



**UNIVERSIDAD
DE LA FRONTERA**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MEDIOAMBIENTE**



**EFFECTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PEQUEÑAS (sEVs) AISLADAS DE UNA
LÍNEA CELULAR ENDOMETRIAL SOBRE LA MODULACIÓN DEL DESARROLLO Y
CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PREIMPLANTACIONALES**

Tesis presentada a la Dirección Académica de Postgrado de la
Universidad de La Frontera para obtener el Grado Doctor en
Ciencias mención Biología Celular y Molecular Aplicada.

LIC. ERWIN MUÑOZ ACUÑA

PROFESORA GUÍA: DRA. MARÍA ELENA ARIAS CEA

**TEMUCO – CHILE
2024**



UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CS. AGROPECUARIAS Y FORESTALES

Informe de Aprobación
Tesis de Doctor

Se informa a la Dirección Académica de Postgrado de la Universidad de La Frontera que la Tesis de Doctor presentada por el candidato:

Lic. Erwin Muñoz Acuña

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias mención Biología Celular y Molecular Aplicada, en el examen de defensa de tesis rendido el 03 de abril de 2024.

Guía Tesis

Dra. María Elena Arias Cea (Chile)

Evaluador Interno

Dra. Pamela Leal Rojas (Chile)

Evaluador Externo

Dr. Marc Yeste Oliveras (España)

Evaluador Externo

Dr. Dimitrios Rizos (España)



COMISIÓN EXAMINADORA

PROFESOR GUÍA

: Dra. María Elena Arias Cea

Profesor Asociado

Departamento de Producción Animal

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Medioambiente

Universidad de La Frontera

EVALUADOR INTERNO : Dra. Pamela Leal Rojas

Profesor Asociado

Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Medioambiente

Universidad de La Frontera

EVALUADOR EXTERNO : Dr. Marc Yeste Oliveras

Profesor Titular (Professor Agregat)

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad de Girona

EVALUADOR EXTERNO : Dr. Dimitrios Rizos

Investigador Titular

Departamento de Reproducción Animal

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
(INIA)

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Reproducción del Centro de Excelencia en Biotecnología de la Reproducción de la Universidad de la Frontera (CEBIOR-UFRO) y en el Laboratorio TechnoSperm del Instituto de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad de Girona, y contó con el financiamiento de:

- 1- Beca de Doctorado Nacional ANID (Anteriormente CONICYT) N° 21191434, con la adjudicación de sus beneficios complementarios de Gastos Operacionales y Extensión para Redacción de Tesis Doctoral, ANID, Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación, Chile.
- 2- Beca de Internacionalización de Pasantías en el Extranjero para estudiantes de Doctorado en el marco del Proyecto N° FRO1999, Ministerio de Educación, Chile.
- 3- Proyecto DI-UFRO N° DI20-0062, Universidad de la Frontera, Chile.
- 4- Proyecto FONDECYT Regular N° 1181453, ANID, Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación, Chile.
- 5- Proyecto FONDECYT Regular N° 1201166, ANID, Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación, Chile.
- 6- Proyecto N° PID2020-113320, Ministerio de Ciencia e Innovación, España.

AGRADECIMIENTOS

En el presente hoja dejo constancia de mis pensamientos de gratitud hacia todas las circunstancias, momentos, personas, errores y victorias que terminaron por llevarme a este desenlace. A veces se habla de que todos nacemos con un destino, pero ¿Qué es el destino? ¿Es acaso la incapacidad de todas las partículas formadas hace 13.800 millones de años en el Big Bang de poder escapar a sus lineamientos? Si nosotros estamos formados de esas mismas partículas, ¿Es en realidad un mérito cada uno de nuestros logros? o es solo el resultado inevitable de una bola en una jugada de pool extremadamente compleja, en la cual sus movimientos fueron dictaminados en el momento en que fue golpeada por la bola blanca? Aunque a día de hoy no existe evidencia científica de que nuestros pensamientos y acciones son separados del resto del cosmos y que por lo tanto puedan escapar ha dicho determinismo, me gusta pensar en que si tenemos libre albedrío, y que por lo tanto el destino no existe. Aunque estemos hechos de polvo de estrellas, nuestras propiedades emergentes son más que solo la suma del todo y nos permiten decidir. A veces, como si se tratara de una serie de TV, tendemos a agrupar nuestra vida por temporadas, y tal y como ocurre en la serie, los personajes pocas veces se acuerdan de eventos importantes en temporadas anteriores. En este sentido, destaco lo anterior, debido a que no me gustaría solo agradecer a todos los eventos y personas que acontecieron durante los últimos 5 años. El estar aquí escribiendo esto representa mucho más que eso, incluso mucho antes de mi vida, cada una de las decisiones, consientes o no, con intenciones directas o no, de cada ser vivo, llevó a que en este pequeño rincón del espacio y el tiempo, un conjunto de partículas, una idea con un nombre, pueda estar demostrándoles gratitud en este momento. Otra cosa que tendemos a pensar, es que nosotros como individuos somos algo definido, algo estático o sólido, un cuerpo y una mente, una persona delimitada. Pero durante las últimas décadas la ciencia nos ha enseñado que al parecer es mucho más complicado que eso, al parecer somos un concepto formado por nosotros mismos, el cual está influenciado por nuestro entorno. El sentido de la continuidad es una de las mayores ilusiones que tenemos, ya que a lo largo de nuestras cortas vidas, todos nuestros átomos y células son constantemente remplazados una y otra vez, y nuestra personalidad o sentido del ser es tan maleable que hasta un simple cambio en nuestro microbioma podría cambiar drásticamente nuestra opinión sobre un tema en particular o nuestro comportamiento en una determinada situación. Según lo anterior, nosotros solo existimos por periodos de tiempo extremadamente pequeños, y luego, sin darnos cuenta, al instante nos convertimos en algo extremadamente similar, pero no lo mismo. Esta ilusión de continuidad provoca que muchas veces sintamos grandeza, sintamos poder, por obtener distinciones y reconocimientos. Cuando pienso en eso, me gusta recordar la foto tomada por el Voyager 1 a más de 6.000 millones de kilómetros de nuestra Tierra. Esta foto fue bautizada con el nombre de “un punto azul pálido” y muestra nuestro mundo y a nosotros como lo que somos para el resto del cosmos, y eso es todo lo que es y lo que podemos ver, un pequeño punto azul a través de los anillos de Saturno, ni más ni menos. También me gusta mucho recordar las palabras dichas por el Cosmólogo Carl Sagan, dejaré un trozo más abajo, pero nos invita a reflexionar en lo pequeños y efímeros que son en realidad nuestras preocupaciones, logros, problemas y nosotros mismos. No obstante, aunque este momento sea un pequeño punto en la historia del tiempo y espacio, me siento agradecido de cada cosa, de cada momento, de mis maestros, de mis amigos, de mis seres amados, de mis amadas mascotas, de los que siguen en este momento del tiempo y de los que ya están en otros tiempos. Gracias a todos los que me enseñaron y ayudaron, ya sea de buena o mala manera, gracias a todos los que siguen caminos parecidos al mío y gracias a los que alguna vez caminaron conmigo. La ciencia aún no ha podido encontrarle un significado humano a la existencia, y es probable que aun falte mucho para eso, pero mientras estamos en la búsqueda de esos grandes misterios, tenemos que disfrutar nuestro pequeño gran momento, y apreciar lo más valioso que tenemos, el tiempo. Me siento agradecido y expreso mi total gratitud, de la manera más humilde posible, a todos los que contribuyeron en esta parte de mi vida, a mis padres Georgina Acuña y Erwin Muñoz, a mis hermanos, Juan, Elizabeth, Eva y Kasus Muñoz, a mis amigos John Quiñones y David Cancino, a mis suegros

Maria Zapata y Nivaldo Fuentes, a mis mentores los Dres. Maria Elena Arias, Ricardo Felmer y Marc Yeste, a mis evaluadores Pamela Leal y Dimitrios Rizos, a mi Director de Doctorado Luis Salazar, a todas mis queridas aves, y a mi compañera en la vastedad del cosmos, Fernanda Fuentes.



Figura 0: Un punto azul pálido. Mira ese punto. Eso es aquí. Eso es nuestro hogar. Eso somos nosotros. En él, todos los que amas, todos los que conoces, todos de los que alguna vez escuchaste, cada ser humano que ha existido, vivió su vida. La suma de todas nuestras alegrías y sufrimientos, miles de religiones seguras de sí mismas, ideologías y doctrinas económicas, cada cazador y recolector, cada héroe y cobarde, cada creador y destructor de civilizaciones, cada rey y campesino, cada joven pareja enamorada, cada madre y padre, niño esperanzado, inventor y explorador, cada maestro de la moral, cada político corrupto, cada “superestrella”, cada “líder supremo”, cada santo y pecador en la historia de nuestra especie, vivió ahí – en una mota de polvo suspendida en un rayo de sol – Carl Sagan. Foto tomada por la NASA en el año 1990 mediante la sonda espacial robótica Voyager 1.

PRODUCTIVIDAD CIENTIFICA

Indicar toda la productividad lograda durante el periodo que cursó el Programa de Doctorado (publicaciones, patentes, congresos, pasantías, etc.)

Pasantías:

Pasantía Internacional bajo la supervisión del Excmo. Sr. Dr. Marc Yeste Oliveras en el Centro de Investigación, Innovación y Transferencia TechnoSperm de la Universidad de Girona.

El Centro TechnoSperm se dedica al estudio de la biotecnología de la reproducción animal y se encuentra en el Parque Científico y Tecnológico de la Universidad de Girona, ubicada en la Ciudad de Girona, Cataluña, España. TechnoSperm pertenece, además, a la red TECNIO de la Generalitat de Catalunya.

Productividad asociada al Doctorado:

Artículos científicos:

1. **Muñoz, E.**, Fuentes, F., Felmer, R., Arias, M. E., & Yeste, M. (2024). Effects of Reactive Oxygen and Nitrogen Species on Male Fertility. *Antioxidants & Redox Signaling*, 1-35. (DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0163>)
2. **Muñoz, E.**, Castro, M., Aguila, L., Contreras, M. J., Fuentes, F., Arias, M. E., & Felmer, R. (2023). Standardization of a Sex-Sorting Protocol for Stallion Spermatozoa by Means of Absolute RT-qPCR. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 11947. (DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241511947>)
3. **Muñoz-Acuña, E.**, Huaiquimil-Sepulveda, V., Pérez-García, F., Fuentes-Zapata, F., Felmer, R., & Arias, M. E. (2023). Characterization and effect of endometriosomes on the development and quality of pre-implantation bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 36(2), 193-194. (DOI: <https://doi.org/10.1071/RDv36n2Ab84>)
4. **Muñoz, E.**, Fuentes, F., Felmer, R., Yeste, M., & Arias, M. E. (2022). Extracellular vesicles in mammalian reproduction: a review. *Zygote*, 1-24. (DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199422000090>)

Presentaciones en Congresos:

1. 2024– **Muñoz-Acuña, EL**, Huaiquimil-Sepulveda, VE, Pérez-García, FA, Fuentes-Zapata, FB, Felmer, RN, Arias, ME. EFFECT OF ENDOMETRIOSOMES ON MODULATION OF DEVELOPMENT AND QUALITY OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED BY IVF. Se Presentó (modalidad póster) en la L reunión anual de la International Embryo Technology Society (IETS), realizada en la Ciudad de Denver, Estado de Colorado, Estados Unidos.
2. 2023– **Erwin Muñoz, Valentina Huaiquimil**, Felipe Pérez, Fernanda Fuentes, Ricardo Felmer, María Elena Arias. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ENDOMETRIOSOMAS, Y POSTERIOR EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE EL DESARROLLO Y CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PREIMPLANTACIONALES PRODUCIDOS POR FECUNDACIÓN IN VITRO. Se Presentó (modalidad póster) en el II Congreso Anual de Salud de la Facultad de

- Medicina de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
3. 2023– **Erwin Muñoz**, Valentina Huaiquimil, Felipe Pérez, Fernanda Fuentes, Ricardo Felmer, María Elena Arias. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ENDOMETRIOSOMES, AND SUBSEQUENT EVALUATION OF THEIR EFFECT ON THE DEVELOPMENT AND QUALITY OF PREIMPLANTATION BOVINE EMBRYOS PRODUCED BY IN VITRO FERTILIZATION. Se Presentó (modalidad póster) en la XXXIV reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR-D-DOHaD), realizada en la Ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, Chile.
 4. 2023– **Erwin Muñoz**, Valentina Huaiquimil, Felipe Pérez, Fernanda Fuentes, Ricardo Felmer, María Elena Arias. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ENDOMETRIOSOMAS, Y POSTERIOR EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE EL DESARROLLO Y CALIDAD DE EMBRIONES BOVINOS PREIMPLANTACIONALES PRODUCIDOS POR FECUNDACIÓN IN VITRO. Se Presentó (modalidad póster) en el IV Congreso Anual de Estudiantes y Graduados de Postgrado de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
 5. 2022– **Erwin Muñoz**, Felipe Pérez, Fernanda Fuentes, Luis Águila, Ricardo Felmer, María Elena Arias. DERIVATION OF PURE PRIMARY CULTURES BY MICROMANIPULATION. Se Presentó (modalidad oral) en la XXXIII reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR-D), realizada en la Ciudad de Talca, Región del Maule, Chile.
 6. 2022– **Erwin Muñoz**, Felipe Pérez, Víctor Gallardo, Fernanda Fuentes, Ricardo Felmer, María Elena Arias. ISOLATION AND PURIFICATION OF ENDOMETRIOSOMES FROM PRIMARY CELL CULTURES. Se Presentó (modalidad oral) en la XXXIII reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR-D), realizada en la Ciudad de Talca, Región del Maule, Chile.
 7. 2022– **Erwin Muñoz**, Felipe Pérez, Víctor Gallardo, Fernanda Fuentes, Ricardo Felmer, María Elena Arias. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ENDOMETRIOSOMAS DESDE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS. Se Presentó (modalidad póster) en el III Congreso Anual de Estudiantes y Graduados de Postgrado de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
 8. 2022– **Erwin Muñoz**, Felipe Pérez, Fernanda Fuentes, Luis Águila, Ricardo Felmer, María Elena Arias. AISLAMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS PUROS MEDIANTE MICROMANIPULACIÓN. Se Presentó (modalidad póster) en el III Congreso Anual de Estudiantes y Graduados de Postgrado de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
 9. 2019– **Erwin Muñoz**, María Elena Arias, Ricardo Felmer. DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN qPCR PARA EVALUAR LA EFICIENCIA DEL SEXADO DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO. Presentado (modalidad póster) en la XXX reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR-D-Congreso Latino Americano Conjunto de Reproducción), realizado en la Ciudad de Santiago de Chile, Región Metropolitana, Chile.

