-Embún, P., Nogués, L., Mazariegos, M. S., Brinkmann, K., López, A. A., Meyer, L., Rodríguez, C., García-Martín, C., Boskovic, J., Letón, R., Montero, C., Robledo, M., Santambrogio, L., Brady, M. S., Szumera-Ciećkiewicz, A., ... Peinado, H. (2019). Use of extracellular vesicles from lymphatic drainage as surrogate markers of melanoma progression and BRAF V600E mutation. *The Journal of Experimental Medicine*, 216(5), 1061–1070.
<https://doi.org/10.1084/JEM.20181522>

Gardiner, C., Vizio, D. Di, Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1).
<https://doi.org/10.3402/JEV.V5.32945>

Geraedts, J. P. M., & De Wert, G. M. W. R. (2009). Preimplantation genetic diagnosis. *Clinical Genetics*, 76(4), 315–325. <https://doi.org/10.1111/J.1399-0004.2009.01273.X>

Giacomini, E., Makieva, S., Murdica, V., Vago, R., & Viganó, P. (2020). Extracellular vesicles as a potential diagnostic tool in assisted reproduction. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 32(3), 179–184. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000621>

Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., & Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology*, 11(9), 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/NCB1929>

Granleese, T., Clark, S. A., Swan, A. A., & Van Der Werf, J. H. J. (2015). Increased genetic gains in sheep, beef and dairy breeding programs from using female reproductive technologies combined with optimal contribution selection and genomic breeding values. *Genetics, Selection, Evolution : GSE*, 47(1). <https://doi.org/10.1186/S12711-015-0151-3>

Gudehithlu, K. P., Garcia-Gomez, I., Vernik, J., Brecklin, C., Kraus, M., Cimbalk, D. J., Hart, P., Dunea, G., Arruda, J. A. L., & Singh, A. K. (2015). In Diabetic Kidney Disease Urinary Exosomes Better Represent Kidney Specific Protein Alterations Than Whole Urine. *American Journal of Nephrology*, 42(6), 418–424. <https://doi.org/10.1159/000443539>

Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C. L., Medina, R. J., & Simpson, D. A. (2012). Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-357>

Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., & Agnati, L. F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 117(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/S00702-009-0288-8>

- Hammond, E. R., McGillivray, B. C., Wicker, S. M., Peek, J. C., Shelling, A. N., Stone, P., Chamley, L. W., & Cree, L. M. (2017). Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertility and Sterility*, *107*(1), 220–228.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.015>
- Haouzi, D., & Hamamah, S. (2009). Pertinence of apoptosis markers for the improvement of in vitro fertilization (IVF). *Current Medicinal Chemistry*, *16*(15), 1905–1916. <https://doi.org/10.2174/092986709788186075>
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding - PubMed. *Eur J Cell Biol*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6151502/>
- Harding, S. M., Benci, J. L., Irianto, J., Discher, D. E., Minn, A. J., & Greenberg, R. A. (2017). Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*, *548*(7668), 466–470. <https://doi.org/10.1038/NATURE23470>
- Harding, C. V., Heuser, J. E., & Stahl, P. D. (2013). Exosomes: looking back three decades and into the future. *The Journal of Cell Biology*, *200*(4), 367–371. <https://doi.org/10.1083/JCB.201212113>
- Harper, J. C., Wilton, L., Traeger-Synodinos, J., Goossens, V., Moutou, C., SenGupta, S. B., Pehlivan Budak, T., Renwick, P., De Rycke, M., Geraedts, J. P. M., & Harton, G. (2012). The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Human Reproduction Update*, *18*(3), 234–247. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMR052>
- Hortin, G. L., & Sviridov, D. (2010). The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. *Journal of Proteomics*, *73*(3), 629–636. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2009.07.001>
- Hristov, M., Erl, W., Linder, S., & Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, *104*(9), 2761–2766. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-10-3614>
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S. I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S. Y., Lauterbach, M. A., Bakhti, M., Grønberg, M., Möbius, W., Rhee, J. S., Barr, F. A., & Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of Cell Biology*, *189*(2), 223–232. <https://doi.org/10.1083/JCB.200911018>
- Ihara, T., Yamamoto, T., Sugamata, M., Okumura, H., & Ueno, Y. (1998). The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology*, *433*(5), 443–447. <https://doi.org/10.1007/S004280050272>
- Iraci, N., Leonardi, T., Gessler, F., Vega, B., & Pluchino, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2), 171. <https://doi.org/10.3390/IJMS17020171>

- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, *177*(2), 428. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.02.029>
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K., & Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(12), 4892–4896. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1018202108/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201018202SI.PDF>
- Kahlert, C., Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, O., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., & Kalluri, R. (2014a). Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(7), 3869–3875. <https://doi.org/10.1074/JBC.C113.532267>
- Kahlert, C., Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, O., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., & Kalluri, R. (2014b). Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(7), 3869–3875. <https://doi.org/10.1074/JBC.C113.532267>
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., & Kudo, A. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genetics*, *24*(3), 279–282. <https://doi.org/10.1038/73502>
- Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS17020170>
- Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borràs, F. E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A., Cocucci, E., Falcon-Perez, J. M., Gabrielsson, S., Gho, Y. S., Gupta, D., Harsha, H. C., ... Mathivanan, S. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biology*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001450>
- Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., & Altevogt, P. (2006). Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters*, *107*(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2006.09.005>
- Kimura, M., Kim, E., Kang, W., Yamashita, M., Saigo, M., Yamazaki, T., Nakanishi, T., Kashiwabara, S. I., & Baba, T. (2009). Functional roles of mouse sperm hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in fertilization. *Biology of Reproduction*, *81*(5), 939–947. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.109.078816>

- Kirchhoff, C., Pera, I., Derr, P., Yeung, C. H., & Cooper, T. (1997). The molecular biology of the sperm surface. Post-testicular membrane remodelling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 424, 221–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5913-9_40
- Kitai, Y., Kawasaki, T., Sueyoshi, T., Kobiyama, K., Ishii, K. J., Zou, J., Akira, S., Matsuda, T., & Kawai, T. (2017). DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 198(4), 1649–1659. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1601694>
- Knight, P. G., & Glister, C. (2003). Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science*, 78(3–4), 165–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00089-7)
- Knight, P. G., & Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132(2), 191–206. <https://doi.org/10.1530/REP.1.01074>
- Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M. A. J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J. M., Ylstra, B., de Menezes, R. X., Würdinger, T., Meijer, G. A., & Pegtel, D. M. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Reports*, 8(6), 1649–1658. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.08.027>
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17442–17452. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.107821>
- Kravets, F. G., Lee, J., Singh, B., Trocchia, A., Pentylala, S. N., & Khan, S. A. (2000). Prostatomes: Current concepts. *The Prostate*, 43(3), 169–174. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(20000515\)43:3<169::AID-PROS2>3.0.CO;2-D](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(20000515)43:3<169::AID-PROS2>3.0.CO;2-D)
- Krug, A. K., Enderle, D., Karlovich, C., Priewasser, T., Bentink, S., Spiel, A., Brinkmann, K., Emenegger, J., Grimm, D. G., Castellanos-Rizaldos, E., Goldman, J. W., Sequist, L. V., Soria, J. C., Camidge, D. R., Gadgeel, S. M., Wakelee, H. A., Raponi, M., Noerholm, M., & Skog, J. (2018). Improved EGFR mutation detection using combined exosomal RNA and circulating tumor DNA in NSCLC patient plasma. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(3), 700–706. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX765>
- Kshirsagar, S. K., Alam, S. M., Jasti, S., Hodes, H., Nauser, T., Gilliam, M., Billstrand, C., Hunt, J. S., & Petroff, M. G. (2012). Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta*, 33(12), 982–990. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2012.10.005>

