



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

“Caracterización morfológica y molecular de vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos pre-implantatorios durante el periodo de compactación”

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Veterinarias

BÁRBARA BELÉN MELO BÁEZ
CHILLÁN-CHILE
2023

Profesor Guía: 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. Ricardo Felmer Dörner
Facultad de Ciencias Agropecuarias y
Forestales
Universidad de la Frontera

Dr. Carlos Escudero Orozco
Facultad de Ciencias
Universidad del Bío-Bío

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

Director de Programa

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

A mi familia,

A mi país,

A Lleretny.

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT N° 1170310 (2017-2020).

Beca de Doctorado Nacional ANID (2019-2022) N° 21191050

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Desarrollo embrionario pre-implantatorio bovino	1
2. Tecnologías de reproducción asistida	5
3. Evaluación embrionaria	9
3.1 Evaluación morfológica	9
3.2 Evaluación de biomarcadores de competencia embrionaria	12
3.2.1 Vesículas extracelulares como biomarcadores de selección embrionaria	19
4. Caracterización de vesículas extracelulares	21
4.1. Caracterización de EVs separadas/aisladas	24
4.2. Análisis funcional de las EVs	26
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	30
IV. MATERIALES Y MÉTODO	31
Diseño Experimental	31
Lugar de estudio	33
Producción de embriones <i>in vitro</i> y colecta de medios de cultivo condicionados	33
Biopsia embrionaria	36
Separación de vesículas extracelulares de medios de cultivo condicionados por embriones pre-implantatorios tempranos	36
Análisis morfológico y molecular de vesículas extracelulares de medios de cultivo condicionados por embriones pre-implantatorios tempranos	37

Caracterización del contenido de miRNAs en vesículas extracelulares secretadas por embriones pre-implantatorios tempranos	39
Análisis cuantitativo de miRNAs en embriones bovinos, biopsia embrionaria y EVs mediante qPCR	40
Análisis estadístico	42
V. RESULTADOS	43
Experimento n°1	43
1. Identificación y caracterización de EVs derivadas de medio de cultivo condicionado por embriones bovinos pre-implantatorios	43
2. Análisis de expresión diferencial de miRNAs	44
3. Identificación in silico de las rutas de señalización relacionadas con los miRNAs identificados diferencialmente expresados entre embriones con diferente capacidad de desarrollo.	49
Experimento n°2	50
1. Desarrollo embrionario post-biopsia	50
2. Análisis de expresión génica en biopsia de blastómera, EVs secretadas durante la compactación y embrión biopsiado	50
VI. DISCUSIÓN	52
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
IX. ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representación esquemática de vías de liberación de los diferentes tipos de vesículas extracelulares. Elaboración propia.	22
Figura 2	Esquema de experimento n°1	32
Figura 3	Esquema de experimento n°2	33
Figura 4	Caracterización mediante citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión de EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro con diferente competencia embrionaria durante la compactación	43
Figura 5	Caracterización Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro con diferente competencia embrionaria durante la compactación	44
Figura 6	Volcano plot de miRNAs diferencialmente expresados en EVs secretadas por embriones bovinos producidos in vitro que se bloquean en estadio de 8-16 células	48
Figura 7	Predicción de vías de señalización KEGG relacionadas con los miRNAs sobreexpresados en las EVs secretadas por embriones producidos in vitro bloqueados que se bloquean en estadio de 8-16 células.	49
Figura 8	Expresión génica de bta-miR-103, bta-miR-100, bra-miR-502a, bta-miR-1, bta-miR-92a, bta-miR-140, bta-miR-2285av y bta-miR-222 en blastómeras obtenidas mediante biopsia al día 3.5 post-IVF, EVs secretadas por éste durante la compactación, y embriones al día 5, con diferente competencia embrionaria. Letras distintas representan diferencia significativa ($p < 0,05$).	50

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Clasificación morfológica según criterios de la Sociedad Internacional de Tecnologías de Embriones (IETS)	10
Tabla 2	Secuencia de partidores utilizados para RT-PCR de miRNAs seleccionados	41
Tabla 3	miRNAs identificados en EVs de medios de cultivo	45

RESUMEN

Las vesículas extracelulares (EVs) son secretadas por diferentes tipos celulares y cargan con diferentes moléculas como ARNm, pequeños ARNs, proteínas, lípidos, e incluso ADN, por lo que se ha propuesto utilizarlas como biomarcadores y agentes terapéuticos. Además, se han descrito como mecanismo de comunicación celular debido a su habilidad de transferir aquellas moléculas a células receptoras. Las EVs están involucradas en diversos procesos fisiológicos reproductivos como desarrollo de gametos y comunicación embrio-materna, incluso previo a la señalización molecular del reconocimiento de la gestación mediado por IFN-tau. Las características de las EVs como concentración, tamaño, distribución y contenido podrían reflejar la calidad embrionaria, y ser útiles para la predicción de la competencia embrionaria en embriones producidos *in vitro*. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar las EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* con diferente competencia embrionaria durante la activación del genoma embrionario, y la búsqueda de miRNAs asociados a EVs que permitan la selección temprana de embriones bovinos, además de identificar si estos miRNAs reflejan el estado molecular del embrión.

En el primer experimento se colectaron las EVs producidas por embriones cultivados individualmente desde la activación del genoma embrionario (día 3.5 post-IVF) hasta la compactación embrionaria (día 5 post-IVF), y se clasificaron según la capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto al día 7. Las EVs expresaron marcadores específicos de superficie como CD9, CD81, CD63 y CD40 en ambos grupos experimentales, y presentaron redondeada con bicapa lipídica. Los embriones que se bloquearon al día 3.5 post-IVF (G1) secretaron mayor concentración de EVs, y éstas tenían un tamaño superior, en comparación a las EVs secretadas por embriones que continuaron su desarrollo (G2). Se identificaron 95 miRNAs en las muestras y 8 miRNAs se expresaron diferencialmente entre los grupos experimentales (G1 contra G2), donde bta-miR-103, bta-miR-100, bra-miR-502a y bta-miR-1 se encontraron sobreexpresados en las EVs secretadas por embriones bloqueados (G1), mientras que bta-miR-92a, bta-miR-140, bta-miR-2285av y bta-miR-222 se encontraron sobreexpresados en el G2. Aquellos miRNAs sobreexpresados se encuentran regulando vías de señalización importantes para el desarrollo embrionario como biosíntesis y metabolismo de ácidos grasos, degradación de lisina, gap junction y regulación de células madre.

En el segundo experimento, se realizó biopsia en embriones bovinos de 8 células al día 3.5 post-IVF y se mantuvo en cultivo individual en medio depletado de EVs hasta el día 5. Se evaluó el set de miRNAs en las blastómeras colectadas al día 3,5 post-IVF, en el embrión resultante al día 5 post-IVF y en el medio de cultivo condicionado durante esta etapa de desarrollo. Se encontró mayor expresión de bta-miR-100, bta-miR-92a, bta-miR-222 en las blastómeras obtenidas mediante biopsia de embriones al día 3.5 post-IVF en relación con los embriones al día 5 ($p < 0.05$). La expresión de bta-miR-100 y bta-miR-103 es mayor en los embriones bloqueados que los embriones competentes. Además, en el caso de bta-miR-100 y bta-miR-103 se sigue un patrón de expresión génica decendiente desde las blastómeras, hacia los embriones, tanto en los bloqueados como en los competentes ($p < 0.05$). Con respecto a bta-miR-140, la mayor expresión se obtuvo en las EVs de los embriones que se bloquearon ($p < 0.05$).

En conclusión, los embriones secretan EVs, cuyas características morfológicas y moleculares dependen de su competencia y estadio de desarrollo. Al mismo tiempo, el embrión utiliza la secreción de EVs como un método de descarte de moléculas perjudiciales para intentar rescatar el desarrollo embrionario.

Palabras clave: Desarrollo embrionario, Vesículas Extracelulares, miRNAs

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are secreted by different cellular types and carry several molecules such as mRNA, small RNAs, proteins, lipids, and DNA. Because of that, they have been proposed as biomarkers and potential therapeutic agents. In addition, they have been described as a cellular communication mechanism due to their ability to transfer those molecules to recipient cells. EVs are involved in diverse reproductive physiological processes including gamete development and embryo-maternal interaction, even before the onset of molecular signaling of pregnancy recognition mediated by IFN-tau. The characteristics of EVs, including their concentration, size, distribution, and content, might reflect embryo quality, thus making them potential markers of developmental competence in embryos produced *in vitro*. This study aimed to characterize EVs secreted by *in vitro*-produced bovine embryos with different embryonic competence during embryonic genome activation, identification of miRNAs within EVs that could allow an early selection of embryos, and define if the miRNA content in EVs reflects the molecular content of the embryo.

In the first experiment, EVs produced by individually cultured embryos were collected from the moment of the embryonic genome activation (day 3.5 post-IVF) until compaction (day 5 post-IVF), and they were classified according to the ability to reach blastocyst stage at day 7. Collected EVs expressed specific surface markers such as CD9, CD81, CD63 and CD40 in both experimental groups, and presented rounded shape with lipid bilayer. Embryos that were blocked at day 3.5 post-IVF (G1) secreted a higher concentration of EVs, and these were larger in size, compared to the EVs secreted by embryos that continued their development (G2). 95 miRNAs were identified among the samples, and 8 were differentially expressed between experimental groups (G1 versus G2), where bta-miR-103, bta-miR-100, bra-miR-502a and bta-miR-1 were found upregulated in EVs secreted by blocked embryos (G1), while bta-miR-92a, bta-miR-140, bta-miR-2285av and bta-miR-222 were found upregulated in G2. Those upregulated miRNAs are found to regulate important signaling pathways for embryonic development such as fatty acid biosynthesis and metabolism, lysine degradation, gap junctions, and stem cell regulation.

In the second experiment, biopsies were performed on 8-cell bovine embryos at day 3.5 post-IVF and they were maintained in individual culture in EVs-depleted media until day 5. The set of miRNAs was evaluated in the blastomeres collected at day 3.5 post-IVF, in the resulting embryo at day 5 post-IVF and in the conditioned culture media during this window of development. Higher expression of bta-miR-100, bta-miR-92a, bta-miR-222 was found in

the blastomeres obtained by biopsy of embryos at day 3.5 post-IVF in relation to embryos at day 5 ($p < 0.05$). The expression of bta-miR-100 and bta-miR-103 is higher in blocked embryos than competent embryos. Furthermore, in the case of bta-miR-100 and bta-miR-103, a descending gene expression pattern is followed from the blastomeres to the embryos, both in the blocked and in the competent ones ($p < 0.05$). Regarding bta-miR-140, the highest expression was obtained in the EVs of the embryos that were blocked ($p < 0.05$).

In conclusion, embryos secrete EVs, whose morphological and molecular characteristics depend on their competence and stage of development. At the same time, the embryo uses the secretion of EVs as a method of discarding harmful molecules to try to rescue embryonic development.

Keywords: Embryo development, Extracellular Vesicles, miRNAs

INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo embrionario pre-implantatorio bovino

Durante décadas se ha utilizado el modelo murino para el estudio del desarrollo embrionario humano. El uso de esta especie en la investigación comenzó en los inicios del siglo 20 (Masopust *et al.*, 2017). Más tarde, el modelo bovino comenzó a tener mayor relevancia luego de que se demostrara la similitud en la expresión génica de embriones bovinos y humanos (Jiang *et al.*, 2015). Además, eventos importantes como la activación del desarrollo embrionario se desarrollan al mismo tiempo en embriones humanos y bovinos (Kues *et al.*, 2008). El estudio del desarrollo embrionario bovino es clave para optimizar el uso de animales domésticos como modelo de estudio para enfermedades humanas. Sin embargo, durante el último siglo, ha tomado mayor importancia debido al impacto que generó la transferencia de embriones en los programas de producción animal, ya que, aumentando el número de bovinos con alto valor genético, se logró acelerar la ganancia genética en los rebaños con un impacto positivo en el crecimiento de la industria (Magata, 2023). Por otra parte, el nacimiento del primer ternero producido por IVF en 1982 (Brackett *et al.*, 1982) y el descubrimiento de la heparina como agente capacitante de espermatozoides bovinos en 1986 (Parrish *et al.*, 1986) fueron eventos claves que permitieron el inicio de una era de intensa investigación para el desarrollo de la producción eficiente de embriones bovinos. Sin embargo, aun la tecnología de producción de embriones *in vitro* tiene resultados menores en términos de nacimientos de crías comparado con la inseminación artificial o la transferencia de embriones *in vivo*. Por ende, estudiar el desarrollo embrionario bovino también ha sido útil para mejorar la seguridad, eficiencia y aplicabilidad de las técnicas de reproducción asistida en esta especie (Hall *et al.*, 2013).

El evento principal que marca el comienzo del desarrollo embrionario es la fecundación, dando lugar a la formación de un embrión (cigoto) que contiene la combinación de genes provenientes de dos progenitores (Gilbert, 2000). Para que este evento se lleve a cabo, la maduración del ovocito (Hall *et al.*, 2013) y la capacitación del espermatozoide es un prerequisite (Wassarman, 1987). La penetración del espermatozoide permite la activación ovocitaria y con ello, la finalización de la meiosis del ovocito, remodelación epigenética del genoma paterno, fusión de pronúcleos y la inducción de la primera división mitótica (Gilbert, 2000). Posterior a la unión de los pronúcleos maternos y paternos comienza la

segmentación, donde las siguientes divisiones son mitóticas, resultando en células hermanas idénticas, denominadas blastómeras (Noden y Lahunta, 1990). La iniciación del desarrollo, así como también el programa de desarrollo embrionario temprano, está controlado por transcritos maternos, además de proteínas producidas y almacenadas durante la ovogénesis y etapas finales de la maduración ovocitaria (Tadros y Lipshitz, 2009).

Cuando el embrión bovino alcanza el estado de 8 células se produce la activación del genoma embrionario, lo cual es necesario para la transición de un control materno del desarrollo a un control exclusivamente embrionario (Camous *et al.*, 1986; Telford *et al.*, 1990). Durante esta etapa ocurre simultáneamente la degradación de proteínas y ARN materno, además de la síntesis “*de novo*” del ARNm embrionario junto a la traducción de nuevas proteínas (Memili y First, 2000). Junto a estos cambios, ocurren modificaciones epigenéticas en el ADN, que ejercen un control en la expresión génica durante el desarrollo embrionario temprano (Kues *et al.*, 2008). Se ha demostrado que esta transición materno-cigótica comprende una serie de sucesos que involucran una expresión génica altamente regulada (Zeng *et al.*, 2004). Existen evidencias que indican que ciertos microRNAs, como miR-21 y miR-130, podrían estar regulando la degradación de los ARN maternos, debido al aumento en la expresión de éstos desde el estado de una célula al estado de 8 células (Mondou *et al.*, 2012). Una inadecuada regulación con respecto al tiempo de activación del genoma y la expresión de genes puede conducir a la detención del desarrollo embrionario (Latham y Schultz, 2001). Durante esta etapa, las blastómeras aún son células totipotentes cuyo estado se mantiene por la expresión de factores de pluripotencia como OCT4 (Octamer-binding transcription factor-4; según siglas en inglés) y SOX2 (SRY (sex determining region Y)-box 2, según siglas en inglés) suministrados por las reservas maternas y luego sintetizados por el genoma embrionario (Avilion *et al.*, 2003; Foygel *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

En bovinos, luego de la tercera segmentación, comienza la compactación y la formación de la mórula. En esta etapa las blastómeras maximizan su contacto mediante uniones estrechas y gap, permitiendo la comunicación intercelular mediante el paso de moléculas pequeñas e iones (Gilbert, 2000). Durante la transición al estado de 32-64 células, ocurre otro evento crítico del desarrollo embrionario: la primera diferenciación celular (Degrelle *et al.*, 2005). Durante la diferenciación se define el destino celular y las células ubicadas en el interior de la mórula dan lugar al macizo celular interno (ICM), mientras que las ubicadas

en el exterior dan lugar al trofotodermo (o trofoblasto) (Balakier y Pedersen, 1982). A nivel molecular, se establecen patrones de expresión génica diferencial entre estos dos tipos celulares (Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010).

La compactación y primera diferenciación celular es un prerequisite para la blastulación (o cavitación), que ocurre al día 7-8 posterior a la ovulación en el bovino (Gilbert, 2000; Vejlsted *et al.*, 2010). Durante este proceso las células del trofotodermo secretan fluido para crear el blastocelo, que ubicará el ICM en un lado del “anillo” de células del trofotodermo, generando una estructura denominada blastocisto (Gilbert, 2000). En este estadio, el embrión bovino tiene alrededor de 120 células, de las cuales aproximadamente el 25% pertenecen al ICM y el 75% al trofotodermo (Morris *et al.*, 2000). La pluripotencia de las células del ICM se mantiene por la expresión de OCT4, SOX2 y NANOG (Foygel *et al.*, 2008). En el blastocisto bovino, OCT4 se expresa tanto en el ICM como en el trofotodermo, a diferencia del blastocisto murino donde la expresión de OCT4 se restringe al ICM (Degrelle *et al.*, 2005). Por el contrario y al igual que en murinos, la expresión de SOX2 y NANOG se restringe al ICM (Kuijk *et al.*, 2008). Por otro lado, CDX2 es otro factor de transcripción relacionado con el destino celular, quien al estar sobreexpresado determina el destino de las blastómeras que darán lugar al trofotodermo (Kuijk *et al.*, 2008).

La liberación de la zona pelúcida es imprescindible para la interacción física del embrión con el ambiente materno (Betteridge y Fléchon, 1988). Existen especies de implantación temprana como roedores y primates superiores, en las cuales, el blastocisto protruido se implanta inmediatamente en el endometrio materno (Strickland *et al.*, 1976). Sin embargo, en los bovinos, la implantación del embrión en el útero es tardía. En esta especie, los blastocistos se expanden por arrastre de agua gracias a la acumulación de iones de sodio en el blastocelo (Wiley, 1984), y al día 8-9 eclosionan (o protruyen) de la zona pelúcida. En este momento, el embrión sufre un segundo proceso de diferenciación celular donde el ICM se diferencia en epiblasto e hipoblasto, que junto a la eliminación del trofotodermo polar que rodea al epiblasto, dan lugar al disco embrionario (Vejlsted *et al.*, 2005). A partir de la eclosión, el embrión crece hasta el día 13 manteniendo una forma esférica y cambiando a una forma ovoide al día 14 (Betteridge y Fléchon, 1988). Posterior a la formación del disco embrionario, se produce la elongación adoptando una forma filamentosa hasta el inicio de la implantación al día 20-21 (Betteridge y Fléchon, 1988; Degrelle *et al.*, 2005; Hue *et al.*, 2001; Maddox-Hyttel *et al.*, 2003). El trofotodermo mural aumenta en longitud y peso (Wales y Cuneo, 1989), lo que facilita la comunicación materno-fetal para una correcta

implantación (Stroband y Van der Lende, 1990). A partir de este momento la expresión de OCT4 se apaga en el trofotodermo mural (Degrelle *et al.*, 2005).

La elongación embrionaria *in vitro* hasta ahora no se ha podido llevar a cabo con éxito, por ser un proceso que requiere de sustancias producidas por las glándulas uterinas y presentes en el fluido luminal uterino (Flechon *et al.*, 1986), denominadas histótrofo. Éste es una mezcla de proteínas, lípidos, aminoácidos, azúcares, iones, citoquinas, factores de crecimiento y vesículas extracelulares (Burns *et al.*, 2014; Spencer *et al.*, 2007), secretada de acuerdo con los cambios en la expresión génica del endometrio y gatillado por la secreción de progesterona ovárica posterior a la ovulación. Las moléculas contenidas en el histótrofo ejercen cambios en la expresión génica de las células uterinas, potenciando la proliferación y migración del trofotodermo, así como la unión y adhesión al epitelio luminal endometrial (Spencer *et al.*, 2007). Sin embargo, en el útero, la comunicación embrio-materna es bidireccional (Maillo *et al.*, 2015). Esto se demostró inicialmente por la secreción de interferón tau (IFNt) por parte del concepto (Bazer, 1992), previo a la implantación y durante la elongación (Roberts *et al.*, 2003).

El IFNt permite la mantención del cuerpo lúteo, además de la diferenciación y funcionalidad endometrial para la recepción del embrión (Spencer *et al.*, 2007), evento denominado 'reconocimiento materno de la gestación'. Por lo tanto, en bovinos la señalización bioquímica más potente que conlleva a la implantación es la mediada por IFNt, cuya secreción máxima ocurre entre los días 16 y 19 de preñez (Bazer, 1992). Se ha propuesto que existe una señalización más temprana, mediada por vesículas extracelulares (EVs), quienes estarían involucradas en la transferencia de miRNAs y moléculas de adhesión, ya sea hacia el blastocisto o al tejido adyacente endometrial (Almiñana y Bauersachs, 2020; Burns *et al.*, 2014; Kusama *et al.*, 2018; Ng *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha demostrado que el embrión bovino es capaz de secretar EVs, cuyas características y contenido de pequeños ARNs dependen de la competencia, origen, etapa, sexo y viabilidad del embrión (Andrade *et al.*, 2019; Dissanayake *et al.*, 2020; Mellisho *et al.*, 2017, 2019; Qu *et al.*, 2017; Taqi *et al.*, 2019). Las EVs secretadas por los embriones son internalizadas por las células endometriales (Giacomini *et al.*, 2017) y oviductales, afectando su expresión génica (Lee *et al.*, 2002). Estos últimos avances en el estudio de la comunicación embrio-materna, desconocida hace unas décadas, se ha logrado gracias al uso de técnicas de reproducción asistida.

2. Tecnologías de reproducción asistida

Las tecnologías de reproducción asistida (ARTs) se refieren a aquellas técnicas donde haya manipulación de gametos y embriones. Son utilizadas, tanto en humanos, como en animales domésticos, en peligro de extinción y de experimentación. El objetivo de las ARTs es diferente para cada grupo (Vajta *et al.*, 2010)

En humanos, estas tecnologías se utilizan para garantizar un embarazo en casos de infertilidad, además tienen la ventaja de permitir el diagnóstico genético preimplantatorio (PGD). Éste se lleva a cabo para la selección de un embrión euploide, es decir, con un número cromosómico normal, mediante el análisis molecular de algunas células del embrión (Taylor y Tachataki, 2002; Vajta *et al.*, 2010).

En caso de las especies domésticas, el objetivo ha cambiado durante el transcurso de los años, ya que inicialmente se utilizaban en programas de mejoramiento genético, para la multiplicación de animales seleccionados por sus características de productividad (producción de leche o ganancia de peso) (Hall *et al.*, 2013), y también para la prevención de infecciones transmitidas por vía sexual (Vajta *et al.*, 2010). La inseminación artificial fue la primera tecnología reproductiva aplicada a los bovinos a principios del siglo XX (Ivanoff, 1922). El nacimiento de los primeros terneros mediante inseminación artificial (Polge y Rowson, 1952) fue un hito importante para el crecimiento de esta tecnología. Posteriormente, se desarrollaron técnicas como la transferencia de embriones asociada a estimulación ovárica (MOET según sus siglas en inglés) y técnicas de mayor complejidad como la producción *in vitro* de embriones. El avance de las tecnologías de embriones *in vitro* e *in vivo* ha contribuido al desarrollo de otras, como la criopreservación de embriones y ovocitos, permitiendo la conservación y distribución de recursos genéticos (Moore y Hasler, 2017).

La producción de embriones *in vitro* se puede llevar a cabo mediante fecundación *in vitro* (IVF), inyección espermática intracitoplasmática (ICSI) ó transferencia nuclear somática (TNS) (Moore y Hasler, 2017). En animales, la producción de embriones *in vitro* e *in vivo* permite el incremento del número de crías generado a partir de parentales seleccionados y la posibilidad de definir la calidad de ese embrión antes de la transferencia (Jaton *et al.*, 2020; Loi *et al.*, 2016; Thomasen *et al.*, 2016). Todo esto tiene un impacto significativo en los programas de mejoramiento genético, permitiendo la reducción de los intervalos generacionales y acelerando el mejoramiento genético del rebaño (Kasinathan *et al.*, 2015).

Sin embargo, la producción de embriones mediante TNS, actualmente está enfocada en la producción de modelos animales de experimentación para la investigación biomédica (Hall *et al.*, 2013; Vajta *et al.*, 2010). Por ejemplo, permite el estudio de eventos epigenéticos, la producción de modelos de enfermedades humanas, la producción de proteínas con relevancia farmacéutica o comercial, y la posibilidad de xenotrasplante (Vajta *et al.*, 2010). También es utilizada en animales en peligro de extinción para preservar el material genético de un individuo muerto y asegurar la biodiversidad genética de la especie (Jewgenow *et al.*, 2017).

En esta especie, la técnica más utilizada es la fecundación *in vitro*, que contempla la maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros (IVM), co-cultivo con espermatozoides capacitados *in vitro* y el subsecuente cultivo *in vitro* de los embriones (IVC) desde cigoto hasta estado de blastocisto (Hall *et al.*, 2013).

En el ámbito de la investigación, frecuentemente los ovocitos se obtienen a partir de ovarios de vacas y vaquillas faenadas. En contraste con la producción de embriones de alto valor genético para venta, donde los ovocitos se obtienen de hembras donadoras mediante aspiración transvaginal guiada por ultrasonografía (Ovum pick-up: OPU) (Patrick Lonergan y Fair, 2016). El origen de los ovocitos es determinante en la tasa de desarrollo de los embriones producidos *in vitro*, ya que depende de la calidad ovocitaria inicial, la cual es inferior en ovocitos obtenidos de hembras faenadas. En este caso, el valor genético, fase del ciclo estral y fase de la onda folicular de la hembra donante es desconocida, por ende, la calidad ovocitaria será muy variable (Patrick Lonergan y Fair, 2016).

El objetivo de la maduración *in vitro* (IVM) es transformar a un ovocito inmaduro en uno competente, lo cual se mide por la capacidad de reanudar la meiosis, interactuar adecuadamente con la célula espermática para producir un cigoto funcional y activar el genoma embrionario en el tiempo correspondiente, llevando a una implantación exitosa en el útero y la mantención de la preñez a término (Luciano y Sirard, 2018). Para esto, los ovocitos inmaduros deben cultivarse en un medio de maduración, que en la mayoría de los laboratorios contiene M-199 (Earle's salts) como medio base, gonadotropinas (LH, FSH o una combinación de éstas), factores de crecimiento (EGF, IGF), esteroides (Estradiol), fuentes de glucosa y proteínas (suero fetal bovino y/o albúmina sérica bovina). En bovinos, el tiempo de maduración usualmente es 22-24 horas (Patrick Lonergan y Fair, 2016).

La fecundación, permite el restablecimiento del número cromosómico somático y la activación del desarrollo embrionario (Schultz y Kopf, 1995). Para generar una fecundación *in vitro* (IVF) exitosa, se requiere un ovocito funcionalmente competente y un espermatozoide capacitado. El paso inicial para la capacitación espermática es la remoción del líquido seminal mediante swim-up, lavado espermático o gradiente de densidad de Percoll. Luego, se debe inducir la capacitación artificial de los espermatozoides en medio de fecundación suplementado con heparina (Parrish, 2014), fuentes de energía como piruvato o glucosa; y proteicas, que usualmente es albúmina sérica (Visconti *et al.*, 1998). La concentración de semen se determina para cada toro para alcanzar la máxima tasa de fecundación, minimizando la poliespermia (Parrish, 2014). La co-incubación de ambos gametos usualmente se realiza por 18 a 20 horas. Durante este periodo, el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida, se fusiona a la membrana plasmática del ovocito, lo que genera la activación de éste y se forman los pronúcleos masculino y femenino. Después de la co-incubación, las células del cúmulus adheridas se eliminan de la zona pelúcida y los presuntos cigotos se cultivan hasta que ocurra la blastulación de los embriones (Machaty *et al.*, 2012).

Los sistemas de cultivo embrionario intentan reproducir las condiciones naturales donde se desarrolla un embrión pre-implantatorio. El medio de cultivo es fundamental para garantizar la entrega de todos los factores que naturalmente el embrión obtendría del ambiente materno, lo cual incluye fuentes energéticas (piruvato, lactato), fuentes proteicas (albúmina sérica, suero fetal bovino) aminoácidos (esenciales y no esenciales), hormonas (LH, FSH, Estradiol) y factores de crecimiento (EGF, IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF β 1, PDGF-BB) (El-Aziz *et al.*, 2016). El fluido sintético oviductal (SOF), diseñado originalmente por Tervit *et al.* (1972) ha sido modificado de forma que pueda soportar el desarrollo de embriones bovinos *in vitro* hasta estadio de blastocisto. Este medio es similar en contenido iónico y proteico al fluido oviductal de las ovejas y actualmente, es la base de muchos protocolos de producción de embriones *in vitro* en rumiantes (El-Aziz *et al.*, 2016). Otros medios basados en soluciones simples salinas balanceadas y carbohidratos que se utilizan para el cultivo de embriones pre-implantatorios son Charles Rosenkrans 1 (CR1) y medio simple de potasio optimizado (KSOM) (El-Aziz *et al.*, 2016). También existen medios con constituyentes más complejos, como el medio de cultivo de tejidos (TCM) con suplementación adicional de suero y/o capa de alimentación de células somáticas (Dimitrios Rizos *et al.*, 2002). Adicionalmente, existen medios comerciales que se han diseñado y optimizado con el objetivo de reducir las variabilidades asociadas a la preparación artesanal en el laboratorio.