Colaboraciones:

Artículos científicos:

1. Contreras, M. J., Arias, M. E., Fuentes, F., **Muñoz, E.**, Bernecic, N., Fair, S., & Felmer, R. (2023). Cellular and molecular consequences of stallion sperm cryopreservation: Recent

- approaches to improve sperm survival. *Journal of Equine Veterinary Science*, 104499. (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104499>)
2. Fuentes, F., **Muñoz, E.**, Contreras, M. J., Arias, M. E., & Felmer, R. (2022). Bovine ICSI: Limiting factors, strategies to improve its efficiency and alternative approaches. *Zygote*, 30(6), 749-767. (DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199422000296>)
 3. Quiñones, J., Díaz, R., Beltrán, J. F., Velazquez, L., Cancino, D., **Muñoz, E.**, Sepúlveda, N.,... & Farías, J. G. (2022). Analysis of Muscle Lipidome in Juvenile Rainbow Trout Fed Rapeseed Oil and Cochayuyo Meal. *Biomolecules*, 12(6), 805. (DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12060805>)
 4. Cancino-Baier, D., **Muñoz, E.**, Quiñones, J., Beltrán, J. F., Fuentes, F., Farías, J., ... & Sepúlveda, N. (2021). A non-synonymous single nucleotide polymorphism in FASN gene alters FASN enzyme activity in subcutaneous and intramuscular adipose tissue in Holstein Friesian steers. *Annals of Animal Science*, 21(1), 109-124. (DOI: <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0059>)
 5. Quiñones, J., Maggiolino, A., Bravo, S., **Muñoz, E.**, Lorenzo, J. M., Cancino, D., Díaz, R., Saenz, C., Sepúlveda, N., & De Palo, P. (2019). Effect of canola oil on meat quality and fatty acid profile of Araucano creole lambs during fattening period. *Animal Feed Science and Technology*, 248, 20-26. (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.12.002>)

Presentaciones en Congresos:

1. 2023– **Fuentes, F**, **Muñoz, E**, Arias ME, Águila L, Felmer R. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TASAS DE FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO ENTRE PIEZO-ICSI E ICSI CONVENCIONAL EN BOVINOS. Se Presentó (modalidad póster) en el II Congreso Anual de Salud de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
2. 2023–**Erwin Muñoz**, Valentina Huaiquimil, Felipe Pérez, Fernanda Fuentes, Ricardo Felmer, María Elena Arias. DISRUPCIÓN DEL GEN DE LA β -CASEÍNA EN LA LÍNEA CELULAR MAC-T A TRAVÉS DE CRISPR-Cas9. Se Presentó (modalidad póster) en el II Congreso Anual de Salud de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
3. 2023– **Fuentes, F**, **Muñoz, E**, Arias ME, Águila L, Felmer R. COMPARISON OF THE EFFECT OF PIEZOELECTRIC AND CONVENTIONAL MICROINJECTION ON BOVINE EMBRYO DEVELOPMENT AND QUALITY. Se Presentó (modalidad póster) en la XXXIV reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR-DHaD), realizada en la Ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, Chile.
4. 2023–Valentina Huaiquimil, **Erwin Muñoz**, Felipe Pérez, Fernanda Fuentes, Ricardo Felmer, María Elena Arias. DISRUPTION OF THE β -CASEIN GENE IN THE MAC-T CELL LINE MEDIATED BY CRISPR-Cas9. Se Presentó (modalidad póster) en la XXXIV reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR-DHaD), realizada en la Ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, Chile.
5. 2023– **Felipe Pérez García**, **Erwin Muñoz Acuña**, Ricardo Felmer Dörner, María Elena Arias Cea. SMALL EXTRACELLULAR VESICLES AS A PROMISING CANDIDATE FOR ENHANCING IN VITRO MATURATION OF BOVINE EMBRYOS. Se Presentó (modalidad póster) en la

- XXXIV reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR-D-DOHaD), realizada en la Ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, Chile.
6. 2023– Fuentes, F, **Muñoz, E**, Arias ME, Águila L, Felmer R. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TASAS DE FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO ENTRE PIEZO-ICSI E ICSI CONVENCIONAL EN BOVINOS. Se Presentó (modalidad póster) en el IV Congreso Anual de Estudiantes y Graduados de Postgrado de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
 7. 2023– Felipe Pérez García, **Erwin Muñoz Acuña**, Ricardo Felmer Dörner, María Elena Arias Cea. USO POTENCIAL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PEQUEÑAS DEL FLUIDO FOLICULAR PARA MEJORAR LA CALIDAD OVOCITARIA EN LA MADURACIÓN IN VITRO. Se Presentó (modalidad póster) en el IV Congreso Anual de Estudiantes y Graduados de Postgrado de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
 8. 2023– **MUÑOZ-ACUÑA, EL, HUAQUIMIL-SEPULVEDA, VE, FUENTES-ZAPATA, FB, ARIAS, ME, FELMER R.** DISRUPCIÓN DEL GEN DE LA β -CASEÍNA EN LA LÍNEA CELULAR MAC-T A TRAVÉS DE CRISPR-Cas9. Se Presentó (modalidad póster) en el IV Congreso Anual de Estudiantes y Graduados de Postgrado de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
 9. 2022– Fuentes F, **Muñoz E**, Águila L, Arias ME, Felmer R. EVALUATION OF PIEZOELECTRIC INJECTION SYSTEM AND SPERM TREATMENTS TO IMPROVE ICSI EFFICIENCY IN CATTLE. Se Presentó (modalidad póster) en la XXXIII reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR), realizada en la Ciudad de Talca, Región del Maule, Chile.
 10. 2022– Fuentes F., Águila L., **Muñoz E.**, Arias M.E., Felmer R. DETERMINACIÓN DE UN TRATAMIENTO PIEZOELÉCTRICO PARA DAÑAR LAS MEMBRANAS DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS Y EVALUACIÓN DEL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL DE EMBRIONES BOVINOS PIEZO-ICSI CON Y SIN ACTIVACIÓN EXÓGENA. Se Presentó (modalidad póster) en el III Congreso Anual de Estudiantes y Graduados de Postgrado de la Universidad de la Frontera, realizado en la Ciudad de Temuco, Región de la Araucanía, Chile.
 11. 2019– David Cancino-Baier, **Erwin Muñoz**, John Quiñones, Karla Inostroza, Néstor Sepúlveda. EFECTO DEL SNP FASN g.17^a24A>G EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FASN EN GRASA DORSAL Y GRASA INTRAMUSCULAR EN NOVILLOS HOLSTEIN-FRIESIAN. Presentado (modalidad oral) en las VIII Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas, realizadas en la Ciudad de Mendoza, Provincia de Mendoza, Argentina.

INDICE DE CONTENIDOS

Contenido

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCION.....	14
sEVs en la embriogénesis animal.....	15
Rol de las células endometriales en la modulación del desarrollo y calidad en los embriones.....	16
HIPÓTESIS DE TRABAJO	18
OBJETIVOS	18
Objetivo General:.....	18
Objetivos Específicos:	18
MATERIALES Y METODOS	19
Aislamiento de células endometriales y oviductales.....	19
Caracterización y análisis de la pureza de los cultivos de CEEP, CEES y BOEC	19
Aislamiento y purificación de endometriosomas por precipitación basada en polímeros y ultrafiltración	20
Caracterización de los endometriosomas pequeños	20
Determinación de la tasa de secreción de proteínas de endometriosomas	21
Cultivo de embriones bovinos suplementados con endometriosomas secretados por las CEES y CEEP	22
Evaluación de la internalización de los endometriosomas	22
Diseño de Oligos	23
Construcción del plásmido para la inmortalización celular.....	23
Inmortalización de las CEEP y CEES	27
Edición genética mediante CRISPR-Cas9	28
Ensayo endonucleasa I del virus T7 (EIT7).....	28
Aislamiento y purificación de endometriosomas por ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaños.....	28
Determinación de la tasa de secreción sEVs.	29
Cultivo de embriones bovinos suplementados con endometriosomas secretados por las CBR-BEEC-UpEx y CBR-BESC-UPEX.....	29
Extracción de ARN total, síntesis de ADN complementario (ADNc) y RT-qPCR de los embriones generados por FIV.....	29
Extracción de ARN total, síntesis de ADN complementario (ADNc) y RT-qPCR de las sEVs.....	29
Análisis estadísticos	31
RESULTADOS	32
Aislamiento y cultivo de las CEEP y CEES.....	32
Aislamiento y caracterización de endometriosomas pequeños.....	33
Estimación de la tasa de secreción de proteína de endometriosomas de las CEEP, CEES y BOEC	34



Efecto de los endometriosomas de las CEES y CEEP sobre el desarrollo y calidad de los embriones bovinos preimplantacionales	35
Internalización de los endometriosomas en los embriones bovinos	35
Validación de Constructos	36
Inmortalización de las Células	37
Edición genética mediante CRISPR-Cas9	38
Determinación de la concentración y tasa de secreción de sEVs.....	39
Efecto de los endometriosomas de las CBR-BESC-UpEx y CBR-BEEC-UpEx sobre el desarrollo y calidad de los embriones bovinos preimplantacionales	41
Análisis de expresión génica relativa por RT-qPCR.....	41
Caracterización y determinación del contenido de ARNm en las sEVs	42
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES.....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

RESUMEN

La producción *in vitro* de embriones (PIV) bovinos, ha permitido hacer investigación en embriogénesis animal y mejorar la reproducción en el ganado. La fertilización *in vitro* (FIV) es la principal técnica para la producción de embriones bovinos. No obstante, su eficiencia en términos de desarrollo y calidad embrionaria sigue siendo baja, en relación con en otras especies animales. Durante la última década un nuevo enfoque ha comenzado a tomar cada vez más fuerza y a considerarse para mejorar la producción de embriones *in vitro*. Se trata de la comunicación mediada por pequeñas vesículas extracelulares (sEVs) con un diámetro menor a 250 nm. Diferentes trabajos han reportado que las sEVs pueden ser cruciales en la modulación del desarrollo y calidad embrionaria. Las sEVs median la comunicación entre el embrión y las células maternas, transportando cargas de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc. Esto genera cambios a nivel metabólico y de expresión génica en los embriones. Al presente, en la PIV se ha evaluado el efecto de sEVs aisladas desde distintas fuentes, como por ejemplo, fluido oviductal, observándose un impacto positivo en términos de desarrollo hasta el estadio de blastocisto y en la calidad embrionaria. Sin embargo, la efectividad de las sEVs sobre la PIV, puede variar debido a la variabilidad de las muestras provenientes desde los mataderos, dada la influencia de factores como la edad de los animales, la genética, la alimentación, entre otros. Una interesante alternativa para disminuir la variabilidad, consiste en aislar sEVs desde líneas celulares establecidas. Las líneas celulares resultan idóneas para este objetivo debido a su homogeneidad morfofisiológica y genética. Adicionalmente, lo propuesto permitiría acabar también con la dependencia de muestras desde mataderos y el riesgo de transmisión de enfermedades. En diferentes especies, las sEVs secretadas por las células endometriales han demostrado tener efectos beneficiosos sobre el desarrollo y calidad de los embriones producidos *in vitro*. Además, se ha reportado que las sEVs endometriales pueden disminuir el estrés oxidativo en los embriones, regulando genes que codifican para enzimas antioxidantes.

En la presente tesis doctoral, se aislaron y caracterizaron desde el sistema reproductor femenino bovino, células oviductales epiteliales (BOEC), células endometriales estromales (CEES) y células endometriales epiteliales (CEEP), lo que permitió indagar en el efecto modulador de las sEVs secretadas *in vitro* por estas células sobre el desarrollo y calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*. Luego, con el fin de poder aumentar la cantidad de pasajes posibles de las CEES y CEEP, sin que pierdan sus características fenotípicas, se construyó un vector plasmídico para llevar a cabo la inmortalización de ambos tipos celulares mediante la transfección con el gen TAG, que codifica para el Antígeno T grande del virus SV40. Además, para aumentar la cantidad de sEVs secretadas por las CEES y CEEP se knockeó, mediante la tecnología CRISPR-Cas9, el gen NDRG1 que está implicado en la producción de exosomas y en el control del ciclo celular. A continuación, se evaluaron los efectos de las sEVs producidas por ambos tipos celulares inmortalizados sobre la modulación del desarrollo y calidad de embriones bovinos preimplantacionales generados por IVF. Finalmente, se caracterizó el contenido de ARNm de las sEVs secretadas por las BOEC, CEES y CEEP inmortalizadas.