- Kunz, F., Kontopoulou, E., Reinhardt, K., Soldierer, M., Strachan, S., Reinhardt, D., & Thakur, B. K. (2019). Detection of AML-specific mutations in pediatric patient plasma using extracellular vesicle-derived RNA. *Annals of Hematology*, *98*(3), 595–603. <https://doi.org/10.1007/S00277-019-03608-Y>
- Kuznyetsov, V., Madjunkova, S., Abramov, R., Antes, R., Ibarrientos, Z., Motamedi, G., Zaman, A., Kuznyetsova, I., & Librach, C. L. (2020). Minimally Invasive Cell-Free Human Embryo Aneuploidy Testing (miPGT-A) Utilizing Combined Spent Embryo Culture Medium and Blastocoel Fluid –Towards Development of a Clinical Assay. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64335-3>
- Lakadamyali, M., Rust, M. J., & Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell*, *124*(5), 997–1009. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.12.038/ATTACHMENT/42C0F686-4EE2-4276-BE17-27A4CB65F958/MMC8.MP4>
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Von Briesen, H., & Schubert, D. (2003). Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, *257*(1–2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00134-0)
- Latifkar, A., Hur, Y. H., Sanchez, J. C., Cerione, R. A., & Antonyak, M. A. (2019). New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *Journal of Cell Science*, *132*(13). <https://doi.org/10.1242/JCS.222406>
- Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J. F., Kobayashi, T., Salles, J. P., Perret, B., Bonnerot, C., & Record, M. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *The Biochemical Journal*, *380*(Pt 1), 161–171. <https://doi.org/10.1042/BJ20031594>
- Li, L., Zhu, D., Huang, L., Zhang, J., Bian, Z., Chen, X., Liu, Y., Zhang, C. Y., & Zen, K. (2012). Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PLoS One*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046957>
- Liang, C., Zhang, L., Lian, X., Zhu, T., Zhang, Y., & Gu, N. (2020). Circulating Exosomal SOCS2-AS1 Acts as a Novel Biomarker in Predicting the Diagnosis of Coronary Artery Disease. *BioMed Research International*, *2020*. <https://doi.org/10.1155/2020/9182091>
- Liu, C., Yao, W., Yao, J., Li, L., Yang, L., Zhang, H., & Sui, C. (2020). Endometrial extracellular vesicles from women with recurrent implantation failure attenuate the growth and invasion of embryos. *Fertility and Sterility*, *114*(2), 416–425. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2020.04.005>
- Liu, J., Chen, Y., Pei, F., Zeng, C., Yao, Y., Liao, W., & Zhao, Z. (2021). Extracellular Vesicles in Liquid Biopsies: Potential for Disease Diagnosis. *BioMed Research International*, *2021*, 6611244. <https://doi.org/10.1155/2021/6611244>

- Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., & Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1831*(7), 1302–1309. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2013.04.011>
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltran-Brena, P., Calle, A., Redruello, A., Lopez-Martin, S., Gutierrez-Adan, A., & Yañez-Mó, M. (2016). Extracellular vesicles from BOEC in in vitro embryo development and quality. *PloS One*, *11*(2), e0148083.
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Vizio, D. Di, Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1). <https://doi.org/10.3402/JEV.V3.26913>
- Lozano-Ramos, I., Bancu, I., Oliveira-Tercero, A., Armengol, M. P., Menezes-Neto, A., Del Portillo, H. A., Lauzurica-Valdemoros, R., & Borràs, F. E. (2015). Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(2015), 1–11. <https://doi.org/10.3402/JEV.V4.27369>
- Ly, K. D., Agarwal, A., & Nagy, Z. P. (2011). Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *28*(9), 833. <https://doi.org/10.1007/S10815-011-9608-7>
- Maas, S. L. N., Breakefield, X. O., & Weaver, A. M. (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology*, *27*(3), 172–188. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2016.11.003>
- Machtinger, R., Laurent, L. C., & Baccarelli, A. A. (2015). Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, *22*(2), 182. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMV055>
- Machtinger, R., Laurent, L. C., & Baccarelli, A. A. (2016). Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Human Reproduction Update*, *22*(2), 182–193. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMV055>
- Makieva, S., Giacomini, E., Scotti, G. M., Lazarevic, D., Pavone, V., Ottolina, J., Bartiromo, L., Schimberni, M., Morelli, M., Alteri, A., Minetto, S., Tonon, G., Candiani, M., Papaleo, E., & Vigan, P. (2024). Extracellular vesicles secreted by human aneuploid embryos present a distinct transcriptomic profile and upregulate MUC1 transcription in decidualised endometrial stromal cells. *Human Reproduction Open*, *2024*(2). <https://doi.org/10.1093/HROPEN/HOAE014>
- Masyuk, A. I., Huang, B. Q., Ward, C. J., Gradilone, S. A., Banales, J. M., Masyuk, T. V., Radtke, B., Splinter, P. L., & LaRusso, N. F. (2010). Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *American*

Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology, 299(4).
<https://doi.org/10.1152/AJPGI.00093.2010>