Independientemente del medio base seleccionado, todos deben suplir las necesidades básicas del embrión, incluyendo fuente de proteínas; aminoácidos esenciales y no esenciales; fuentes de energía; factores de crecimiento y compuestos que reduzcan el estrés oxidativo que genera el sistema *in vitro* (luz, tensión de oxígeno) (El-Aziz *et al.*, 2016).

La producción de embriones bovinos ha permitido el desarrollo de modelos para el estudio de los eventos biológicos que controlan el desarrollo temprano y que podrían estar relacionados con problemas de baja fertilidad, tanto en animales, como en humanos (Hall *et al.*, 2013; Lopera-Vásquez *et al.*, 2016). Sin embargo, la producción de embriones mediante maduración, fecundación y cultivo *in vitro* sigue siendo menos eficiente que *in vivo* (Wright y Ellington, 1995): 90% de los ovocitos inmaduros alcanzan la maduración, 80% logra ser fecundado y dividido al menos hasta el estadio de 2 células a las 24-48 horas post-IVF. Sin embargo, sólo el 30-40% de los ovocitos inmaduros alcanzan el estado de blastocisto al día 7 y 8 post-IVF (Rizos *et al.*, 2002). Un alto porcentaje de los embriones producidos *in vitro* tienen menor calidad morfológica (Wright y Ellington, 1995); citoplasma más oscuro, mayor contenido lipídico, zona pelúcida más frágil, además de diferencias en su metabolismo, expresión génica aberrante y mayor incidencia de anomalías cromosómicas (Rizos *et al.*, 2002; Tšuiiko *et al.*, 2017; Turner *et al.*, 2019). La gran mayoría (85%) de los mARN evaluados en embriones bovinos producidos *in vitro* se encuentran desregulados con respecto a la expresión génica de los embriones bovinos producidos *in vivo*. Dentro de los genes desregulados, la mayoría están relacionados con los eventos de transcripción y traducción, sugiriendo que embriones producidos *in vitro* tienen menor calidad debido a una deficiencia en la maquinaria asociada a estos eventos (Corcoran *et al.*, 2006). Todos estos problemas se correlacionan con baja tasa de implantación y desarrollo a término, de los embriones producidos *in vitro* (Crosier *et al.*, 2001; J. F. Hasler *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2019).

La baja eficiencia para la producción de crías saludables, a partir de embriones producidos *in vitro*, ha llevado a un crecimiento más lento en la masificación de la tecnología en los programas productivos (Moore y Hasler, 2017). Es por esto que, múltiples grupos de investigación se enfocan en la optimización de los procesos tecnológicos y biológicos asociados; incrementando la calidad de los gametos y los sistemas de cultivo embrionario (Wright y Ellington, 1995). Además, los esfuerzos para asegurar la producción de crías, ha llevado a la constante búsqueda de biomarcadores para seleccionar los embriones más competentes previo a una transferencia (Rødgaard *et al.*, 2015).

3. Evaluación embrionaria

A pesar de los esfuerzos para mejorar la producción de embriones *in vitro*, la capacidad de desarrollo posterior a la transferencia embrionaria sigue siendo inferior en comparación a la de los embriones producidos *in vivo* (Hasler, 2000). Con la finalidad de garantizar mayores tasas de implantación y desarrollo a término posterior a la transferencia embrionaria, es necesario seleccionar al embrión más competente (Maddox-Hyttel *et al.*, 2003). El término de competencia embrionaria se ha asociado a la calidad embrionaria, definiéndola como la habilidad de desarrollarse hasta blastocisto, implantarse y dar lugar a una cría viva y saludable (Hoelker *et al.*, 2014). El método más utilizado sigue siendo la evaluación morfológica, no sólo por su sencillez, también ser el método menos estresante e invasivo para el embrión (Merton, 2002). Sin embargo, es bastante subjetivo, por lo que actualmente se proponen nuevos métodos de evaluación embrionaria (Christine Wrenzycki, 2018).

3.1. Evaluación morfológica

En 1983, Lindner y Wright propusieron un sistema de grados para la evaluación de embriones bovinos al día 7, combinando un número para el estado de desarrollo (de 5 a 9) y otro para la clasificación morfológica en excelente (I), buena (II), regular (III) y pobre (IV) (Lindner y Wright, 1983). Años después se reemplazó por sistema de grados propuesto por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (actualmente Sociedad Internacional de Tecnologías de Embriones, IETS), donde en el grado 1 se combinaban embriones con grado I y II del sistema anterior (Stringfellow y Seidel, 1998).

Actualmente, el sistema de grados de la IETS sigue siendo la referencia estándar para la evaluación de embriones. En este sistema se plantea que el mejor predictor de viabilidad embrionaria es el estado de desarrollo relativo al que debería tener en un día determinado. Por ejemplo, al día 7 posterior a la fecundación se debería encontrar un embrión en estado de blastocisto expandido, por lo tanto, un embrión que no haya alcanzado aquel estado de desarrollo no será un embrión de calidad excelente. Además, un embrión de buena calidad debe tener morfología compacta y esférica; con blastómeras de tamaño, color y textura similar; citoplasma homogéneo, sin vesículas; espacio perivitelino limpio sin debrís celular; y zona pelúcida uniforme, es decir, sin fisuras ni debrís en su superficie. En base a estas características, el sistema incluye un número para el estado de desarrollo (de 1 a 9), y otro número para la calidad morfológica (de 1 a 4), donde “Excelente o buena” corresponde a

embriones con al menos 85% del material celular intacto y viable. Estos embriones sobreviven bien a la vitrificación/desvitrificación y se recomiendan para su exportación. Los embriones clasificados como calidad “regular”, tienen menor sobrevivencia a vitrificación/desvitrificación, pero la tasa de preñez es adecuada si el embrión es transferido fresco a una receptora. En el caso de los embriones de calidad “Pobre”, no sobreviven a la vitrificación/desvitrificación y la tasa de preñez es baja aun cuando el embrión es transferido fresco. Embriones clasificados con calidad “4” no son viables y deben ser descartados (Tabla 1) (Bó y Mapletoft, 2013).

Tabla 1. Clasificación morfológica según criterios de la Sociedad Internacional de Tecnologías de Embriones (IETS)

Clasificación estado de desarrollo	Estado de desarrollo	Clasificación calidad morfológica	Calidad morfológica
1	Ovocito no fecundado o embrión de 1-célula	1	Excelente o buena
2	Embrión de 2-12 células	2	Regular
3	Mórula	3	Pobre
4	Mórula compacta	4	Muerto o degenerado
5	Blastocisto temprano		
6	Blastocisto		
7	Blastocisto expandido		
8	Blastocisto protruyendo		
9	Blastocisto protruído		

Hace unas décadas, era comúnmente aceptado que embriones bovinos con segmentación temprana eran los mejores candidatos para transferencia embrionaria. Esto se basaba en la correlación entre la primera segmentación y la mayor probabilidad de desarrollarse hasta mórula compacta o blastocisto (Lonergan *et al.*, 1999; Van Soom *et al.*, 1992), menor índice de apoptosis celular (Vandaele *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2016), menor porcentaje de células con anomalías cromosómicas (Pers-Kamczyc *et al.*, 2012; Sugimura *et al.*, 2012) y expresión génica similar a la de embriones producidos *in vivo* (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2004). Sin embargo, los espermatozoides también tienen un rol sobre el programa de desarrollo de los embriones, enlenteciendo la primera segmentación cuando los ovocitos son fecundados con espermatozoides de toros con baja fertilidad (Ward *et al.*, 2001).

Considerando la importancia del programa de desarrollo para la calidad embrionaria, se ha propuesto el uso de *time-lapse* para evaluar el tiempo de segmentación de los embriones y seleccionar los más rápidos (Holm *et al.*, 2002). Sin embargo, la disponibilidad de esta tecnología es más limitada en los laboratorios productores de embriones bovinos a diferencia de las clínicas de fertilidad humana debido a los altos costos de implementación y el bajo número de embriones que se pueden monitorear a la vez (Gutierrez-Adan *et al.*, 2015). Además, Lonergan *et al.* no encontraron diferencias significativas en las preñeces al día 35 posterior a la transferencia de embriones con segmentación lento y rápido (Lonergan *et al.*, 1999).

Adicionalmente, es posible seleccionar embriones mediante la evaluación del conteo y distribución de las células embrionarias. Un mayor número total de células es indicador de mayor capacidad de desarrollo embrionario, siendo menor en embriones bovinos producidos *in vitro* en comparación a embriones bovinos colectados de hembras donantes (Ushijima *et al.*, 2008). Con respecto al número de células en el ICM, disminuye junto a la calidad del embrión (Van Soom *et al.*, 1997a; Van Soom *et al.*, 1997b). Con el uso de tinciones también es posible evaluar el número de células apoptóticas con respecto al número de células viables, ya que un mayor número de células apoptóticas es indicador de menor calidad embrionaria (Bredbacka, 1995).

3.2. Evaluación de biomarcadores de competencia embrionaria

Los cambios morfológicos que se producen durante el desarrollo, en particular durante la etapa temprana pre-implantatoria, están acompañados de cambios en la expresión génica. La detección de marcadores moleculares involucrados en la calidad embrionaria, se pueden evaluar mediante métodos invasivos, como no invasivos (Rødgaard *et al.*, 2015). En este sentido se sugiere el uso de la evaluación de los patrones transcripcionales como criterio de calidad embrionaria (Wrenzycki *et al.*, 2007), ya que éstos varían en embriones evaluados con el mismo código según la clasificación morfológica de la IETS. Al comparar blastocistos bovinos con morfología similar mediante análisis de secuenciación de ARN (RNA-Seq) se encontraron 793 genes diferencialmente expresados entre embriones producidos *in vitro* e *in vivo*, demostrando que la caracterización morfológica es muy limitada (Driver *et al.*, 2012).

La variación de la expresión de genes relacionados con el control de la muerte celular programada (apoptosis) es considerada un indicador de la calidad embrionaria y su respuesta ante las condiciones ambientales, especialmente cuando los embriones son producidos *in vitro* (Gjørret *et al.*, 2003, 2005; Pomar *et al.*, 2005). Dentro de los genes involucrados en los mecanismos apoptóticos, existen los de la familia BCL-2, que actúan regulando positiva o negativamente la cascada en respuesta a estímulos que inducen apoptosis (Vander Heiden y Thompson, 1999). En bovinos, genes anti-apoptóticos como BCL2L1 (BCL2-like 1) y genes pro-apoptóticos como BAX (BCL2-associated X protein), están involucrados en la regulación de la apoptosis en embriones pre-implantatorios (Lonergan *et al.*, 2003; Yang y Rajamahendran, 2002), controlando la activación de caspasas iniciadoras y efectoras como CASP3 (caspase 3), responsables de los cambios que llevan a la muerte celular (Huppertz *et al.*, 1999).

Las características de las diferentes estirpes celulares (macizo celular interno, IMC y trofoblasto, TB) son mantenidas por la expresión de genes que también son utilizados para la evaluación de calidad embrionaria. SOX2 (Sex determining Region Y-box 2) es un factor de transcripción que en asociación con OCT4 (octamer-binding transcription factor 4), controla la expresión de genes relacionados con el desarrollo embrionario, cumpliendo un rol fundamental en la embriogénesis temprana y en la mantención de la pluripotencia de células madre (Avilion *et al.*, 2003). PTTG1 (Pituitary tumor-transforming gene 1) y MSX1 (Homeobox protein MSX-1) son otros factores de transcripción, que se encontraron

disminuidos en embriones producidos *in vivo* e *in vitro* que dieron lugar a una preñez a término (Hoelker *et al.*, 2014).

Por otra parte, la expresión de los genes relacionados con la placentación e implantación, como CDX2 (Caudal Type Homeobox 2), COX2 (Cytochrome c oxidase subunit 2), PLAU (Plasminogen Activator, urokinase) y PLAC8 (Placenta Associated 8) se correlacionan con la calidad y competencia embrionaria. Estos genes se encontraron enriquecidos en biopsias de blastocistos bovinos producidos *in vitro* que generaron crías vivas posterior a la transferencia, en comparación a los blastocistos que conllevaron a fallas en la preñez (El-Sayed *et al.*, 2006). Adicionalmente, la expresión de PLAU también se encontró disminuida en las células endometriales de vacas que presentaron fallas en la preñez (Galaviz-Hernandez *et al.*, 2003). La expresión de PLAC8 también fue mayor en embriones de día 14 cultivados *in vivo*, en comparación a los cultivados *in vitro* (Machado *et al.*, 2013) y en blastocistos bovinos producidos *in vivo* que generaron crías vivas (Ghanem *et al.*, 2011). IFNt (Interferon tau) es producido por las células del trofoblasto y es la principal señal embrionaria para el reconocimiento de la gestación en rumiantes (Spencer *et al.*, 2007). La expresión de IFNt es menor en blastocistos de mala calidad en relación a los de calidad alta (Hernandez-Ledezma *et al.*, 1993). Esto podría explicar la menor tasa de implantación y generación de preñez en embriones que tienen menor número de células trofoblásticas (Stojkovic *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 1999).

La expresión de genes relacionados con estrés oxidativo y metabolismo energético también se ha correlacionado con competencia embrionaria. Por ejemplo, IDH (Isocitrate Dehydrogenase) y CAT (Catalase), ambos involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo, se encontraron sobreexpresados en embriones que se desarrollan más rápido (Dode *et al.*, 2006; Held *et al.*, 2012). Adicionalmente, CAT se encontró sobreexpresado en biopsia de embriones que dieron lugar a un blastocisto, en comparación a los embriones arrestados en un estado previo de desarrollo (Held *et al.*, 2012). SLC2A3 (GLUT3, Solute Carrier Family 2 member 3) y SOD2 (Superoxide dismutase 2) son genes relacionados con el transporte de glucosa, y con la actividad mitocondrial, respectivamente y su expresión es menor en embriones producidos *in vivo* versus embriones *in vitro* (Machado *et al.*, 2013). La expresión de ALOX15 (Arachidonate 15-lipoxygenase), un gen relacionado con el metabolismo de los carbohidratos, se encontró incrementada en biopsias de embriones bovinos que generaron preñez (El-Sayed *et al.*, 2006). Otros relacionados con el estrés oxidativo y metabolismo de la glucosa, como TXN (Tenascin XB), AKR1B1 (Aldo-keto

reductase family 1 member B) y PGK1 (Phosphoglycerate kinase 1) se encontraron desregulados en embriones bovinos que no generaron preñez o que conllevaron a pérdida embrionaria (El-Sayed *et al.*, 2006; Ghanem *et al.*, 2011). Los niveles de ARNm de las metaloproteinasas MMP9 (Matrix metalloproteinase 9) y MMP2 (Matrix metalloproteinase 2), que tienen un rol en la migración del trofoblasto y el remodelamiento endometrial, se encuentran aumentados en embriones con mayor criotolerancia y calidad morfológica (Mesalam *et al.*, 2019). EPHA5 (EPH receptor A5), un gen relacionado con la adhesión del trofoblasto al endometrio (Fujii *et al.*, 2006), se encontró sobreexpresado en demi-embriones que lograron dar generar un resultado de preñez exitoso (Zolini *et al.*, 2020).

Sin embargo, a pesar de la alta correlación entre la expresión de ciertos genes y la competencia embrionaria, la evaluación de la expresión génica no se considera un método efectivo para la selección de embriones que serán transferidos a hembras receptoras. Esto está dado principalmente porque para este análisis se requiere la toma de una biopsia embrionaria que frecuentemente afecta la competencia embrionaria. No obstante, este método es de gran utilidad para determinar el estrés que sufren los embriones ante los diferentes procesos asociados a la manipulación. De esta forma, es posible modificar la técnica utilizada en función de aumentar la calidad embrionaria (Cánepa *et al.*, 2014).

El diagnóstico genético pre-implantatorio (PGD, por sus siglas en inglés) actualmente es una herramienta bastante útil en la clínica de reproducción humana y veterinaria, permitiendo un diagnóstico temprano para varios desordenes genéticos y la selección de un embrión con las características deseadas (Campos-Chillon *et al.*, 2015). El PGD también incluye el diagnóstico de sexo, una herramienta con gran utilidad en la producción de animales domésticos mayores, ya que permite la selección del sexo deseado, por ejemplo: hembras para la industria lechera o machos para la industria cárnica (Cenariu *et al.*, 2012). Sin embargo, este análisis también requiere una biopsia embrionaria.

Existen tres métodos de biopsia embrionaria, la más común involucra la remoción de 1-2 blastómeras de un embrión de 8-16 células posterior a la perforación de la zona pelúcida (De Vos y Van Steirteghem, 2001). Otro método utiliza el material genético de los cuerpos polares liberados cuando el ovocito finaliza la meiosis II posterior a la fecundación, sin embargo, la información entregada mediante esta técnica es limitada porque no incluye la contribución paterna (Kuliev y Verlinsky, 2005). Para el PGD de embriones en estado de blastocisto, se remueven células del trofotodermo y se diferencia de las anteriores porque

en esta técnica se analizan varias células, lo que aumenta la precisión de los resultados (de Boer *et al.*, 2002).

Dentro de las tecnologías utilizadas para PGD, la hibridación fluorescente *in-situ* (FISH) es utilizada en la clínica de fertilidad humana para analizar el número y la estructura cromosómica en una célula individual, con el objetivo de testear aneuploidías, reordenamientos cromosómicos y enfermedades ligadas al sexo (Thornhill *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2020). En ganadería, la primera aplicación del PGD estaba orientada a la determinación del sexo del embrión previo a la transferencia de éste (Herr *et al.*, 1991). Sin embargo, también es útil para identificar animales portadores de un genotipo de interés (Ej.: portadores del alelo B del gen de la kappa caseína), confirmar la integración de un transgén dentro del genoma en el caso de la producción de animales transgénicos, y detectar trastornos genéticos hereditarios (Bodó *et al.*, 2001).

A pesar de la información de gran valor entregada mediante biopsia embrionaria, es una técnica de carácter invasivo, donde se realiza la perforación de la zona pelúcida, pudiendo afectar el rol protector que ésta ejerce sobre el embrión (Cenariu *et al.*, 2012). En el caso de la transferencia de embriones bovinos a gran escala, aún se considera un procedimiento muy caro para su uso en la predicción de competencia embrionaria (Perkel *et al.*, 2015).

El diagnóstico molecular es sin lugar a duda el de mayor predicción de competencia embrionaria, sin embargo, como se ha mencionado, la complejidad técnica y el carácter invasivo de la biopsia embrionaria ha limitado su aplicación, principalmente en animales. Es por ello que, durante los últimos años las investigaciones se han enfocado en el desarrollo de métodos menos invasivos y con similar capacidad de predicción de la calidad de embriones humanos y de especies domésticas con valor productivo. En este sentido, los análisis moleculares se han centrado en la evaluación de marcadores en fluido folicular, células de la granulosa, fluido seminal y medio de cultivo condicionado por embriones, los cuales contienen información molecular correlacionada con la competencia embrionaria (Perkel *et al.*, 2015). En el medio de cultivo condicionado por embriones, las sustancias de interés pueden ser divididas en tres grupos principales que representan tres pasos diferentes de la función celular: 1) proteínas traducidas de productos específicos de expresión génica celular (proteómica); 2) productos finales de los procesos biológicos de las células (metabolómica); y 3) reguladores negativos de la expresión génica (ARNs pequeños no codificantes), quienes son estables extracelularmente (Jung *et al.*, 2010).

Las técnicas ómicas, que incluyen la transcriptómica, proteómica, metabolómica, entre otras, de células o tejidos, permiten describir patrones moleculares de gametos, embriones, así como también del ambiente materno al cual se expondrán éstos. La descripción e interpretación de los cambios en los patrones moleculares durante el desarrollo apuntan a entender la base genética de los eventos moleculares anteriormente mencionados y su relación con el éxito reproductivo, mediante el estudio de genes y vías de señalización involucradas (Bauersachs *et al.*, 2010).

Aun cuando algunos embriones son morfológica y cromosómicamente normales, fallan en implantarse. Un contribuyente importante es la alteración en el metabolismo embrionario y la baja disponibilidad de glucosa (Leese, 2012). Es por ello, se ha propuesto el uso de la metabolómica como método objetivo y cuantitativo de los metabolitos como ATP, ácidos grasos, glucosa, colesterol, hormonas y otras moléculas de señalización presentes en el medio de cultivo, para inferir los procesos metabólicos que ocurren en un embrión y predecir su viabilidad (Nagy *et al.*, 2008; Nel-Themaat y Nagy, 2011). Si bien el área de la metabolómica se ha investigado bastante para la predicción de viabilidad embrionaria, aún no se ha establecido un biomarcador temprano, consistente y sensible para uso clínico (Rødgaard *et al.*, 2015).

Por otro lado, el proteoma representa todas las proteínas traducidas a partir de productos específicos de la expresión génica celular, en un momento y condiciones específicas, en cambio, el secretoma embrionario corresponde a las proteínas producidas y secretadas por el embrión en desarrollo. Es esperable que el perfil del secretoma de los embriones varíe según la viabilidad del embrión (Katz-Jaffe y Gardner, 2008), es por ello, que se han buscado proteínas como biomarcadores en el medio de cultivo (Rødgaard *et al.*, 2015). Por ejemplo, Apolipoproteína A-I se encontró en menor concentración en medios de cultivo de embriones humanos que generan embarazo (Nyalwidhe *et al.*, 2013). Niveles altos de EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer) se encontraron en medio de cultivo de embriones humanos que se desarrollan a blastocisto en comparación a los que no logran desarrollarse hasta aquel nivel, así como también, bajos niveles de CASP3 en el medio de cultivo de embriones que alcanzan el estado de blastocisto con buena calidad morfológica (Lindgren *et al.*, 2018).

Por otra parte los miRNAs corresponden a una clase de ARN pequeño no codificante, de 18-22 nucleótidos de largo, capaces de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional en varios procesos biológicos como diferenciación, proliferación y

sobrevivencia celular; ya sea bloqueando la traducción (por complementariedad incompleta) o degradando el ARN mensajero blanco mediante complementariedad completa con este último (Bartel, 2007). Se han encontrado miRNAs desregulados en múltiples patologías provocadas por alteraciones génicas (Krol *et al.*, 2010; Rupaimoole y Slack, 2017). Por esta razón, se ha considerado que los miRNAs son un candidato interesante para el diagnóstico y terapia de numerosas enfermedades, incluyendo cáncer, hepatitis, enfermedades cardiovasculares y enfermedades relacionadas con la edad. Por otro lado, los miRNAs son estables, resistentes a la degradación, se expresan en todas las células y son fáciles de detectar (Rupaimoole y Slack, 2017).

Rosenbluth *et al.*, demostraron que los embriones humanos secretan miRNAs al medio de cultivo, lo que permitió predecir aneuploidía en embriones y competencia embrionaria (Rosenbluth *et al.*, 2014). Los miRNAs identificados se encontraron diferencialmente expresados según la técnica de reproducción utilizada, estado cromosomal y resultado de embarazo. Inicialmente encontraron 10 miRNAs (hsa-miR-106b, 191, 30c, 372, 376a, 548a, 548c, 548d, 576-30, 603) expresados consistentemente en medios de cultivo condicionados por embriones. Luego, se validó que sólo dos (hsa-miR-191 y 372) de éstos estaban presentes únicamente en los medios de cultivo condicionados por embriones. Por lo tanto, los restantes se encontraron en medio de cultivo sin exposición a embriones. Interesantemente, un miRNA (hsa-miR-645), se encontró únicamente en el medio de cultivo sin exposición a embriones, lo que evidencia que los miRNAs pueden ser incorporados y usados por los embriones en desarrollo. Por lo que, en un experimento posterior donde se evaluó la expresión de éste en medios de cultivo con diferente resultado de embarazo, se encontró sobreexpresado en embriones que no se implantaban, sugiriendo que hsa-miR-645 es utilizado por embriones que lograron implantarse. Finalmente, hsa-miR-191 y hsa-miR-372 se correlacionaron negativamente con el resultado de embarazo posterior a la transferencia, pero sólo hsa-miR-191 se encontró asociado a aneuploidía (Rosenbluth *et al.*, 2014).

En embriones bovinos se han encontrado diferencias en los niveles de miRNAs entre medios de cultivo de embriones que no pasan del estado de mórula con respecto a embriones que se desarrollan hasta blastocisto (Kropp *et al.*, 2014). En este estudio se detectó un alto contenido de miRNA-25, miRNA 302c, miRNA-196a2 y miRNA-181a en embriones bovinos y humanos que se arrestan en estado de mórula. Sin embargo, sus resultados no fueron concluyentes, ya que la expresión de éstos fue dependiente del tipo

de suplementación proteica al medio de cultivo, sugiriendo que las proteínas como la albúmina sérica bovina, aportan una fuente externa de miRNAs (Kropp *et al.*, 2014). Posteriormente, los mismos autores, evaluaron el contenido de miRNAs en medios de cultivo de embriones bovinos, mediante secuenciación de ARN; bta-miR-24-3p, bta-miR-191 y bta-miR-148a se encontraron sobreexpresados en medios de cultivo de embriones que se arrestan al día 5 de desarrollo, en comparación a los que se desarrollan hasta blastocisto al día 8 (Kropp y Khatib, 2015). Con la finalidad de evaluar si la presencia de miRNA-24 en el medio de cultivo afecta realmente al desarrollo embrionario, suplementaron con un análogo de miRNA-24, lo que disminuyó el desarrollo de mórulas hasta estado de blastocisto, de un 75,6% a 48,3% (Kropp y Khatib, 2015).

Lin *et al.* (2019) realizaron un estudio similar, donde encontraron sobreexpresión de bta-miR-10b y bta-miR-45 en medios de cultivo de embriones bovinos que se encuentran degenerados al día 8. Adicionalmente detectaron sobreexpresión de bta-miR-30c junto a bta-miR-10b en medios de cultivo de blastocistos con segmentación lenta en comparación a los de segmentación rápida. Al suplementar el medio de cultivo con un mimetizador de miRNA-30, observaron la internalización de éste por parte de embriones cultivados en grupo, lo que aumentó la apoptosis celular. En base a esos resultados postularon a miRNA-30 como posible biomarcador relacionado con la apoptosis y disminución del desarrollo embrionario (Lin *et al.*, 2019).

En estudios del contenido de miRNAs en medios de cultivo de embriones humanos, se encontró miR-661 sobreexpresado cuando los embriones se implantaron. Este miRNA contribuye a la pérdida de adhesión entre las células endometriales y del trofotodermo (Cuman *et al.*, 2015). Por otra parte, miR-20 y miR-30c se encuentran sobreexpresados cuando el blastocisto logra implantarse, favoreciendo la proliferación, comunicación y adhesión celular (Capalbo *et al.*, 2016). miR-486-3p, miR-30c y miR-509-3-5p están sobreexpresados en medio de cultivo de embriones que logran implantarse, en comparación a embriones producidos por bipartición (Noli *et al.*, 2017), sugiriendo que el método de producción embrionaria genera cambios en la secreción de miRNAs. Al usar miRNAs como biomarcadores de selección embrionaria, se debe considerar la manipulación que sufre el embrión (Capalbo *et al.*, 2016; Cuman *et al.*, 2015; Noli *et al.*, 2017). miR-634 se ha propuesto como predictor de resultado positivo de embarazo posterior a transferencia embrionaria con un 85% de sensibilidad (Abu-Halima *et al.*, 2017). Por otro lado, el perfil de miRNAs en medios de cultivos se ha asociado a la cantidad de EVs que

secretan los embriones, siendo más alta en embriones humanos que no se desarrollan a término (Abu-Halima *et al.*, 2017).

Posteriormente, al evaluar los miRNAs presentes en las EVs secretadas por embriones bovinos a su medio de cultivo, el mayor repertorio de miRNAs se encontró cuando la viabilidad de los blastocistos estuvo comprometida, junto a una mayor secreción de EVs, coincidiendo con la hipótesis de Abu-Halima *et al.* (2017) (Mellisho *et al.*, 2019). A diferencia de estudios previos, evaluaron características y el contenido de pequeños ARNs de las EVs secretadas durante la blastulación, y se comparó con la viabilidad de los embriones al día 11, donde bta-miR-1, bta-miR-2889, bta-miR-184 y bta-miR-2368-3p se encontraron sobreexpresados cuando la viabilidad embrionaria se mantuvo al día 11, en comparación a los que degeneraron posterior a la blastulación. Basándose en las características morfológicas del embrión, junto a las características de las EVs secretadas, se generó un modelo de predicción de viabilidad embrionaria, no considerando la expresión de miRNAs, probablemente por falta de validación biológica (Mellisho *et al.*, 2019).