Los resultados mostraron que las sEVs proveniente de las CEEP tienen efectos positivos estadísticamente significativos sobre el desarrollo embrionario en términos de tasa de clivaje (control 80,8% y sEVs-CEEP 95,9%) y formación de blastocistos (control 28,8% y sEVs-CEEP 43,5%), con respecto al control no suplementado con sEVs, el cual se conservó luego de la inmortalización y edición del gen NDRG1 en las CEEP. Además, en términos de calidad, se observó que genes como el CASP3, implicado en la apoptosis intrínseca, disminuye en los embriones suplementados con sEVs. Por otro lado, se identificaron transcritos de varios genes implicados en el desarrollo embrionario en el interior de las sEVs, como OCT4, CDX2, DNMT1, IFNT2, SOD1 y CAT.

Se concluye que este trabajo de tesis doctoral aporta con nuevas metodologías para el aislamiento de células y sEVs, y conocimientos sobre el papel de las células endometriales y sus sEVs en la reproducción bovina, abriendo oportunidades para el desarrollo de terapias y tecnologías innovadoras en la mejora de la reproducción asistida y la producción ganadera.

ABSTRACT

The *in vitro* production of bovine embryos (IVP) has enabled research into animal embryogenesis and improved reproduction in cattle. *In vitro* fertilisation (IVF) is the main technique for the production of bovine embryos. However, its efficiency in terms of embryo development and quality remains low, relative to other animal species. During the last decade a new approach has started to gain more and more momentum and to be considered to improve *in vitro* embryo production. This is communication mediated by small extracellular vesicles (sEVs) with a diameter of less than 250 nm. Several studies have reported that sEVs may be crucial in modulating embryo development and embryo quality. The sEVs mediate communication between the embryo and the maternal cells, transporting loads of proteins, lipids, carbohydrates, nucleic acids, etc. This leads to metabolic and gene expression changes in the embryos. Currently, the effect of isolated sEVs from different sources, e.g. oviductal fluid, has been evaluated in IVP and a positive impact has been observed in terms of development up to the blastocyst stage and embryo quality. However, the effectiveness of sEVs on IVP may vary due to the variability of samples from slaughterhouses, given the influence of factors such as animal age, genetics, feeding, among others. An interesting alternative to reduce variability is to isolate sEVs from established cell lines. Cell lines are ideal for this purpose due to their morpho-physiological and genetic homogeneity. In addition, the proposed approach would also eliminate the reliance on samples from slaughterhouses and the risk of disease transmission. In different species, sEVs secreted by endometrial cells have been shown to have beneficial effects on the development and quality of embryos produced *in vitro*. In addition, it has been reported that endometrial sEVs can decrease oxidative stress in embryos by regulating genes encoding for antioxidant enzymes.

In this PhD thesis, oviductal epithelial cells (BOEC), endometrial stromal cells (CEES) and endometrial epithelial cells (CEEP) were isolated and characterised from the bovine female reproductive system to investigate the modulatory effect of sEVs secreted *in vitro* by these cells on the development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. Then, in order to increase the number of possible passages of CEES and CEEP, without losing their phenotypic characteristics, a plasmid vector was constructed to carry out the immortalisation of both cell types by transfection with the TAg gene, which codes for the SV40 virus large T antigen. In addition, to increase the amount of sEVs secreted by CEES and CEEP, the NDRG1 gene, which is involved in exosome production and cell cycle control, was knocked out using CRISPR-Cas9 technology. Next, the effects of sEVs produced by both immortalised cell types on the modulation of the development and quality of preimplantation bovine embryos generated by IVF were evaluated. Finally, the mRNA content of sEVs secreted by immortalised BOEC, CEES and CEEP was characterised.

The results showed that sEVs from CEEP have statistically significant positive effects on embryo development in terms of cleavage rate (control 80.8% and sEVs-CEEP 95.9%) and blastocyst formation (control 28.8% and sEVs-CEEP 43.5%), with respect to the control not supplemented with sEVs, which was preserved after immortalisation and editing of the NDRG1 gene in CEEPs. Moreover, in terms of quality, it was observed that genes such as CASP3, involved in intrinsic apoptosis, decreased in embryos supplemented with sEVs. On the other hand, transcripts of several genes involved in embryonic development were identified within the sEVs, such as OCT4, CDX2, DNMT1, IFNT2, SOD1 and CAT.

It is concluded that this PhD thesis work provides new methodologies for cell and sEV isolation and insights into the role of endometrial cells and their sEVs in bovine reproduction, opening opportunities for the development of innovative therapies and technologies to improve assisted reproduction and livestock production.

INTRODUCCION

El cultivo de embriones bovinos *in vitro* ha contribuido al mejoramiento de la producción del ganado debido a que prolonga la vida reproductiva de animales genéticamente valiosos, permite seleccionar el sexo y características genéticas de las futuras crías y aprovechar en mejor medida el semen escaso y de alto valor genético (Brackett et al., 1982; Greve et al., 1993). Adicionalmente, los ovocitos empleados en la producción de embriones *in vitro*, pueden provenir del aprovechamiento de ovarios de mataderos, una fuente económica y accesible. Debido a esto, en las últimas décadas se ha logrado avanzar significativamente en el entendimiento de los fenómenos que subyacen a la reproducción y embriogénesis animal. Además, el creciente interés por mejorar las características genéticas en los bovinos, ha ocasionado un incremento anual de la transferencia de embriones producidos *in vitro* a hembras receptoras (International Embryo Technology Society, http://www.iets.org/comm_data.asp). Actualmente, existen diversos medios y metodologías que han mejorado las condiciones del cultivo embrionario, sin embargo, se continúan estudiando los posibles factores que podrían estar influyendo sobre la modulación del desarrollo y calidad de los embriones bovinos producidos *in vitro*. Las principales técnicas para la producción de embriones bovinos *in vitro* incluyen la fertilización *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), cuya eficiencia en las tasas de formación de blastocistos son aproximadamente de un 46% (Miranda et al., 2016), 28% (Zambrano et al., 2017) y 29% (Jafarpour et al., 2020), respectivamente. En bovinos, la eficiencia de la FIV es bastante baja si se compara con el éxito de la misma técnica en otros mamíferos, como por ejemplo en ratones, donde se ha logrado una tasa de formación de embriones hasta el estadio de blastocistos superior a un 90% (Johnson et al., 2019). Lo anterior, da cuenta de la posibilidad de continuar mejorando la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones bovinos. Un factor determinante para incrementar la tasa de formación de blastocistos bovinos *in vitro*, son los medios de cultivo, los cuales se han mejorado bastante en las últimas décadas. Por ejemplo, Larson et al. (1992), lograron una tasa de formación de blastocistos bovinos de un 24,6%, añadiendo distintos factores de crecimiento al medio de cultivo. Por otra parte, Miranda et al. (2016), observaron una eficiencia de formación de blastocistos de un 46%, co-cultivando los embriones con células mesenquimales. En ambos estudios los embriones fueron generados por FIV, apreciándose en el tiempo el progreso en el cultivo de embriones. Los medios de cultivo de embriones se han suplementado con distintos compuestos y concentraciones con el fin de mejorarlos, entre ellos hormonas, como la hormona del crecimiento (GH) (Moreira et al., 2002), hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Kim et al., 2018), aminoácidos como la taurina (Liu et al., 1995) o glutamina (Steeves et al., 1999), vitaminas como el myo-inositol (Holm et al., 1999) y vitamina E (Olson et al., 2000), y carbohidratos como la glucosa (Takahashi et al., 1992). El principal objetivo de estos medios de cultivo *in vitro* es suplir los requisitos nutricionales y simular de la mejor manera posible el ambiente materno de los embriones preimplantacionales durante el cultivo.

Un atractivo nuevo enfoque que ha comenzado a considerarse hoy en día para mejorar el cultivo de embriones *in vitro*, es el de la comunicación celular mediada por distintos tipos de vesículas extracelulares pequeñas (sEVs) (Sadeldin et al., 2014; Almiñana et al., 2017; Qiao et al., 2018; Bauersachs et al., 2020). Las sEVs son de naturaleza lipídica, con un diámetro menor a 250 nm, las cuales pueden tener un origen endosomal, como es el caso de los exosomas (Théry et al., 2018). En el interior de las sEVs se encuentra su lumen, el que puede contener proteínas de señalización, enzimas, proteínas de choque térmico, proteínas del citoesqueleto, factores de transcripción, ARNm, miRNA, ADNmt, etc. (Rana et al., 2012). Las sEVs transportan su contenido de una célula a otra (con diferentes grados de especificidad), pudiendo provocar cambios en el proteoma, transcriptoma, epigenoma y por lo tanto, en la respuesta a factores internos y externos en sus células objetivo (Sullivan et al., 2005; Subra et al., 2007; Théry, 2011; Betagov et al., 2011; Rana et al., 2012; Piehl et al., 2013; Sohél et al., 2013; Rodrigues et al., 2018). Sin embargo, uno de los principales problemas para utilizar las sEVs como una estrategia terapéutica, es la baja tasa de secreción de sEVs en los cultivos celulares *in vitro*, por lo que ha sido necesario desarrollar nuevas estrategias para aumentar la secreción de sEVs (Mol et

al., 2017; Yamashita et al., 2018). Al respecto, se ha reportado que el silenciamiento del gen NDRG1, aumentó de forma significativa la tasa de secreción de exosomas, un tipo de sEVs, en células cardíacas progenitoras humanas (CPCs), células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) y células del músculo cardíaco de ratón (HL-1) (Ortega et al., 2019). El gen NDRG1 codifica para una proteína citoplasmática del mismo nombre que participa en procesos como la resistencia al estrés oxidativo y la hipoxia (Said et al., 2017). Además, se ha reportado que el silenciamiento de NDRG1 aumenta el pH lisosómico y la acumulación citoplasmática de autofagosomas, alterando los niveles generales de esfingolípidos y ceramidas neutras (Pietäinen et al., 2013; Sahni et al., 2014; Wang et al., 2017^a; Sevinsky et al., 2018). Por lo tanto, según los antecedentes bibliográficos revisados, una reducción o la ausencia total de la expresión del gen NDRG1, podría ser una estrategia eficiente para aumentar la tasa de secreción de sEVs desde una fuente de células presuntamente beneficiosas para la producción de embriones *in vitro*.

sEVs en la embriogénesis animal

Como se mencionó anteriormente, las sEVs han comenzado a ganar terreno en la investigación de la embriogénesis animal *in vitro*. Un trabajo en ovejas demostró que desde el lumen uterino se secretan sEVs durante el ciclo estral y en los primeros meses de la preñez, que estimulan a las células del trofoectodermo de los embriones a proliferar y secretar IFN-t (Interferón tau), una proteína clave durante el primer mes de embarazo en rumiantes, ya que entre otras cosas, coordina la producción de progesterona y regula genes involucrados en el transporte de nutrientes al embrión (Bazer et al., 2015; Ruiz-González et al., 2015). El análisis del contenido de las sEVs, identificó la presencia de ARNm de genes que codifican para la proteína de choque térmico 70 (HSC70), interleucinas, factores reguladores de interferones (IFN) y la proteína de envoltura del retrovirus endógeno ovino Jaagsiekte (nJSRV-ENV) (Ruiz-González et al., 2015). Estas proteínas regulan la proliferación y secreción de IFN-t mediante su interacción con los receptores toll-like (TLR) de las células trofoectodérmicas, lo cual demuestra la importancia de la comunicación del útero con el embrión mediado por las sEVs (Ruiz-González et al., 2015). Saadeldin et al. (2014), demostraron por primera vez que el co-cultivo de embriones de cerdo generados por SCNT y partenotes, aumenta el desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto con respecto al cultivo de embriones en condiciones estándares (Saadeldin et al., 2014). El efecto del co-cultivo observado por los citados autores, se atribuye a las sEVs secretadas por los partenotes, en las que se determinó la presencia de ARNm de genes involucrados en la pluripotencialidad y proliferación celular como OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, entre otros (Saadeldin et al., 2014). Lo anterior se plantea como consecuencia del impacto de las sEVs en las células objetivo, ya que las sEVs al ingresar al embrión, liberan su contenido e incrementan el número de transcritos de ciertos genes en las células embrionarias y por consecuencia las proteínas productos de estos transcritos, mediante la traducción directa de los ARNm y/o inhibiendo la acción de miRNAs encargados de regular la expresión de estos transcritos (Shifrin et al., 2013; Saadeldin et al. 2014). Al respecto, Jasmin et al. (2014), reportaron un aumento significativo de la proteína OCT4 en un mayor número de células de embriones murinos al ser co-cultivados con fibroblastos embrionarios de la misma especie (Jasmin et al., 2014). Dicho aumento podría estar mediado por las sEVs secretadas por los fibroblastos y causar un efecto similar a los descritos por Saadeldin et al. (2014). Otro estudio comparó los efectos del co-cultivo de embriones bovinos con células mesenquimales derivadas desde tejido adiposo bovino (b-ATMSC), con respecto al cultivo de embriones suplementado con medio condicionado proveniente de b-ATMSC, observándose que el co-cultivo mejoró en mayor medida la tasa de clivaje y de formación de blastocistos (Miranda et al., 2016). Los sistemas de co-cultivo pueden provocar un suministro continuo de sEVs y otros factores hacia los embriones (Saadeldin et al., 2014), lo que podría explicar en gran medida los resultados obtenidos por Miranda et al. (2016). Sin embargo, el co-cultivo tiene desventajas, ya que el ambiente generado por este tipo de sistemas de cultivo es de naturaleza indefinida, pues se desconoce el o los factores que modulan el desarrollo embrionario. Además, el co-cultivo promueve en los embriones la generación de radicales libres en el medio y aumenta la tasa mutagénica, lo que podría impactar negativamente el desarrollo embrionario post-implantación (Moody & Hassan, 1982; Anderson, 1995).