- Mellisho, E. A., Briones, M. A., Velásquez, A. E., Cabezas, J., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2019a). Extracellular vesicles secreted during blastulation show viability of bovine embryos. *Reproduction*, 158(6), 477–492. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0233>
- Mellisho, E. A., Briones, M. A., Velásquez, A. E., Cabezas, J., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2019b). Extracellular vesicles secreted during blastulation show viability of bovine embryos. *Reproduction*, 158(6), 477–492.
- Mellisho, E. A., Velásquez, A. E., Nuñez, M. J., Cabezas, J. G., Cueto, J. A., Fader, C., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2017). Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. *PloS One*, 12(5), e0178306.
- Melo-Báez, B., Mellisho, E. A., Cabezas, J., Velásquez, A. E., Veraguas, D., Escobar, D. A. C., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2021). Nanoparticles from culture media are internalized by in vitro-produced bovine embryos and its depletion affect expression of pluripotency genes. *Animal Reproduction*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0028>
- Melo-Baez, B., Wong, Y. S., Aguilera, C. J., Cabezas, J., Mançanares, A. C. F., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodriguez-Alvarez, L. (2020). Micrnas from extracellular vesicles secreted by bovine embryos as early biomarkers of developmental competence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21238888>
- Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 785. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2020.108320>
- Mitra, A., Yoshida-Court, K., Solley, T. N., Mikkelson, M., Yeung, C. L. A., Nick, A., Lu, K., & Klopp, A. H. (2021). Extracellular vesicles derived from ascitic fluid enhance growth and migration of ovarian cancer cells. *Scientific Reports*, 11(1), 9149. <https://doi.org/10.1038/S41598-021-88163-1>
- Miyado, K., Yoshida, K., Yamagata, K., Sakakibara, K., Okabe, M., Wang, X., Miyamoto, K., Akutsu, H., Kondo, T., Takahashi, Y., Ban, T., Ito, C., Toshimori, K., Nakamura, A., Ito, M., Miyado, M., Mekada, E., & Umezawa, A. (2008). The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12921–12926. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0710608105>
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P. Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Oquin, S., Bonebreak, C. M., Saracoglu, E., Skog, J., & Kuo, W. P. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological Chemistry*, 394(10), 1253–1262. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2013-0141>

- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Tigges, J., Toxavidis, V., Ericsson, M., Distel, R. J., Ivanov, A. R., Skog, J., & Kuo, W. P. (2012). Alternative methods for characterization of extracellular vesicles. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2012.00354>
- Moutou, C., Goossens, V., Coonen, E., De Rycke, M., Kokkali, G., Renwick, P., Sengupta, S. B., Vesela, K., & Traeger-Synodinos, J. (2014). ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(5), 880–903. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEU012>
- Munro, T. P., Magee, R. J., Kidd, G. J., Carson, J. H., Barbarese, E., Smith, L. M., & Smith, R. (1999). Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34389–34395. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.48.34389>
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., & D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current Biology : CB*, 19(22), 1875–1885. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2009.09.059>
- 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.
- Németh, A., Orgovan, N., Sódar, B. W., Osteikoetxea, X., Pálóczi, K., Szabó-Taylor, K., Vukman, K. V., Kittel, Á., Turiák, L., Wiener, Z., Tóth, S., Drahos, L., Vékey, K., Horvath, R., & Buzás, E. I. (2017). Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08392-1>
- Niu, M., Li, Y., Li, G., Zhou, L., Luo, N., Yao, M., Kang, W., & Liu, J. (2020). A longitudinal study on α -synuclein in plasma neuronal exosomes as a biomarker for Parkinson's disease development and progression. *European Journal of Neurology*, 27(6), 967–974. <https://doi.org/10.1111/ENE.14208>
- Nyren-Erickson, E. K., Bouton, M., Raval, M., Totzauer, J., Mallik, S., & Alberto, N. (2014). Urinary concentrations of ADAM 12 from breast cancer patients pre- and post-surgery vs. cancer-free controls: a clinical study for biomarker validation. *Journal of Negative Results in Biomedicine*, 13(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1477-5751-13-5>
- O'Brien, M., Baczyk, D., & Kingdom, J. C. (2017). Endothelial Dysfunction in Severe Preeclampsia is Mediated by Soluble Factors, Rather than Extracellular Vesicles. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06178-z>
- Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamaguchi, T., Toda, T., Endo, T., Tsubuki, M., & Yanoshita, R. (2011). Proteomic analysis of two types of

exosomes in human whole saliva. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(1), 13–23.
<https://doi.org/10.1248/BPB.34.13>