3.2.1. Vesículas extracelulares como biomarcadores de selección embrionaria

En 2013 se demostró por primera vez que embriones humanos secretan EVs, evidenciado por tinciones de membrana y ADN (Ferreira *et al.*, 2013). Junto con la evaluación de medios de cultivo de embriones humanos (148 muestras obtenidas al día 3 y 91 muestras, obtenidas al día 5 de desarrollo); se analizó la media del tamaño y concentración de las EVs mediante NTA con la finalidad de correlacionarlos con la calidad morfológica embrionaria y el día de desarrollo, concluyendo que existe una correlación negativa entre el tamaño medio de las EVs y la calidad del embrión (Ferreira *et al.*, 2013). Por otra parte, Saadeldin *et al.* (2014) y Kim *et al.*, (2018) evaluaron el efecto de las EVs sobre el desarrollo de embriones porcinos y murinos, respectivamente sin embargo, las características de las EVs no fueron correlacionadas con competencia embrionaria por lo que estos estudios no permitieron relacionar características de las EVs con calidad embrionaria (Saadeldin *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2018).

En el 2017, Pallinger *et al.* desarrollaron un test rápido de evaluación de calidad de embriones humanos basado en la cuantificación de EVs aislada de medios de cultivo embrionario al día 5 de desarrollo. Las EVs aisladas fueron cuantificadas mediante citometría de flujo por la identificación de ácidos nucleicos marcado con yoduro de propidio.

Este test evidenció que los embriones que logran implantarse tienen menor conteo de EVs (Pallinger *et al.*, 2017). Este resultado está en concordancia con lo publicado por Abu-Halima *et al.*, donde la concentración de EVs en medios de cultivo de embriones humanos al día 3 y 5 post-ICSI, evaluada mediante NTA, fue menor en embriones que se implantaron. Por otro lado, se identificó el miRNA-634 en las EVs como biomarcador predictor de gestación (Abu-Halima *et al.*, 2017).

La secreción de EVs por parte de embriones bovinos producidos *in vitro* se demostró por primera vez en el año 2017. Mellisho *et al.* (2017) inicialmente evaluaron concentración y tamaño de EVs secretadas por embriones bovinos producidos por IVF y por partenogénesis, cultivados individualmente desde el día 7 a día 9 de desarrollo. Las características de las EVs fueron diferentes según el método de producción embrionaria. Al correlacionar las características de las EVs con la viabilidad del embrión definida al día 11 de desarrollo, se demostró que los embriones no viables producidos por IVF secretan mayor concentración de EVs al medio de cultivo. Por lo tanto, estos autores concluyeron que las características de las EVs secretadas por embriones bovinos, dependen de la competencia embrionaria y de su origen (Mellisho *et al.*, 2017). Posteriormente, se evaluaron las características de las EVs secretadas por embriones bovinos durante la blastulación (día 5 a día 7 post-IVF) y se correlacionó con la viabilidad al día 11, concluyendo que los embriones viables al día 11 secretan menor concentración de EVs y el tamaño de éstas es mayor, en comparación a los embriones que detienen su desarrollo (Mellisho *et al.*, 2019). Además, identificaron 182 miRNAs y 32 snoRNAs en las EVs, donde 12 de los miRNAs estaban sobreexpresados y 15 menormente expresados en las EVs de embriones viables, en comparación a las EVs de embriones no viables al día 11. Estos autores propusieron un modelo matemático para la selección de embriones viables, incluyendo las características poblacionales de las EVs y morfológicas de los embriones. Este modelo permitía la selección de embriones con un 85% de confianza (Mellisho *et al.*, 2019).

Más tarde los estudios realizados por Dissayanake *et al.* (2020) confirmaron las conclusiones de Mellisho *et al.* (2019). En este estudio se colectó el medio de cultivo de embriones al día 2, 5 y 7 post-IVF, y concluyeron que los embriones en proceso de degeneración secretan más EVs a su medio de cultivo, y que éstas tienen menor tamaño, en comparación a las EVs de los embriones que logran desarrollarse hasta blastocisto (Dissanayake *et al.*, 2020). A partir de la bibliografía revisada se concluye que la concentración, tamaño e incluso el cargo de las EVs secretadas por embriones producidos

in vitro serían indicativos de la salud de éstos, permitiendo el potencial uso de las EVs como indicador de calidad embrionaria o predictor de preñez.

4. Caracterización de vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (EVs) son nanopartículas delimitadas por una membrana lipídica sin capacidad de replicarse, liberadas naturalmente por diferentes tipos de células hacia el espacio extracelular (Théry *et al.*, 2018) (Figura 1). Constituyen una vía de comunicación intercelular que permite la transferencia de proteínas, lípidos y diferentes tipos de ácidos nucleicos hacia otras células (Raposo y Stoorvogel, 2013) pudiendo influenciar sobre la función de la célula receptora. Este tipo de transferencia de información tiene como ventaja la protección de las moléculas de señalización, así como la opción de distribución local o a distancia. El tamaño, composición de membrana y contenido de las EVs, es heterogéneo y dinámico dependiendo del tipo y estado celular, además de las condiciones de su ambiente (Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Los exosomas son EVs pequeñas, secretadas como consecuencia de la fusión del endosoma multivesicular tardío con la membrana plasmática (Denzer *et al.*, 2000), y su tamaño varía entre 30 a 120 nm de diámetro. De mayor tamaño (100 a 1000 nm de diámetro), las que son secretadas directamente por gemación desde la membrana plasmática de la célula secretora. Por otro lado, la última clasificación de las EVs son los cuerpos apoptóticos, los cuales son liberados a partir de células en proceso de apoptosis, teniendo un tamaño de 50 a 500 nm (Hauser *et al.*, 2017; Théry *et al.*, 2009).

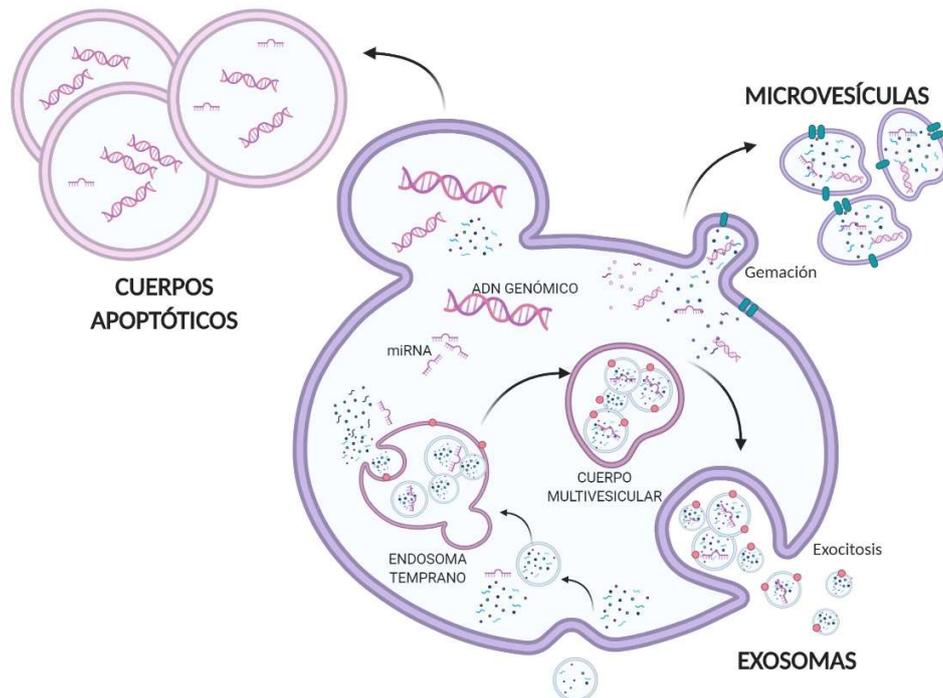


Figura 1. Representación esquemática de vías de liberación de los diferentes tipos de vesículas extracelulares. Elaboración propia, Biorender.

Durante el año 2012 se fundó la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, por sus siglas en inglés), que estableció por primera vez en el 2014 una guía (“*MISEV2014 guidelines*”) con los requerimientos mínimos experimentales para la definición de EVs según estándares bioquímicos, biofísicos y funcionales, para reportar apropiadamente en los estudios relacionados (Lötvall *et al.*, 2014). En vista del aumento de publicaciones describiendo funciones fisiológicas y patológicas de las EVs, en el año 2018 se realizó una actualización de los requerimientos descritos en la guía *MISEV2014*. Esta actualización tuvo como objetivo mejorar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados publicados sobre EVs teniendo como finalidad el uso como biomarcadores o con aplicación terapéutica (Théry *et al.*, 2018).

Las EVs pueden ser obtenidas a partir de diferentes tejidos, fluidos corporales o sobrenadante de medio de cultivo celular (Théry *et al.*, 2006). Sin embargo existe una amplia variedad de factores que puedan afectar la recuperación de EVs, por lo tanto, es importante mencionar las características del fluido/tejido a partir del cual se obtienen así como las condiciones experimentales utilizadas, incluyendo nombre de la especie, tipo

celular, tipo de matriz y procedimientos implicados (Théry *et al.*, 2018). En vista de la cantidad de fluidos biológicos existentes (más de 30), la guía *MISEV2018* no especifica protocolos para el reporte de las EVs estudiadas (Théry *et al.*, 2018). En este caso se recomienda revisar otras guías metodológicas para el estudio de EVs (Coumans *et al.*, 2017; Witwer *et al.*, 2013). Para el caso del estudio de EVs colectadas de tejidos, es crítico asegurar que las vesículas realmente provengan del espacio extracelular, evitando contaminación de vesículas intracelulares, así como también de partículas liberadas de células durante la colecta, el procesamiento o almacenamiento (Théry *et al.*, 2018).

En el caso de analizar sobrenadante de medio de cultivo es necesario detallar las condiciones del cultivo y colecta de la muestra a analizar, incluyendo la composición y preparación del medio de cultivo. Con respecto a este último, dependiendo del análisis a realizar es recomendable exponer a las células a medio de cultivo depletado de EVs durante el periodo de secreción de EVs a evaluar (Théry *et al.*, 2018). Sin embargo, es posible que este proceso afecte la proliferación celular (Eitan *et al.*, 2015).

La purificación absoluta o aislamiento completo de EVs se considera, según la guía *MISEV2018*, una meta poco realista. Es por lo que, se comienzan a usar los términos “separación” y “concentración”. El término “separación” (coloquialmente referido a la purificación o aislamiento) se refiere a la separación de las EVs de otros componentes no EVs de la matriz, así como también a la separación de diferentes tipos de EVs. Por otro lado, el término “concentración” se refiere al aumento del número de EVs por unidad de volumen, con o sin separación. El término “enriquecimiento” se debe usar cuando se aumenta la concentración de EVs (Théry *et al.*, 2018). Los protocolos de aislamiento varían en costo, equipamiento requerido, tiempo de procesamiento, tipo y volumen de la muestra y finalmente en la pureza final del aislado (Lane *et al.*, 2017). Según Gardiner *et al.* (2016), el método más usado en los estudios de EVs es la técnica de separación y concentración mediante ultracentrifugaciones diferenciales (Gardiner *et al.*, 2016). Sin embargo, el protocolo a utilizar depende de la pureza deseada de la muestra, y por ende de la pregunta experimental y del uso final de las EVs (Théry *et al.*, 2018).

Los protocolos basados en precipitación con polietilenglicol (Kordelas *et al.*, 2014), uso de filtros de centrifugación con bajo corte de peso molecular de las nanopartículas (Cheruvanky *et al.*, 2007) y ultracentrifugación a alta velocidad permiten recuperar alta cantidad de partículas extracelulares, sin embargo, la pureza y/o especificidad es baja (Théry *et al.*, 2018). Por otra parte los protocolos como cromatografía de exclusión por

tamaño (SEC) (Böing *et al.*, 2014), uso de filtros de centrifugación con alto corte de peso molecular de las nanopartículas (Vergauwen *et al.*, 2017), ultracentrifugaciones utilizando tiempos/velocidades intermedias con o sin lavados (Enderle *et al.*, 2015), y columnas con afinidad de membrana (Stranska *et al.*, 2018) permiten una recuperación y pureza intermedia, donde es posible separar las EVs, pero con proteínas, ribonucleoproteínas y lipoproteínas (Théry *et al.*, 2018). Con la finalidad de separar EVs de componentes no vesiculares se puede utilizar la combinación de filtración y SEC, separación por gradiente de densidad o aislamiento por inmunofinidad mediante uso de expresión de marcadores de superficie, los cuales permiten mayor especificidad (Lane *et al.*, 2017; Théry *et al.*, 2018). En todos los casos el procedimiento de separación y/o aislamiento de EVs debe ser reportado en detalle para permitir su replicación (Théry *et al.*, 2018).

4.1. Caracterización de EVs separadas/aisladas

La principal clasificación de las EVs se basa en su biogénesis, identificándose tres tipos: exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos. Sin embargo, los métodos de aislamiento de las EVs no permiten la separación de estos tres grupos por lo que actualmente, el término “vesículas extracelulares” se utiliza genéricamente. La ISEV ha sugerido el uso de una nomenclatura general para identificar las poblaciones de EVs aisladas, basada en el tamaño (“pequeñas” versus “medianas/grandes” o con rangos definidos), densidad (“baja”, “media”, “alta”), composición bioquímica (marcadores de superficie) y/o descripción de las condiciones de las células de origen (Ej: EVs hipóxicas). Sin embargo, el término “vesícula extracelular” solo debe utilizarse si esta población cumple con los requisitos mínimos definidos en la guía *MISEV2018*, siendo más apropiado utilizar el término “partículas extracelulares” (Théry *et al.*, 2018).

La mayor parte de los artículos científicos relacionados con EVs incluyen marcadores positivos de EVs, y sólo la minoría complementa marcadores negativos para diferenciar de componentes no vesiculares (Van Deun *et al.*, 2017). Sin embargo, el Consorcio EV-TRACK y la ISEV, enfatizan en la importancia de la caracterización mediante múltiples técnicas complementarias para evaluar los resultados de las técnicas de separación/aislamiento y para establecer que los biomarcadores o funciones reportadas estén realmente asociados a las EVs y no a otro material co-separado/aislado (Théry *et al.*, 2018). Por lo tanto, se debe cumplir con los siguientes requisitos:

1. Cuantificación de la fuente de obtención de EVs, así como también de la preparación de EVs: En cuanto a la fuente de obtención de EVs, se debe reportar el número de células cultivadas, volumen inicial total de la matriz o peso del tejido. Por otro lado, para la preparación de EVs, se debe realizar la cuantificación global de éstas, ya sea mediante número total de partículas, o cuantificación de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. Sin embargo, la cuantificación de estos componentes no necesariamente está correlacionada con el número de EVs (Théry *et al.*, 2018).

El número de partículas es posible medirlo mediante tecnologías de dispersión de luz dinámica, como el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Filipe *et al.*, 2010); citometría de flujo (van der Pol *et al.*, 2012); sensor de pulso resistivo (RPS) (De Vrij *et al.*, 2013); cryo-EM (Arraud *et al.*, 2013); resonancia superficial de plasmones asociada a microscopía de fuerza atómica (Obeid *et al.*, 2017). El uso de estas tecnologías genera variabilidad en los resultados, por lo que se sugiere que se reporte el rango de tamaño de las EVs y concentración de éstas en la muestra, además de evaluar la presencia de marcadores proteicos (Théry *et al.*, 2018).

2. Caracterización de EVs basada en el contenido proteico: Para demostrar la naturaleza de las EVs y su grado de pureza se deben analizar:
 - Al menos una proteína de transmembrana o ancladas a glicosilfosfatidilinositol, para demostrar la presencia de una bicapa lipídica en el material analizado. Ejemplos: CD63, CD81, CD82, ITGA (Integrin alpha precursor), CD9, CD90.
 - Al menos una proteína citosólica con habilidad de unión a proteínas lipídicas o de membrana, para demostrar que el material analizado contiene material citosólico de la célula secretora. Ejemplos: TSG101 (Tumor susceptibility gene 101), ANXA (Annexin), HSP70 (Heat shock protein 70 kDa).
 - Al menos una proteína comúnmente co-aislada en la preparación de EVs como control de pureza. Ejemplos: APOA1 (Apolipoprotein A1), APOA2 (Apolipoprotein A2), ALB (Albumin).
 - Opcionalmente, proteínas presentes en compartimientos subcelulares que no sean membrana plasmática o endosomas. Ejemplos: HIST1H (Histone H1), CYC1 (Cytochrome c1), CANX (Calnexin).

- Opcionalmente, proteínas extracelulares solubles con actividades funcionales, para determinar el modo de asociación con EVs. Ejemplos: TGFB1/2 (Transforming growth factor beta 1 y 2), EGF (Epidermal growth factor), FN1 (Fibronectin 1) (Théry *et al.*, 2018).
3. Caracterización de las vesículas individuales:
 - Mediante técnicas que entregan imágenes de alta resolución, como microscopía electrónica, microscopía de sonda de barrido (SPM), microscopía de fuerza atómica (AFM) o microscopía de super-resolución. Se deben proporcionar imágenes de toda la preparación y en primer plano.
 - Mediante técnicas que estimen características biofísicas de las EVs, como análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), citometría de flujo de alta resolución, espectroscopía de correlación de fluorescencia (Théry *et al.*, 2018).
 4. Caracterización de la topología de los componentes asociados a EVs, para determinar si el componente en estudio (ácidos nucleicos, proteínas, glicanos, etc.) está en la superficie de las EVs o en su lumen. Este tipo de caracterización se recomienda cuando se necesita asociar una función biológica asociada (Théry *et al.*, 2018).

4.2. Análisis funcional de las EVs

La principal clasificación de las EVs se basa en su biogénesis, identificándose tres tipos: exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos. Sin embargo, los métodos de aislamiento de las EVs no permiten la separación de estos tres grupos por lo que actualmente, el término “vesículas extracelulares” se utiliza genéricamente. La ISEV ha sugerido el uso de una nomenclatura general para identificar las poblaciones de EVs aisladas, basada en el tamaño (“pequeñas” versus “medianas/grandes” o con rangos definidos), densidad (“baja”, “media”, “alta”), composición bioquímica (marcadores de superficie) y/o descripción de las condiciones de las células de origen (Ej: EVs hipóxicas). Sin embargo, el término “vesícula extracelular” solo debe utilizarse si esta población cumple con los requisitos mínimos definidos en la guía *MISEV2018*, siendo más apropiado utilizar el término “partículas extracelulares” (Théry *et al.*, 2018).

Para demostrar que una función está asociada específicamente a las EVs liberadas de la célula, requiere la demostración de que la función ocurre sin contacto célula-célula. La

función se debe demostrar mediante un estudio de dosis-respuesta comparando el efecto de la matriz (medio condicionado o biofluido) antes y después de la eliminación de EVs, además del efecto que produce la suplementación de las EVs solas. Junto al estudio del efecto que ejercen las EVs solas sobre un tejido o cultivo celular, se deben incluir controles negativos, que en el caso del medio condicionado como fuente de obtención de EVs se debe incluir este mismo medio sin la presencia de las células, y en el caso de biofluidos asociados a una enfermedad, se debe incluir el mismo tipo de biofluido, pero de pacientes sanos o sin tratamiento según corresponda. Para descartar que el efecto esté asociado a factores solubles no asociados a EVs es necesario asegurar que las EVs sean separadas de componentes no vesiculares mediante métodos como gradiente de densidad o cromatografía de exclusión por tamaño (Théry *et al.*, 2018).

Debido a que el estudio de EVs ha aumentado exponencialmente, la guía MISEV se recomienda a la comunidad científica, con la finalidad de estandarizar los estudios relacionados con éstas y así comprender los mecanismos biológicos de una manera más objetiva.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema de producción y cultivo de embriones *in vitro* afecta negativamente la cinética de desarrollo, patrones de expresión génica, señalización celular, metabolismo y estructuración cromosómica (Cagnone y Sirard, 2016; Rizos *et al.*, 2003; Rodríguez-Alvarez *et al.*, 2010; Wrenzycki *et al.*, 2001), disminuyendo la competencia de los embriones y aumentando las pérdidas embrionarias (Hansen *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que el embrión bovino es capaz de secretar EVs, cuyas características y contenido de pequeños ARNs dependen de la competencia, origen, etapa, sexo y viabilidad del embrión, así como también de la tensión de oxígeno o medio de cultivo utilizado en el sistema de cultivo (Andrade *et al.*, 2019; Dissanayake *et al.*, 2020; Mellisho *et al.*, 2017, 2019; Qu *et al.*, 2017; Taqi *et al.*, 2019), permitiendo su uso como biomarcador de selección embrionaria mediante un método no invasivo.

Hasta el 2019, el estudio del cargo de las EVs se había limitado al periodo de la blastulación (Mellisho *et al.*, 2019), es decir, cuando la primera diferenciación celular se lleva a cabo. Si bien este es un periodo trascendental para el destino celular y el establecimiento de dos tipos celulares, existe un proceso crítico del desarrollo previo. Durante la activación del genoma embrionario se generan grandes cambios en los patrones de expresión génica, ya que se reemplazan los transcriptos maternos por nuevos transcriptos embrionarios. Además, este proceso es crítico por estar asociado a los primeros eventos de diferenciación celular, al éxito de implantación embrionaria y al desarrollo fetal. En el caso de una inapropiada activación del desarrollo embrionario, el embrión no continúa su desarrollo (Misirlioglu *et al.*, 2006). Por lo tanto, conocer el cargo de las EVs secretadas durante este periodo, no sólo es importante en la búsqueda de biomarcadores moleculares, sino que también para entender extensamente el control genético que permite la continuación del desarrollo embrionario.

Durante la biogénesis de las EVs, las moléculas empaquetadas están relacionadas con el estado molecular de la célula secretora (Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Por lo tanto, es lógico pensar que durante la activación del genoma embrionario las células embrionarias liberen EVs hacia su medio de cultivo, que reflejen las características moleculares del embrión en desarrollo. Esto permitiría su uso para una predicción temprana de embriones competentes, sin la necesidad de esperar hasta el día 7 de desarrollo para realizar la transferencia a una hembra receptora. Por otra parte, el estudio del contenido de las EVs secretadas durante

esta etapa temprana nos permitiría identificar posibles mecanismos tempranos de comunicación embrio-materna. Es por ello, que este trabajo está enfocado en la caracterización de las EVs secretadas por embriones bovinos con diferente competencia embrionaria durante la activación del genoma embrionario, y la búsqueda de miRNAs asociados a EVs que permitan la selección temprana de embriones bovinos e identificación en las rutas de señalización involucradas. Sin embargo, es posible que el embrión libere EVs hacia el medio de cultivo con la finalidad de eliminar moléculas que perjudiquen su desarrollo y que no reflejen su estado molecular. Para corroborar esta hipótesis, se propone evaluar el contenido de los miRNAs diferencialmente expresados en el medio de cultivo de embriones durante los días 3.5 a 5 post-IVF, así como también en las blastómeras del embrión al día 3.5 y al día 5, y correlacionarlo con la capacidad de alcanzar el estado de blastocisto al día 7.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El contenido de miRNAs en vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos durante la compactación, es un reflejo de su estado molecular, el cual varía según la competencia embrionaria.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la relación entre la expresión de miRNAs en embriones bovinos con diferente competencia embrionaria y el contenido de miRNAs derivado de vesículas extracelulares secretadas al medio de cultivo durante la compactación, para su utilización como biomarcador molecular temprano de calidad embrionaria.

Objetivos específicos

1. Evaluar concentración, tamaño, presencia de marcadores específicos y contenido de miRNAs en vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos, durante la compactación (día 3,5 a 5), con diferente capacidad para alcanzar el estado de blastocisto al día 7 de desarrollo.
2. Identificar miRNAs diferencialmente expresados en vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos durante la compactación (día 3,5 a 5), con diferente capacidad para alcanzar el estado de blastocisto al día 7 de desarrollo.
3. Identificar *in silico* las rutas de señalización relacionadas con los miRNAs identificados diferencialmente expresados entre embriones con diferente capacidad de desarrollo.
4. Comparar la expresión de los miRNAs diferencialmente expresados identificados, en vesículas extracelulares secretadas por el embrión bovino desde la activación del genoma embrionario hasta la compactación, con la expresión génica del embrión al inicio y término de este periodo del desarrollo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Experimento n°1:

Este experimento buscaba responder a los objetivos 1, 2 y 3.

Los embriones bovinos producidos por fecundación *in vitro* (IVF) en estado de 8-16 células, se cultivaron individualmente en medio depletado de vesículas extracelulares (EVs) al día 3,5 post-IVF. El medio de cultivo de cada embrión se colectó al día 5 post-IVF, y los embriones se mantuvieron en cultivo individual hasta el día 7, para la evaluación del desarrollo embrionario. Los medios de cultivo se clasificaron según la capacidad del embrión correspondiente para alcanzar el estado de blastocisto al día 7: embriones detenidos en estado de 8-16 células (G1) y embriones de blastocisto (G2).

Mediante ultracentrifugación se separaron las EVs presentes en el medio de cultivo condicionado por embriones bovinos pre-implantatorios entre los días 3,5 y 5 post-IVF. Éstas se caracterizaron mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), citometría de flujo y secuenciación de pequeños RNAs para evaluar su concentración y tamaño, morfología, marcadores de superficie, y contenido de miRNAs, respectivamente. Mediante análisis bioinformáticos se determinaron los miRNAs desregulados en las EVs secretadas por embriones que alcanzan el estado de blastocisto al día 7. Posteriormente se realizó un análisis de las vías de señalización relacionadas con los miRNAs desregulados.

Se evaluó la expresión de miRNAs de las EVs presentes en el medio de cultivo de embriones individuales para validar los datos de RNA-Seq obtenidos. Se produjeron embriones bovinos para su cultivo individual a partir del día 3.5 post-IVF en medio de cultivo depletado de EVs. El medio de cultivo condicionado por cada embrión se colectó al día 5 post-IVF para el análisis de expresión de miRNAs mediante RT-PCR, y se evaluó la cinética de desarrollo del embrión correspondiente hasta el día 7 para comprobar si alcanzaba o no el estado de blastocisto (Figura 2).

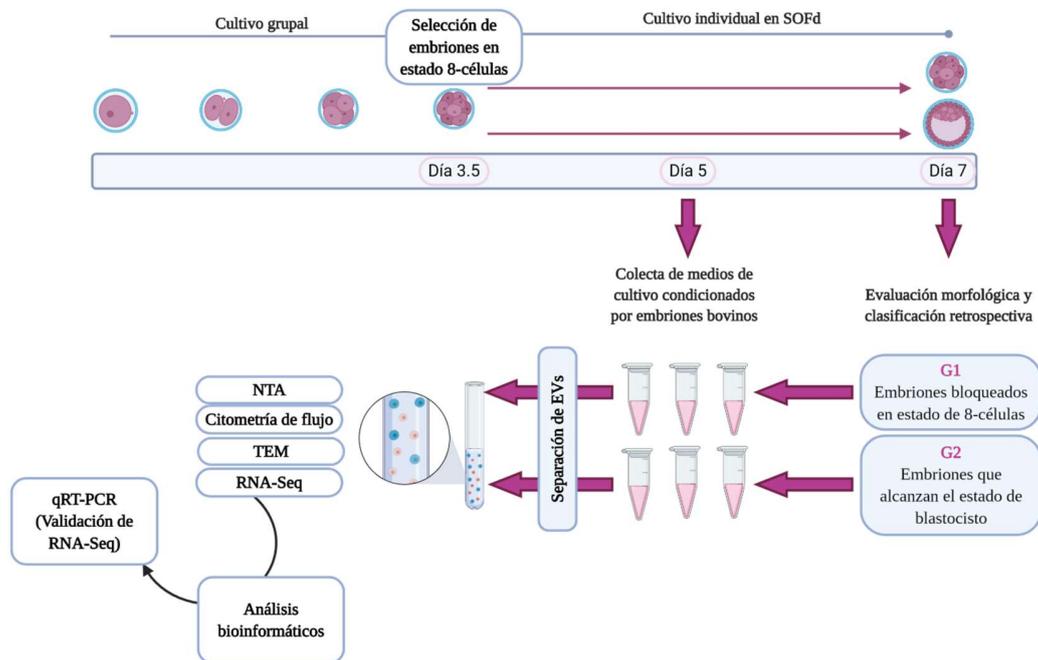


Figura 2. Esquema del experimento n°1

Experimento n°2:

Este experimento responde el objetivo específico n°4, cuya finalidad fue evaluar la expresión de los miRNAs obtenidos en el análisis bioinformático del experimento n°1, tanto en las EVs del medio de cultivo condicionado por el embrión entre la etapa de la activación del genoma embrionario y la compactación, como también en el embrión al comienzo (día 3,5 post-IVF) y al final (día 5 post-IVF) de este periodo de desarrollo. De esta forma se determinó si el contenido de miRNAs de las EVs secretadas por el embrión bovino, posterior a la activación del genoma embrionario, corresponde a una representación del contenido presente en las células embrionarias o la secreción de EVs representa un método de descarte de moléculas que no son necesarias para el desarrollo embrionario. Para ello, se realizó biopsia en embriones bovinos de 8 células al día 3.5 post-IVF y se mantuvo en cultivo individual en medio depletado de EVs hasta el día 5. Se evaluó el set de miRNAs en las blastómeras colectadas al día 3,5 post-IVF, en el embrión resultante al día 5 post-IVF y en el medio de cultivo condicionado durante esta etapa de desarrollo (Figura 3).