De acuerdo a los estudios revisados, una novedosa alternativa al co-cultivo sería aislar directamente las sEVs desde determinados orígenes celulares y adicionarlas al medio de cultivo *in vitro* de los embriones, y de esta forma lograr un experimento controlado y reproducible. Diferentes estudios han demostrado que se pueden obtener sEVs desde fluidos corporales como plasma sanguíneo, semen u orina o también desde tejidos sólidos como tejido musculo-esquelético o tumoral, o incluso desde células en cultivo (Arraud et al., 2014; Lozano-Ramos et al., 2015; Lopera-Vásquez et al., 2016; Morad et al., 2019; Rome et al., 2019; Vojtech et al., 2019). Qiao et al. (2018), observaron que el cultivo *in vitro* de embriones bovinos generados por SCNT en presencia de sEVs aisladas del útero en la fase lútea temprana, aumenta la expresión de genes implicados en el crecimiento y desarrollo embrionario como la acrogranina y IFN- τ (señal de reconocimiento materno) y disminuye la expresión de genes como BAX (marcador pro-apoptótico) y BIP (marcador de estrés del retículo endoplasmático rugoso), aumentando de forma significativa la tasa de clivaje, formación de blastocistos y el número de blastómeras, y disminuyendo la tasa de apoptosis, con respecto a embriones cultivados en ausencia de dichas sEVs (Qiao et al. 2018). Otro estudio comparó los efectos de la suplementación de sEVs frescas y sEVs post-descongelación, provenientes del oviducto, al medio de cultivo de embriones bovinos, reportando que las sEVs post-descongelación incrementan significativamente, la tasa de formación de blastocistos, de eclosión y el número de células en embriones bovinos generados por FIV, con respecto al cultivo en presencia de sEVs frescas y al control sin sEVs (Almiñana et al., 2017). Por otra parte, la adición de sEVs, frescas y post-descongelación, aisladas desde el medio condicionado de una línea de células epiteliales del oviducto bovino (BOEC) al medio de cultivo *in vitro* de embriones bovinos, no mostró efectos sobre el clivaje y la tasa de formación de blastocistos, no obstante, impactó positivamente en el número de células del trofoectodermo y la tasa de supervivencia post-descongelación de embriones vitrificados (Lopera-Vásquez et al., 2016). De igual forma, da Silveira et al. (2017), observaron que la suplementación del medio de cultivo de embriones bovinos con sEVs aisladas desde fluido folicular proveniente de folículos de 3-6 mm de diámetro, impacta positivamente la tasa de formación de blastocistos, aumentando la expresión de genes implicados en el metabolismo y remodelando la cromatina, con respecto a las sEVs desde folículos de mayor tamaño (pre-ovulatorios) y al control (ausencia de sEVs) (da Silveira et al., 2017).

Es importante señalar, que diferentes estudios describen que factores como la edad de los animales, el origen de las sEVs (in vivo o in vitro), la genética, la alimentación, el modo de transporte de los tejidos al laboratorio, el tipo de conservación o incluso la estación del año, podrían generar variabilidad en los resultados obtenidos de muestras recolectadas desde mataderos (Menck et al., 1997; Rutledge, 2001; Orsi & Reischl, 2007; Almiñana et al., 2017). Una estrategia para eliminar dichos factores de variabilidad, sería aislar sEVs desde una línea celular, debido a su homogeneidad genética y morfofisiológica, acabando con la dependencia de muestras desde mataderos, el riesgo de transmisión de enfermedades y las variaciones dependientes de los lotes en el resultado de los cultivos (Menck et al., 1997). Una alternativa interesante sería utilizar una línea celular derivada desde tejido endometrial bovino, según se explica a continuación.

Rol de las células endometriales en la modulación del desarrollo y calidad en los embriones

El endometrio bovino, es un tejido endocrino altamente especializado que ayuda a regular el ciclo estral. Su principal función es la de permitir la implantación de un óvulo fecundado, el cual posteriormente se transformará en un embrión, dando lugar al desarrollo del saco gestacional y la placenta que protegerán a dicho embrión. Cuando no hay implantación embrionaria, la secreción de estradiol por parte del folículo dominante, provoca que el endometrio secrete prostaglandinas (PGF 2α), causando la luteólisis o regresión del cuerpo lúteo, lo que termina por reiniciar el ciclo estral en el día 21 (Intagri, 2018). Las hembras bovinas, como la mayoría de los mamíferos tienen ciclo estral y por lo tanto, cuando no existe fecundación el endometrio es reabsorbido por las paredes del útero (Wang et al., 2007). A nivel citológico, el endometrio se compone de dos tipos celulares, las células endometriales epiteliales (CEEP) y las células endometriales estromales (CEES) (Sanin et al., 2010). En la fase folicular del ciclo estral, el endometrio está en su fase proliferativa, debido al estrógeno secretado por los ovarios, en esta

fase las células endometriales se encargan de proliferar (Sanin et al., 2010). Por otro lado, en la fase lútea, el cuerpo lúteo en los ovarios secreta progesterona, causando que las células endometriales entren en su fase secretora (Sanin et al., 2010; Wang et al., 2007). En ambas fases las células endometriales cambian su morfofisiología y por lo tanto su patrón de expresión génica (Wang et al., 2007).

Desai et al. (1994), compararon el co-cultivo *in vitro* de embriones de ratón con células oviductales, células VERO (provenientes del riñón de *Chlorocebus sabaeus*) y células endometriales, mejorando las tasas de formación de blastocistos y de eclosión (52 y 13%, 45 y 21%, y 69% y 30%, respectivamente). Los resultados anteriores indican que las células endometriales podrían ser más beneficiosas para la producción de embriones *in vitro* que las células oviductales. Las células oviductales al ser parte del ambiente natural del embrión durante sus primeros días al recorrer el oviducto, podrían resultar beneficiosas para la producción de embriones *in vitro* (Lopera-Vásquez et al., 2016). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las células oviductales podrían liberar factores anti-implantacionales y anti-eclosión, debido a que en el momento en que el embrión viaja por el oviducto, se debe evitar la implantación o eclosión prematura, con el fin de evitar la gestación ectópica o un desarrollo anómalo (Bongso et al., 1990; Pauerstein et al., 1990). Sin embargo, los resultados observados por Desai et al. (1994), no proporcionan información sobre los mecanismos moleculares que impactan en el desarrollo embrionario, no obstante, la estrecha comunicación mediada por sEVs, entre el embrión y el endometrio, podría ser una explicación factible.

La comunicación entre los embriones preimplantacionales y el endometrio es esencial para una implantación exitosa, las sEVs endometriales tienen un importante papel en esta comunicación (Cuman et al., 2014; Vilella et al., 2015). Las sEVs aisladas desde CEEP o CEES podrían impactar positivamente la producción de embriones *in vitro*. Según han indicado algunos estudios las sEVs endometriales podrían tener un rol importante en la respuesta a estímulos externos e internos de los embriones (Ng et al., 2013; Koh et al., 2016; Blazquez et al., 2018; Burns et al., 2018; Marinaro et al., 2019; Gurung et al., 2020). Se ha reportado que la progesterona regula 1611 genes y 9 miRNA en las CEEP ovinas e incrementa la tasa de secreción de sEVs endometriales (Burns et al., 2018). Las sEVs endometriales se dirigen al concepto-trofooctodermo modulando su desarrollo e implantación (Burns et al., 2016; Burns et al., 2018). Kho et al. (2016), analizaron las consecuencias de la hipoxia sobre la comunicación mediada por sEVs entre las CEES y los embriones bovinos preimplantacionales, demostrando que a una concentración de 1% de O₂, las CEES liberan una mayor cantidad de sEVs con aproximadamente 128 proteínas diferencialmente expresadas implicadas en el desarrollo del embrión, en comparación con CEES cultivadas en condiciones normales (Koh et al., 2016). En ratones por su parte, se ha visto que las sEVs endometriales mejoran la tasa de eclosión y calidad embrionaria, además, inducen la liberación de moléculas que promueven la vascularización, angiogénesis, diferenciación y remodelación del tejido endometrial, generando un ambiente más beneficioso para su desarrollo (Blazquez et al., 2018). Del mismo modo, se observó en ratones que los embriones cultivados *in vitro* en presencia de sEVs aisladas de CEEP humanas, mejoraron significativamente la tasa de implantación, eclosión y calidad embrionaria (Gurung et al., 2020). Otro estudio en humanos, demostró que los sEVs secretados por las CEEP, contienen miRNA relevantes para la implantación embrionaria que incluyen, hsa-miR-200c, hsa-miR-17 y hsa-miR-06^a (Ng et al., 2013). Sin embargo, en lo referente a la producción *in vitro* no existen estudios que reporten una comparación entre los efectos de las sEVs secretadas por las CEEP y CEES, sobre el desarrollo y calidad embrionaria.

Por lo tanto, dadas las características de las células endometriales y particularmente de las sEVs que originan, resulta interesante la propuesta de evaluar el efecto de dichas sEVs en el cultivo *in vitro* de embriones bovinos preimplantacionales sobre su desarrollo y calidad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La adición de sEVs aisladas desde medio condicionado de una línea celular endometrial al cultivo *in vitro* de embriones, impacta positivamente las tasas de desarrollo y modula la calidad en embriones bovinos preimplantacionales.

OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar el efecto de sEVs aisladas desde líneas celulares endometriales sobre el desarrollo y calidad de embriones bovinos preimplantacionales generados por fecundación *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- 1 – Establecer líneas celulares bovinas a partir de células endometriales.
- 2 – Evaluar el efecto de las sEVs aisladas desde medio condicionado de las líneas celulares endometriales en el medio de cultivo *in vitro* de embriones bovinos, sobre el desarrollo y la calidad embrionaria.
- 3 – Caracterizar y determinar el contenido de ARNm de las sEVs aisladas desde medio condicionado por las líneas celulares endometriales establecidas.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de células endometriales y oviductales

En base a la morfología folicular (Ireland et al., 1979), se seleccionaron y recolectaron úteros en los días 1 a 4 del ciclo estral (fase proliferativa del endometrio) desde un matadero local (Frigorífico Temuco, Temuco, Chile), y se transportaron al laboratorio en hielo con el fin de reducir el metabolismo y el daño celular post-mortem. Las células endometriales y oviductales se aislaron según lo indicado por Asselin et al., (1996), con algunas modificaciones. Brevemente, utilizando bisturí y tijeras estériles se diseccionaron las capas del miometrio desde ambos cuernos uterinos, los cuales posteriormente se invirtieron para dejar expuesto el epitelio endometrial. Se extrajeron de 5 a 8 g de tejido endometrial y se lavó al menos 3 veces en DPBS suplementado con penicilina/estreptomicina al 1%. Luego, el tejido endometrial se cortó en trozos de 2 mm aproximadamente. Para aislar las células endometriales epiteliales (CEEP), el tejido fue digerido durante 3 horas a 60 RPM y 38,5 °C en DPBS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}), suplementado con tripsina (0,3% p/v). Mientras que para aislar las células endometriales estromales (CEES), el tejido endometrial se digirió durante 1 hora a 150 RPM y 38,5 °C en DPBS (con Ca^{2+} y Mg^{2+}) suplementado con colagenasa (0,07% p/v), DNasa I (0,02% p/v), tripsina (0,03% p/v). En cuanto a las células oviductales epiteliales (BOEC), se obtuvieron desde el ámpula del oviducto, digiriendo el tejido epitelial durante 3 horas a 60 RPM y 38,5 °C en DPBS (sin calcio ni magnesio), suplementado con tripsina (0,3% p/v). Luego, los sobrenadantes resultantes de cada digestión se filtraron a través de un tamiz celular con poros de 70 μm . Los sobrenadantes tamizados se centrifugaron durante 15 minutos a 700 RCF para recuperar las células. Los pellets de los 3 tipos celulares se lavaron 2 veces en DPBS y luego se sembraron a una concentración de 4×10^4 células por mL en placas de 60 mm con medio DMEM/F-12 (Cat. #11320033 – ThermoFisher) suplementado al 10% (v/v) con suero fetal bovino inactivado (SFB) y al 2% (v/v) con antibiótico/antimicótico, cambiando el medio de cultivo cada 48 horas. Las células se cultivaron a 38,5 °C con una concentración de CO_2 del 5% y humedad relativa al 100%, hasta que alcanzaran una confluencia del 40 a 60%.

Con el fin de obtener cultivos puros, utilizando una pipeta de aspiración con un diámetro de 150 μm , bajo un microscopio invertido acoplado a micromanipuladores, se aislaron colonias de cada tipo celular en base a su morfología. Los procedimientos de micromanipulación de las CEEP y las BOEC se realizaron en una solución de StemPro™ Accutase™ (Cat. #A1110501 – ThermoFisher), suplementada al 2% con antibiótico/antimicótico. Los procedimientos de micromanipulación de las CEES se realizaron en una solución de DPBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , suplementada al 2% con antibiótico/antimicótico. Finalmente las presuntas colonias puras aspiradas se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron bajo las condiciones antes mencionadas. Cabe mencionar que con el fin de analizar la capacidad proliferativa de las células aisladas mediante micromanipulación, se evaluó si los 3 tipos celulares tenían la capacidad de llegar al menos hasta el pasaje 7.