Ohno, H. (2006). Clathrin-associated adaptor protein complexes. *Journal of Cell Science*, 119(18), 3719–3721. <https://doi.org/10.1242/JCS.03085>

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

Pallinger, E., Bogнар, Z., Bodis, J., Csabai, T., Farkas, N., Godony, K., Varnagy, A., Buzas, E., & Szekeres-Bartho, J. (2017). A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *Scientific Reports*, 7, 39927. <https://doi.org/10.1038/SREP39927>

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

Pasquet, J. M., Dachary-Prigent, J., & Nurden, A. T. (1996). Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *European Journal of Biochemistry*, 239(3), 647–654. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1996.0647U.X>

Pavani, K., Hendrix, A., Van Den Broeck, W., Couck, L., Szymanska, K., Lin, X., De Koster, J., Van Soom, A., & 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20010038>

Pérez-Treviño, P., Velásquez, M., & García, N. (2020). Mechanisms of mitochondrial DNA escape and its relationship with different metabolic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1866(6). <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165761>

Pillay, P., Moodley, K., Moodley, J., & Mackraj, I. (2017). Placenta-derived exosomes: potential biomarkers of preeclampsia. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 8009. <https://doi.org/10.2147/IJN.S142732>

Pisitkun, T., Shen, R. F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0403453101>

Pons-Rejraji, H., Artonne, C., Sion, B., Brugnon, F., Canis, M., Janny, L., & Grizard, G. (2011). Prostatosomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signalling in human sperm. *International Journal of Andrology*, 34(6 Pt 1), 568–580. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2010.01116.X>

- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V, Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, *183*(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Rejraji, H., Vernet, P., & Drevet, J. R. (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Molecular Reproduction and Development*, *63*(1), 96–103. <https://doi.org/10.1002/MRD.10136>
- Revenfeld, A. L. S., Bæk, R., Nielsen, M. H., Stensballe, A., Varming, K., & Jørgensen, M. (2014). Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clinical Therapeutics*, *36*(6), 830–846. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2014.05.008>
- Rodríguez-Alvarez, L., Manriquez, J., Velasquez, A., & Castro, F. O. (2013). Constitutive expression of the embryonic stem cell marker OCT4 in bovine somatic donor cells influences blastocysts rate and quality after nucleus transfer. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *49*(9), 657–667. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9650-0>
- Ronquist, G., & Brody, I. (1985). The prostasome: its secretion and function in man. *Biochimica et Biophysica Acta*, *822*(2), 203–218. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(85\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(85)90008-5)
- Ronquist, G. K., Larsson, A., Stavreus-Evers, A., & Ronquist, G. (2012a). Prostatosomes are heterogeneous regarding size and appearance but affiliated to one DNA-containing exosome family. *The Prostate*, *72*(16), 1736–1745. <https://doi.org/10.1002/PROS.22526>
- Ronquist, G. K., Larsson, A., Stavreus-Evers, A., & Ronquist, G. (2012b). Prostatosomes are heterogeneous regarding size and appearance but affiliated to one DNA-containing exosome family. *The Prostate*, *72*(16), 1736–1745. <https://doi.org/10.1002/PROS.22526>
- Ronquist, K. G., Ek, B., Morrell, J., Stavreus-Evers, A., Ström Holst, B., Humblot, P., Ronquist, G., & Larsson, A. (2013). Prostatosomes from four different species are able to produce extracellular adenosine triphosphate (ATP). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1830*(10), 4604–4610. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.05.019>
- Rosenbluth, E. M., Shelton, D. N., Wells, L. M., Sparks, A. E. T., & Van Voorhis, B. J. (2014). Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation. *Fertility and Sterility*, *101*(5), 1493–1500. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2014.01.058>
- Runge, K. E., Evans, J. E., He, Z. Y., Gupta, S., McDonald, K. L., Stahlberg, H., Primakoff, P., & Myles, D. G. (2007). Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental Biology*, *304*(1), 317–325. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2006.12.041>
- Saadeldin, I. M., Kim, S. J., Choi, Y. Bin, & Lee, B. C. (2014a). 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. <https://doi.org/10.1089/CELL.2014.0003>