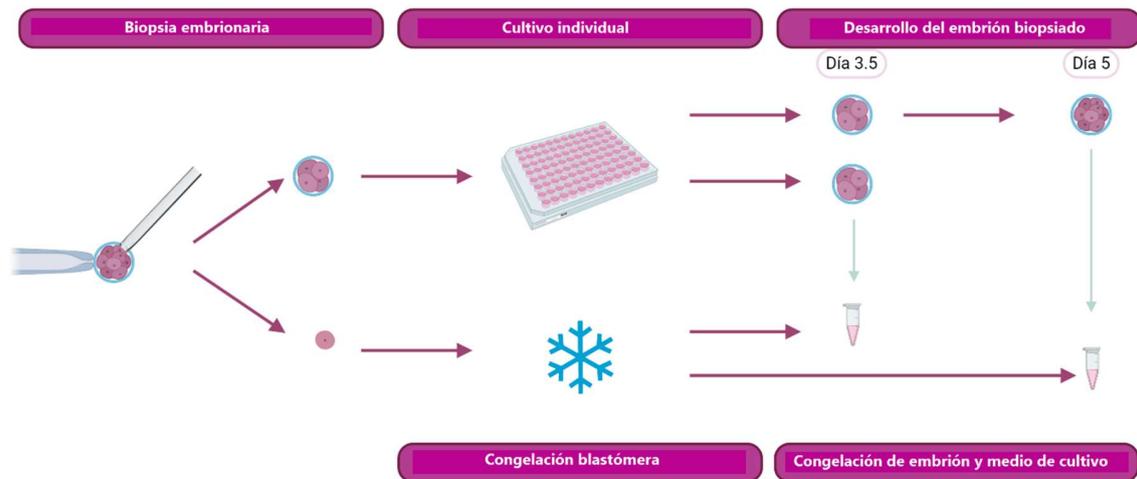


Figura 3. Esquema de experimento n°2

Lugar de estudio

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.

El análisis de microscopía electrónica de transmisión se realizó en el Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción, Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Campus Concepción.

Método

Producción de embriones in vitro y colecta de medios de cultivos condicionados

Se utilizaron reactivos y medios de cultivo de Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA) para el trabajo con ovocitos y embriones, salvo que se indique explícitamente lo contrario. Los embriones bovinos fueron producidos mediante fecundación in vitro siguiendo los protocolos estándares descritos en nuestro laboratorio según Rodríguez-Alvarez *et al.*, (2013) y Velasquez *et al.*, (2016).

Para la producción de los embriones se utilizaron ovocitos madurados in vitro para lo cual se obtuvieron complejos cúmulus-ovocito (CCO's) a partir de ovarios de vacas y vaquillas faenadas en el matadero Frigosur Chillán. Los ovarios se transportaron al laboratorio en solución salina más antibiótico/antimicótico a una temperatura entre 33 y 35°C, donde se lavaron para realizar la punción folicular evitando contaminación. Se puncionaron sólo los

folículos de un tamaño entre 3 y 8 mm con una jeringa y aguja hipodérmica de 19 G para la recolección del líquido folicular en tubos de 15 mL. El líquido folicular colectado se mantuvo en un baño termostático a 37°C, hasta el momento del procesamiento para la búsqueda y colecta de CCO's. El líquido folicular se dejó decantar para eliminar el sobrenadante de y coleccionar el sedimento donde se encontraban los CCO's. El sedimento colectado se mezcló con medio de manipulación, el cual consiste en TCM199 con 4 mM de bicarbonato de sodio, 18 mM de Hepes, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 50 µg/mL de gentamicina. La búsqueda de los CCO's se realizó bajo estereomicroscopio a 37°C, para seleccionar CCO's grado I y II, es decir, con citoplasma oscuro y homogéneo con al menos dos capas compactas de células del cúmulus.

La maduración *in vitro* (IVM) de los CCO's se realizó en una placa de cuatro pocillos (Nunc, ThermoScientific, Rochester, NY, USA) en medio 199 suplementado con 0,6 mM de glutamina, 0,2 mM de piruvato, 0,2 U/mL de FSH/LH, 1 µg/mL de estradiol, 50 µg/mL de gentamicina, 10 ng/mL de EGF y 10% de SFB. En cada pocillo se maduraron 25-30 CCO's durante 23 a 24 horas a 39°C, en una atmósfera controlada con 5% de CO₂.

Transcurrido el tiempo de maduración se estimó la calidad de la maduración ovocitaria por la expansión de las células del cúmulus. Los CCO's maduros se fecundaron utilizando semen comercial congelado, de un toro seleccionado previamente de acuerdo con su capacidad fecundante según los resultados de experimentos previos de nuestro laboratorio. La IVF se realizó siguiendo los protocolos estándar utilizados en nuestro laboratorio (Velasquez *et al.*, 2016). El semen contenido en una pajuela de 0,25 mL se descongeló en agua a 37°C. La obtención de espermatozoides móviles se realizó mediante gradiente de percoll (45% sobre 90% de Percoll) y centrifugación a 4.500 RPM por 6 minutos. El pellet obtenido se lavó en 500 µL de medio de fecundación y centrifugó a 3.000 RPM por 3 minutos. La concentración de espermatozoides móviles de la muestra obtenida se evaluó mediante conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer, además de motilidad en cámara de Makler.

La fecundación se realizó en grupos de 25-30 CCO's y una concentración de espermatozoides de 1×10^6 / mL. La incubación de ambos gametos se realizó durante 18-20 horas en placas de 4 pocillos, en 500 µL de medio de fecundación (TALP FIV suplementado con 0,01 mg/mL de heparina, 2 mM de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina y 6 mg/mL de BSA) en atmósfera controlada con 5% de CO₂. Al transcurrir el periodo de fecundación, se eliminaron las células del cúmulus de los presuntos cigotos en una solución

de 0,3 mg/mL de hialurodinasa con medio TCM199-Hepes sin SFB, aplicando 4 minutos de vórtex a temperatura ambiente (25 °C) y se corroboró la pérdida de las células del cúmulus en el estereomicroscopio.

El cultivo de los presuntos cigotos se realizó en medio SOFaa en placas de 4 pocillos (Nunc, ThermoScientific, Rochester, NY, USA). 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 3.5 post-IVF. Al día 3.5 post-IVF, los embriones que alcanzaron el estado de 8-16 células se seleccionaron para cultivo individual en medio SOFaa depletado de vesículas extracelulares (SOFd). El medio de cultivo se depletó mediante ultrafiltración a 3000 xg por 15 minutos en filtro Amicon® (100 kDa, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Este sistema permite concentrar en el filtro las vesículas con un tamaño mayor a 100 kDa, no permitiendo el paso de éstas al medio de cultivo. Se verificó la ausencia de EVs en el medio de cultivo mediante NTA (Análisis de seguimiento de nanopartículas; NanoSight NS300; Malvern Instruments Ltd, UK). El medio depletado se conservó a -80°C para el cultivo embrionario.

Los embriones seleccionados, se lavaron en SOFd de forma grupal, con la finalidad de eliminar EVs provenientes del medio de cultivo SOFaa, además de las secretadas durante el periodo anterior. Se ubicó un embrión por pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc, ThermoScientific, Rochester, NY, USA), que contenía SOFd previamente estabilizado en atmósfera controlada con 5% de CO₂, en la incubadora a 39°C. Al día 5 post-IVF, todos los embriones se cambiaron a una nueva placa de 98 pocillos, que contenía SOFaa previamente estabilizado en atmósfera controlada con 5% de CO₂, en incubadora a 39°C. Se evaluó individualmente el estadio del desarrollo embrionario y la calidad morfológica. El medio de cultivo condicionado por los embriones desde el día 3.5 al 5 post-IVF se colectó individualmente en tubos eppendorf, se identificó con el embrión correspondiente, y se almacenaron a -80°C para los futuros análisis.

Al día 7 post-IVF, se realizó la evaluación morfológica según estadio de desarrollo y calidad morfológica, siguiendo los criterios de la Sociedad Internacional de Tecnologías de Embriones (IETS). La evaluación de los blastocistos se basó en la presencia y tamaño del blastocele, y la calidad morfológica considerando las características del trofoblasto y del macizo celular interno.

Finalmente, los medios de cultivo colectados al día 5, se clasificaron según la capacidad de su embrión para alcanzar el estado de blastocisto al día 7: embriones detenidos en estado de 8-16 células (G1) y embriones que alcanzan estado de blastocisto (G2).

Biopsia embrionaria

Para evaluar si la expresión de un set de miRNAs definido, en las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos durante la compactación (día 3.5 a 5 post-IVF) corresponde a un reflejo de la expresión de los embriones de 8 células, se realizó una biopsia en embriones de 8 células. En primer lugar, fueron producidos los embriones bovinos *in vitro* según el protocolo descrito anteriormente. Al día 3.5 post-IVF se seleccionaron embriones de 8 células. Dos blastómeras del embrión seleccionado se aspiraron utilizando una pipeta de biopsia biselada de 30 µm de diámetro, mediante micromanipulación y se almacenaron en tubos eppendorf a -80°C hasta el momento de análisis de la expresión del set de miRNAs seleccionado.

Los embriones biopsiados se lavaron en medio SOFd para posteriormente cultivar un embrión por pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc, Rochester, NY, USA), que contenía SOFd previamente estabilizado en atmósfera controlada con 5% de CO₂, en la incubadora a 39°C. Al día 5 post-IVF, se evaluó individualmente el estadio del desarrollo embrionario y la calidad morfológica previo a la colecta y almacenaje del embrión en tubos eppendorff a -80°C, así como también del medio de cultivo condicionado por éste durante el cultivo individual. Cada embrión y medio de cultivo se identificó con la biopsia embrionaria ejecutada al día 3.5 para su posterior análisis.

Separación de vesículas extracelulares de medios de cultivo condicionados por embriones pre-implantatorios tempranos.

Con la finalidad de caracterizar las EVs presentes en el medio de cultivo condicionado por embriones bovinos, se analizó un pool de medios de cultivo de embriones individuales de cada grupo experimental. Para esto se colectó el medio de cultivo de 100 medios de cultivo individual provenientes de embriones que se bloquearon al día 3.5 (G1) y 100 medios de cultivo individual provenientes de embriones que alcanzaron el estado de blastocisto al día 7 (G2). La separación de las vesículas extracelulares se llevó a cabo utilizando el método descrito por Théry *et al.* (2006) con modificaciones. Al pool de 100 medios de cultivo se adicionó PBS hasta completar 15 mL en un tubo Falcon. Se realizaron centrifugaciones seriadas: 700 xg por 10 minutos, 2000 xg por 10 minutos, 10.000 xg por 70 minutos, en

donde el pellet se eliminó en cada una de ellas. Finalmente, el sobrenadante obtenido en la última centrifugación se centrifugó a 100.000 xg por 18 horas. El pellet obtenido se resuspendió en 0,5 mL. La concentración de las EVs se realizó mediante ultrafiltración (filtro para centrifugación de 0.5 mL, 10 kDa, Amicon, Merck, Darmstadt, Germany) a 3000 xg por 20 minutos; se obtuvo 200 µL que se congelaron a -20°C antes de proceder con la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y citometría de flujo.

Para el caso de la separación de EVs a partir de medio de cultivo individual condicionado por embriones (Experimento n°2), no se realizó ultracentrifugación para evitar pérdida de muestra. A cada medio de cultivo individual (60 µL) se añadió 500 µL de PBS y se realizaron dos centrifugaciones seriadas (700 xg por 10 minutos; 2000 xg por 10 minutos). La separación de las EVs se llevó a cabo mediante ultrafiltración a 3000 xg por 15 minutos en filtro Amicon® (0.5 mL, 10 kDa, Merck Millipore, Billerica, MA, USA).

Análisis morfológico y molecular de vesículas extracelulares de medios de cultivo condicionados por embriones pre-implantatorios tempranos.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La preparación de las muestras se realizó utilizando el protocolo descrito por Théry *et al.* (2006) con modificaciones. El pellet obtenido a 100.000 xg con la suspensión de EVs (10 µL) se descongeló y mezcló con un volumen igual de paraformaldehído al 4%. Se prepararon 2 grillas de cobre (300 mesh) con película de formar-carbón para cada grupo experimental. Se depositó 5 µL de la mezcla obtenida previamente, y se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. Las grillas se lavaron y fijaron en glutaraldehído al 1%. El contraste se realizará con una solución de oxalato de uranilo (pH 7,0) y luego con acetato de uranilo al 4%. La obtención de las imágenes se realizó en el Centro de Espectroscopía y Microscopía (CESMI, Universidad de Concepción, Chile) en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200 EXII con resolución de 5Å, equipado con cámara Gatan 782, operado a 80 kV y utilizando el software provisto por el equipo.

Análisis de marcadores de superficie mediante Citometría de Flujo:

El fenotipo de las EVs se evaluó mediante la identificación de marcadores de superficie utilizando citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito por Théry *et al.* (2006) con modificaciones. Las EVs (4×10^8 partículas/ml) se incubaron con 1×10^5 partículas/mL de perlas de látex de 4 µm de diámetro (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente, se añadió glicina 1 M en PBS y se mezcló suavemente (para bloquear los

sitios no unidos de las perlas de látex), manteniéndolas durante 45 minutos a temperatura ambiente. El complejo de EVs + perlas de látex se lavó dos veces con 100 µL de PBS con 0,5% de BSA por centrifugación a 1500 xg durante 3 min a temperatura ambiente. Se recuperaron 10 µL de los complejos EVs + perlas de látex y se incubaron con anticuerpos contra CD63 (FITC-conjugated; Abcam, ab18235) y CD81 (PE-conjugated; Abcam ab81436), CD9 (FITC-conjugated; Abcam, ab34162) y CD40L (PE/Cy5®-conjugated; Abcam ab25044) durante 2 horas a 4°C. Como control negativo se utilizó una reacción de cada anticuerpo (CD63, CD9, CD81, CD40L) con las perlas de látex. Para control positivo se utilizó EVs aisladas de sobrenadante de cultivo de una línea celular humana y de líquido folicular bovino (Mellisho *et al.*, 2017). Para realizar el análisis, 10 µl del complejo de EVs + perlas de látex marcadas, se resuspendieron con 490 µL de fluido de enfoque para citometría de flujo usando el equipo Attune™ NxT Flow Cytometer (Life Technologies, Inc, USA).

Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

La concentración y la distribución del tamaño de las nanopartículas secretadas por estos embriones (G1 y G2), se determinó mediante NTA (NanoSight NS300; Malvern Instruments Ltd, UK), equipado con una cámara sCMOS, siguiendo el protocolo descrito por Mellisho *et al.* (2017). El equipo NTA (NS 300) está configurado para medir tamaño de partículas entre 10 a 2000 nm. Para mayor confianza de las mediciones, la concentración de partículas se ajustó entre 20 a 100 partículas por campo. Se analizaron 30 medios de cultivo por cada grupo experimental. Como controles negativos se utilizó PBS filtrado previamente con filtro de 0,22 µm, además del medio de cultivo SOFd utilizado para el cultivo de los embriones *in vitro*. Se analizó el sobrenadante obtenido posterior a las dos primeras centrifugaciones seriadas. Cada muestra se cargó a jeringas de 1 mL, conectadas a la bomba de jeringa para NanoSight (Malvern Instruments Ltd, UK) que permite realizar análisis de muestras a una velocidad de flujo constante. Cada muestra se analizó 3 veces con la misma configuración de cámara, con un tiempo de adquisición de 60 segundos y ajuste del umbral de detección de nivel 13. Asimismo, el láser de luz utilizado fue de 488 nm. Los datos se capturaron y analizaron, utilizando el software de análisis (NTA versión 3.2 Dev Build 3.2.16, Malvern Instruments Ltd, UK). Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo con su grupo experimental. La concentración de partículas se reportó como partículas por mililitro.

Caracterización del contenido de miRNAs en vesículas extracelulares secretadas por embriones pre-implantatorios tempranos

Para extracción de RNA, evaluación de su calidad y secuenciación (NGS) de miRNAs se contrató a la compañía Norgen Biotek (Toronto, Canadá). Se realizaron replicas con 10 medios de cultivo. Tres réplicas de cada grupo experimental se enviaron a las instalaciones de Norgen Biotek. Todo el ARN se aisló utilizando el Kit Mini de Purificación de ARN en Suero/Plasma (Norgen Biotek, Toronto, Canadá). Se realizó la cuantificación en un lector de microplacas a 260 nm, mediante kit Ribogreen, utilizando 1 μ L de ARN. La integridad de la calidad se midió con el kit "Agilent RNA Pico chip" (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Análisis de secuenciación de ARNs pequeños

Las librerías se construyeron utilizando el kit "Small RNA Library Prep", siguiendo las instrucciones del fabricante (Norgen Biotek, Toronto, Canadá). La secuenciación de ARNs pequeños se llevó a cabo utilizando el kit "NextSeq 500/550 High Output v2" en un equipo Illumina NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA). La calidad de las librerías resultantes se analizó con el software FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK). Las secuencias adaptadoras se cortaron, alinearon y contaron utilizando "SRNA bench pipeline" (Barturen *et al.*, 2014). Para la librería de miRNAs se aceptaron lecturas con valores por debajo de 30 Phreads y con un tamaño entre 18 a 30 pb. Las lecturas obtenidas se mapearon contra el genoma de referencia ARS-UCD 1.2 y la base de datos miRbase, utilizando el software Bowtie2 y el mapeador miRdeep2. Las cuentas de genes se calcularon utilizando HTSeq, con una filtración de 5 o más cuentas por millón (CPM).

Con la lista de miRNAs resultantes, se llevó a cabo el análisis de expresión diferencial utilizando el paquete EdgeR. Se aplicaron dos criterios para discriminar los miRNAs sobre- y sub-regulados: p -valor < 0,05 y el logaritmo del fold change > y < a 0,5. Los resultados se graficaron en un Volcano Plot utilizando el paquete ggplot2.

Análisis de enriquecimiento de vías de señalización

Finalmente, el set de miRNAs diferencialmente expresados se utilizó para el análisis de enriquecimiento de vías de señalización, utilizando la herramienta online mirPath 3.0 (Vlachos *et al.*, 2015), y la predicción de las vías de señalización de la Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genoma (KEGG, por sus siglas en inglés) basado en el algoritmo Tarbase. Los valores de significancia estadística asociada a las vías biológicas se calcularon mediante el software mirPath.

Análisis cuantitativo de miRNAs en embriones bovinos, biopsia embrionaria y EVs mediante qPCR

Este análisis se realizó para evaluar si los miRNAs presentes en EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* a su medio de cultivo durante la etapa de compactación, corresponde a un reflejo de su contenido molecular o a moléculas de descarte. Para ello, se analizó la expresión génica de dos blastómeras biopsiadas al día 3.5 post-IVF, del embrión resultante al día 5 post-IVF y de las EVs secretadas al medio de cultivo durante los días 3-5 a 5 post-IVF.

El ARN extraído se trató con 1U de ADNasa (Invitrogen, Carlsbead, CA, USA) para la eliminación de ADN genómico en un volumen de reacción de 10,8 μ L e incubó por 15 minutos a 35°C. La ADNasa se inactivó en presencia de 25 mM EDTA (1 μ L). El ARN se convirtió a ADNc utilizando la enzima Reverso Transcriptasa Superscript IV (Invitrogen, Carlsbead, CA). Se utilizó el volumen total del tratamiento con DNasa I (11,8 μ L) en una reacción final de 20 μ L que contenía buffer de reacción de 10x Poly A polimerasa, e.coli Poly A Polimerasa (5U/ μ L), ATP (1mM), dNTP (10 mM), RT primer (2 μ L), inhibidor de ribonucleasas RNaseOUT™ (100mM, Invitrogen, Carlsbead, CA) y enzima reverso transcriptasa Superscript IV (200 U/ μ L). Los parámetros de incubación fueron 37°C por 30 min, 50°C por 10 min, 80°C por 10 minutos y finalmente 4°C hasta procesar la muestra. Los ADNc producidos se mantuvieron congelados a -20°C hasta su uso en los experimentos de q-RT-PCR.

Para el análisis cuantitativo de miRNAs, se realizó la reacción de PCR con el kit “kiCqStar Universal SYBR Green qPCR” (Merk, Darmstadt, Germany) en un volumen final de 10 μ L. Los primers (Tabla 2) se diseñaron utilizando el programa miRprimer (Busk, 2014).

Tabla 2. Secuencia de partidores utilizados para RT-PCR de miRNAs seleccionados

miRNA	Número de acceso en miRBase	Secuencia del miRNA	Secuencia del partidor	Tm (°C)	Tamaño del templado (bp)
bta-miR-222	MIMAT0003530	agctacatctggctactgggt	F: gcagagctacatctggct	66,8	18
			R: ccagttttttttttaccagt	66,6	26
bta-miR-2285av	MIMAT0046347	aaaagttcgctcgggtttt	F: gcgcagaaaagttcgctc	64,5	18
			R: ggtccagtttttttttaaaaacc	68,1	29
bta-miR-92a	MIMAT0009383	tattgcactgtcccggcctgt	F: cgcagtattgcactgtc	64,5	18
			R: ggtccagttttttttttacag	66,6	26
bta-miR-140	MIMAT0003789	taccacagggtagaaccacgga	F: gtaccacagggtagaacca	67,6	19
			R: gtccagttttttttttccgt	66	25
bta-miR-21-5p	MIMAT0003528	tagctatcagactgatgttgact	F: gcagtagctatcagactgatg	69,5	22
			R: gtccagtttttttttttagtcaac	67,6	28
bta-mir-93	MIMAT0003837	caaagtgcgttcgtgcaggta	F: gcaaagtgcgttcgtg	63,5	17
			R: gtccagtttttttttttacctg	66,6	26
bta-mir-103	MIMAT0003521	agcagcattgtacagggctatga	F: gcagagcagcattgtacag	67,6	19
			R: ggtccagttttttttttcatag	67,1	27
bta-mir-502a	MIMAT0009338	aatgcacctgggcaaggattca	F: aatgcacctgggcaag	62,4	16
			R: ggtccagttttttttttgaaac	67,1	27
bta-mir-100	MIMAT0009215	aaccgtagatccgaactgtg	F: cagaaccgtagatccga	66,8	18
			R: gtccagttttttttttcacaag	67,1	27
bta-mir-1	MIMAT0009214	tggaatgtaagaagtatgtat	F: cgcagtggaatgtaagaag	66,2	20
			R: ggtccagttttttttttatatac	68,6	30

Análisis estadístico

Los datos de tamaño y concentración de las EVs, obtenidos mediante NTA, se analizaron con prueba “t de student”, comparando los datos del grupo experimental 1 con los datos del grupo experimental 2, considerando las diferencias significativas con $p < 0,05$.

El análisis de expresión diferencial de los miRNAs obtenidos en el análisis de RNA-Seq, se realizó utilizando el paquete EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) en el programa R studio (Boston, MA, USA, 2020). Se aplicaron dos criterios para discriminar los miRNAs sobre- e sub-regulados: p -valor $< 0,05$ y el logaritmo del fold change $> y < a 0,5$.

Para el análisis de los resultados de expresión génica obtenidos mediante qPCR de los miRNAs seleccionados en los medios de cultivo, embriones y biopsia, se utilizó prueba de Kruskal Wallis.

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico InfoStat (Buenos Aires, Argentina, 2002). Excepto, el análisis de expresión diferencial de los datos obtenidos en la RNA-Seq.

V. RESULTADOS

Experimento n°1:

1. Identificación y caracterización de EVs derivadas de medio de cultivo condicionado por embriones bovinos pre-implantatorios

Las nanopartículas separadas a partir de medios de cultivo de embriones bovinos fueron evaluadas mediante citometría de flujo, lo que permitió clasificarlas como EVs, debido a la expresión de marcadores específicos de superficie CD9, CD81, CD63 y CD40 en ambos grupos experimentales (G1 y G2), pero no en el control negativo (Figura 4A). Además, estas EVs fueron visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), donde se corroboró la morfología clásica, redondeada con bicapa lipídica en ambos grupos experimentales (Figura 4B).

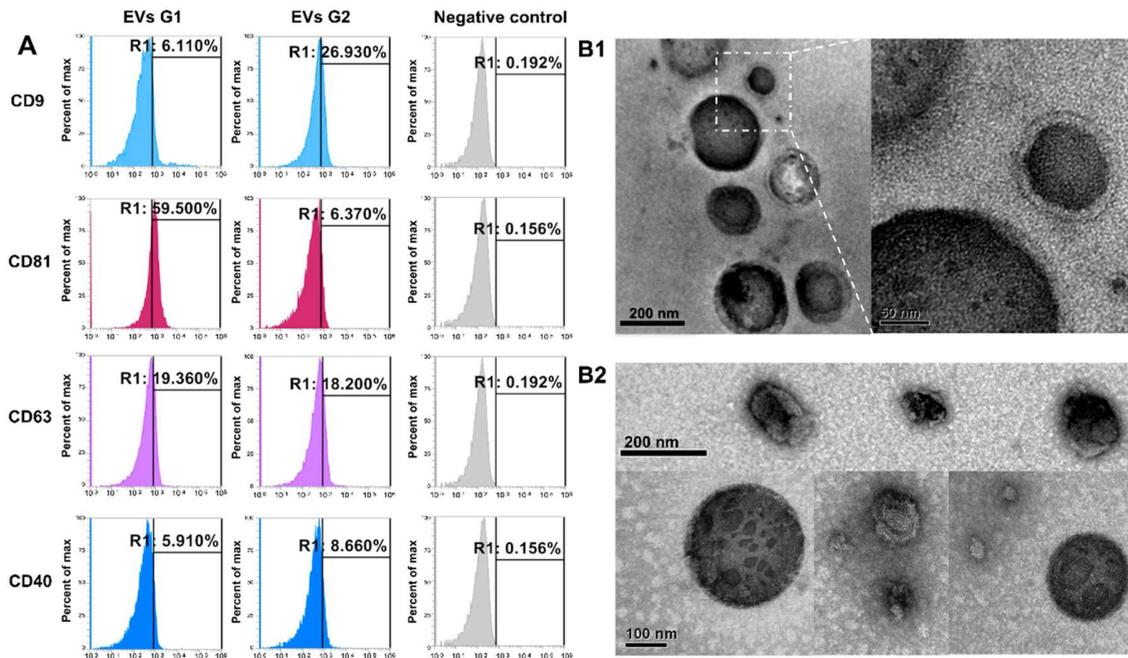


Figura 4. Caracterización mediante citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión de EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* con diferente competencia embrionaria durante la compactación

La concentración de las EVs secretadas por embriones que alcanzan el estadio de blastocisto al día 7 (G2) fue $9,4 \times 10^8$ partículas/mL, mientras la media y la moda del tamaño de éstas fue 109,4 y 89,1 nm respectivamente. Todos estos valores fueron

significativamente menores ($p < 0,05$) comparados con las EVs de embriones bloqueados en 8-16 células (G1), donde la concentración fue $1,5 \times 10^9$ partículas/mL y la media y la moda del tamaño fue 129,6 nm y 108,3 nm respectivamente (Figura 5).

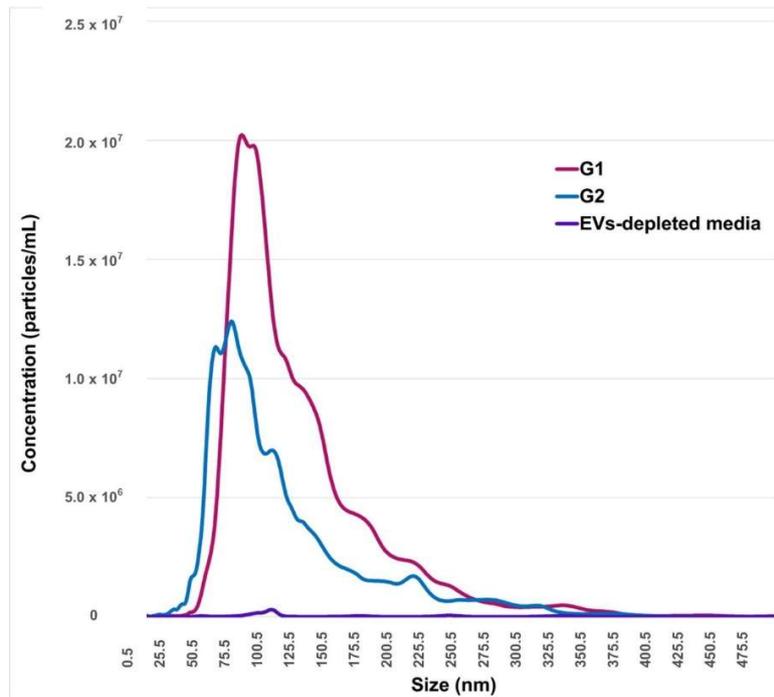


Figura 5. Caracterización mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* con diferente competencia embrionaria durante la compactación. La figura representa la distribución de las poblaciones de nanopartículas según su tamaño (eje X) y concentración (eje Y).