Caracterización y análisis de la pureza de los cultivos de CEEP, CEES y BOEC

Con el fin de confirmar la naturaleza de las células aisladas desde el tejido endometrial y oviductal, estas se caracterizaron morfológicamente mediante microscopía en campo claro y de contraste de fases, comparándolas con las CEEP, CEES y BOEC reportadas en la literatura (Krishnaswamy et al., 2009). Además, se identificaron marcadores proteicos específicos de cada tipo celular mediante inmunofluorescencia visualizada por microscopía de fluorescencia. En el caso de las CEEP y BOEC, se inmunodetectó citoqueratina, una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de las células epiteliales, en las cuales están ausentes otros marcadores del citoesqueleto como la vimentina (Kang et al., 2004). En cuanto a las CEES, se identificó la vimentina, una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de los fibroblastos, los cuales carecen de otros marcadores del citoesqueleto como la citoqueratina (Kang et al., 2004). La inmunofluorescencia se llevó a cabo según lo indicado por Krishnaswamy et al. (2009). Brevemente, las células se sembraron en placas para microscopía confocal y se cultivaron hasta que alcanzaran una confluencia del 40 a 60%. Luego, se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con

DPBS. Las células se fijaron añadiendo formaldehído frío al 4% (v/v) en las placas e incubándolas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, el formaldehído se retiró y las células se lavaron 3 veces con DPBS frío durante 5 minutos. A continuación las células se permeabilizaron en DPBS suplementado al 0,2% (v/v) con Triton-X100, incubando durante 10 minutos. Las células se lavaron 3 veces y se incubaron en una solución de DPBS que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v), Albumina sérica de cabra al 1% (v/v) y glicina 22,52 mg/mL, con el fin de bloquear las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos. Luego, las células se incubaron con un anticuerpo pan primario anti-citoqueratina (Cat. #MA1-91326 – ThermoFisher) durante toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron y se incubaron en oscuridad durante 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (Cat. #A-21121 – ThermoFisher). A continuación, las células se lavaron 3 veces y se incubaron en oscuridad, durante al menos 18 horas, con un anticuerpo primario monoclonal anti-vimentina conjugado a Alexa Fluor 647 (Cat. #MA5-11883-A647 – ThermoFisher) suplementado con Hoechst 33342 a 0,4 µg/mL. Finalmente las células se lavaron 3 veces en DPBS durante 5 minutos y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia, irradiando de forma secuencial los distintos fluoróforos con sus respectivas longitudes de onda de excitación.

Por otro lado, con el fin de estimar la pureza de los cultivos celulares primarios con sus respectivos marcadores proteicos específicos identificados mediante inmunofluorescencia (como se detalló anteriormente), se escaneó una superficie de 14 mm utilizando un microscopio TissueFAXS I Plus Cytometer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Aislamiento y purificación de endometriosomas por precipitación basada en polímeros y ultrafiltración

El aislamiento de endometriosomas pequeños (vesículas extracelulares pequeñas (sEVs) liberadas por células endometriales, Muñoz et al., 2022), se llevó a cabo siguiendo las metodologías descritas por Alvarez et al. (2015) y Niu et al. (2017), con algunas modificaciones. Una vez que las CEEP y CEES alcanzaron una confluencia del 80 al 90%, se les retiró el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con DPBS y se añadió el medio de aislamiento de sEVs el cual consistía en DMEM-F12, suplementado al 1% (v/v) con antibiótico/antimicótico y 1% (v/v) de Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) (Alvarez et al., 2015). El medio condicionado se recuperó después de 72 horas con el fin de aislar los endometriosomas liberados por ambos tipos celulares. Primero, el medio condicionado se centrifugó a 300 RCF durante 15 minutos para eliminar las células que pudieran estar en suspensión. El sobrenadante resultante, se centrifugó a 2.000 RCF durante 20 minutos para eliminar el debris y células muertas. A continuación, para eliminar las vesículas extracelulares grandes y medianas (m/IEVs), el sobrenadante resultante, se centrifugó a 20.000 RCF durante 1 hora. Luego, los endometriosomas pequeños y otras moléculas no solubles se precipitaron del sobrenadante resultante de la centrifugación a 20.000 RCF, añadiendo en una proporción 2:1 el reactivo el reactivo “*Total Exosome Isolation*” (Cat. #4478359 – ThermoFisher) y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, la mezcla fue centrifugada a 10.000 RCF durante 1 hora a 4 °C, y se eliminó la mayor parte del sobrenadante, dejando aproximadamente de 20 a 40 µL, con el fin de no arriesgarse a perder el pellet de endometriosomas (no visible). Luego, se mezcló el pequeño volumen que contenía los endometriosomas con 2 mL de DPBS frío. A continuación, con el fin de concentrar los endometriosomas y eliminar las trazas del reactivo “*Total Exosome Isolation*” que resulta embriotóxico, el medio que contenía los endometriosomas se eluyó a través de un filtro hidrófilico de policarbonato con poros de 10 nm generados por *Track Etch* (Cat. #PCT00113100 – Sterlitech) acoplado a un holder centrífugo modelo UHP-13C (Advantec, Tokio, Japón), centrifugando a 4500 RCF durante 1 hora a 4 °C en una centrifuga de ángulo oscilante. Los endometriosomas se lavaron con DPBS en el holder UHP-13C mediante centrifugación, y se recuperaron de la parte superior del filtro, quedando en un volumen final de 100 µL.

Caracterización de los endometriosomas pequeños

Los endometriosomas fueron caracterizados morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM). Las CEEP y CEES a un 90% de confluencia se cultivaron en placas de

24 pocillos en medio de aislamiento de sEVs durante 3 días (Alvarez et al., 2015). Luego, 1 mL del medio condicionado resultante se utilizó para aislar endometriosomas mediante la metodología descrita anteriormente. Los endometriosomas precipitados fueron resuspendidos en glutaraldehído al 4% (v/v), y 5 μ L de la suspensión se montaron en grillas de cobre con soporte de carbón/formvar. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos aproximadamente y se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido VP – SEM, STEM con EDX, SU 3500 (Hitachi, Tokio, Japón), con un voltaje de aceleración de 80 kV. De forma paralela, se realizó un control que consistió en aplicar el reactivo “*Total Exosome Isolation*” a medio de aislamiento de sEVs no condicionado, con el fin de descartar artefactos similares a los endometriosomas ocasionados por el polímero de precipitación de sEVs o algún componente del medio de aislamiento o partículas desprendidas de los filtros. Por otro lado, con el fin de validar las microfotografías obtenidas por STEM, se inmunodetectaron mediante western blot las proteínas CD9, CD63 y TSG101, las cuales son marcadores habitualmente utilizados para caracterizar sEVs, y que además se han reportado en endometriosomas (Niu et al., 2017; Blazquez et al., 2018). Brevemente, 8 mL de medio condicionado por las células durante 6 días se emplearon para aislar los endometriosomas para el inmunoensayo. Las sEVs aisladas, se resuspendieron en DPBS y se incubaron durante 5 minutos a 100 °C con el fin de lisarlas y extraer sus proteínas. A continuación la concentración de proteínas se midió utilizando el cuantificador fluorométrico Qubit 3.0 (Invitrogen, Waltham, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, las proteínas extraídas se mezclaron con buffer de carga (el cual contiene SDS y β -mercaptoetanol) y aproximadamente 10 μ g de proteínas totales se cargaron en cada carril de un gel SDS-PAGE, para llevar a cabo una electroforesis denaturante a 100 volts durante 2 horas y 30 minutos. Transcurrido el tiempo, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 15 horas a 50 mA. La membrana con las proteínas transferidas, se incubó por separado con anticuerpos anti-CD9, anti-CD63 y anti-TSG101 durante toda la noche a 80 RPM. Al día siguiente, la membrana se lavó 4 veces en PBS al 1X y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) durante 30 minutos a 80 RPM. Finalmente, la membrana se lavó 4 veces, y se incubó con peróxido de hidrogeno y luminol (1:1) para que la enzima HRP lleve a cabo la reacción bioluminiscente, la cual se pesquisó mediante placas radiográficas en un cuarto oscuro implementado para este fin.

Por otro lado, se analizó el tamaño de los endometriosomas aislados mediante *Dynamic Light Scattering* (DLS). Los endometriosomas purificados mediante la metodológica anteriormente descrita, se resuspendieron en 1 mL de DPBS y se pusieron en celdas de 4,5 mL para determinar la distribución del tamaño de partículas a 37 °C en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Co, Malvern, Inglaterra), según las instrucciones del fabricante. Se analizaron 3 réplicas biológicas de cada tipo de endometriosomas y cada replica biológica se midió 3 veces, en donde cada una de las 3 mediciones corresponde al promedio de 10 lecturas. Los resultados fueron analizados con el software Zetasizer v7.11. Finalmente, para medir la concentración de sEVs por mL se utilizó el NanoSight NS300 (Malvern Co, Malvern, Inglaterra) equipado con un láser de 488 nm y una cámara sCMOS. Las características de las sEVs se determinaron con 20 a 100 partículas por fotograma. Las muestras se inyectaron en un flujo continuo en la cámara de muestras, a temperatura ambiente, utilizando una bomba de jeringa.

Determinación de la tasa de secreción de proteínas de endometriosomas

Con el fin de determinar la tasa de secreción de proteínas de endometriosomas de las CEEP, CEES y BOEC, estas se cultivaron en placas de 24 pocillos. Una vez que los cultivos alcanzaron una confluencia del 100%, cada pocillo fue tripsinizado de forma individual. Las células se lavaron 2 veces con DPBS a 700 RCF durante 10 minutos. Después del último lavado, el pellet de células se resuspendió en 850 μ L de DPBS suplementado con SYBR-14 a una concentración final de 6,3 nM para teñir el núcleo celular. Luego, se analizó el número de células por pocillo mediante un Citómetro de Flujo FACS CANTO II (Becton Dickinson, Nueva Jersey, USA) a una velocidad de 60 μ L por minuto. Se analizaron 3 réplicas biológicas y cada replica se midió 4 veces por 30 segundos. Por otro lado, se aislaron los endometriosomas de los 3 tipos celulares según la metodología descrita anteriormente. Luego se extrajeron las proteínas de los endometriosomas y se cuantificaron mediante el kit Micro BCA™ Protein

Assay (Cat. #23235 – ThermoFisher), según las instrucciones del fabricante, midiendo la absorbancia a 562 nm en un lector de placas Infinite M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suiza). Finalmente, se calculó la cantidad de proteínas de endometriomas secretada por hora de cada tipo celular, dividiendo la cantidad de proteínas obtenidas por 72 (3 días) y el resultado se dividió nuevamente por la cantidad de células en cada pocillo de 15,5 mm.

Cultivo de embriones bovinos suplementados con endometriomas secretados por las CEES y CEEP

Los ovarios bovinos, se recolectaron desde un matadero local (Frigorífico Temuco, Temuco, Chile). Los ovocitos provistos de sus células del cumulo se aspiraron desde folículos de 2 a 7 mm y los ovocitos de buena calidad se maduraron en medio TCM-199 (Gibco™, Waltham, USA) suplementado al 10% (v/v) con SFB (Gibco™, Waltham, USA), hormona LH (6 µg/mL) y estradiol (1 µg/mL), en condiciones estándares de cultivo celular bovino (38,5 °C en 5% de CO₂ y humedad relativa a saturación) (Arias et al., 2015). Los ovocitos previamente madurados por 24 horas, fueron fecundados in vitro según lo indicado por Arias et al. (2015). Brevemente, los ovocitos madurados se coincubaron con 1x10⁶ de espermatozoides por mL (Alta Genetics Inc., Alberta, Canadá), seleccionados por un gradiente de percoll 45-90%, durante 18-20 horas en medio IVF-TL (Caisson Labs, Smithfield, Utah, USA) suplementado con piruvato de sodio (0,2 mM), BSA libre de ácidos grasos (6 mg/mL), gentamicina (0,025 mg/mL) heparina (2 µg/mL) y PHE [penicilamina (80 µM), hipotaurina (40 µM), epinefrina (10 µM)] en condiciones estándares de cultivo. Luego, los presuntos cigotos fueron despojados de sus células del cumulo por vortex durante 5 minutos en un medio de manipulación de embriones (medio Hepes Buffered HECM), suplementado con hialuronidasa (1 mg/mL). Los presuntos cigotos se lavaron en medio de manipulación de embriones y se cultivaron en gotas de 50 µL de medio KSOM suplementado con BME-aminoácidos esenciales (1% v/v), MEM-aminoácidos no esenciales (1% v/v), PVA (0,01% v/v), ITS (1% v/v) y 80 ng/µL de proteína de cada tipo de endometrioma, a 38,5 °C con una mezcla de gases de CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂ (90%) y humedad relativa a saturación (Arias et al., 2015; Almiñana et al., 2017). Se realizó un control negativo con embriones cultivados en ausencia de endometriomas y otro control con embriones suplementados con medio de cultivo no condicionado, el cual se trató con la metodología de aislamiento de sEVs descrita, lo anterior con el fin de descartar sustancias embriotóxicas generadas durante el aislamiento de los endometriomas. Las tasas de clivaje y formación de blastocistos se registraron a los días 3 y 7 post-fecundación, respectivamente (Arias et al., 2016; Almiñana et al., 2017).