- Saadeldin, I. M., Kim, S. J., Choi, Y. Bin, & Lee, B. C. (2014b). Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells)*, *16*(3), 223–234.
- Sakurai, A., Ono, H., Ochi, A., Matsuura, M., Yoshimoto, S., Kishi, S., Murakami, T., Tominaga, T., Nagai, K., Abe, H., & Doi, T. (2019). Involvement of Elf3 on Smad3 activation-dependent injuries in podocytes and excretion of urinary exosome in diabetic nephropathy. *PLoS ONE*, *14*(5), e0216788. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0216788>
- Sampino, S., Zacchini, F., Swiergiel, A. H., Modlinski, A. J., Loi, P., & Ptak, G. E. (2014). Effects of blastomere biopsy on post-natal growth and behavior in mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *29*(9), 1875–1883. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEU145>
- Sato, B. L. M., Sugawara, A., Ward, M. A., & Collier, A. C. (2014). Single blastomere removal from murine embryos is associated with activation of matrix metalloproteinases and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathways of placental inflammation. *Molecular Human Reproduction*, *20*(12), 1247–1257. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAU072>
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., & Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, *3*(4), 346–352. <https://doi.org/10.1038/35070019>
- Shelke, G., Jang, S. C., Yin, Y., Lässer, C., & Lotvall, J. (2016). Human mast cells release extracellular vesicle-associated DNA. *Matters (Zürich)*. <https://doi.org/10.19185/matters.201602000034>
- Shimoda, A., Sawada, S. ichi, Sasaki, Y., & Akiyoshi, K. (2019). Exosome surface glycans reflect osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Profiling by an evanescent field fluorescence-assisted lectin array system. *Scientific Reports 2019 9:1*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47760-x>
- Siciliano, L., Marcianò, V., & Carpino, A. (2008). Prostate-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, *6*. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-5>
- 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). <https://doi.org/10.3390/genes11020203>
- Simon, T., Jackson, E., & Giamas, G. (2020). Breaking through the glioblastoma micro-environment via extracellular vesicles. *Oncogene*, *39*(23), 4477–4490. <https://doi.org/10.1038/S41388-020-1308-2>

- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology* 2008 10:12, 10(12), 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
- Soetikno, V., Arozal, W., Louisa, M., & Setiabudy, R. (2014). New insight into the molecular drug target of diabetic nephropathy. *International Journal of Endocrinology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/968681>
- 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. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0078505>
- Stigliani, S., Anserini, P., Venturini, P. L., & Scaruffi, P. (2013). Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Human Reproduction*, 28(10), 2652–2660. <https://doi.org/10.1093/humrep/det314>
- Stringfellow, D. A. ., & Givens, M. Daniel. (2013). *Manual of the International Embryo Transfer Society : a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures.*
- Sugawara, A., Sato, B., Bal, E., Collier, A. C., & Ward, M. A. (2012). Blastomere Removal from Cleavage-Stage Mouse Embryos Alters Steroid Metabolism During Pregnancy. *Biology of Reproduction*, 87(1), 4. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.111.097444>
- Sullivan, R., Frenette, G., & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 483–491. <https://doi.org/10.1111/J.1745-7262.2007.00281.X>
- Sun, R., Wang, H., Shi, Y., Gao, D., Sun, Z., Chen, Z., Jiang, H., & Zhang, J. (2019). A Pilot Study of Urinary Exosomes in Alzheimer’s Disease. *Neuro-Degenerative Diseases*, 19(5–6), 184–191. <https://doi.org/10.1159/000505851>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms15287>
- Takizawa, F., Tsuji, S., & Nagasawa, S. (1996). Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Letters*, 397(2–3), 269–272. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01197-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01197-0)
- Tamai, K., Tanaka, N., Nakano, T., Kakazu, E., Kondo, Y., Inoue, J., Shiina, M., Fukushima, K., Hoshino, T., Sano, K., Ueno, Y., Shimosegawa, T., & Sugamura, K. (2010). Exosome secretion

of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3), 384–390. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.07.083>