Análisis de expresión diferencial de miRNAs

Luego de evaluar la concentración y tamaño de las EVs mediante NTA, se procedió a realizar 3 pools con 10 medios de cultivo cada uno, con la finalidad de secuenciar los ARNs pequeños contenidos en las EVs de ambos grupos experimentales. Todos los ARNs de cada replica biológica fueron aislados y cuantificados previo a la construcción de las librerías y Next-Generation Sequencing (NGS). Con la finalidad de analizar los datos, en primer lugar, los adaptadores fueron removidos y las lecturas fueron filtrados según su calidad y longitud, resultando en 24.336.044 lecturas utilizadas para el mapeo de miRNAs. Las lecturas se mapearon contra el genoma de referencia bovino (ARS-UCD 1.2) en miRbase (<https://www.mirbase.org>). Sólo se seleccionaron los recuentos de genes con

CPM (cuentas por millón)>5 para el análisis de expresión diferencial. Se expresaron un total de 95 miRNAs en las muestras (Tabla 5) y 8 miRNAs se expresaron diferencialmente entre los grupos experimentales (G1 contra G2), donde bta-miR-103, bta-miR-100, bra-miR-502a y bta-miR-1 se encontraron sobreexpresados en las EVs secretadas por embriones bloqueados (G1), mientras que bta-miR-92a, bta-miR-140, bta-miR-2285av y bta-miR-222 se encontraron sobreexpresados en el G2 (Figura 6).

Tabla 3. miRNAs identificados en EVs de medios de cultivo

miRNA	Significancia	Expresión génica respecto a G2
bta-miR-103	0,0003	Aumentada
bta-miR-100	0,0004	Aumentada
bta-miR-502a	0,0097	Aumentada
bta-miR-1	0,0208	Aumentada
bta-miR-101	0,1199	Aumentada
bta-let-7e	0,1682	Aumentada
bta-miR-215	0,1876	Aumentada
bta-miR-205	0,2915	Aumentada
bta-miR-193a-3p	0,4369	Aumentada
bta-miR-224	0,4895	Aumentada
bta-miR-222	0,0034	Disminuída
bta-miR-92a	0,0323	Disminuída
bta-miR-2285av	0,0385	Disminuída
bta-miR-140	0,0429	Disminuída
bta-miR-25	0,0545	Disminuída
bta-miR-9-5p	0,0692	Disminuída
bta-miR-16b	0,0824	Disminuída
bta-miR-191	0,1003	Disminuída
bta-miR-744	0,1038	Disminuída
bta-miR-451	0,1163	Disminuída
bta-miR-10b	0,1211	Disminuída

bta-let-7f	0,1519	Disminuída
bta-miR-2904	0,1561	Disminuída
bta-miR-11980	0,1609	Disminuída
bta-let-7g	0,1609	Disminuída
bta-miR-30d	0,1714	Disminuída
bta-miR-93	0,1873	Disminuída
bta-miR-378	0,1994	Disminuída
bta-let-7i	0,2239	Disminuída
bta-miR-148b	0,2253	Disminuída
bta-miR-143	0,2362	Disminuída
bta-miR-144	0,2412	Disminuída
bta-miR-151-3p	0,251	Disminuída
bta-miR-21-5p	0,2891	Disminuída
bta-miR-221	0,3007	Disminuída
bta-miR-152	0,3234	Disminuída
bta-miR-455-5p	0,3246	Disminuída
bta-miR-199a-3p	0,3564	Disminuída
bta-miR-11995	0,3646	Disminuída
bta-miR-200a	0,396	Disminuída
bta-miR-96	0,418	Disminuída
bta-miR-124b	0,4465	Disminuída
bta-miR-124a	0,4622	Disminuída
bta-miR-15b	0,4951	Disminuída
bta-miR-92b	0,5279	Disminuída
bta-miR-486	0,1387	Similar
bta-miR-10a	0,245	Similar
bta-miR-423-5p	0,3259	Similar
bta-let-7c	0,3432	Similar
bta-miR-27a-3p	0,3529	Similar
bta-miR-1246	0,3565	Similar

bta-miR-27b	0,3948	Similar
bta-let-7b	0,4056	Similar
bta-miR-183	0,4368	Similar
bta-miR-151-5p	0,5007	Similar
bta-miR-142-5p	0,5462	Similar
bta-miR-302b	0,5876	Similar
bta-miR-24-3p	0,5886	Similar
bta-miR-181a	0,597	Similar
bta-miR-29b	0,597	Similar
bta-miR-99a-5p	0,6146	Similar
bta-miR-29d-3p	0,6151	Similar
bta-miR-29c	0,6178	Similar
bta-miR-320a	0,6476	Similar
bta-miR-125b	0,6481	Similar
bta-miR-192	0,6536	Similar
bta-miR-29a	0,6548	Similar
bta-miR-125a	0,6586	Similar
bta-miR-484	0,6634	Similar
bta-miR-26b	0,6787	Similar
bta-miR-199a-5p	0,6898	Similar
bta-miR-30a-5p	0,7072	Similar
bta-miR-22-3p	0,734	Similar
bta-miR-146a	0,7652	Similar
bta-miR-375	0,7673	Similar
bta-miR-2478	0,7729	Similar
bta-miR-122	0,7755	Similar
bta-miR-141	0,7853	Similar
bta-miR-30e-5p	0,7925	Similar
bta-miR-146b	0,7971	Similar
bta-miR-26a	0,8062	Similar

bta-miR-148a	0,8207	Similar
bta-miR-99b	0,8406	Similar
bta-miR-184	0,8484	Similar
bta-miR-7	0,8697	Similar
bta-miR-23b-3p	0,8705	Similar
bta-miR-423-3p	0,875	Similar
bta-miR-30c	0,8867	Similar
bta-miR-10174-3p	0,8955	Similar
bta-let-7a-5p	0,9635	Similar
bta-miR-182	0,9746	Similar
bta-miR-23a	0,9817	Similar
bta-miR-186	0,9912	Similar
bta-miR-185	1	Similar
bta-miR-2473	1	Similar

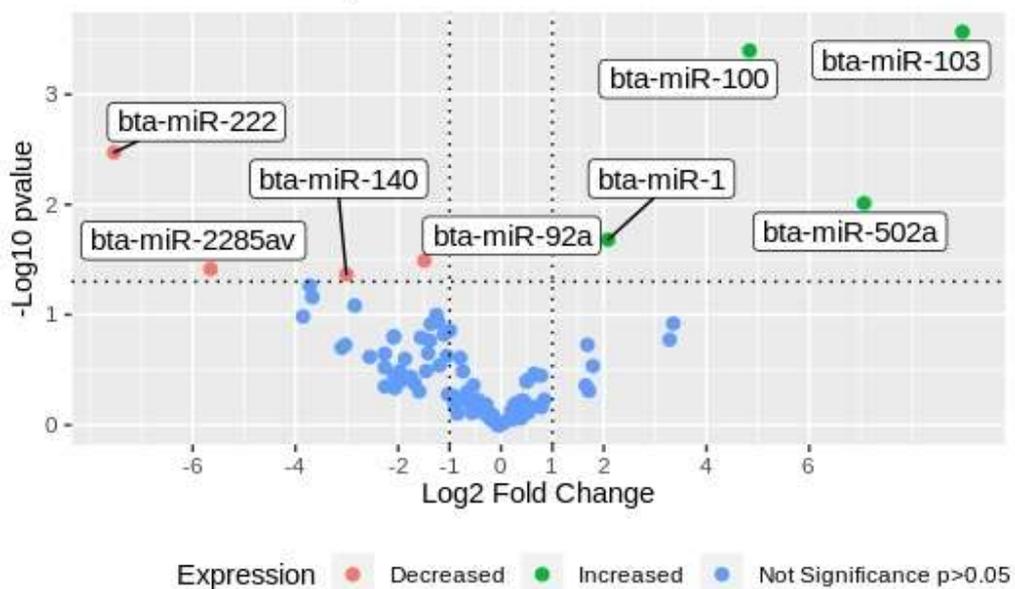


Figura 6. Volcano plot de miRNAs diferencialmente expresados en EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* que se bloquean en estadio de 8-16 células

Identificación *in silico* de las rutas de señalización relacionadas con los miRNAs identificados diferencialmente expresados entre embriones con diferente capacidad de desarrollo.

Se realizó análisis de las vías de señalización relacionadas con el set de miRNAs diferencialmente expresados en las EVs de embriones bloqueados en estadio de 8-16 células, revelando 15 vías de señalización KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome) con $p < 0,05$. Las rutas con mayor significancia ($p < 0,01$) fueron: “biosíntesis y metabolismo de ácidos grasos”, “proteoglicanos en cáncer”, “degradación de lisina”, “gap junction” y “vías de señalización reguladoras de células madre” (Figura 7). Éstas se predijeron utilizando el número de los genes blanco y los miRNAs involucrados.

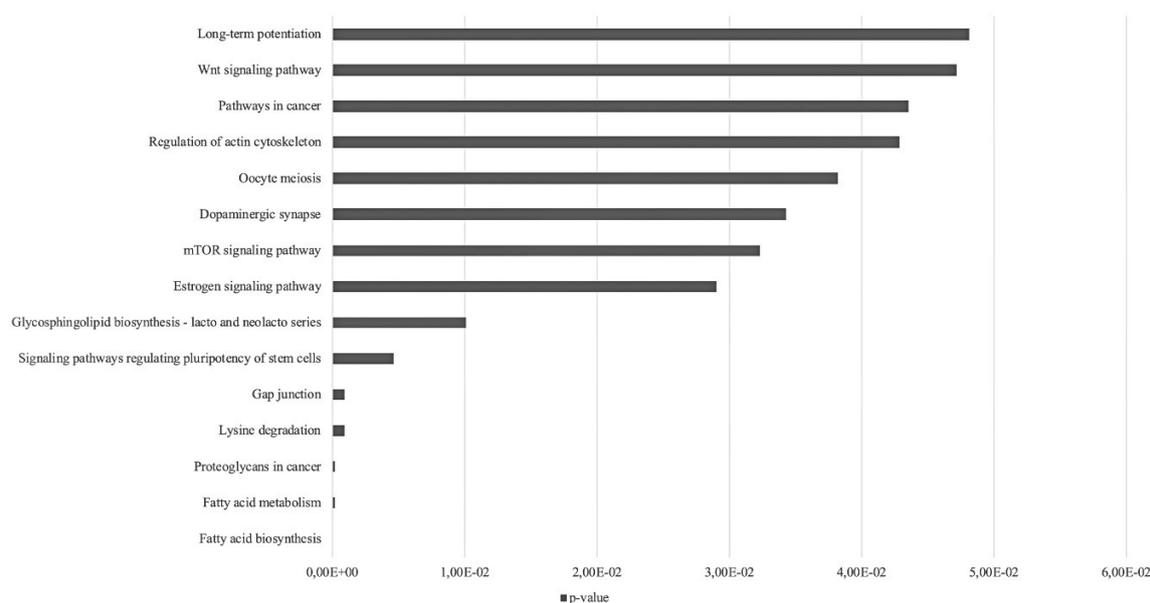


Figura 7. Predicción de vías de señalización KEGG relacionadas con los miRNAs sobreexpresados en las EVs secretadas por embriones producidos *in vitro* que se bloquean en estadiode 8-16 células.

Experimento n°2:

1. Desarrollo embrionario post-biopsia

Se realizó biopsia a 64 embriones que al día 3 alcanzaron el estadio de 8-células. Posterior a la biopsia, éstos se cultivaron individualmente en medio depletado de EVs hasta el día 5, momento donde se colectó el embrión resultante y el medio de cultivo correspondiente. Al día 5, el 55% de los embriones alcanzó el estadio de mórula, el 41% no continuó su desarrollo posterior al día 3, y el 4% se lisó durante el proceso de biopsia.

2. Análisis de expresión génica en biopsia de blastómeras, EVs secretadas durante la compactación y embrión biopsiado.

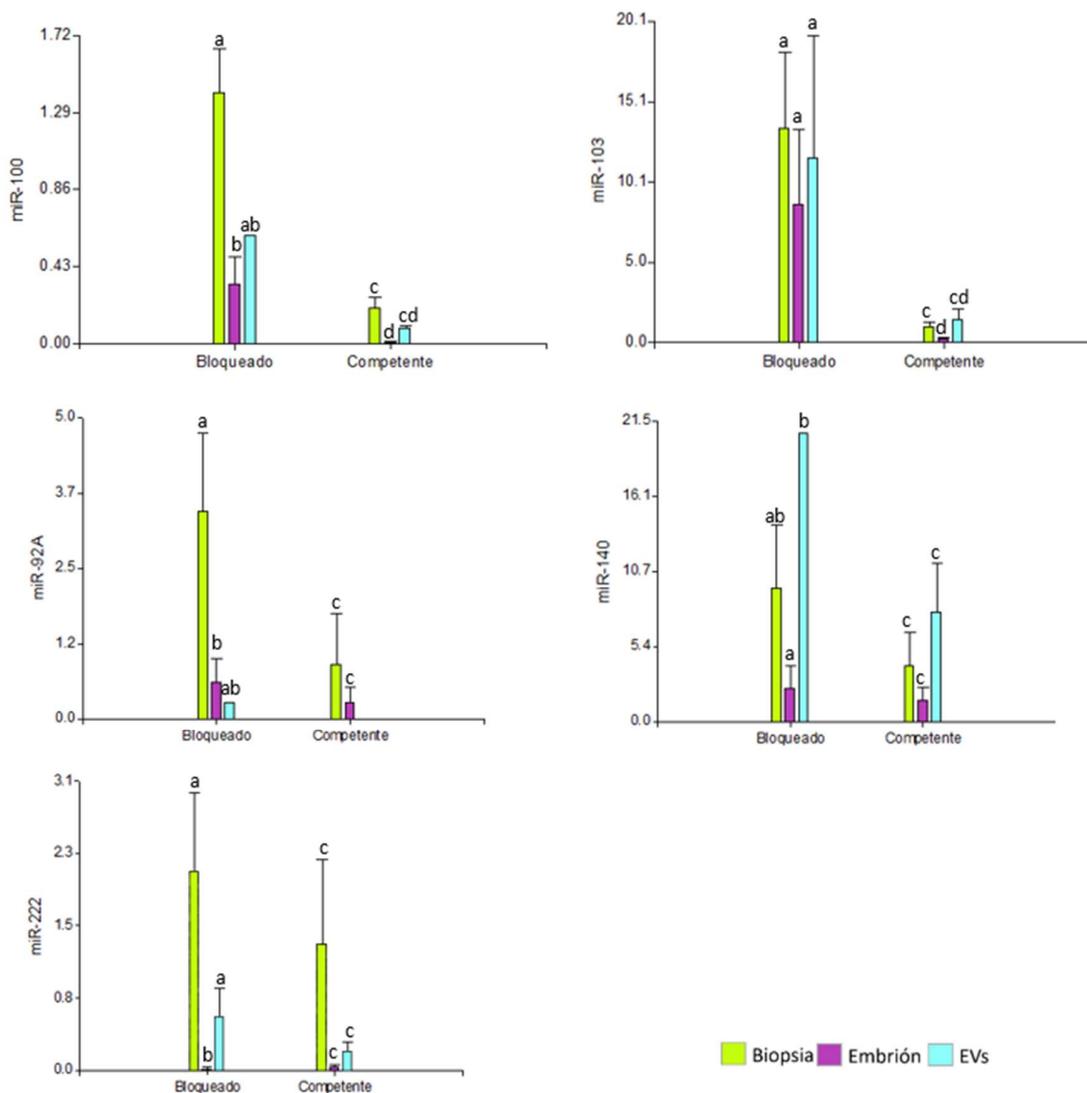


Figura 8. Expresión génica de bta-miR-103, bta-miR-100, bra-miR-502a, bta-miR-1, bta-

miR-92a, bta-miR-140, bta-miR-2285av y bta-miR-222 en blastómeras obtenidas mediante biopsia al día 3.5 post-IVF, EVs secretadas por éste durante la compactación, y embriones al día 5, con diferente competencia embrionaria. Letras distintas representan diferencia significativa ($p < 0,05$).

Se realizó biopsia embrionaria en embriones en estadio de 8 células al día 3.5 post-IVF, y éstos se mantuvieron en cultivo hasta el día 5. Se colectó el medio de cultivo y el embrión resultante al día 5 post-IVF, ya sea como mórula (embrión competente) o como embrión de 8 células (embrión bloqueado). Las EVs del medio de cultivo de cada embrión fueron colectadas. Se analizó expresión génica de bta-miR-103, bta-miR-100, bra-miR-502a, bta-miR-1, bta-miR-92a, bta-miR-140, bta-miR-2285av y bta-miR-222 en las blastómeras obtenidas mediante biopsia embrionaria, en el embrión, y en las EVs colectadas. Se encontró mayor expresión de bta-miR-100, bta-miR-92a, bta-miR-222 en las blastómeras obtenidas mediante biopsia de embriones al día 3.5 post-IVF en relación con los embriones al día 5 ($p < 0.05$) (Figura 8). La expresión de bta-miR-100 y bta-miR-103 es mayor en los embriones bloqueados que los embriones competentes. Además, en el caso de bta-miR-100 y bta-miR-103 se sigue un patrón de expresión génica decendiente desde las blastómeras, hacia los embriones, tanto en los bloqueados como en los competentes ($p < 0.05$). Con respecto a bta-miR-140, la mayor expresión se obtuvo en las EVs de los embriones que se bloquearon ($p < 0.05$).

VI. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* durante la ventana de compactación embrionaria y descifrar si su contenido de miRNAs corresponde a moléculas intencionalmente descartadas durante este periodo en función del reemplazo de los transcritos de mRNA materno que se produce en la activación del genoma embrionario. En primer lugar, se desarrolló un modelo *in vitro* para coleccionar EVs provenientes exclusivamente de células embrionarias durante el periodo de compactación. Los medios de cultivo han sido estandarizados, simulando las condiciones del ambiente materno para garantizar el desarrollo embrionario. Entre los diferentes componentes, estos medios incluyen fuentes naturales de proteínas, como suero fetal bovino o albúmina sérica bovina que pueden incluir gran cantidad de EVs. Las vesículas son indistinguibles de las secretadas por el embrión, por lo que hay que eliminarlas. Una alternativa es evitar añadir fuentes proteicas a los medios de cultivo, sin embargo, las proteínas son necesarias para apoyar el desarrollo embrionario durante el cultivo *in vitro*. El enfoque más aceptado es eliminar las nanopartículas del medio de cultivo listo para usar. No obstante, se ha descrito previamente que el crecimiento y sobrevivencia celular disminuyen, por lo que se evaluó el efecto del medio de cultivo depletado de EVs sobre el desarrollo de embriones bovinos pre-implantatorios, permitiendo validar un sistema de cultivo *in vitro* para los experimentos de este proyecto (anexo 1).

Los medios de cultivo condicionados por los embriones durante la ventana de compactación (día 3 a 5) se clasificaron en dos grupos según su potencial de desarrollo al día 7: embriones no competentes que se bloquearon durante la compactación (G1) y embriones competentes que alcanzaron el estadio de blastocisto al día 7 (G2). Se separaron las nanopartículas presentes en los medios de cultivo para confirmar la presencia de EVs caracterizando los marcadores proteicos y morfología según los criterios sugerido por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares en 2018 (Théry et al., 2018). Se obtuvo baja positividad a los marcadores de superficie medidos CD9, CD81, CD63 y CD40 en los medios de cultivo, sin embargo, en el control negativo no se detectó positividad. Esto estaría dado por la baja positividad de los marcadores de superficie, a la metodología utilizada y a la baja concentración de EVs contenidas en el medio de cultivo de un embrión individual. Con la finalidad de evaluar los marcadores de superficie mediante citometría de flujo convencional, las EVs deben asociarse a perlas de látex que tienen un diámetro de 4 μm ,

ya que el tamaño de las EVs está por debajo del tamaño mínimo necesario para su detección (Suárez et al., 2017). Sin embargo, la concentración de EVs secretadas por un embrión individual en general es muy baja, por lo que también la concentración de complejos de perlas de látex-EVs resulta ser baja. Normalmente los métodos de detección o caracterización de EVs son estandarizados en experimentos que utilizan gran cantidad de EVs obtenidas mediante el cultivo de células 2D donde es posible tener una placa de cultivo de 100 μm con más de 1 millón de células, no obstante, en este proyecto se trabajó con embriones que contienen sólo 8 células.

A pesar de lo anterior, las nanopartículas que fueron evaluadas mediante citometría de flujo también fueron observadas mediante TEM, donde se evidenció la presencia de nanopartículas con bicapa lipídica y con forma de copa, lo cual es característico de EVs. La concentración de EVs fue evaluada individualmente en los embriones de ambos grupos experimentales mediante NTA: los embriones competentes secretan menos EVs que los embriones que no logran alcanzar el estadio de blastocisto y su tamaño es menor. Estos resultados están en concordancia con otros estudios que reportan menor concentración y tamaño en las EVs secretadas hacia el medio de cultivo por embriones humanos de buena calidad que logran implantarse (Abu-Halima et al., 2017; Ferreira et al., 2013; Pallinger et al., 2017), así como también por parte de embriones bovinos que alcanzan el estadio de blastocisto (Dissayanake et al., 2020; Mellisho et al., 2019). Sin embargo, en el estudio de Dissayanake et al. (2020) este patrón no se repite en todas las ventanas de desarrollo que fueron evaluadas, ya que cuando colectaron el medio de cultivo al día 5 no encontraron diferencias estadísticamente significativas en concentración ni tamaño de EVs (Dissayanake et al., 2020). No es posible hacer una comparación exacta entre estos estudios, ya que en el de Dissayanake et al. (2020) el diseño experimental ni el método de separación de EVs fue igual.

Además de la calidad embrionaria, existen diversas variables que alteran el patrón de secreción de EVs, como el método de producción de embriones, etapa de desarrollo evaluada, sexo y viabilidad del embrión, así como también la tensión de oxígeno o el medio de cultivo utilizado en el sistema de cultivo (Andrade et al., 2019; Bridi et al., 2021; Dissanayake et al., 2020; Mellisho et al., 2017, 2019; Qu et al., 2017; Taqi et al., 2019). Se estudió si la presencia de zona pelúcida es otra de las variables que influyen en la secreción de EVs hacia el medio de cultivo. Ésta podría actuar como una barrera que inhibe la liberación de las EVs, atrapándolas en el espacio perivitelino. A pesar de que se observó

una variación en la cantidad y diámetro de los poros de la zona pelúcida a través del desarrollo embrionario, se concluyó que su presencia no afecta la secreción de EVs. Sin embargo, la concentración y el tamaño de las EVs secretadas por embriones bovinos aumenta a medida que avanza el desarrollo embrionario en embriones con presencia de zona pelúcida (anexo 2).

Adicionalmente, las variables mencionadas previamente modifican el cargo de miRNAs dentro de las EVs. Por ejemplo, miR-120 se encuentra menormente representado en las EVs secretadas por embriones cultivados con alta tensión de oxígeno (Andrade et al., 2019); 6 miRNAs se encontraron en menor cantidad en las EVs secretadas por embriones producidos *in vitro*, mientras que otros 7 miRNAs sobre-regresados cuando los embriones fueron producidos *in vitro* (Bridi et al., 2021); 12 miRNAs se encontraron sobre-regulados en embriones bovinos que se mantuvieron viables al día 11 en relación a los no viables, y de éstos, sólo 5 miRNAs se identificaron únicamente en aquel grupo, siendo miR-2284ab el de mayor representación (Mellisho et al., 2019).

Hasta ahora sólo se conocía el cargo de miRNAs dentro de las EVs secretadas por embriones bovinos durante la ventana de blastulación (día 5 a 7) y hatching (día 7 a 9), pero no existía un reporte que indicara el patrón de miRNAs durante una etapa previa. Considerando los cambios en la expresión génica que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario temprano, éstos deberían verse representados en el contenido de las EVs que son secretadas, por lo que el contenido de miRNAs contenido en las EVs secretadas en una etapa previa no debería ser el mismo. Aquella hipótesis se confirmó comparando el patrón de secreción de EVs y su contenido de miRNAs en embriones bovinos competentes durante la compactación y blastulación, siendo ambos eventos críticos en el desarrollo embrionario (anexo 3).

Se ha demostrado la participación de miRNAs en la degradación de los transcritos maternos (Mondou et al., 2012), por lo que es razonable postular que los cambios en el contenido de miRNAs en las células embrionarias durante la activación del genoma embrionario se reflejarán en el contenido de las EVs secretadas, y que adicionalmente variará dependiendo de la competencia del embrión.

Mediante secuenciación de pequeños ARNs en las EVs secretadas por embriones bovinos al medio de cultivo, se obtuvo un total de 95 miRNAs. Cuatro miRNAs se encontraron sobre-regulados en las EVs de embriones no competentes: miR-103, miR-100, miR-502a y miR-

1, mientras que miR-92a, miR-140, miR-2285av y miR-222 se encontraron sub-regulados. Éstos últimos cuatro participan en vías de señalización relacionadas con la síntesis y metabolismo de ácidos grasos, degradación de lisina, uniones gap y regulación de la pluripotencia de células madre, mediante la regulación de genes importantes para el desarrollo embrionario (anexo 4).

Usando análisis bioinformático predictivo (DIANA-Tarbase v8), se identificaron 14 genes (FASN, ACADSB, ACSL3, ACOX1, HADH, CPT2, ACADVL, SCD, ACSL4, ACSL1, HSD17B12, ECHS1, y ACAT1) regulados por miR-103, que pueden modular el metabolismo de ácidos grasos. Recientemente, fue reportado un cambio de expresión en los genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos durante la transición materno-cigótica en embriones porcinos producidos por IVF, sugiriendo un rol importante de esta vía de señalización durante el desarrollo temprano de embriones porcinos (Xiang et al., 2020). Los genes relacionados con las uniones gap también son muy importantes durante el desarrollo embrionario temprano, ya que es necesario para la comunicación celular que permite el crecimiento y diferenciación celular, lo que asegura una compactación y blastulación embrionaria exitosa (Sugimoto et al., 2013).

Se ha reportado miR-100-5p sobre-regulado en exosomas derivadas de suero proveniente de mujeres con embarazo uterino viable en relación a las que tenían embarazo ectópico y aborto espontáneo (Sun et al., 2020). La sub-regulación de miR-100 en la sangre periférica está asociada a complicaciones del embarazo (Hromadnikova et al., 2016; Yang et al., 2018). Sin embargo, en este trabajo, miR-100 se encontró sobre-regulado en las EVs provenientes de embriones clasificados como no competentes. Al usar análisis predictivo, se identificó que miR-100 puede regular el gen SMARCA5, también conocido como SNF2H, que es parte de los remodeladores de cromatina dependiente de ATP (Wilson y Roberts, 2011). En embriones murinos, la pérdida de SNF2H resulta en arresto embrionario y muerte de las células del macizo celular interno y del trofoectodermo (Torres-Padilla y Zernicka-Goetz, 2006). Además, SNF2H es necesario para la proliferación de las células madre derivadas de blastocisto temprano, y su ausencia previene el desarrollo y la diferenciación de estas células (Wilson y Roberts, 2011).

Otro miRNA sobre-regulado en las EVs provenientes de embriones no competentes, puede regular varios ARNm que contribuyen en el desarrollo y diferenciación de los tejidos. Por ejemplo, GLCCI1 es un gen necesario para el desarrollo glomerular en embriones de ratón y pez cebra (Nishibori et al., 2011). ATXN1 tiene un rol importante en la neurogénesis, y

miR-502 puede disminuir su expresión (Lee et al., 2011), así como también puede regular NRBF2 que se encuentra disminuido en embriones murinos, ya que altera funciones relacionadas con el sistema nervioso (Ouyang et al., 2020). Así como también, DGCR8 es un gen que puede ser modulado por miR-103, y que al estar KO conlleva a la detención del desarrollo de embriones murinos (Wang et al., 2007).

Considerando la información obtenida mediante análisis bioinformático predictivo y mediante la literatura, podemos inferir que los altos niveles de miR-502, 103 y 100 en los EV secretados por embriones que no alcanzan el estadio de blastocisto (G1) podrían estar potencialmente correlacionados con la baja competencia de estos embriones.

Por otro lado, miR-140, miR-92a, miR-222 y miR-2285 se encontraron sobre-regulados en EVs provenientes de embriones competentes. Si se asume que hay una correlación positiva entre el cargo de miRNAs en las EVs y el embrión, se puede inferir que estos miRNAs también estarán sobre-regulados en el embrión. Sin embargo, la sub-regulación de miR-140 en embriones murinos es esencial para la implantación (Sihori et al., 2018). La administración de un agonista sintético de miR-140 (mimic) reduce el número de sitios de implantación en el útero murino, lo que genera una disminución en la expresión de IGF1R en las células endometriales epiteliales (Sihori et al., 2018). En embriones bovinos, IGF1R es crucial para el crecimiento y desarrollo previo a la implantación (McCarthy et al., 2012), sugiriendo que miR-140 debería estar sub-regulado en los embriones. Es más, miR-140 modula negativamente a SOX2 (Green et al., 2015), cuya expresión en el embrión bovino comienza en el estadio de 16-células, y que tiene un rol muy importante en la mantención de la pluripotencia celular (Goissis y Cibelli, 2014).