Evaluación de la internalización de los endometriomas

Para evaluar la internalización de los endometriomas en los embriones bovinos preimplantacionales, se utilizó la metodología descrita por Niu et al., 2017, con algunas modificaciones. Brevemente, los endometriomas se aislaron con la metodología descrita anteriormente. Una vez que las sEVs fueron precipitadas por el reactivo *Total Exosome Isolation* durante toda la noche y centrifugadas a 10.000 RCF, se descartó la mayor parte del sobrenadante (sin perturbar el pellet de sEVs) y los endometriomas fueron resuspendidos en 2 mL de DPBS suplementado con el colorante fluorescente de membrana FM™ 1-43FX (Cat. #F35355 – Invitrogen) a una concentración final de 5 µg/mL. Luego, los endometriomas se concentraron y lavaron utilizando una membrana de policarbonato con poros de 10 nm generados por *Track Etch*, mediante la metodología detallada anteriormente. A continuación, los endometriomas teñidos, se coincubaron durante 24 horas con embriones generados por FIV en el día 6 de cultivo a 38,5 °C con una mezcla de gases de CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂ (90%) y humedad relativa a saturación. Transcurrido el tiempo, los embriones se lavaron 2 veces en DPBS y se fijaron durante 15 minutos a 4°C en formaldehído al 4% suplementado con Hoechst 33342 a una concentración final de 0,4 µg/mL para visualizar los núcleos celulares. Finalmente, los embriones fueron lavados 3 veces durante 5 minutos en DPBS frío y se montaron en portaobjetos para ser visualizados en un microscopio laser confocal (CLSM) FV1000 (Olympus, Tokio, Japón), irradiando de forma secuencial los distintos fluoróforos con sus respectivas longitudes de onda de excitación, obteniendo microfotografías confocales Z-stack.

Diseño de Oligos

Para el diseño de primers las secuencias moldes fueron obtenidas desde Addgene o la base de datos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NCBI). Los primers fueron diseñados inicialmente con AmplifX v1.7.0 (Universidad de Aix-Marsella, Marsella, Francia) con el fin de obtener sus temperaturas de annealing teórica. Luego, para descartar amplificaciones inespecíficas todos los primers fueron analizados por la Herramienta de diseño de Primers y de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos (Primer-BLAST), proporcionada por NCBI. A continuación, con el fin de examinar las características fisicoquímicas de los primers para descartar formación de homodímeros, heterodímeros y horquillas, todos los primers fueron analizados en la herramienta OlygoAnalyzer de Integrated DNA Technologies (IDT). Finalmente, todos los primers fueron enviados a sintetizar a Macrogen (Macrogen, Seúl, Corea del Sur). Las secuencias de los primers diseñados para ingeniería genética se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Oligos para Ingeniería Genética.

Nombre Oligo	Secuencia 5' → 3'	Amplicón
Amp_Ori_F	GCTAAAGTCGACGAATCAGGGGATAACGCAGG	1897 pb
Amp_Ori_R	GTGTTTCTAGAGCCTCGTGATACGCCTATTT	1897 pb
XhoI_Site_F	*CCGGTATATTATCATGACTCGAGAAGC	-
XhoI_Site_R	*GGCCGCTTCTCGAGTCATGATAATATA	-
TAg_mCherry_F	AATTGGACCGGTGCCACCATGGATAAAAGTTTTAAACAGAGAGG	4663 pb
TAg_mCherry_R	GATTTCTCGAGAGCTAGAGCCAGACATGATA	4663 pb
ARNg_NDRG1_F	*CACCGCAGGACGTGGACCTCGCCG	7765 pb
ARNg_NDRG1_R	*AAACCGGCGAGGTCCACGTCCTGC	-
NDRG1_E1T7_F	CCGTCCTGTCATCTTGGCTT	1098 pb
NDRG1_E1T7_R	AGGTGCTTGGAGGAACCTGG	1098 pb
pCEB_Colony_PCR_R	GCTCGTATGTTGTGTGGA	7765 pb

Secuencias de los oligos utilizados para procedimientos de ingeniería genética. Las letras de colores indican los sitios de reconocimiento de las restrictasas *Sall*, *XbaI*, *XhoI* y *AgeI*, según corresponda. Las letras de colores indican los extremos salientes para las enzimas *AgeI*, *NotI*, *BsaI*, según correspondan. Las regiones destacadas en color gris y olivo indican los sitios estabilizadores para las restrictasas y una secuencia Kozak, respectivamente. Los * indican los extremos 5' fosforilados. Debido a las características de la polimerasa recombinante de alta fidelidad Platinum SuperFi II de Invitrogen, todos los primers se utilizaron con una temperatura de annealing de 62 °C para aumentar su especificidad.

Construcción del plásmido para la inmortalización celular

Todas las construcciones fueron diseñadas y montadas *in silico* con el software SnapGene v7.0 (GSL Biotech LLC, San Diego, USA). Con el fin de establecer líneas celulares inmortalizadas de las CEEP y CEES, se construyó un vector plasmídico que codifica para el antígeno T grande del SV40 (TAg). Para generar este constructo se utilizaron los plásmidos pUC19 (Plásmido 19 de la Universidad de California, Cat. #50005 – Addgene), pCEB (Plásmido Cas9-EGFP-BSD) y pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry (Cat. #58993 – Addgene). Primero, se linealizó el pUC19 (**Fig. 1**) con la enzima *XbaI* y se amplificó por PCR de alta fidelidad (Cat. #12368010 – Invitrogen) el gen AMP conteniendo su promotor y terminador. Luego, utilizando las restrictasas *XbaI* (Cat. #R0145S – New England Biolabs) y *Sall* (Cat. #R0138S – New England Biolabs) se digirió por separado el amplicón AMP y el pCEB (**Fig. 2**), el producto de ambas digestiones se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 110 volts constantes durante 1 hora. Desde el gel de electroforesis se purificó de la digestión del gen AMP un fragmento de ADN de 1921 pb y desde la digestión de pCEB un fragmento de 7487 pb, utilizando el kit QIAquick® Gel Extraction (Cat. #28704 – QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN purificados y cohesivos en sus extremos, fueron ligados utilizando una ADN Ligasa T4 (Cat. #M0202S – New England Biolabs), lo que generó el pACEB (plásmido AMP-Cas9-EGFP-BSD) (**Fig. 3**). El pACEB se clonó transformando bacterias competentes DH5 alfa (Cat. #18258012 - Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación las bacterias presuntamente transformadas se sembraron en estrías y seleccionaron en placas Petri conteniendo medio de cultivo

solido Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, cultivándose durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente las colonias aisladas y resistentes a ampicilina se analizaron mediante una Colony-PCR para confirmar la presencia del ADN plasmídico en ellas. Las colonias positivas para el pACEB se cultivaron en 20 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina durante 16 horas a 37 °C y agitación a 180 RPM. Trascorridas las 16 horas el ADN plasmidial se aisló y purificó desde las bacterias utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Cat. #27104 – QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El pACEB purificado se digirió con las restrictasas AgeI (Cat. #R3552S – New England Biolabs) y NotI (Cat. #R0189S – New England Biolabs), el resultado se corrió en una electroforesis de agarosa y, como se detalló anteriormente, se purificó desde el gel un fragmento de 4084 pb. El fragmento purificado se ligó con un oligo de ADN de doble hebra cohesivo, el cual contenía un sitio de reconocimiento para la restrictasa XhoI, resultando en el pAB (plásmido AMP-BSD) (**Fig. 4**). El pAB se clonó en bacterias DH5 alfa competentes y se purificó por miniprep, del mismo modo como se mencionó anteriormente. En paralelo, mediante PCR de alta fidelidad se amplificó desde el pRRLsin-SV40 T antígeno-IRES-mCherry (**Fig. 5**) un policistrón que codifica para el gen TAG y mCherry unidos mediante una secuencia IRES, el amplicón resultante también contenía la secuencia del terminador, pero no del promotor. Luego, el pAB y el amplicón TAG-mCherry se digirieron por separado con las restrictasas AgeI (Cat. #R3552S – New England Biolabs) y XhoI (Cat. #R0146S – New England Biolabs). Los resultado de ambas digestiones se corrieron en una electroforesis para purificar un fragmento de 4093 pb y 4675 pb desde la digestión del pAB y el amplicón TAG-mCherry, respectivamente. Por último, ambos fragmentos fueron ligados resultando en el pTMB (plásmido TAG-mCherry-BSD) (**Fig. 6**), el cual se clonó en bacterias competentes DH5 alfa, y se purificó mediante miniprep para ser utilizado en la transfección de las CEEP y CEES. Todas las mediciones de concentración de ácidos nucleicos se realizaron con el cuantificador fluorométrico Qubit 3 (Invitrogen, Waltham, USA).

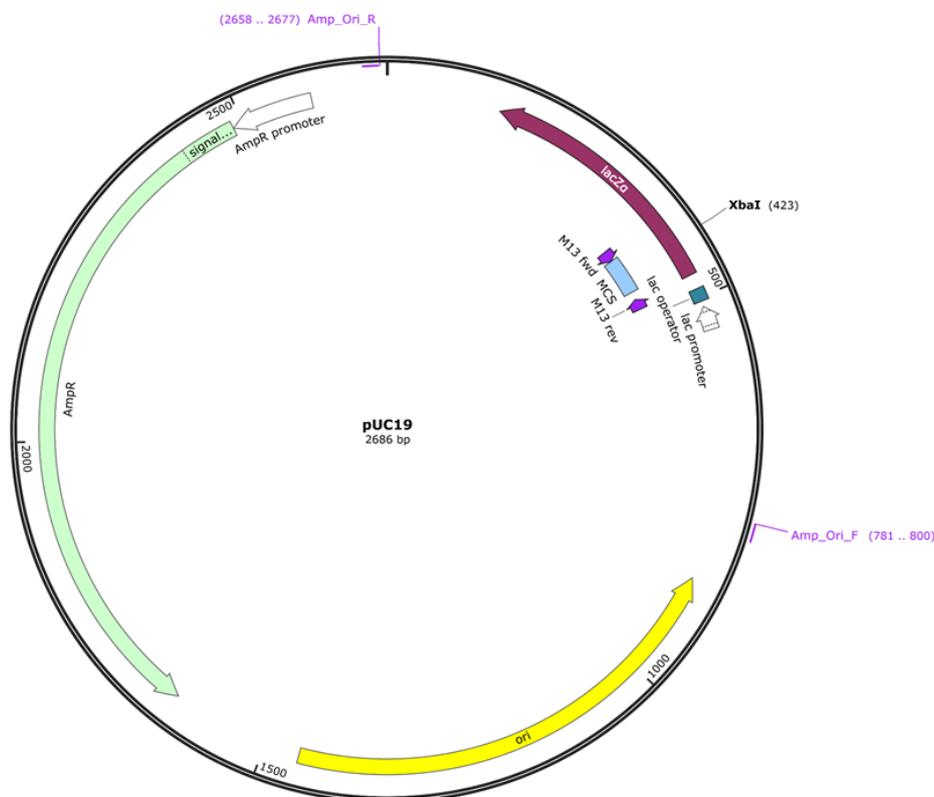


Figura 1: Plásmido 19 de la Universidad de California. En la figura se puede observar el mapa del pUC19 y los primers, en letras rosadas, utilizados para obtener el amplicón AMP. También se puede apreciar el sitio de restricción de la enzima XbaI con cual fue linealizado. El gen AmpR, en color cian, codifica para la enzima beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina a las bacterias.

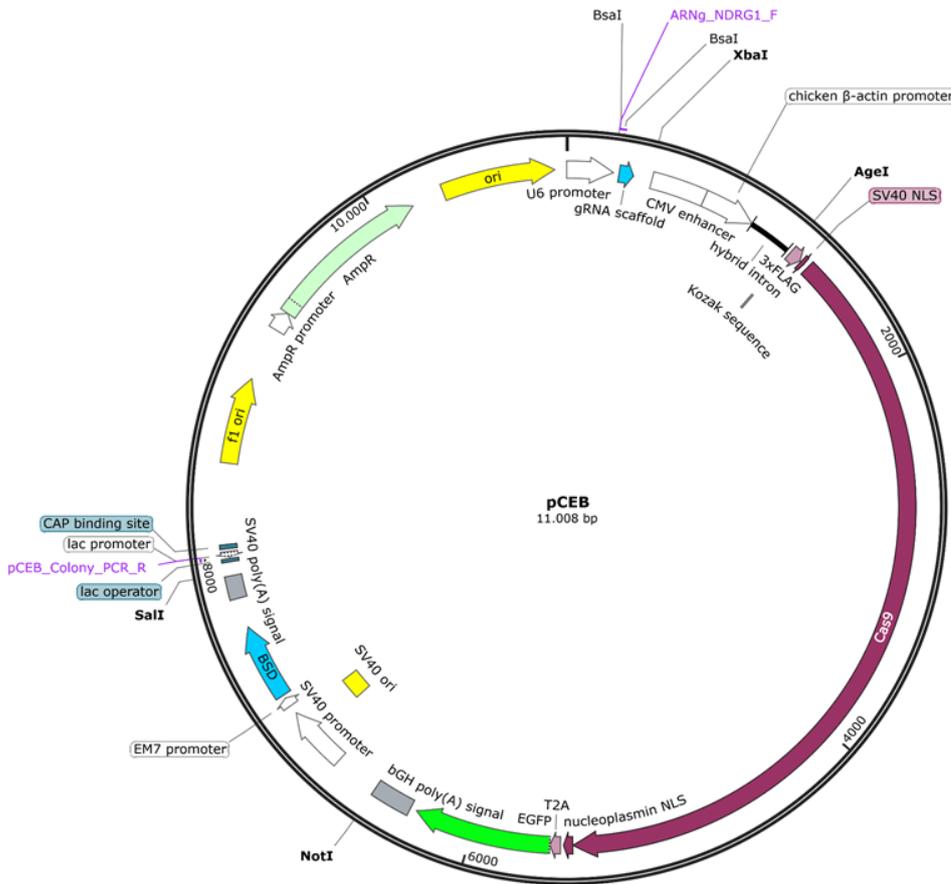


Figura 2: Plásmido Cas9-EGFP-BSD. En la figura se puede observar el mapa del pCEB y los primers, en letras rosadas, utilizados para la Colony PCR. También se pueden apreciar los sitios de restricción de distintas restrictasas. En color celeste se puede apreciar el Scaffold de ARNg, en el cual mediante la restrictasa BsaI se liga el ARNg diseñado. El gen Cas9, en color burdeos, codifica para la enzima CRISPR associated protein 9 la cual es guiada para el ARNg diseñado para generar el corte en la doble hebra de ADN. El gen EGFP, en verde, codifica para la Enhanced Green Fluorescent Protein. El gen BSD, en color celeste, codifica para la enzima blasticidina-S deaminasa, que confiere resistencia a la blasticidina a las células animales.