Taylor, D. D., Chou, I. N., & Black, P. H. (1983). Isolation of plasma membrane fragments from cultured murine melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 113(2), 470–476. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91749-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91749-7)

Taylor, D. D., Zacharias, W., & Gercel-Taylor, C. (2011). Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 728, 235–246. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-068-3_15

Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., ... Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766–769. <https://doi.org/10.1038/CR.2014.44>

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3.22. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>

Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(12), 7309–7318. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.12.7309>

Théry, C., Regnault, A., Garin, J., Wolfers, J., Zitvogel, L., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 599–610. <https://doi.org/10.1083/JCB.147.3.599>

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Jose Alcaraz, M., Anderson, J. D., Jay, S. M., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S. M., Jones, J. C., Jong, A., Jovanovic-Talisman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S., Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E. T., ... Schiffelers, R. (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. *Anabela Cordeiro-Da-Silva*, 357. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/NRI855>

Thornburg, K. L., O'Tierney, P. F., & Louey, S. (2010). Review: The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta*, 31 Suppl(Suppl). <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2010.01.002>

- Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, J., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, *645*(1), 63–70. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5)
- Ugidos, N., Mena, J., Baquero, S., Alloza, I., Azkargorta, M., Elortza, F., & Vandembroeck, K. (2019). Interactome of the Autoimmune Risk Protein ANKRD55. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02067>
- Utleg, A. G., Yi, E. C., Xie, T., Shannon, P., White, J. T., Goodlett, D. R., Hood, L., & Lin, B. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *The Prostate*, *56*(2), 150–161. <https://doi.org/10.1002/PROS.10255>
- Vagner, T., Spinelli, C., Minciacchi, V. R., Balaj, L., Zandian, M., Conley, A., Zijlstra, A., Freeman, M. R., Demichelis, F., De, S., Posadas, E. M., Tanaka, H., & Di Vizio, D. (2018). Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1505403>
- van Blitterswijk, W. J., de Veer, G., Krol, J. H., & Emmelot, P. (1982). Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *688*(2), 495–504. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(82\)90361-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(82)90361-3)
- Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.125>
- Vaswani, K., Koh, Y. Q., Almughlliq, F. B., Peiris, H. N., & Mitchell, M. D. (2017). A method for the isolation and enrichment of purified bovine milk exosomes. *Reproductive Biology*, *17*(4), 341–348. <https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2017.09.007>
- 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. <https://doi.org/10.1017/s0967199414000677>
- Vella, L. J., Greenwood, D. L. V., Cappai, R., Scheerlinck, J. P. Y., & Hill, A. F. (2008). Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *124*(3–4), 385–393. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2008.04.002>
- Veraguas, D., Aguilera, C., Henriquez, C., Velasquez, A. E., Melo-Baez, B., Silva-Ibañez, P., Castro, F. O., & Rodriguez-Alvarez, L. (2020). Evaluation of extracellular vesicles and gDNA from culture medium as a possible indicator of developmental competence in human embryos. *Zygote*. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000593>
- Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., Jimenez-Almazan, J., Martinez, S., Navarro, R., Peinado, V., Mercader, A., Meseguer, M., Blesa, D., Moreno, I., Valbuena, D., Rubio, C., & Simon, C.

- (2018). Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Human Reproduction*, 33(4), 745–756. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey028>
- Vernet, P., Aitken, R. J., & Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1–2), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.069>
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS3980>
- Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Conrad, R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(7), 940–948. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2012.03.017>
- Waldenström, A., Genneback, N., Hellman, U., & Ronquist, G. (2012). Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PloS One*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034653>
- Wang, L., & Zhang, L. (2020). Circulating Exosomal miRNA as Diagnostic Biomarkers of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.00053>
- Wei, W., Ao, Q., Wang, X., Cao, Y., Liu, Y., Zheng, S. G., & Tian, X. (2021). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: A Promising Biological Tool in Nanomedicine. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.590470>
- Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M. J. A., & Vader, P. (2018). Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00738>
- Wu, Y., Lv, Z., Yang, Y., Dong, G., Yu, Y., Cui, Y., Tong, M., Wang, L., Zhou, Z., Zhu, H., Zhou, Q., & Sha, J. (2014). Blastomere biopsy influences epigenetic reprogramming during early embryo development, which impacts neural development and function in resulting mice. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(9), 1761–1774. <https://doi.org/10.1007/S00018-013-1466-2>
- Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T., & Ishiguro, N. (2012). Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74(11), 1523–1525. <https://doi.org/10.1292/JVMS.12-0032>
- Yang, H., Yang, D., Zhu, Q., Wang, K., Zhang, C., Chen, B., Zou, W., Hao, Y., Ding, D., Yu, Z., Ji, D., Chen, D., Cao, Y., Zou, H., & Zhang, Z. (2022). Application of Two Blastocyst Biopsy Strategies in Preimplantation Genetic Testing Treatment and Assessment of Their Effects. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.852620>