Una alta expresión de miR-92a se ha vinculado a la modulación negativa de la expresión de genes relacionados con la adhesión celular (Yamada et al., 2019). Uno de los cambios morfológicos que ocurre en el estadio de 8-células es la compactación, que involucra un alisado de la superficie del embrión asociado a un incremento en la adhesión intercelular mediada por E-caderina (Shirayoshi et al., 1983). En el caso de una disminución en la adhesión intercelular mediada por E-caderina se produce una incorrecta segregación del trofoectodermo y el macizo celular interno (Stephenson et al., 2010), induciendo arresto embrionario (Sathanawongs et al., 2012). Sin embargo, miR-92a puede modular a ASCL2 (Karagkouni et al., 2017), que es necesario para la mantención del glicógeno en las células trofoblásticas durante el desarrollo. Un nivel bajo de ASCL2 conlleva a falla en el desarrollo

de la placenta en ratones, y su ausencia conlleva a letalidad embrionaria (Bogutz et al., 2018).

La sobre-regulación de miR-222 se ha relacionado a una invasión anormal del trofoblasto, lo que induce apoptosis mediante la regulación negativa de la expresión de BCL2-L11 (Qu et al., 2018). El bajo nivel de los miembros de la familia BCL2 proapoptóticos conduce a apoptosis en el embrión bovino (Fear y Hansen, 2011). Por lo que la alta expresión de miR-222 es perjudicial para el embrión. Sin embargo, considerando el patrón de miR-140, miR-222 y miR-92 en las EVs secretadas por embriones competentes y las funciones que ejercen sobre el desarrollo embrionario, se podría inferir que las EVs actúan como un mecanismo de descarte de moléculas perjudiciales para el embrión. Esta teoría se ha discutido previamente por Van Niel et al. (2018).

Se ha reportado previamente que los ARNs transferidos a embriones bovinos pre-implantatorios mediante EVs oviductales regulan la expresión de genes relacionados con alteraciones epigenéticas, metabolismo, canales reguladores del transporte de agua, y desarrollo embrionario e implantación (Almiñana et al., 2017; Bauersachs et al., 2020; López-Vasquez et al., 2017). La suplementación de EVs derivadas de oviducto bovino aumentó la tasa de blastocisto, aumentó la supervivencia embrionaria, mejoró la calidad de los embriones (Almiñana et al., 2017) y aumentó la tasa de supervivencia embrionaria posterior a la vitrificación y desvitrificación (López-Vasquez et al., 2017). Dentro de los ARNs presentes en las EVs oviductales, se detectaron 62 miRNAs que pueden modular 57 de los 96 genes que se encontraron como sub-regulados en embriones bovinos suplementados con EVs oviductales frescas. Interesantemente, muchos de estos genes están relacionados con “diferenciación celular trofoectodermal” y, “procesos embrionarios relacionados con preñez”, que pueden ser modulados por cuatro miRNAs presentes en las EVs oviductales, dando a entender cómo la expresión génica de los embriones puede ser modulada por las EVs secretadas en el oviducto mediante la regulación negativa de los ARNm embrionarios (Bauersachs et al., 2020).

Por otra parte, también se ha estudiado el efecto de las EVs provenientes del fluido uterino sobre el éxito de la implantación embrionaria. Dentro de las proteínas exosomales provenientes de éste, se encuentran el factor IFNt, y otras moléculas que pueden regular la expresión de genes relacionados con la apoptosis y con la adhesión en bovinos (Kusama et al., 2017). Además, contienen diferente cargo de miRNAs según el estado hormonal; miR-423 sólo se encontró en EVs provenientes de fluido uterino de ovejas preñadas, en

cambio otros 27 miRNAs se encontraron exclusivamente al día 14 del ciclo estral (Burns et al., 2014); en el caso del fluido uterino de cabra, 29 y 46 miRNAs se encontraron exclusivamente al día 16 del ciclo estral y al día 16 de gestación, respectivamente (Xie et al., 2021), sugiriendo que las células endometriales epiteliales secretan EVs independiente de otros mecanismos de secreción con la finalidad de proteger el contenido de proteínas y ARNs de las proteasas presentes en el fluido uterino (Burns et al., 2014). Estas EVs son internalizadas por el trofoectodermo del conceptus y por las células endometriales epiteliales, pero no por las células endometriales estromales ni el miometriales, generando un impacto positivo en la producción de IFN α , el crecimiento del conceptus (Burns et al., 2016) y la adhesión al endometrio. Por ejemplo, miR-30d es secretado por el endometrio mediante exosomas y favorece la adhesión de los embriones al epitelio endometrial (Vilella et al., 2015). Se ha demostrado que también es posible generar un impacto negativo en el embrión o el conceptus, por ejemplo, cuando éstos internalizan exosomas provenientes de fluido uterino de vacas con endometritis. Se sugirió que los 118 miRNAs desregulados son los causantes de la infertilidad en vacas con endometritis (Wang et al., 2019).

Sin embargo, la comunicación que ocurre entre las células oviductales y endometriales hacia las células embrionarias al momento de la implantación mediante EVs no es de una sólo dirección. Se ha demostrado previamente, así como también en este estudio, que los embriones secretan EVs, que pueden ser internalizadas por las células endometriales favoreciendo el intercambio de moléculas de señalización (Giacomini et al., 2017; Aguilera et al., 2023). En el estudio de Giacomini et al. (2017) se evaluó el contenido de EVs en el medio de cultivo de embriones humanos desde el día 3 a 5 post-IVF, donde el tamaño medio de las partículas medidas mediante NTA fue 77 ± 3.16 nm, a diferencia de este estudio donde el tamaño medio de las partículas fue 109,4 nm. Esta diferencia en tamaño podría deberse a que no corresponden a la misma especie, pero un factor más importante es el método de aislamiento de EVs utilizado, ya que midieron el total de nanopartículas en el medio de cultivo condicionado por los embriones, y no depletaron de EVs el medio de cultivo previo a su uso, lo que aporta varias nanopartículas de menor tamaño y que no corresponden precisamente a EVs. Lo interesante del estudio de Giacomini et al (2017) es que co-cultivaron estas EVs marcadas con una tinción fluorescente en una monocapa de células endometriales, demostrando la internalización de las EVs y sugiriendo que éstas tienen un rol en la decidualización y por ende en el establecimiento de la preñez. Además, se encontró en el secretoma de aquellos embriones, moléculas como HLA-G (antígeno leucocitario humano G) y PIF (factor pre-implantatorio) asociadas a EVs, las que tienen la

función de iniciar la inmunotolerancia del embrión para invadir las células deciduales (Giacomini et al., 2019). De esta forma, los embriones pre-implantatorios usan las EVs como mediador para notificar a la madre sobre su presencia y así favorecer la implantación (Bridi et al., 2020). Se demostró que las células oviductales actúan como un sensor de calidad embrionaria. El contenido de las EVs secretadas por embriones bovinos de buena calidad difiere de aquellos de mala calidad, y aunque ambas son internalizadas por las células oviductales, desencadenan una respuesta diferente en la expresión génica de las células oviductales. Dentro de los genes sobrerregulados frente a la respuesta de suplementación con EVs de embriones de buena calidad, se encuentran ISG-15, MX1, OAS1Y y LOC100139670, todos ellos conocidos como genes estimulados por interferón o involucrados en la vía de señalización de IFN α . Por lo tanto, pareciera que el embrión se comunica con el ambiente materno, y éste toma la decisión de invertir o no en los recursos necesarios para mantener una preñez (Dissayanake et al., 2021), lo que permite inferir que el embrión elimina componentes perjudiciales a su entorno.

Pese que la secreción de EVs inicialmente se describió como un medio para la eliminación de componentes no necesarios para la célula (Johnstone et al., 1987), actualmente el mayor interés de estudio radica en su capacidad de intercambiar componentes entre las células, actuando como vehículos de señalización en procesos homeostáticos normales, constituyendo un mecanismo de comunicación intercelular (van Niel et al., 2018). Sin embargo, el cargo de las EVs no siempre va a generar una acción que beneficie a la célula receptora, ya que también pueden transportar moléculas asociadas a tumores en el caso del cáncer, lo que propicia el establecimiento de un nicho pre-metastásico (Maida et al., 2016), o moléculas asociadas a enfermedades neurodegenerativas (Fais et al., 2016).

Normalmente se describe que la naturaleza y abundancia de los componentes que acarrean las EVs es específica según el tipo celular y son influenciadas por el estado molecular de la célula secretora. Aún así, es importante resaltar que el destino final y probablemente el más frecuente de las EVs es hacia los lisosomas, lo que conduce a la degradación de proteínas y lípidos transportados por las EVs, proporcionando a su vez una fuente relevante de metabolitos para las células receptoras (van Niel et al., 2018). Es por ello que, en algunos estudios se ha encontrado un patrón distinto de miRNAs entre las células y las EVs que secreta. Por ejemplo, de los 227 miRNAs presentes en las EVs secretadas por células endometriales epiteliales, 13 no se encontraron en las células de origen, indicando que

ciertos miRNAs se empacan en las EVs intencionalmente para su eliminación (Ng et al., 2013).

Hasta el momento no se sabía si el patrón de miRNAs secretados por las células embrionarias durante la etapa de compactación era un indicativo del patrón molecular que el embrión mantiene durante su desarrollo. Es por ello que en este proyecto se analizó el patrón de 8 miRNAs en las EVs secretadas durante la compactación (día 3-5) y en el embrión al inicio (día 3) y al final de este periodo (día 5). Los miRNAs analizados corresponden a los que se encontraron diferencialmente expresados en el experimento anterior, es decir; miR-103, miR-502a, miR-100, miR-1, miR-92a, miR-140, miR-2285a, miR-222. Con la finalidad de evaluar el patrón de miRNAs en el embrión al inicio del periodo, se realizó biopsia de blastómera a 64 embriones en estado de 8-células; luego los embriones biopsiados se cultivaron individualmente en medio de cultivo depletado de EVs, y finalmente al día 5 se colectaron los medios de cultivo y los embriones, manteniendo la identificación individual de éstos.

Según el análisis bioinformático de la expresión de miRNAs presentes en las EVs secretadas por embriones no competentes, se esperaba observar mayor expresión de bta-miR-100, bta-miR-103, bta-miR-1 and bta-miR-502a que en las EVs secretadas por embriones competentes, sin embargo, no hubo expresión de estos últimos dos, probablemente debido a la baja cantidad de EVs que se obtienen del medio de cultivo individual. La expresión de bta-miR-100 y bta-miR-103 sí fue mayor en las EVs provenientes de embriones bloqueados que en las EVs de los embriones competentes, mismo patrón en las blastómeras obtenidas mediante biopsia de estos embriones al día 3.5 post-IVF. Por otro lado, en el análisis bioinformático, miR-140, miR-92a, miR-222 y miR-2285 se encontraron sobre-regulados en EVs provenientes de embriones competentes. Sin embargo, al evaluar la expresión génica mediante qRT-PCR no se identificó el mismo patrón, incluso bta-miR-140 se encontró sobre-expresado en las EVs provenientes de embriones no competentes. Interesantemente, este resultado coincide con la literatura, donde se menciona que una sobre-regulación de estos genes en los embriones, puede conllevar a fallas en la adhesión celular (Yamada et al., 2019), letalidad embrionaria en ratones (Bogutz et al., 2018) y apoptosis celular (Qu et al., 2018).

Si se asume que hay una correlación positiva entre el cargo de miRNAs en las EVs y el embrión, se puede inferir que estos miRNAs también estarán sobre-regulados en el embrión. No obstante, en los estudios que se habían llevado a cabo hasta el momento, sólo

se evaluaba la expresión génica del embrión posterior al periodo de secreción de las EVs (Dissayanake et al., 2020; Mellisho et al., 2019) y en este estudio, se pudo evaluar la expresión génica al inicio del periodo y al final. Gracias a esto, se identificó que la expresión génica en las blastómeras es mayor que en el embrión al día 5 post-IVF ($p < 0.05$), con lo que se podría asumir que el embrión utiliza la secreción de EVs como un método de descarte de moléculas perjudiciales para intentar rescatar el desarrollo embrionario.

VII. CONCLUSIONES

1. Los embriones bovinos pre-implantatorios secretan nanopartículas del tipo vesículas extracelulares durante el periodo de compactación embrionaria, cuyas características varían según la competencia del embrión.
2. El perfil de miRNAs contenido en las vesículas extracelulares secretadas por embriones bovinos durante el periodo de compactación, varía según la competencia embrionaria.
3. La desregulación de miRNAs podría influir en vías de señalización importantes en el desarrollo embrionario, mediante la regulación de expresión de genes.
4. Es posible comparar la expresión génica de un embrión al inicio y al término de un periodo determinado en que secreta EVs, y ésta es diferente en sus distintas etapas.

VIII. REFERENCIAS

- Abd El-Aziz, A. H., Mahrous, U. E., Kamel, S. Z., y Sabek, A. A. (2016). Factors influencing in vitro production of bovine embryos: A review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(12), 737–756. <https://doi.org/10.3923/ajava.2016.737.756>
- Abu-Halima, M., Häusler, S., Backes, C., Fehlmann, T., Staib, C., Nestel, S., Nazarenko, I., Meese, E., y 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*, 7(1), 13525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13683-8>
- Aguilera, C., Velásquez, A. E., Gutierrez-Reinoso, M. A., Wong, Y. S., Melo-Baez, B., Cabezas, J., Caamaño, D., Navarrete, F., Rojas, D., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodríguez-Alvarez, L. (2023). Extracellular Vesicles Secreted by Pre-Hatching Bovine Embryos Produced In Vitro and In Vivo Alter the Expression of IFN τ -Stimulated Genes in Bovine Endometrial Cells. *International journal of molecular sciences*, 24(8), 7438. <https://doi.org/10.3390/ijms24087438>
- Almiñana, C., y Bauersachs, S. (2020). Extracellular vesicles: Multi-signal messengers in the gametes/embryo-oviduct cross-talk. *Theriogenology*, 150, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.077>
- Andrade, G. M., Bomfim, M. M., del Collado, M., Meirelles, F. V., Perecin, F., y da Silveira, J. C. (2019). Oxygen tension modulates extracellular vesicles and its miRNA contents in bovine embryo culture medium. *Molecular Reproduction and Development*, 86(8), 1067–1080. <http://doi.org/10.1002/mrd.23223>
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J. M., Mornet, S., y Brisson, A. R. (2013). Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 83(3), 301–305 <https://doi.org/10.1111/jth.12554>
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., y Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes and Development*, 17(1), 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Balakier, H., y Pedersen, R. A. (1982). Allocation of cells to inner cell mass and trophectoderm lineages in preimplantation mouse embryos. *Developmental Biology*, 90(2), 352–362. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90384-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90384-0)
- Bartel, D. P. (2007). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281-297, 2004). *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
- Barturen, G., Rueda, A., Alganza, A., Lebron, R., Kotsfakis, M., Shi, B.-J., y Koppers-Lalic, Danijela, Hackenberg, M. (2014). sRNAbench: profiling of small RNAs and its sequence variants in single or multi-species high-throughput experiments. *Methods in Next Generation Sequencing*, 1, 21–31. <https://doi.org/10.2478/mngs-2014-0001>
- Bauersachs, S., Blum, H., Krebs, S., Fröhlich, T., Arnold, G. J., y Wolf, E. (2010). Creating new knowledge for ruminant reproduction from rapidly expanding and evolving scientific

databases. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 67, 29–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21755661>

Bauersachs, S., Mermillod, P., y Almiñana, C. (2020). The Oviductal Extracellular Vesicles' RNA Cargo Regulates the Bovine Embryonic Transcriptome. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1303. <https://doi.org/10.3390/ijms21041303>

Bazer, F. W. (1992). Mediators of Maternal Recognition of Pregnancy in Mammals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 199(4), 373–384. <https://doi.org/10.3181/00379727-199-43371A>

Betteridge, K. J., y Fléchon, J. E. (1988). The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, 29(1), 155–187. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90038-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90038-6)

Bó, G. A., y Mapletoft, R. J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*, 10(3), 344–348.

Bodó, S., Baranyai, B., Góczy, E., Dohy, J., & Markkula, M. (2001). Preimplantation genetic diagnosis in cattle: a review. *Acta veterinaria Hungarica*, 49(1), 99–109. <https://doi.org/10.1556/004.49.2001.1.12>

Bogutz, A. B., Oh-McGinnis, R., Jacob, K. J., Ho-Lau, R., Gu, T., Gertsenstein, M., Nagy, A., y Lefebvre, L. (2018). Transcription factor ASCL2 is required for development of the glycogen trophoblast cell lineage. *PLoS genetics*, 14(8), e1007587. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007587>

Böing, A. N., van der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., y Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23430. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>

Brackett, B., Bousquet, D., Boice, M., Donawick, W., Evans, J., y Dressel, M. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27(1), 147–158.

Bredbacka, P. (1995). Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. *Theriogenology*, 44(2), 159–166. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00165-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00165-5)

Bridi, A., Perecin, F., & Silveira, J. C. D. (2020). Extracellular Vesicles Mediated Early Embryo-Maternal Interactions. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 1163. <https://doi.org/10.3390/ijms21031163>

Bridi, A., Andrade, G. M., Del Collado, M., Sangalli, J. R., de Ávila, A. C. F. C. M., Motta, I. G., da Silva, J. C. B., Pugliesi, G., Silva, L. A., Meirelles, F. V., da Silveira, J. C., y Perecin, F. (2021). Small extracellular vesicles derived from in vivo- or in vitro-produced bovine blastocysts have different miRNAs profiles-Implications for embryo-maternal recognition. *Molecular reproduction and development*, 88(9), 628–643. <https://doi.org/10.1002/mrd.23527>

Burns, G., Brooks, K., Wildung, M., Navakanitworakul, R., Christenson, L. K., y Spencer, T. E. (2014). Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS ONE*, 9(3), e90913.

Burns, G. W., Brooks, K. E., & Spencer, T. E. (2016). Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. *Biology of reproduction*, 94(3), 56. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134973>

Busk, P. K. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-29>

Cagnone, G., y Sirard, M. A. (2016). The embryonic stress response to in vitro culture: Insight from genomic analysis. En *Reproduction* (Vol. 152, Número 6, pp. R247–R261). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0391>

Camous, S., Kopečný, V., y Flechon, J. E. (1986). Autoradiographic detection of the earliest stage of [3H]-uridine incorporation into the cow embryo. *Biology of the cell*, 58(3), 195–200.

Cánepa, M. J., Ortega, N. M., Monteleone, M. C., Mucci, N., Kaiser, G. G., Brocco, M., y Mutto, A. (2014). Expression profile of genes as indicators of developmental competence and quality of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *PLoS ONE*, 9(9), e108139. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108139>

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

Cenariu, M., Pall, E., Cernea, C., y Groza, I. (2012). Evaluation of bovine embryo biopsy techniques according to their ability to preserve embryo viability. *Journal of Biomedicine y Biotechnology*, 541384. <https://doi.org/10.1155/2012/541384>

Cheruvanky, A., Zhou, H., Pisitkun, T., Kopp, J. B., Knepper, M. A., Yuen, P. S. T., y Star, R. A. (2007). Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292(5), F1657–1661. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00434.2006>

Corcoran, D., Fair, T., Park, S., Rizos, D., Patel, O. V., Smith, G. W., Coussens, P. M., Ireland, J. J., Boland, M. P., Evans, A. C. O., y Lonergan, P. (2006). Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction*, 131(4), 651–660. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01015>

Coumans, F. A. W., Brisson, A. R., Buzas, E. I., Dignat-George, F., Drees, E. E. E., El-Andaloussi, S., Emanuelli, C., Gasecka, A., Hendrix, A., Hill, A. F., Lacroix, R., Lee, Y., van Leeuwen, T. G., Mackman, N., Mäger, I., Nolan, J. P., van der Pol, E., Pegtel, D. M., Sahoo, S., ... Nieuwland, R. (2017). Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation Research*, 120(10), 1632–1648. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>

Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., y Farin, C. E. (2001). Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction*, 64(5), 1375–1385. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1375>

Cuman, C., Van Sinderen, M., Gantier, M. P., Rainczuk, K., Sorby, K., Rombauts, L., Osianlis, T., y Dimitriadis, E. (2015). Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate

Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine*, 2(10), 1528–1535. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.003>

de Boer, K., McArthur, S., Murray, C., y Jansen, R. (2002). O-54. First live birth following blastocyst biopsy and PGD analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 4(Suppl. 2), 35. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(12\)60073-x](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(12)60073-x)

De Steirteghem, A. V. A. Van. (2001). Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 21(9), 767–780. <https://doi.org/10.1002/pd.172>

De Vrij, J., Maas, S. L. N., Van Nispen, M., Sena-Esteves, M., Limpens, R. W. A., Koster, A. J., Leenstra, S., Lamfers, M. L., y Broekman, M. L. D. (2013). Quantification of nanosized extracellular membrane vesicles with scanning ion occlusion sensing. *Nanomedicine*, 8(9), 1443–1458. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.173>

Degrelle, S., Campion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., y Hue, I. (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental biology*, 288(2), 448–460.

Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F. G., Stoorvogel, W., y Geuze, H. J. (2000). Exosome: From internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, 113, 3365–3374.

Dissanayake, K., Nömm, 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., y 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>

Dissanayake, K., Nömm, M., Lättekivi, F., Ord, J., Ressaissi, Y., Godakumara, K., Reshi, Q. U. A., Viil, J., Jääger, K., Velthut-Meikas, A., Salumets, A., Jaakma, Ü., y Fazeli, A. (2021). Oviduct as a sensor of embryo quality: deciphering the extracellular vesicle (EV)-mediated embryo-maternal dialogue. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 99(5), 685–697. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02042-w>

Dode, M. A. N., Dufort, I., Massicotte, L., y Sirard, M. A. (2006). Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 73(3), 288–297. <https://doi.org/10.1002/mrd.20427>

Driver, A. M., Peñagaricano, F., Huang, W., Ahmad, K. R., Hackbart, K. S., Wiltbank, M. C., y Khatib, H. (2012). RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genomics*, 13(1), 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-118>

Eitan, E., Zhang, S., Witwer, K. W., y Mattson, M. P. (2015). Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 26373. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26373>

El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M. A., Schellander, K., y Tesfaye, D. (2006). Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo

biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological Genomics*, 28(1), 84–96. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00111.2006>

Enderle, D., Spiel, A., Coticchia, C. M., Berghoff, E., Mueller, R., Schlumpberger, M., Sprenger-Haussels, M., Shaffer, J. M., Lader, E., Skog, J., y Noerholm, M. (2015). Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. *PLOS ONE*, 10(8), e0136133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136133>

Fais, S., O'Driscoll, L., Borrás, F. E., Buzas, E., Camussi, G., Cappello, F., Carvalho, J., Cordeiro da Silva, A., Del Portillo, H., El Andaloussi, S., Ficko Trček, T., Furlan, R., Hendrix, A., Gursel, I., Kralj-Iglic, V., Kaeffer, B., Kosanovic, M., Lekka, M. E., Lipps, G., Logozzi, M., ... Giebel, B. (2016). Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS nano*, 10(4), 3886–3899. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b08015>

Fear, J. M., y Hansen, P. J. (2011). Developmental changes in expression of genes involved in regulation of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Biology of reproduction*, 84(1), 43–51. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086249>

Ferreira, Y. J., Gardiner, C., Poli, M., Turner, K., Child, T., y Sargent, I. L. (2013). O-253 Human embryos release extracellular vesicles which may act as indicators of embryo quality. *Human Reproduction*, 28(suppl.1), i104–i106.

Filipe, V., Hawe, A., y Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796–810. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>

Findikli, N., Kahraman, S., Saglam, Y., Beyazyurek, C., Sertyel, S., Karlikaya, G., Karagozoglu, H., y Aygun, B. (2006). Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage. *Reproductive BioMedicine Online*, 13(1), 38–46. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62014-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62014-7)

Flechon, J. E., Guillomot, M., Charlier, M., Fléchon, B., y Martal, J. (1986). Experimental studies on the elongation of the ewe blastocyst. *Reproduction Nutrition Developpement*, 26(4), 1017–1024. <https://doi.org/10.1051/rnd:19860609>

Foygel, K., Choi, B., Jun, S., Leong, D. E., Lee, A., Wong, C. C., Zuo, E., Eckart, M., Reijo Pera, R. A., Wong, W. H., y Yao, M. W. M. (2008). A novel and critical role for Oct4 as a regulator of the maternal-embryonic transition. *PLoS ONE*, 3(12), e4109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004109>

Fujii, H., Tatsumi, K., Kosaka, K., Yoshioka, S., Fujiwara, H., y Fujii, S. (2006). Eph-ephrin A system regulates murine blastocyst attachment and spreading. *Developmental Dynamics*, 235(12), 3250–3258. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20977>

Galaviz-Hernandez, C., Stagg, C., De Ridder, G., Tanaka, T. S., Ko, M. S. H., Schlessinger, D., y Nagaraja, R. (2003). Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. *Gene*, 309(2), 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00508-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00508-0)

Gardiner, C., Vizio, D. Di, Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., y Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles:

Results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5, 32945. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>

Ghanem, N., Salilew-Wondim, D., Gad, A., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., y Hoelker, M. (2011). Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction*, 142(4), 551–564. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0476>

Giacomini, E., Vago, R., Sanchez, A. M., Podini, P., Zarovni, N., Murdica, V., Rizzo, R., Bortolotti, D., Candiani, M., y Viganò, P. (2017). Secretome of in vitro cultured human embryos contains extracellular vesicles that are uptaken by the maternal side. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05549-w>

Giacomini, E., Alleva, E., Fornelli, G., Quartucci, A., Privitera, L., Vanni, V. S., y Viganò, P. (2019). Embryonic extracellular vesicles as informers to the immune cells at the maternal-fetal interface. *Clinical and experimental immunology*, 198(1), 15–23. <https://doi.org/10.1111/cei.13304>

Gilbert, S. (2000). *Development Biology* (Sixth Edit). Sinauer.

Gjørret, J. O., Knijn, H. M., Dieleman, S. J., Avery, B., Larsson, L., y Maddox-Hyttel, P. (2003). Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1193–1200.

Gjørret, J. O., Wengle, J., Maddox-Hyttel, P., y King, W. A. (2005). Chronological appearance of apoptosis in bovine embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer from quiescent granulosa cells. *Reproduction in domestic animals*, 40(3), 210–216.

Green, D., Dalmay, T., y Fraser, W. D. (2015). Role of miR-140 in embryonic bone development and cancer. *Clinical science (London, England:1979)*, 129(10), 863–873. <https://doi.org/10.1042/CS20150230>

Goissis, M. D., y Cibelli, J. B. (2014). Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. *Molecular reproduction and development*, 81(10), 962–970. <https://doi.org/10.1002/mrd.22415>

Gutiérrez-Adán, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F. A., Boland, M. P., Pintado, B., y De la Fuente, J. (2001). Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 55(5), 1117–1126. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00471-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00471-X)

Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., Fair, T., Moreira, P. N., Pintado, B., De La Fuente, J., Boland, M. P., y Lonergan, P. (2004). Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 68(4), 441–448. <https://doi.org/10.1002/mrd.20113>

Gutierrez-Adan, A., White, C. R., Van Soom, A., y Mann, M. R. W. (2015). Why we should not select the faster embryo: Lessons from mice and cattle. En *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 27, Número 5, pp. 765–775). CSIRO. <https://doi.org/10.1071/RD14216>

Hall, V., Hinrichs, K., Lazzari, G., Betts, D. H., y Hyttel, P. (2013). Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *Veterinary Journal*, 197(2), 128–142. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.026>

Hansen, P. J., Block, J., Loureiro, B., Bonilla, L., y Hendricks, K. E. M. (2010). Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. En *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 22, Número 1, pp. 59–66). *Reprod Fertil Dev*. <https://doi.org/10.1071/RD09212>

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

Hasler, John F. (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, 15(suppl. 5), 47–58. https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_5.47

Hauser, P., Wang, S., y Didenko, V. V. (2017). Apoptotic bodies: Selective detection in extracellular vesicles. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1554, pp. 193–200). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9_12

Held, E., Salilew-Wondim, D., Linke, M., Zechner, U., Rings, F., Tesfaye, D., Schellander, K., y Hoelker, M. (2012). Transcriptome Fingerprint of Bovine 2-Cell Stage Blastomeres Is Directly Correlated with the Individual Developmental Competence of the Corresponding Sister Blastomere1. *Biology of Reproduction*, 87(6), 1–13. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102921>

Herr, C.M., Reed, K.C. (1991). Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, 35 (1), 45-54. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90147-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90147-6).

Hoelker, M., Held, E., Salilew-Wondim, D., Schellander, K., y Tesfaye, D. (2014). Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 22–36. <https://doi.org/10.1071/RD13255>

Holm, P., Booth, P. J., y Callesen, H. (2002). Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, 123(4), 553–565. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230553>

Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Hympanova, L., y Krofta, L. (2016). Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. *Thrombosis research*, 137, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.11.032>

Hue, I., Renard, J. P., y Viebahn, C. (2001). Brachyury is expressed in gastrulating bovine embryos well ahead of implantation. *Development Genes and Evolution*, 211(3), 157–159. <https://doi.org/10.1007/s004270100138>

Huppertz, B., Frank, H. G., y Kaufmann, P. (1999). The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embriology*, 200(1), 1–18.