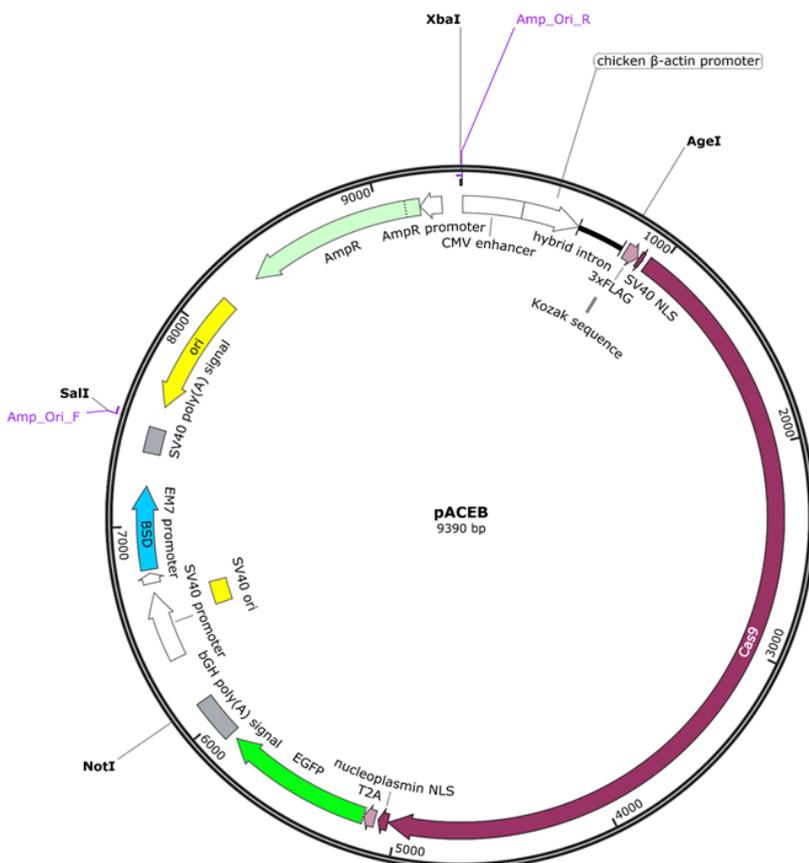


Figura 3: Plásmido Amp-Cas9-EGFP-BSD. En la figura se observa el mapa del pACEB. Se puede apreciar la eliminación del sitio de resistencia a ampicilina antiguo, de ambos orígenes de replicación y del Scaffold de ARNg. Este es un plásmido intermediario, no tiene ninguna función biológica en su versión actual.

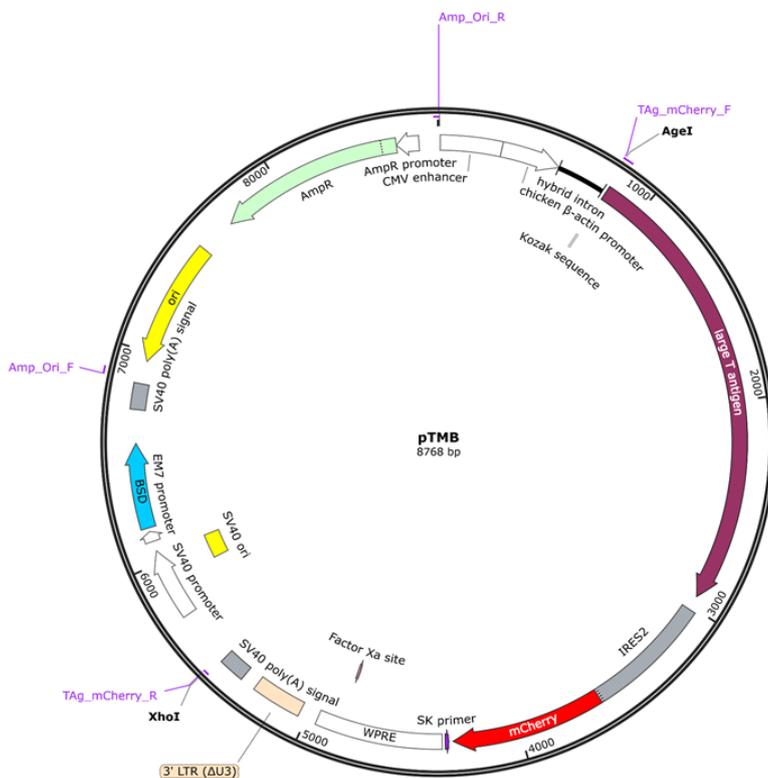


Figura 6: Plásmido TAg-mCherry-BSD. En la figura se observa el mapa del pTMB. Se puede apreciar el policistron TAg-mCherry, que codifica para el antígeno T grande del SV40 y la proteína fluorescente roja mCherry. El antígeno T grande del SV40, en color burdeos, está implicado en la inmortalización de las células animales y la proteína mCherry, en color rojo, sirve como reportero de la transfección. El gen BSD, en color celeste, codifica para la enzima blasticidina-S deaminasa, que confiere resistencia a la blasticidina a las células animales, utilizado como gen de selección. Finalmente, El gen AmpR, en color cian, codifica para la enzima beta-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina a las bacterias, utilizado, en combinación con el origen de replicación en amarillo (ori), para replicar el plásmido en las *E. coli* DH5 alfa competentes. Este plásmido fue utilizado para generar las líneas celulares animales.

Inmortalización de las CEEP y CEES

Para la inmortalización de ambos tipos celulares se lipofectó el pTMB que contiene un gen que codifica para el antígeno T grande del SV40, una oncoproteína que induce la transformación maligna de varios tipos de células mediante la perturbación de las proteínas supresoras tumorales retinoblastoma (pRb) y p53 (DeCaprio et al., 1988; Ahuja et al., 2005). 24 horas antes de la transfección se sembraron por separado las CEEP y CEES a una densidad de 200.000 células/mL en placas Petri de 35 mm de diámetro cultivadas con 2 mL de medio de cultivo DMEM-GlutaMAX (Cat. #10569010 – Gibco) suplementado al 10% con FBS y 1% Antibiótico-antimicótico (Cat. #15240062 – Gibco). Una vez alcanzada una confluencia celular del 60-90% se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio Opti-MEM (Cat. #31985070 – Gibco) suplementado al 10% con FBS y 1% Antibiótico-antimicótico. En paralelo, utilizando el pTMB y el reactivo de transfección X-tremeGENE 360 (Cat. #XTG360-RO – Roche) se produjeron los complejos ADN-Lípido mezclando el ADN (1 μ g) con el reactivo X-tremeGENE 360 (1 μ L) en las proporciones 1:1 1:2 1:3 y 1:4. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, los complejos ADN-Lípido se añadieron a las células para ser transfectadas. A las 72 horas utilizando un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón), se evaluó la transfección mediante la visualización de la proteína mCherry, la cual al ser irradiada con un haz de luz con una longitud de onda de 587 nm, emite luz con una longitud de onda de 610 nm (rojo). Luego de confirmar la transfección mediante el gen reportero, se añadió blasticidina 4 μ g/mL (Cat. #SBR00022 – Sigma-Aldrich) al medio de cultivo con el fin de seleccionar las células transfectadas. Las células resistentes a blasticidina se subcultivaron por al menos 10 pasajes sin cambios morfológicos aparentes. Finalmente, las CEEP y CEES inmortalizadas se nombraron como CBR-BEEC (CEBIOR-Bovine Endometrial Epithelial Cells) y CBR-BESC (CEBIOR-Bovine Endometrial Stromal Cells), respectivamente.

Edición genética mediante CRISPR-Cas9

Con el fin de aumentar la producción de sEVs sin afectar su contenido, se silenció el gen NDRG1 mediante la nucleasa Cas9 dirigida por un ARNg. Utilizando la plataforma Benchling, se diseñó un ARNg que tiene como objetivo la cadena positiva del exón codificante 1 del gen NDRG1, ubicado en el cromosoma 14 de *Bos taurus*. La puntuación de On-Target y Off-Target fueron de 73.9 y 82.0, respectivamente, sobre un máximo de 100 puntos para ambos parámetros según los algoritmos empleados por Benchling (Hsu et al., 2013; Doench et al., 2016). La secuencia del ARN guía (ARNg) diseñado se envió a sintetizar junto con su cadena complementaria a Macrogen (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) (**Tabla 1**). A su vez a ambos oligonucleótidos se les fosforilaron sus extremos 5', los que además contienen extremos salientes complementarios a los extremos pegajosos generados por la restrictasa BsaI. Los oligos se mezclaron en una proporción 1:1 en agua libre de nucleasas y proteasas y se alinearon *in vitro* mediante un ramp-down desde los 95 °C hasta los 4°C. En paralelo se digirió el pCEB (**Fig. 2**) con la restrictasa BsaI (Cat. #R3733S – New England Biolabs), la digestión resultante se corrió en un gel de electroforesis, del cual se purificó un fragmento de 10.983 pb, de la misma manera como se detalló anteriormente. Luego, el fragmento purificado y los oligos alineados se ligaron, resultando en el pCEB-ARNg-NDRG1, el cual fue clonado y purificado en bacterias competentes DH5 alfa. A continuación las CBR-BEEC y CBR-BESC fueron transfectadas con el pCEB-ARNg-NDRG1, de la misma manera como se detalló en la sección anterior. La correcta transfección se confirmó con un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse TS100, mediante la visualización de la proteína EGFP la cual emite luz a una longitud de onda de 507 nm (verde) cuando es irradiada con un haz de luz de 488 nm.

Ensayo endonucleasa I del virus T7 (EIT7)

Con el fin de confirmar rápidamente la edición por el sistema CRISPR-Cas9, las células positivas para EGFP se analizaron con el ensayo de la endonucleasa I del virus T7 (EIT7). Brevemente, se extrajo el ADN genómico desde ambas líneas celulares utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Cat. #69504 – QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se amplificaron por PCR de alta fidelidad amplicones de 1 kb aproximadamente de la región objetivo del ARNg desde células no editadas y células presuntamente editadas (positivas para EGFP). A continuación ambos amplicones se mezclaron en una proporción 1:1 y se alinearon *in vitro* mediante un ramp-down desde los 95 °C hasta los 4 °C. Los heteroduplex producto de la hibridación de una cadena de ADN wild-type con una mutada, fueron analizados con la EIT7 en busca de bucles de ADN monocatenarios generados por el apareamiento incorrecto de las bases en las regiones donde ocurrieron eventos de IDELS (Inserciones o Deleciones). El resultado de esta digestión se corrió en una electroforesis en gel de agarosa para confirmar las 3 bandas en caso de una edición correcta. Las CBR-BEEC y CBR-BESC correctamente editadas se nombraron como CBR-BEEC-UpEx (CEBIOR-Bovine Endometrial Epithelial Cells-Up Exosome secretion) y CBR-BESC-UPEX (CEBIOR-Bovine Endometrial Epithelial Cells-Up Exosome secretion), respectivamente.

Aislamiento y purificación de endometriosomas por ultrafiltración y cromatografía de exclusión por tamaños

En cuanto al aislamiento de los endometriosomas proveniente de las CBR-BEEC-UpEx y CBR-BESC-UPEX, con el fin de aumentar su rendimiento y purificación para realizar los análisis posteriores, sus sEVs fueron aisladas mediante Cromatografía de Exclusión por Tamaños (SEC). Brevemente, para eliminar los restos celulares y las vesículas extracelulares superiores a 250 nm, los medios condicionados por las células durante 72 horas se centrifugaron a 300, 2.000 y 20.000 RCF durante 15, 20 y 60 minutos, respectivamente y los sobrenadantes resultantes se guardaron a -80 °C por al menos 3 días. Luego, 50 mL de medio condicionado de cada línea celular se concentró hasta 150 µL aproximadamente utilizando concentradores centrífugos Vivaspin 20 MWCO 100 kDa (Cat. #GE28-9323-63 – Cytiva), con un tamaño de poro aproximado de 10 nm. Los medios enriquecidos con sEVs se completaron hasta un volumen de 1 mL con DPBS, y se corrieron por separados en columnas qEV1 / 35nm (Cat. #IC1-35 – Izon Science), siguiendo las instrucciones del fabricante, recuperando las

fracciones 1 a la 10, de 700 μ L cada una.

Determinación de la tasa de secreción sEVs.

En cuanto a la determinación de la tasa de secreción de sEVs, desde el medio condicionado se aislaron las sEVs por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), y su concentración se midió por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), todo esto como se describió anteriormente. Finalmente se calculó la cantidad de sEVs secretada por hora de cada tipo celular, dividiendo la cantidad de sEVs obtenidas por 72 (3 días) y el resultado se dividió nuevamente por la cantidad de células en cada pocillo de 15,5 mm.