- Yang, L., Lv, Q., Chen, W., Sun, J., Wu, Y., Wang, Y., Chen, X., Chen, X., & Zhang, Z. (2017). Presence of embryonic DNA in culture medium. *Oncotarget*, *8*(40), 67805–67809. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.18852>
- Yang, S., Che, S. P. Y., Kurywchak, P., Tavormina, J. L., Gansmo, L. B., Correa de Sampaio, P., Tachezy, M., Bockhorn, M., Gebauer, F., Haltom, A. R., Melo, S. A., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2017). Detection of mutant KRAS and TP53 DNA in circulating exosomes from healthy individuals and patients with pancreatic cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *18*(3), 158–165. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1281499>
- Yang, Y., Zeng, Y., Lv, Z., Wan, R., Tong, M., Zhu, H., Wang, L., Zhou, Z., Zhou, Q., & Sha, J. (2012). Abnormal development at early postimplantation stage in mouse embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)*, *295*(7), 1128–1133. <https://doi.org/10.1002/AR.22456>
- Yao, Q., Chen, L., Liang, Y., Sui, L., Guo, L., Zhou, J., Fan, K., Jing, J., Zhang, Y., & Yao, B. (2016). Blastomere removal from cleavage-stage mouse embryos alters placental function, which is associated with placental oxidative stress and inflammation. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep25023>
- Yokoi, A., Villar-Prados, A., Oliphint, P. A., Zhang, J., Song, X., DeHoff, P., Morey, R., Liu, J., Roszik, J., Clise-Dwyer, K., Burks, J. K., O'Halloran, T. J., Laurent, L. C., & Sood, A. K. (2019). Mechanisms of nuclear content loading to exosomes. *Science Advances*, *5*(11). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAX8849>
- Yu, Y., Wu, J., Fan, Y., Lv, Z., Guo, X., Zhao, C., Zhou, R., Zhang, Z., Wang, F., Xiao, M., Chen, L., Zhu, H., Chen, W., Lin, M., Liu, J., Zhou, Z., Wang, L., Huo, R., Zhou, Q., & Sha, J. (2009). Evaluation of Blastomere Biopsy Using a Mouse Model Indicates the Potential High Risk of Neurodegenerative Disorders in the Offspring. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *8*(7), 1490. <https://doi.org/10.1074/MCP.M800273-MCP200>
- Zacchini, F., Arena, R., Abramik, A., & Ptak, G. E. (2017). Embryo biopsy and development: the known and the unknown. *Reproduction (Cambridge, England)*, *154*(5), R143–R148. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0431>
- Zeng, Y., Lv, Z., Gu, L., Wang, L., Zhou, Z., Zhu, H., Zhou, Q., & Sha, J. (2013). Preimplantation genetic diagnosis (PGD) influences adrenal development and response to cold stress in resulting mice. *Cell and Tissue Research*, *354*(3), 729–741. <https://doi.org/10.1007/S00441-013-1728-1>
- Zhang, H., & Martin-DeLeon, P. A. (2003). Mouse Spam1 (PH-20) Is a Multifunctional Protein: Evidence for Its Expression in the Female Reproductive Tract. *Biology of Reproduction*, *69*(2), 446–454. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.102.013854>

Zhang, M., Ouyang, H., & Xia, G. (2009). The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular Human Reproduction*, *15*(7), 399–409. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAP031>

Zhao, H. C., Zhao, Y., Li, M., Yan, J., Li, L., Li, R., Liu, P., Yu, Y., & Qiao, J. (2013). Aberrant epigenetic modification in murine brain tissues of offspring from preimplantation genetic diagnosis blastomere biopsies. *Biology of Reproduction*, *89*(5). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.109926>

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, *4*(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/NM0598-594>