Illmensee, K., Kaskar, K., y Zavos, P. M. (2005). Efficient blastomere biopsy for mouse embryo splitting for future applications in human assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online*, 11(6), 716–725. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61690-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61690-2)

Ivanoff, E. I. (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science*, 12(3), 244–256. <https://doi.org/10.1017/S002185960000530X>

Jaton, C., Schenkel, F. S., Chud, T. C. S., Malchiodi, F., Sargolzaei, M., Price, C. A., Canovàs, A., Baes, C., y Miglior, F. (2020). Genetic and genomic analyses of embryo production in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(2), 50. <https://doi.org/10.1071/RD19275>

Jewgenow, K., Braun, B. C., Dehnhard, M., Zahmel, J., y Goeritz, F. (2017). Research on reproduction is essential for captive breeding of endangered carnivore species. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(Suppl. 2), 18–23. <https://doi.org/10.1111/rda.12836>

Jiang, Z., Dong, H., Zheng, X., Marjani, S. L., Donovan, D. M., Chen, J., y Tian, X. C. (2015). mRNA Levels of Imprinted Genes in Bovine in Vivo Oocytes, Embryos and Cross Species Comparisons with Humans, Mice and Pigs. *Scientific Reports*, 5(1), 17898. <https://doi.org/10.1038/srep17898>

Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., y Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry*, 262(19), 9412–9420.

Jung, M., Schaefer, A., Steiner, I., Kempkensteffen, C., Stephan, C., Erbersdobler, A., y Jung, K. (2010). Robust MicroRNA Stability in Degraded RNA Preparations from Human Tissue and Cell Samples. *Clinical Chemistry*, 56(6), 998–1006. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.141580>

Kasinathan, P., Wei, H., Xiang, T., Molina, J. A., Metzger, J., Broek, D., Kasinathan, S., Faber, D. C., y Allan, M. F. (2015). Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Scientific Reports*, 5(8674). <https://doi.org/10.1038/srep08674>

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., y Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic acids research*, 46(D1), D239–D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>

Katz-Jaffe, M. G., y Gardner, D. K. (2008). Can proteomics help to shape the future of human assisted conception? *Reproductive BioMedicine Online*, 17(4), 497–501. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60235-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60235-0)

Kim, J., Lee, J., Lee, T. B., y Jun, J. H. (2018). Embryotrophic effects of extracellular vesicles derived from outgrowth embryos in pre- and peri-implantation embryonic development in mice. *Molecular Reproduction and Development*, 86(2), 187–196.

- Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A. K., Radtke, S., Ruesing, J., Doepfner, T. R., Epple, M., Horn, P. A., Beelen, D. W., y Giebel, B. (2014). MSC-derived exosomes: A novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *En Leukemia* (Vol. 28, Número 4, pp. 970–973). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.41>
- Krol, J., Loedige, I., y Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Kropp, J., y Khatib, H. (2015). Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6552–6563. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9510>
- Kropp, J., Salih, S. M., y Khatib, H. (2014). Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. *Frontiers in Genetics*, 5, 91. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00091>
- Kues, W. A., Sudheer, S., Herrmann, D., Carnwath, J. W., Havlicek, V., Besenfelder, U., Lehrach, H., Adjaye, J., y Niemann, H. (2008). Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19768–19773. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805616105>
- Kuijk, E. W., Du Puy, L., Van Tol, H. T. A., Oei, C. H. Y., Haagsman, H. P., Colenbrander, B., y Roelen, B. A. J. (2008). Differences in early lineage segregation between mammals. *Developmental Dynamics*, 237(4), 918–927. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21480>
- Kuliev, A., y Verlinsky, Y. (2005). Preimplantation diagnosis: A realistic option for assisted reproduction and genetic practice. *En Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* (Vol. 17, Número 2, pp. 179–183). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000162189.76349.c5>
- Kusama, K., Nakamura, K., Bai, R., Nagaoka, K., Sakurai, T., y Imakawa, K. (2018). Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 1370–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.176>
- Lane, R. E., Korbie, D., Trau, M., y Hill, M. M. (2017). Purification Protocols for Extracellular Vesicles. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1660, 111–130. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_10
- Latham, K. E., y Schultz, R. M. (2001). Embryonic genome activation. *En Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* (Vol. 6, pp. D748-759). *Front Biosci*. <https://doi.org/10.2741/latham>
- Lee, K. F., Yao, Y. Q., Kwok, K. L., Xu, J. Sen, y Yeung, W. S. B. (2002). Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2), 564–570. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6676>
- Lee, Y., Fryer, J. D., Kang, H., Crespo-Barreto, J., Bowman, A. B., Gao, Y., Kahle, J. J., Hong, J. S., Kheradmand, F., Orr, H. T., Finegold, M. J., & Zoghbi, H. Y. (2011). ATXN1

protein family and CIC regulate extracellular matrix remodeling and lung alveolarization. *Developmental cell*, 21(4), 746–757. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.017>

Leese, H. J. (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 Years on. *Reproduction*, 143(4), 417–427. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0484>

Li, L., Zheng, P., y Dean, J. (2010). Maternal control of early mouse development. *Development*, 137(6), 859–870. <https://doi.org/10.1242/dev.039487>

Lin, X., Beckers, E., Cafferty, S. M., Gansemans, Y., Szymańska, K. J., Pavani, K. C., Catani, J. P., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., De Sutter, P., Van Soom, A., y Peelman, L. (2019). Bovine embryo-secreted microRNA-30c is a potential noninvasive biomarker for hampered preimplantation developmental competence. *Frontiers in Genetics*, 10(315), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00315>

Lindgren, K. E., Gülen Yaldir, F., Hreinsson, J., Holte, J., Kårehed, K., Sundström-Poromaa, I., Kaihola, H., y Åkerud, H. (2018). Differences in secretome in culture media when comparing blastocysts and arrested embryos using multiplex proximity assay. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 123(3), 143–152. <https://doi.org/10.1080/03009734.2018.1490830>

Lindner, G. M., y Wright, R. W. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407–416. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90201-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90201-7)

Loi, P., Toschi, P., Zacchini, F., Ptak, G., Scapolo, P. A., Capra, E., Stella, A., Marsan, P. A., y Williams, J. L. (2016). Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. En *Genetics Selection Evolution* (Vol. 48, Número 1, p. 53). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0231-z>

Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., y Boland, M. P. (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117(1), 159–167. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170159>

Lonergan, Patrick, y Fair, T. (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review of animal biosciences*, 4, 255–268.

Lonergan, Patrick, Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Moreira, P. M., Pintado, B., De la Fuente, J., y Boland, M. P. (2003). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1424–1431. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018168>

Lopera-Vásquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., Calle, A., Redruello, A., López-Martín, S., Gutierrez-Adán, A., Yáñez-Mó, M., Ramirez, M. Á., y Rizos, D. (2016). Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLOS ONE*, 11(2), e0148083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148083>

Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., Ramirez, M. Á., Yáñez-Mó, M., y Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, 153(4), 461–470. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0384>

Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., y Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 26913. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>

Luciano, A. M., y Sirard, M. A. (2018). Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. *Biology of Reproduction*, 98(2), 162–169. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox149>

Machado, G. M., Ferreira, A. R., Pivato, I., Fidelis, A., Spricigo, J. F., Paulini, F., Lucci, C. M., Franco, M. M., Dode, M. A., Recursos, E., y Eticos, G. (2013). Post-Hatching Development of In Vitro Bovine Embryos From Day 7 to 14 In Vivo Versus In Vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 80, 936–947. <https://doi.org/10.1002/mrd.22230>

Machaty, Z., Peippo, J., y Peter, A. (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology]. *Theriogenology*, 78, 937–950.

Maddox-Hyttel, P., Alexopoulos, N. I., Vajta, G., Lewis, I., Rogers, P., Cann, L., Callesen, H., Tveden-Nyborg, P., y Trounson, A. (2003). Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. *Reproduction*, 125(4), 607–623. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250607>

Magata F. (2023). Time-lapse monitoring technologies for the selection of bovine in vitro fertilized embryos with high implantation potential. *The Journal of reproduction and development*, 69(2), 57–64. <https://doi.org/10.1262/jrd.2022-131>

Maida, Y., Takakura, M., Nishiuchi, T., Yoshimoto, T., y Kyo, S. (2016). Exosomal transfer of functional small RNAs mediates cancer-stroma communication in human endometrium. *Cancer medicine*, 5(2), 304–314. <https://doi.org/10.1002/cam4.545>

Maillo, V., Gaora, P., Forde, N., Besenfelder, U., Havlicek, V., Burns, G. W., Spencer, T. E., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., y Rizos, D. (2015). Oviduct-embryo interactions in cattle: Two-way traffic or a one-way street? *Biology of Reproduction*, 92(6), 144. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.127969>

Marin, D., y Scott, R. T. (2018). Extracellular vesicles: A promising tool for assessment of embryonic competence. En *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* (Vol. 30, Número 3, pp. 171–178). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000458>

Masopust, D., Sivula, C. P., y Jameson, S. C. (2017). Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 199(2), 383–388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700453>

McCarthy, S. D., Roche, J. F., y Forde, N. (2012). Temporal changes in endometrial gene expression and protein localization of members of the IGF family in cattle: effects of progesterone and pregnancy. *Physiological genomics*, 44(2), 130–140. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00106.2011>

- Mellisho, E. A., Briones, M. A., Velásquez, A. E., Cabezas, J., Castro, F. O., y Rodríguez-Álvarez, L. (2019). 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., Velásquez, A. E., Nuñez, M. J., Cabezas, J. G., Cueto, J. A., Fader, C., Castro, F. O., y Rodríguez-Álvarez, L. (2017). Identification and characteristics of Extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. *PLoS ONE*, 12(5), e0178306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178306>
- Memili, E., y First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: A review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. En *Zygote* (Vol. 8, Número 1, pp. 87–96). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0967199400000861>
- Merton, S. (2002). Morphological Evaluation of Embryos in Domestic Species. En Ann Van Soom y M. Boerjan (Eds.), *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and non-invasive techniques* (pp. 33–55). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0343-8_2
- Mesalam, A., Lee, K.-L., Khan, I., Chowdhury, M. M. R., Zhang, S., Song, S.-H., Joo, M.-D., Lee, J.-H., Jin, J.-I., y Kong, I.-K. (2019). A combination of bovine serum albumin with insulin–transferrin–sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix metallopro. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(2), 333. <https://doi.org/10.1071/RD18162>
- Misirlioglu, M., Page, G. P., Sagirkaya, H., Kaya, A., Parrish, J. J., First, N. L., y Memili, E. (2006). Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 18905–18910. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608247103>
- Mondou, E., Dufort, I., Gohin, M., Fournier, E., y Sirard, M.-A. (2012). Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. *Molecular Human Reproduction*, 18(9), 425–434. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas015>
- Moore, S. G., y Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Morris, D., Diskin, M., y Sreenan, J. (2000). Protein synthesis and phosphorylation by elongating 13-15-day-old cattle blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(1–2), 39–44.
- Muñoz, M., Uyar, A., Correia, E., Díez, C., Fernandez-Gonzalez, A., Caamaño, J. N., Martínez-Bello, D., Trigal, B., Humblot, P., Ponsart, C., Guyader-Joly, C., Carrocera, S., Martin, D., Marquant Le Guienne, B., Seli, E., y Gomez, E. (2014). Prediction of pregnancy viability in bovine in vitro-produced embryos and recipient plasma with Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5497–5507. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8067>

- Nagy, Z. P., Sakkas, D., y Behr, B. (2008). Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reproductive BioMedicine Online*, 17(4), 502–507. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60236-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60236-2)
- Nel-Themaat, L., y Nagy, Z. P. (2011). A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta*, 32(SUPPL. 3), S257–S263. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.05.011>
- Ng, Y. H., Rome, S., Jalabert, A., Forterre, A., Singh, H., Hincks, C. L., y Salamonsen, L. A. (2013). Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PloS One*, 8(3), e58502. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058502>
- Nishibori, Y., Katayama, K., Parikka, M., Oddsson, A., Nukui, M., Hultenby, K., Wernerson, A., He, B., Ebarasi, L., Raschperger, E., Norlin, J., Uhlén, M., Patrakka, J., Betsholtz, C., y Tryggvason, K. (2011). *Glcci1* deficiency leads to proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 22(11), 2037–2046. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010111147>
- Noden, D. M., y Lahunta, A. (1990). Estadios iniciales del desarrollo en aves y mamíferos. En *Embriología de los animales domésticos* (1a ed., pp. 29–33). Acribia.
- Noli, L., Ogilvie, C., Khalaf, Y., y Ilic, D. (2017). Potential of human twin embryos generated by embryo splitting in assisted reproduction and research. *Human reproduction update*, 23(2), 156–165. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw041>
- Nyalwidhe, J., Burch, T., Bocca, S., Cazares, L., Green-Mitchell, S., Cooke, M., Birdsall, P., Basu, G., Semmes, O. J., y Oehninger, S. (2013). The search for biomarkers of human embryo developmental potential in IVF: a comprehensive proteomic approach. *Molecular Human Reproduction*, 19(4), 250–263. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas063>
- Obeid, S., Ceroi, A., Mourey, G., Saas, P., Elie-Caille, C., y Boireau, W. (2017). Development of a NanoBioAnalytical platform for “on-chip” qualification and quantification of platelet-derived microparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 93, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.100>
- Ouyang, X., Ahmad, I., Johnson, M. S., Redmann, M., Craver, J., Wani, W. Y., Benavides, G. A., Chacko, B., Li, P., Young, M., Jegga, A. G., Darley-Usmar, V., y Zhang, J. (2020). Nuclear receptor binding factor 2 (NRBF2) is required for learning and memory. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 100(9), 1238–1251. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0433-4>
- Pallinger, E., Bognar, Z., Bodis, J., Csabai, T., Farkas, N., Godony, K., Varnagy, A., Buzas, E., y 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>
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., y First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591–600. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90143-3)

- Parrish, John J. (2014). Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Perkel, K. J., Tscherner, A., Merrill, C., Lamarre, J., y Madan, P. (2015). The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Molecular Reproduction and Development*, 82(11), 822–838. <https://doi.org/10.1002/mrd.22525>
- Pers-Kamczyc, E., Pawlak, P., Rubes, J., y Lechniak, D. (2012). Early Cleaved Bovine Embryos Show Reduced Incidence of Chromosomal Aberrations and Higher Developmental Potential on Day 4.5 Post-Insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 899–906. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01987.x>
- Polge, C., y Rowson, L. E. A. (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C . *Nature*, 169, 626–627.
- Qu, H. M., Qu, L. P., Pan, X. Z., y Mu, L. S. (2018). Upregulated miR-222 targets BCL2L11 and promotes apoptosis of mesenchymal stem cells in preeclampsia patients in response to severe hypoxia. *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(1), 110–119.
- Qu, P., Qing, S., Liu, R., Qin, H., Wang, W., Qiao, F., Ge, H., Liu, J., Zhang, Y., Cui, W., y Wang, Y. (2017). Effects of embryo-derived exosomes on the development of bovine cloned embryos. *PloS One*, 12(3), e0174535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174535>
- Qu, P., Zhao, Y., Wang, R., Zhang, Y., Li, L., Fan, J., & Liu, E. (2019). Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth rates after embryo transfer in mice. *Reproduction, fertility, and development*, 31(2), 324–332. <https://doi.org/10.1071/RD18203>
- Raposo, G., y Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., de la Fuente, J., Boland, M. P., y Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, 68, 236–243.
- Rizos, Dimitrios, Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., y Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>
- Roberts, R. M., Ezashi, T., Rosenfeld, C. S., Ealy, A. D., y Kubisch, H. M. (2003). Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 61, 239–251.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., y Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

- Rødgaard, T., Heegaard, P. M. H., y Callesen, H. (2015). Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. En *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 31, Número 5, pp. 585–592). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.003>
- Rodríguez-Alvarez, L., Cox, J., Tovar, H., Einspanier, R., y Castro, F. O. (2010). Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and in vitro produced embryos. *Zygote*, 18(3), 269–279. <https://doi.org/10.1017/S0967199409990323>
- Rodríguez-Alvarez, L., Manriquez, J., Velasquez, A., y 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 and Developmental Biology - Animal*, 49(9), 657–667. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9650-0>
- Rosenbluth, E. M., Shelton, D. N., Wells, L. M., Sparks, A. E. T., y 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>
- Rubio Pomar, F. J., Teerds, K. J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar, B., y Roelen, B. A. J. (2005). Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: A comparative study. *Theriogenology*, 63(8), 2254–2268. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.015>
- Rupaimoole, R., y Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. En *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 16, Número 3, pp. 203–222). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Saadeldin, I. M., Kim, S. J., Choi, Y. Bin, y Lee, B. C. (2014). Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: A possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cellular Reprogramming*, 16(3), 223–234. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0003>
- Sathanawongs, A., Nganvongpanit, K., Mekchay, S. (2012). Expression patterns of cell adhesion molecules in bovine preimplantation embryos cultured in vitro. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 42, 455–461.
- Schultz, R. M., y Kopf, G. S. (1995). Molecular basis of mammalian egg activation. *Current topics in Developmental biology*, 30, 21–62.
- Shirayoshi, Y., Okada, T. S., y Takeichi, M. (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell*, 35(3 Pt 2), 631–638. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90095-8)
- Silva, T., Santos, E. C., Annes, K., Soares, C. A., Leite, R. F., Lima, C. B., & Milazzotto, M. P. (2016). Morphokinetic-related response to stress in individually cultured bovine embryos. *Theriogenology*, 86(5), 1308–1317. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.072>
- Sirard M. A. (2010). Activation of the embryonic genome. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 67, 145–158.

- Sirohi, V. K., Gupta, K., Kumar, R., Shukla, V., y Dwivedi, A. (2018). Selective estrogen receptor modulator ormeloxifene suppresses embryo implantation via inducing miR-140 and targeting insulin-like growth factor 1 receptor in rat uterus. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 178, 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.006>
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., y Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. En *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 19, Número 1, pp. 65–78). *Reprod Fertil Dev*. <https://doi.org/10.1071/RD06102>
- Stephenson, R. O., Yamanaka, Y., y Rossant, J. (2010). Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development* (Cambridge, England), 137(20), 3383–3391. <https://doi.org/10.1242/dev.050195>
- Stojkovic, M., Büttner, M., Zakhartchenko, V., Riedl, J., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., Brem, G., y Wolf, E. (1999). Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: Comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Animal Reproduction Science*, 55(3–4), 151–162. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00015-9)
- Stopka, T., y Skoultchi, A. I. (2003). The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14097–14102. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336105100>
- Stranska, R., Gysbrechts, L., Wouters, J., Vermeersch, P., Bloch, K., Dierickx, D., Andrei, G., y Snoeck, R. (2018). Comparison of membrane affinity-based method with size-exclusion chromatography for isolation of exosome-like vesicles from human plasma. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1374-6>
- Strickland, S., Reich, E., y Sherman, M. I. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell*, 9(2), 231–240. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90114-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90114-8)
- Stringfellow, D. A., y Seidel, S. M. (1998). *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures*. International Embryo Transfer Society.
- Stroband, H. W., y Van der Lende, T. (1990). Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 40, 261–277.
- Suárez, H., Gámez-Valero, A., Reyes, R., López-Martín, S., Rodríguez, M. J., Carrascosa, J. L., Cabañas, C., Borràs, F. E., y Yáñez-Mó, M. (2017). A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of Extracellular Vesicles. *Scientific reports*, 7(1), 11271. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11249-2>
- Sugimoto, M., Sasaki, S., Gotoh, Y., Nakamura, Y., Aoyagi, Y., Kawahara, T., y Sugimoto, Y. (2013). Genetic variants related to gap junctions and hormone secretion influence conception rates in cows. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19495–19500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309307110>

- Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somfai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, E., Konishi, K., & Imai, K. (2012). Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PloS one*, 7(5), e36627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036627>
- Sun, J., Deng, G., Ruan, X., Chen, S., Liao, H., Liu, X., Li, J., Zhao, G., y Gao, J. (2020). Exosomal MicroRNAs in Serum as Potential Biomarkers for Ectopic Pregnancy. *BioMed research international*, 2020, 3521859. <https://doi.org/10.1155/2020/3521859>
- Tadros, W., y Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: A play in two acts. *Development*, 136(18), 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>
- Taqi, M. O., Saeed-Zidane, M., Gebremedhn, S., Salilew-Wondim, D., Khdrawy, O., Rings, F., Neuhoff, C., Hoelker, M., Schellander, K., y Tesfaye, D. (2019). Sexual dimorphic expression and release of transcription factors in bovine embryos exposed to oxidative stress. *Molecular Reproduction and Development*, 86(12), 2005–2019. <https://doi.org/10.1002/mrd.23272>
- Taylor, D., y Tachataki, M. (2002). Biopsy and Preimplantation Diagnosis of Human Embryos. En Ann Van Soom y M. Boerjan (Eds.), *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and non-invasive techniques* (pp. 157–177). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0343-8_7
- Telford, N. A., Watson, A. J., y Schultz, G. A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. En *Molecular Reproduction and Development* (Vol. 26, Número 1, pp. 90–100). <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260113>
- Tervit, H. R., Whittingham, D. G., y Rowson, L. E. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of reproduction and fertility*, 30(3), 493–497. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0300493>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., y Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), 3.22.1-3.22.29. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Ostrowski, M., y Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Número 8, pp. 581–593). <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thomassen, J. R., Willam, A., Egger-Danner, C., y Sørensen, A. C. (2016). Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1331–1340. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9437>

Thornhill, A. R., deDie-Smulders, C. E., Geraedts, J. P., Harper, J. C., Harton, G. L., Lavery, S. A., Moutou, C., Robinson, M. D., Schmutzler, A. G., Scriven, P. N., Sermon, K. D., y Wilton, L. (2005). ESHRE PGD Consortium “Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)”. *Human Reproduction* (Oxford, England), 20(1), 35–48. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh579>

Torres-Padilla, M. E., y Zernicka-Goetz, M. (2006). Role of TIF1alpha as a modulator of embryonic transcription in the mouse zygote. *The Journal of cell biology*, 174(3), 329–338. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603146>

Tšuiiko, O., Catteeuw, M., Esteki, M. Z., Destouni, A., Pascottini, O. B., Besenfelder, U., Havlicek, V., Smits, K., Kurg, A., Salumets, A., D’Hooghe, T., Voet, T., Van Soom, A., y Vermeesch, J. R. (2017). Genome stability of bovine in vivoconceived cleavage-stage embryos is higher compared to in vitro-produced embryos. *Human Reproduction*, 32(11), 2348–2357. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex286>

Turner, K. J., Silvestri, G., Black, D. H., Dobson, G., Smith, C., Handyside, A. H., Sinclair, K. D., y Griffin, D. K. (2019). Karyomapping for simultaneous genomic evaluation and aneuploidy screening of preimplantation bovine embryos: The first live-born calves. *Theriogenology*, 125, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.014>

Ushijima, H., Akiyama, K., y Tajima, T. (2008). Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: In vivo collected and in vitro produced embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 54(4), 239–243. <https://doi.org/10.1262/jrd.19128>

Vajta, G., Callensen, H., Boe-Hansen, G.; Hall, V., Hyttel, P. (2010). Assisted Reproduction Technologies. En K. Betteridge (Ed.), *Essentials of domestic animal embryology* (p. 455). Saunders Elsevier.

Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., y Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 676–705. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>

Van Deun, J., Mestdagh, P., Agostinis, P., Akay, Ö., Anand, S., Anckaert, J., Martinez, Z. A., Baetens, T., Beghein, E., Bertier, L., Berx, G., Boere, J., Boukouris, S., Bremer, M., Buschmann, D., Byrd, J. B., Casert, C., Cheng, L., Cmoch, A., ... Hendrix, A. (2017). EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nature Methods*, 14(3), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4185>

Van Niel, G., D’Angelo, G., y Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

Van Soom, A, Boerjan, M. L., Bols, P. E., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M., y de Kruif, A. (1997). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biology of Reproduction*, 57(5), 1041–1049. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.1041>

Van Soom, A, Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A. R., Deluyker, H., y de Kruif, A. (1992). Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination

to first cleavage. *Theriogenology*, 38(5), 905–919. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(92\)90165-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(92)90165-n)

Van Soom, A., Ysebaert, M. T., y de Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 47(1), 47–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199705\)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q)

Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D. G. D., de Kruif, A., y Van Soom, A. (2007). Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced embryos of different developmental capacity. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(4), 709–718. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0109>

Vander Heiden, M. G., y Thompson, C. B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biology*, 1(8), E209–E216. <https://doi.org/10.1038/70237>

Vejlsted, M., Avery, B., Schmidt, M., Greve, T., Alexopoulos, N., y Maddox-Hyttel, P. (2005). Ultrastructural and Immunohistochemical Characterization of the Bovine Epiblast1. *Biology of Reproduction*, 72(3), 678–686. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.034348>

Velasquez, A. E., Castro, F. O., Veraguas, D., Cox, J. F., Lara, E., Briones, M., y Rodríguez-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>

Vergauwen, G., Dhondt, B., Van Deun, J., De Smedt, E., Berx, G., Timmerman, E., Gevaert, K., Miinalainen, I., Cocquyt, V., Braems, G., Van den Broecke, R., Denys, H., De Wever, O., y Hendrix, A. (2017). Confounding factors of ultrafiltration and protein analysis in extracellular vesicle research. *Scientific Reports*, 7(1), 2704. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02599-y>

Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martínez, S., Marcilla, A., y Simón, C. (2015). Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development (Cambridge, England)*, 142(18), 3210–3221. <https://doi.org/10.1242/dev.124289>

Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M., y Kopf, G. S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. En *Journal of Andrology* (Vol. 19, Número 2, pp. 242–248). <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb01994.x>

Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., y Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W460–W466. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>

Wales, R. G., y Cuneo, C. L. (1989). Morphology and chemical analysis of the sheep conceptus from the 13th to the 19th day of pregnancy. *Reproduction, Fertility, and Development*, 1(1), 31–39. <https://doi.org/10.1071/rd9890031>

- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., y Belloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*, 39(3), 380–385. <https://doi.org/10.1038/ng1969>
- Wang, X., Tian, F., Chen, C., Feng, Y., Sheng, X., Guo, Y., y Ni, H. (2019). Exosome-derived uterine microRNAs isolated from cows with endometritis impede blastocyst development. *Reproductive biology*, 19(2), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.06.003>
- Ward, F., Rizos, D., Corridan, D., Quinn, K., Boland, M., y Lonergan, P. (2001). Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development*, 60(1), 47–55. <https://doi.org/10.1002/mrd.1060>
- Wassarman, P. (1987). Early events in mammalian fertilization. *Annual Review of Cell Biology*, 3, 109–142.
- Wiley, L. M. (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. *Developmental Biology*, 105(2), 330–342. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90290-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90290-2)
- Wilson, B. G., y Roberts, C. W. (2011). SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 11(7), 481–492. <https://doi.org/10.1038/nrc3068>
- Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötval, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., y Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., y Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*, 68(SUPPL. 1), S77–S83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.028>
- Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R., y Niemann, H. (2001). Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biology of Reproduction*, 65(1), 309–317. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.309>
- Wrenzycki, Christine. (2018). Gene expression analysis and in vitro production procedures for bovine preimplantation embryos: Past highlights, present concepts and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 14–19. <https://doi.org/10.1111/rda.13260>
- Wright, R. W., y Ellington, J. (1995). Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology*, 44, 1167–1189. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00327-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00327-5)
- Xiang, J., Xing, Y., Long, C., Hou, D., Liu, F., Zhang, Y., Lu, Z., Wang, J., Zuo, Y., y Li, X. (2020). Fatty acid metabolism as an indicator for the maternal-to-zygotic transition in porcine IVF embryos revealed by RNA sequencing. *Theriogenology*, 151, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.015>

- Xie, Y., Liu, G., Zang, X., Hu, Q., Zhou, C., Li, Y., Liu, D., y Hong, L. (2021). Differential Expression Pattern of Goat Uterine Fluids Extracellular Vesicles miRNAs during Peri-Implantation. *Cells*, 10(9), 2308. <https://doi.org/10.3390/cells10092308>
- Xie, Y., Wu, C., Chen, W., Wu, Z., Cai, G., y Hong, L. (2023). Extracellular vesicles-encapsulated microRNA in mammalian reproduction: A review. *Theriogenology*, 196, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.022>
- Yang, Q., Gu, W. W., Gu, Y., Yan, N. N., Mao, Y. Y., Zhen, X. X., Wang, J. M., Yang, J., Shi, H. J., Zhang, X., y Wang, J. (2018). Association of the peripheral blood levels of circulating microRNAs with both recurrent miscarriage and the outcomes of embryo transfer in an in vitro fertilization process. *Journal of translational medicine*, 16(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1556-x>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang, M. Y., y Rajamahendran, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 159–169. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00186-5)
- Yamada, N. O., Heishima, K., Akao, Y., y Senda, T. (2019). Extracellular Vesicles Containing MicroRNA-92a-3p Facilitate Partial Endothelial-Mesenchymal Transition and Angiogenesis in Endothelial Cells. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4406. <https://doi.org/10.3390/ijms20184406>
- Yu, G., Ma, S., Zhu, Y., Liu, Y., Zhang, H., Wu, K., & Hao, A. (2020). Application of improved single blastomere fixation technique in preimplantation genetic diagnosis. *Cytotechnology*, 72(2), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00371-1>
- Zeng, F., Baldwin, D. A., y Schultz, R. M. (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Developmental Biology*, 272(2), 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.018>
- Zolini, A. M., Block, J., Rabaglino, M. B., Rincon, G., Hoelker, M., Bromfield, J. J., Salilew-Wondim, D., y Hansen, P. J. (2020). Genes associated with survival of female bovine blastocysts produced in vivo. *Cell and Tissue Research*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03257->

IX. ANEXOS

Anexo 1

Efecto del medio de cultivo depletado de EVs sobre el desarrollo embrionario

Además de las actividades asociadas a los objetivos de este trabajo, se realizó un experimento preliminar con el objetivo de estandarizar las condiciones para el cultivo individual y en medio depletado de vesículas extracelulares de embriones bovinos (Melo-Baez et al., 2021)*. Se demostró que la remoción de nanopartículas del medio de cultivo no afectó la tasa de blastulación al día 7 ni al día 8 de desarrollo (post-IVF) de embriones bovinos producidos *in vitro*, tampoco el número total de células embrionarias, ni el diámetro del blastocisto resultante. Sin embargo, el número de blastocistos de calidad 1 según los parámetros de evaluación de la IETS, fue significativamente mayor en embriones cultivados en medio de cultivo no depletado de nanopartículas (GTd), pero menos avanzados en desarrollo al día 8 que los embriones cultivados en medio de cultivo GTd ($p=0,03$) (Figura anexo-1.1).

Por otra parte, el cultivo en GTd afectó la expresión génica en los blastocistos producidos. La expresión de SOX2, fue significativamente mayor en blastocistos cultivados en medio, GTd mientras que la expresión de NANOG fue menor en aquellos embriones. No hubo diferencia entre los grupos para el resto de los genes analizados (POU5F1, CDX2, GATA6, TP1, BCL2L1, BAX; Figura anexo-1.2).

* 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), e20200028. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0028>

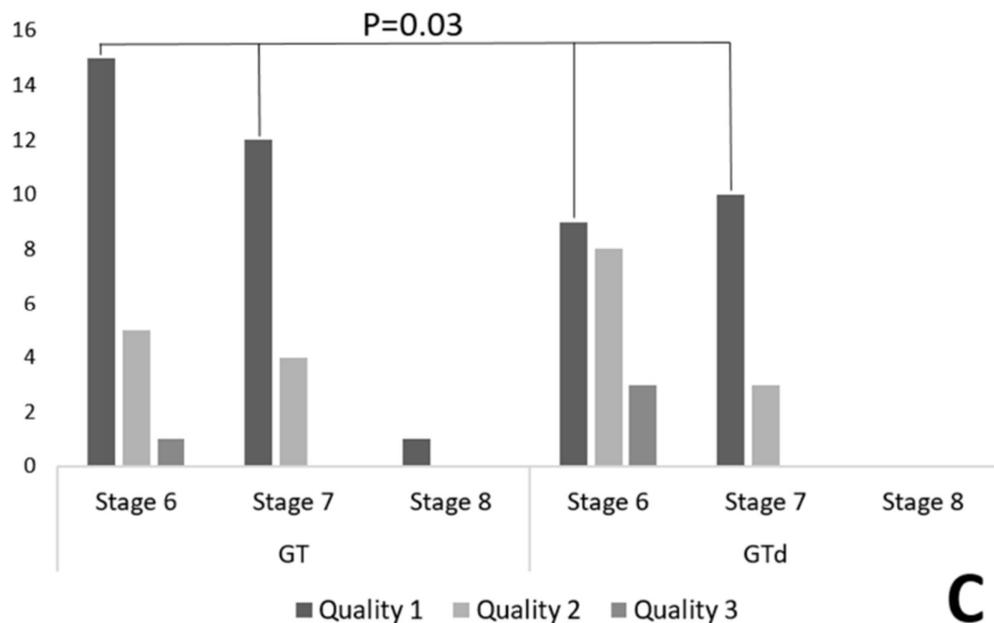
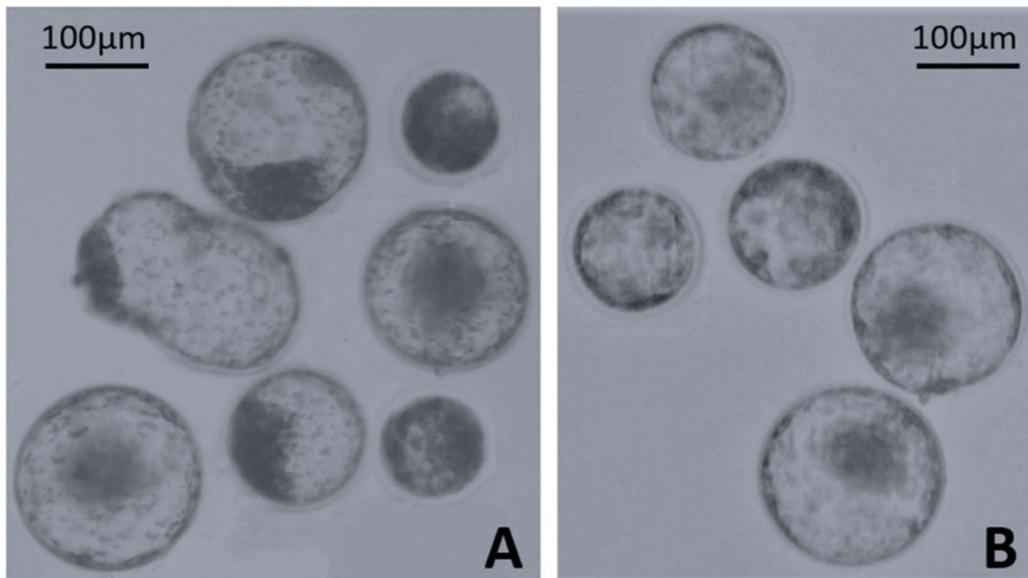


Figura anexo-1.1: Clasificación morfológica en blastocistos al día 8 post-IVF. Imagen representativa de blastocistos al día 8 post-IVF derivados de embriones producidos *in vitro* en medio no depletado de EVs (A) y en medio depletado de EVs (B); Número de embriones en cada categoría considerando estadio y calidad embrionaria acorde al manual de la IETS.

* 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), e20200028. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0028>

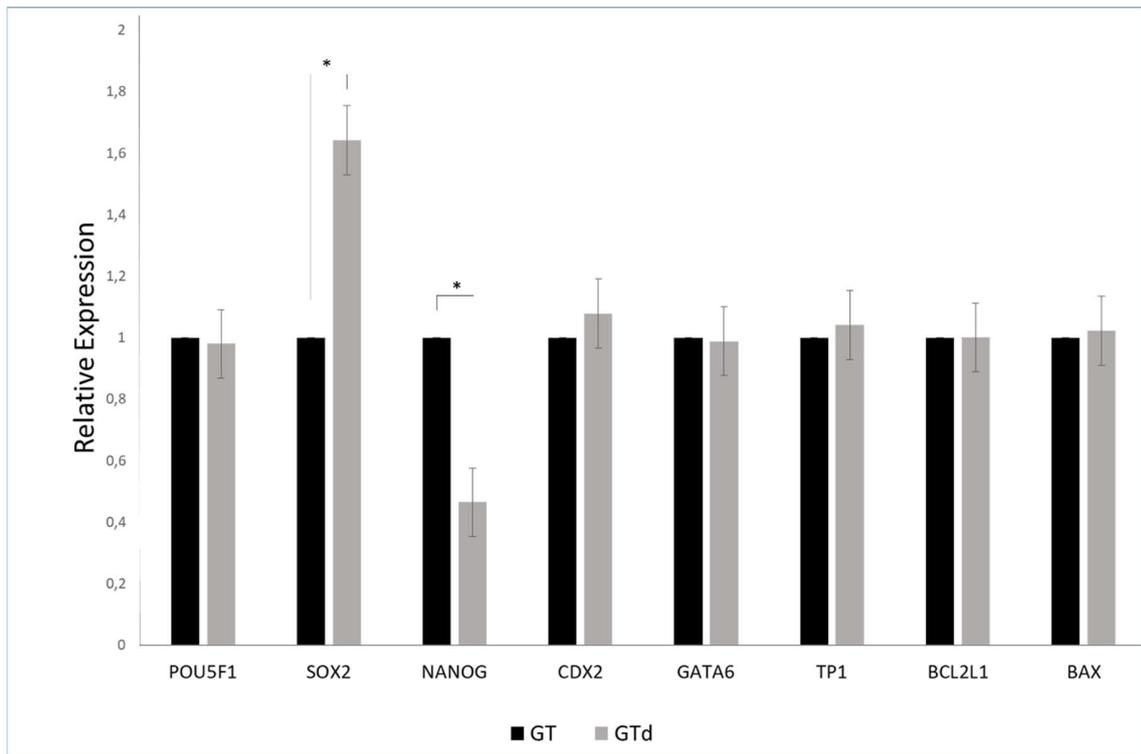


Figura anexo-1.2: Expresión génica en blastocistos derivados de embriones producidos en medio depletado de EVs (GTd) y no depletado de EVs (GT). El nivel de expresión de cada gen fue normalizado con la expresión de ACTB. *Indica diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$).

Este experimento permitió concluir que las vesículas extracelulares presentes en el medio de cultivo, ya sea aportadas por las fuentes de proteínas como el suero fetal bovino o la BSA son posiblemente internalizadas por los embriones bovinos cultivados in vitro. De esta forma, las EVs, específicamente su contenido molecular afecta el desarrollo embrionario. No obstante, en este caso, si bien hubo cambio en algunos parámetros de calidad embrionaria el sistema de cultivo aun permite producir blastocistos de calidad permitiendo la validación de este sistema de cultivo para el análisis de EVs embrionarias.

* 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), e20200028. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0028>

Anexo 2

Efecto de la zona pelúcida sobre la secreción de EVs por parte de embriones bovinos producidos *in vitro*

Una de las primeras interrogantes al inicio de este trabajo fue el posible papel de la zona pelúcida en la liberación de las EVs embrionarias al medio de cultivo. Con el objetivo responderlo, inicialmente se caracterizaron las nanopartículas presentes en el medio condicionado por embriones cultivados con y sin zona pelúcida. No se encontró diferencia significativa en concentración y tamaño de las EVs secretadas por ambos grupos experimentales ($p>0,05$), indicando que la presencia de zona pelúcida no inhibe la secreción de EVs hacia el medio de cultivo en embriones cultivados *in vitro* hasta el día 8 post-IVF (Figura anexo-2.1).

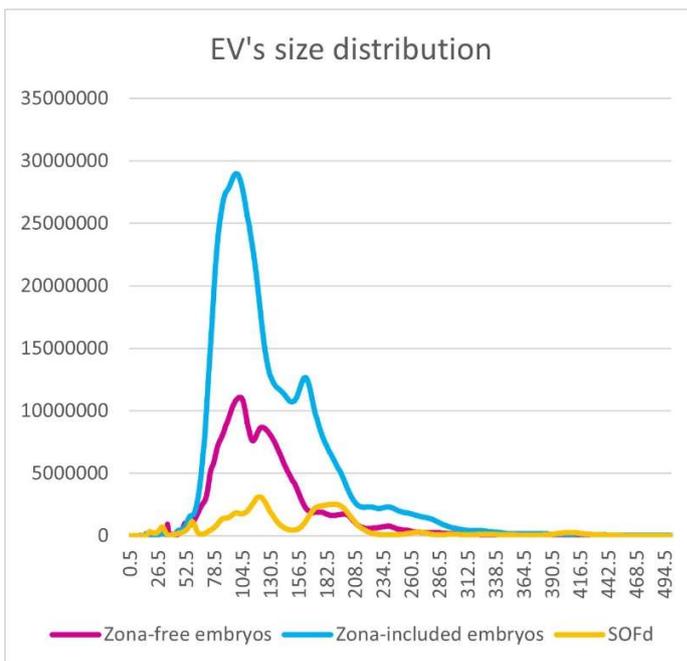
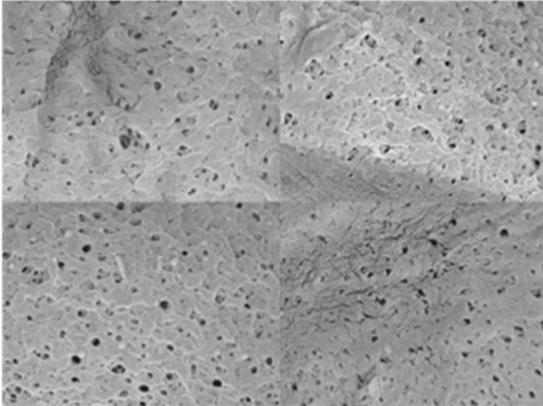


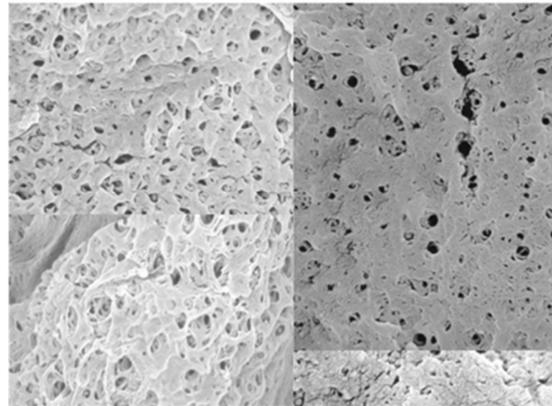
Figura anexo-2.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas de EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro*. Distribución del tamaño de EVs secretadas por embriones competentes cultivados sin zona pelúcida (zona-free embryos) y con zona pelúcida (zona-included embryos) durante el periodo pre-implantatorio.

Adicionalmente se evaluó el efecto de la ventana de desarrollo sobre las características (morfología) de la zona pelúcida y las características de las poblaciones de vesículas liberadas por los embriones producidos in vitro. Para esto se consideraron 4 ventanas de desarrollo: W1- desde el día 0 hasta el día 3.5 de desarrollo, coincidente con la activación del genoma embrionario; W2- día 3.5 hasta día 5 de desarrollo, etapa de compactación embrionaria; W3- día 5 hasta día 7 de desarrollo, etapa de blastulación y W4- día 7 hasta día 9, etapa de protrusión. En este experimento se evidenció mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), un cambio en la estructura de la zona pelúcida durante el período temprano de desarrollo (Figura anexo-3.2). A medida que avanza el desarrollo se observa que la zona pelúcida adquiere un aspecto menos uniforme con mayor definición de los poros (Figura anexo-3.2- W3 y W4). Este cambio en la zona podría estar relacionado con los cambios que se observan en las poblaciones de vesículas. A partir de la ventana W2 y a medida que avanza el desarrollo embrionario aumenta la concentración y tamaño de las vesículas identificadas (Figura anexo-2.3 A y B).

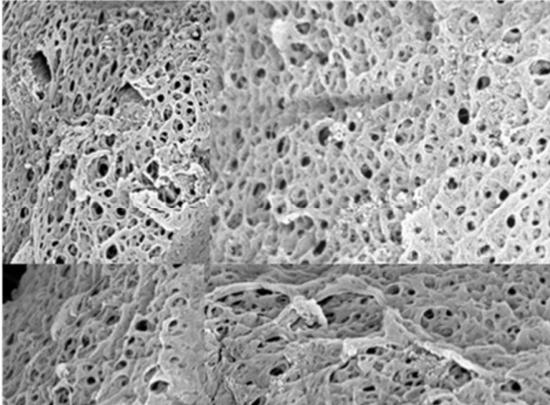
ZP embriones 2-células



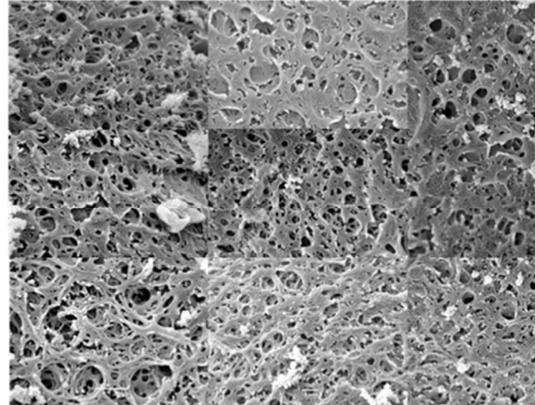
ZP embriones 8-células



ZP mórulas



ZP blastocistos



10 μ m

Figura anexo-2.2: Imágenes representativas mediante SEM de la zona pelúcida (ZP) de embriones bovinos producidos *in vitro* en diferentes estadios del desarrollo.

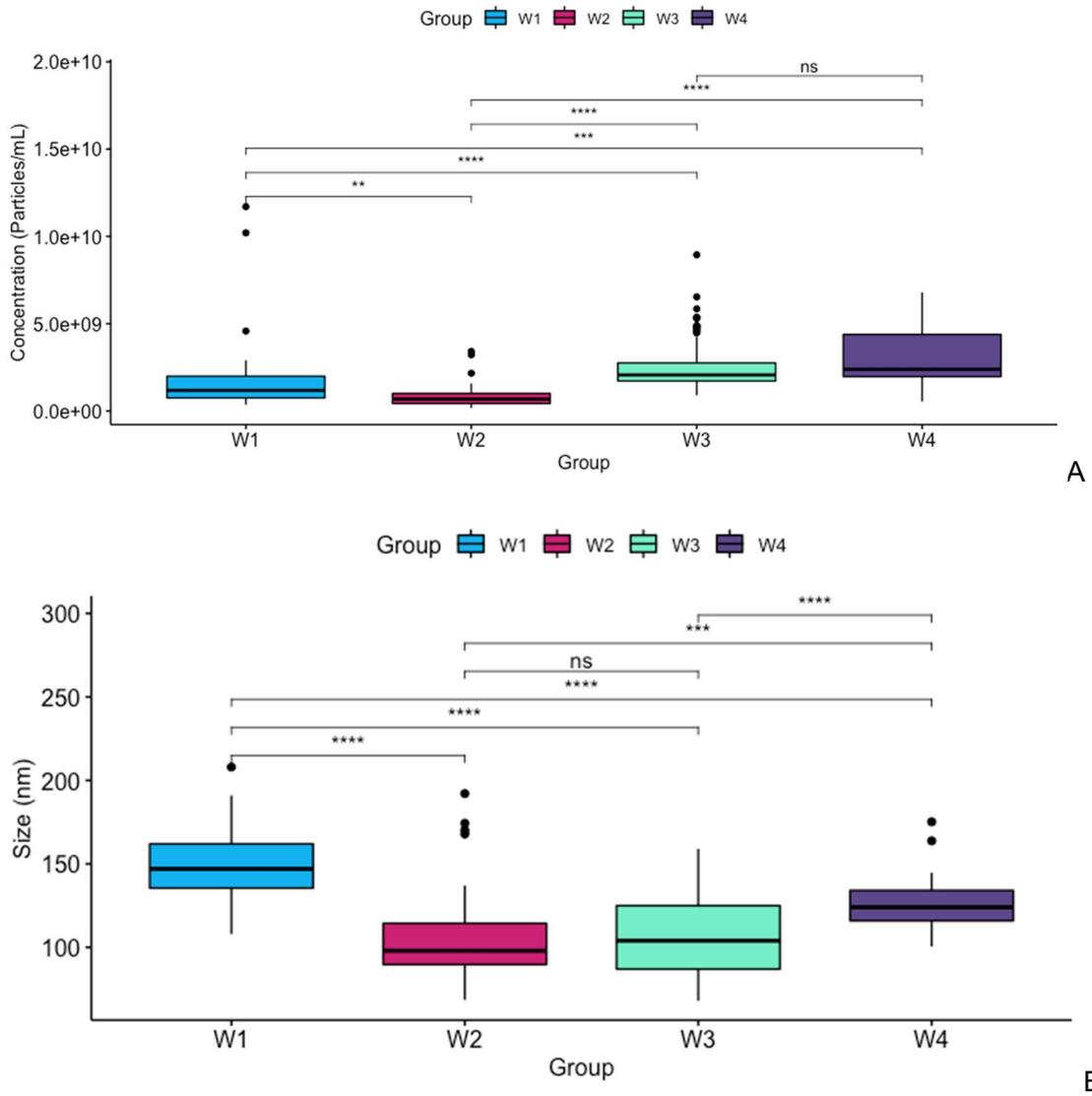


Figura anexo-2.2: Análisis de seguimiento de nanopartículas de EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro*. Comparación de la concentración (A) y tamaño (B) de EVs secretadas por embriones competentes durante diferentes estadios del desarrollo: W1- desde el día 0 hasta el día 3.5 de desarrollo; W2- día 3.5 hasta día 5 de desarrollo; W3- día 5 hasta día 7 de desarrollo, y W4- día 7 hasta día 9. *Indica diferencia significativa entre grupos ($p < 0.05$)

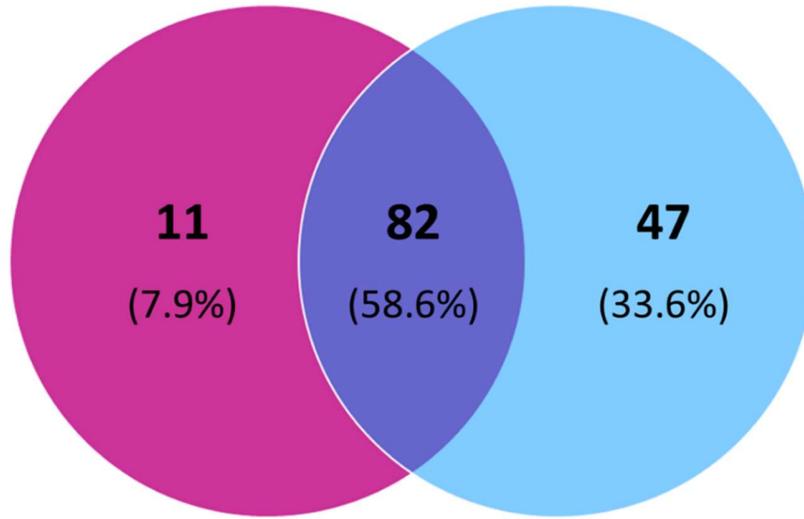
Anexo 3

Efecto de la ventana de desarrollo sobre el contenido de microRNAs en las EVs liberadas por embriones bovinos

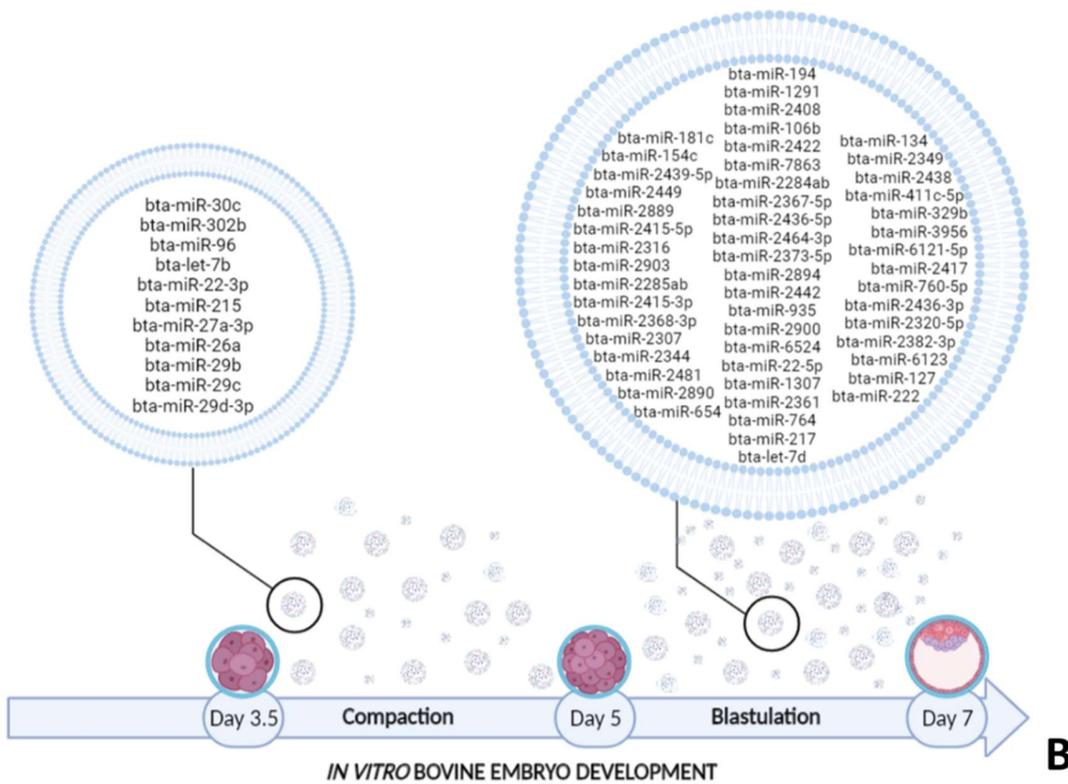
Se planteó que el cargo de miRNAs en las EVs secretadas por embriones bovinos varía debido a los constantes cambios en la expresión génica que tienen lugar durante el desarrollo embrionario pre-implantatorio. Se realizó un estudio** donde se comparó el cargo de miRNAs en las EVs secretadas hacia el medio de cultivo durante dos ventanas de desarrollo: compactación desde día 3 a día 5 post-IVF, y blastulación desde día 5 a 7 post-IVF en embriones bovinos competentes. Se detectaron 140 miRNAs, donde sólo 11 se encontraron únicamente durante la compactación, 47 durante la blastulación, y 82 en común (figura anexo-3.1 A y B).

** Melo-Báez, B., Mellisho, E. A., Wong, Y. S., Cabezas, J., Caamaño, D., Aguilera, C., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodríguez-Alvarez, L. (2023). Bovine embryos release extracellular vesicles with differential miRNA signature during the compaction and blastulation stages. *Reproductive biology*, 23(1), 100725. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100725>

COMPACTION **BLASTULATION**



A



** Melo-Báez, B., Mellisho, E. A., Wong, Y. S., Cabezas, J., Caamaño, D., Aguilera, C., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodríguez-Alvarez, L. (2023). Bovine embryos release extracellular vesicles with differential miRNA signature during the compaction and blastulation stages. *Reproductive biology*, 23(1), 100725. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100725>

Figura anexo-3.1: Diagrama de Venn de miRNAs detectados en EVs secretadas por embriones bovinos durante la compactación y blastulación (A). Representación de miRNAs detectados únicamente en EVs secretadas durante la compactación o blastulación (B).

Este estudio indica el dinamismo que existe en el patrón de secreción de EVs durante el desarrollo de embriones bovinos pre-implantatorios, probablemente como una respuesta ante las necesidades del embrión para mantener la homeostasis e interactuar con el ambiente materno. El número de miRNAs incrementa desde el estadio de mórula a blastocisto, en concordancia con el aumento en el número de células y la regulación en la expresión génica que toma lugar durante este periodo.

Anexo 4

Lista de genes relacionados con miRNAs diferencialmente expresados en EVs secretadas por embriones bovinos producidos *in vitro* durante la etapa de compactación

Las rutas con mayor significancia ($p < 0,01$) fueron: “biosíntesis y metabolismo de ácidos grasos”, “proteoglicanos en cáncer”, “degradación de lisina”, “gap junction” y “vías de señalización reguladoras de células madre”.

KEGG pathway	p-value	N° genes	miRNAs
Biosíntesis de ácidos grasos	0.00000542	FASN ACSL3 ACSL4 ACSL1	miR-103
Metabolismo de ácidos grasos	0.000169625560448	FASN ACADSB ACSL3 ACOX1 HADH HADHA CPT2 ACADVL SCD ACSL4 ACSL1 HSD17B12 ECHS1 ACAT1	miR-103
Proteoglicanos en cancer	0.000169625560448	BRAF ACTB PRKCA STAT3 MET	miR-100 miR-103 miR-502a

		FLNC NRAS PIK3CB PIK3R2 PIK3R5 PPP1CC MAPK14 ACTG1 PXN FZD6 IQGAP1 IGF1R TGFB1 ITGB5 ARHGEF1 TP53 AKT2 ITGAV SLC9A1 PPP1R12A CCND1 GPC1 CTNNB1 HIF1A MYC MMP9 IGF2 FLNB PRKACA ITGA2 ITPR1 FZD2 PIK3CG PRKX PLAUR FGF2 CDC42 WNT3A HOXD10 FN1 CDKN1A VMP1 ITPR3 MAPK1 CD63 MDM2 PRKACB PPP1CB	
Degradación de lisina	0.000897714671327	SETD7 SETD1B PLOD3	miR-100 miR-103 miR-502a

		HADH NSD1 ASH1L HADHA OGDH PHYKPL KMT2D KMT2A ECHS1 ACAT1 KMT2E PLOD1 SETD1A COLGALT1 ALDH2 EHMT1	
Gap junction	0.000897714671327	SOS2 EGFR PLCB3 PRKG2 TUBB2B GNAI2 ITPR3 GNAI1 GNA11 GRB2	mir-1 miR-100
Vías de señalización de reguladores de células madre	0.00461216313908	JARID2 GSK3B STAT3 KAT6A NRAS PIK3CB REST ACVR1B PIK3R2 PIK3R5 MAPK14 FZD6 IGF1R ZFHX3 ACVR2B AKT2 PCGF5 RIF1 SMAD4 CTNNB1 AXIN2 MYC SMAD5 FZD2 PIK3CG	miR-100 miR-103 miR-502a

		FGF2 WNT3A IL6ST MAPK1 PCGF3 KLF4 BMPR2 PCGF2	
--	--	--	--