Cultivo de embriones bovinos suplementados con endometriosomas secretados por las CBR-BEEC-UpEx y CBR-BESC-UPEX

La obtención y maduración de los ovocitos, y la FIV fue realizado como se describió anteriormente. Después de las 18 a 20 horas post-fecundación, los presuntos cigotos se lavaron en medio de manipulación de embriones y se cultivaron en gotas de 50 μ L de medio KSOM suplementado con BME-aminoácidos esenciales (1% v/v), MEM-aminoácidos no esenciales (1% v/v), PVA (0,01% v/v), ITS (1% v/v) y 400.000 oviductosomas secretados por las BOEC, a 38,5 °C con una mezcla de gases de CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂ (90%) y humedad relativa a saturación (Arias et al., 2015; Almiñana et al., 2017). Al día 3 de cultivo se adicionaron 400.000 endometriosomas provenientes de las CBR-BESC-UpEx y CBR-BEEC-UpEx a cada tratamiento respectivo. Se realizó un control negativo con embriones cultivados en ausencia de endometriosomas. Las tasas de clivaje y formación de blastocistos se registraron a los días 3 y 7 de cultivo, respectivamente (Arias et al., 2016; Almiñana et al., 2017).

Extracción de ARN total, síntesis de ADN complementario (ADNc) y RT-qPCR de los embriones generados por FIV

Con el fin de analizar la expresión relativa de los genes OCT-4, CDX2, NANOG, SOX2, IFNT2, GATA2, SOD1, CAT, DNMT1, HDAC1 y CASP3, todos involucrados en el desarrollo embrionario (Arias et al., 2016), se extrajo el ARN total de pools de 5 embriones similares por cada tratamiento. La extracción del ARN se realizó utilizando el kit Arcturus PicoPure RNA Isolation (Cat. #KIT0204 – Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, el ARN total extraído de cada pool de 5 embriones se utilizó para la síntesis de ADNc utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Cat. #K1622 – ThermoFisher), con una proporción de 1:1 de Random Primers y Oligos-dT, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc resultante de 20 μ L totales de reacción de retrotranscripción se diluyó a un volumen final de 100 μ L con agua libre de nucleasas y proteasas. A continuación se preparó la reacción de qPCR utilizando el MasterMix Brilliant II SYBR Green (Cat. #ST.600828 – Agilent Technologies), 5 μ L de la dilución de ADNc y todos los primers a una concentración final de 250 nM. Finalmente, la RT-qPCR se realizó en un termociclador StratageneMx3000P de Agilent Technologies (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Las condiciones de reacción fueron: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 20 s a 95 °C, 20 s a 58 °C y 20 s a 72 °C, finalizando con una incubación de 1 s a 25 °C y 15 s a 72 °C. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron con el programa informático MxPro v4.10 (Agilent Technologies) y se utilizaron los genes SF3A1, HMBS y PPIA como housekeeping, de acuerdo a la literatura (Arias et al., 2016). Las secuencias de los primers utilizados para la RT-qPCR se muestran en la **Tabla 2**.

Extracción de ARN total, síntesis de ADN complementario (ADNc) y RT-qPCR de las sEVs

Con el fin de caracterizar y determinar el contenido de ARNm de las sEVs aisladas desde medio condicionado de las líneas celulares endometriales establecidas y de las BOEC, se extrajo por separado el ARN total desde 3.200.000 sEVs secretadas por las CRB-BESC, CBR-BEEC y BOEC, utilizando el kit Arcturus PicoPure RNA Isolation (Cat. #KIT0204 – Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis del ADNc y la RT-qPCR se realizaron de la misma forma en cómo se describió anteriormente. Se analizó la presencia de los genes OCT-4, CDX2, NANOG, SOX2,

IFNT2, GATA2, SOD1, CAT, DNMT1, HDAC1 y CASP3. La expresión relativa de ARNm de cada gen se fijó arbitrariamente en uno, de acuerdo a la literatura (Saadeldin et al., 2014).

Tabla 2: Primers utilizados para la RT-qPCR.

Nombre Primer	Código Acceso ARNm en NCBI	Nombre proteína que codifica	Secuencia del Primer	Tamaño del amplicón
OCT-4_F	NM_174580.3	POU class 5 homeobox 1	GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTC	314 pb
OCT-4_R	NM_174580.3	POU class 5 homeobox 1	ACACTCGGACCACGTCTTTC	314 pb
CDX2_F	NM_001206299.1	Caudal type homeobox 2	GCCACCATGTACGTGAGCTAC	140 pb
CDX2_R	NM_001206299.1	Caudal type homeobox 2	ACATGGTATCCGCCGTAGTC	140 pb
NANOG_F	NM_001025344.1	Nanog homeobox	CTGTGTGTGCTCAATGACAG	166 pb
NANOG_R	NM_001025344.1	Nanog homeobox	TATTCCTCGCCAGTTGTTT	166 pb
SOX2_F	NM_001105463.2	SRY-box transcription factor 2	TTTGTCGAGACGGAGAAGC	146 pb
SOX2_R	NM_001105463.2	SRY-box transcription factor 2	CTCCGGCAGTGTGTACTTA	146 pb
IFNT2_F	NM_001015511	Interferon tau	TGGCCTGGTGCTGGTCAGC	108 pb
IFNT2_R	NM_001015511	Interferon tau	TCATTCGGGCCAGGAGCCTG	108 pb
GATA2_F	NM_001192114.3	GATA binding protein 2	GAGGACTGTAAGCGTAAAGG	140 pb
GATA2_R	NM_001192114.3	GATA binding protein 2	AAGAACCAAGTCTCCCAT	140 pb
SOD1_F	NM_174615.2	Superoxide dismutase 1	GCTGTACCAGTGCAGGTC	195 pb
SOD1_R	NM_174615.2	Superoxide dismutase 1	CATGGACCACCATCGTGC	195 pb
CAT_F	NM_001035386.2	Catalase	ACCCTCGTGGCTTTGCAG	192 pb
CAT_R	NM_001035386.2	Catalase	ACTCAGGACGCAGGCTCC	192 pb
DNMT1_F	NM_182651.2	DNA methyltransferase 1	CGCATGGGCTACCAAGTGCACCTT	312 pb
DNMT1_R	NM_182651.2	DNA methyltransferase 1	GGGCTCCCCGTTGTATGAAATCT	312 pb
HDAC1_F	NM_001037444.2	Histone deacetylase 1	GGCTCTGACTCCTTGTCTTGG	103 pb
HDAC1_R	NM_001037444.2	Histone deacetylase 1	GCATAGGCAGGTTGAAGCTC	103 pb
CASP3_F	NM_001077840.1	Caspase 3	TACTTGGGAAGGTGTGAGAAAATAA	71 pb
CASP3_R	NM_001077840.1	Caspase 3	AACCCGTCTCCCTTTATATTGCT	71 pb
SF3A1_F	NM_001081510.1	Splicing factor 3 ^a subunit 1	GCGGGAGGAAGAAGTAGGAG	125 pb
SF3A1_R	NM_001081510.1	Splicing factor 3 ^a subunit 1	TCAGCAAGAGGGACACAAA	125 pb
IGF2_F	NM_174087.4	Insulin like growth factor 2	CTTCAGCCGACCATCCAGCCGCATAAAC	323 pb
IGF2_R	NM_174087.4	Insulin like growth factor 2	TCAGCGGACGGTGACTCTTGGCCTCTCT	323 pb
BAX_F	NM_173894.1	BCL2 associated X	TCCTTCGAGAGCGGCTGC	123 pb
BAX_R	NM_173894.1	BCL2 associated X	AGGCGGTGAGCACTCCAG	123 pb
BCL2A1_F	NM_001037100.3	BCL2 related protein A1	AGACTGTCTCGGTCACTTGC	222 pb
BCL2A1_R	NM_001037100.3	BCL2 related protein A1	TGCTTCAGAGTCTTTCCAC	222 pb
HMBS_F	NM_001046207.1	Hydroxymethylbilane synthase	CTTTGGAGAGGAATGAAGTGG	80 pb
HMBS_R	NM_001046207.1	Hydroxymethylbilane synthase	AATGGTGAAGCCAGGAGGAA	80 pb
PPIA_F	NM_178320.2	Peptidylprolyl isomerase A	CTGGCATCTTGTCCATGGCAA	203 pb
PPIA_R	NM_178320.2	Peptidylprolyl isomerase A	CCACAGTCAGCAATGGTGATCTTC	203 pb

Como se explicó anteriormente, todos los primers se utilizaron con una temperatura de annealing de 58 °C. Todos los primers tienen una eficiencia de amplificación superior al 80%.



Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism 8. Los resultados del desarrollo embrionario se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado para saber si existían diferencias entre los tratamientos y mediante la prueba exacta de Fisher, para identificar las diferencias. Los resultados de los análisis de la tasa de secreción de proteínas de endometriosomas se analizaron mediante ANOVA o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para saber si existían diferencias entre los tratamientos y mediante el test post-hoc de Tukey o de Dunn, respectivamente, para identificar las diferencias. El nivel de significancia establecido para todas las pruebas estadísticas fue $p < 0,05$.

RESULTADOS

Aislamiento y cultivo de las CEEP y CEES

Las CEEP, CEES y BOEC fueron aisladas y cultivadas correctamente. La capacidad proliferativa de los 3 tipos celulares se evaluó hasta el pasaje 7 con éxito, sin cambios aparentes en su morfología. La morfología de las CEEP, CEES y BOEC coincide con la reportada en la literatura (**Fig. 7**) (Walter, 1995; Krishnaswamy et al., 2009). Por otro lado, como se puede observar en la **Figura 8**, las CEEP y BOEC resultaron ser positivas para citoqueratina y negativas para vimentina, mientras que las CEES fueron positivas para vimentina y negativas para citoqueratina, coincidiendo con los fenotipos esperados (Krishnaswamy et al., 2009). Finalmente, la citometría por microscopia de fluorescencia mostró que los 3 tipos de cultivo tenían una pureza del 100% (**Fig. 9**).

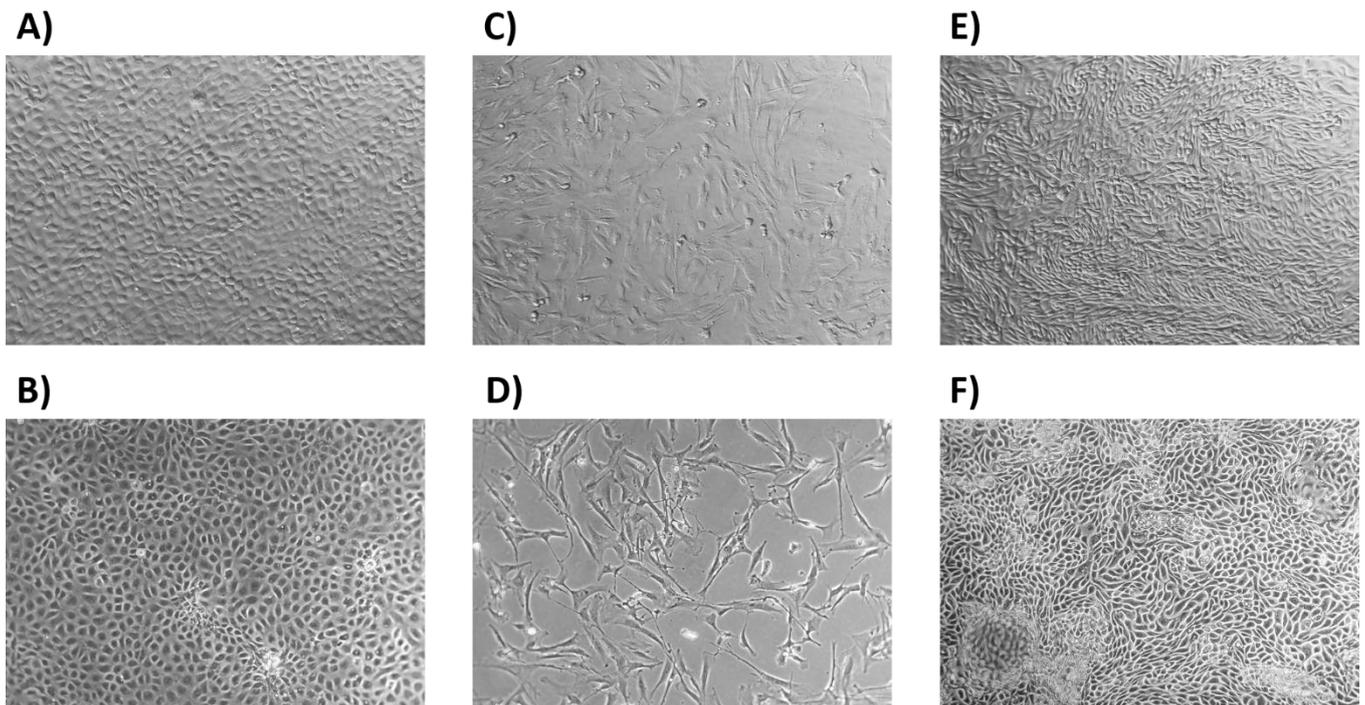


Figura 7: Caracterización morfológica de las CEEP, CEES y CEOP por microscopia en campo claro y de contraste de fases. En A), C) y E) se observa la morfología de las CEEP, CEES y BOEC en campo claro, respectivamente. B), D) y F) Corresponden a las CEEP, CEES y BOEC en contraste de fases, respectivamente.

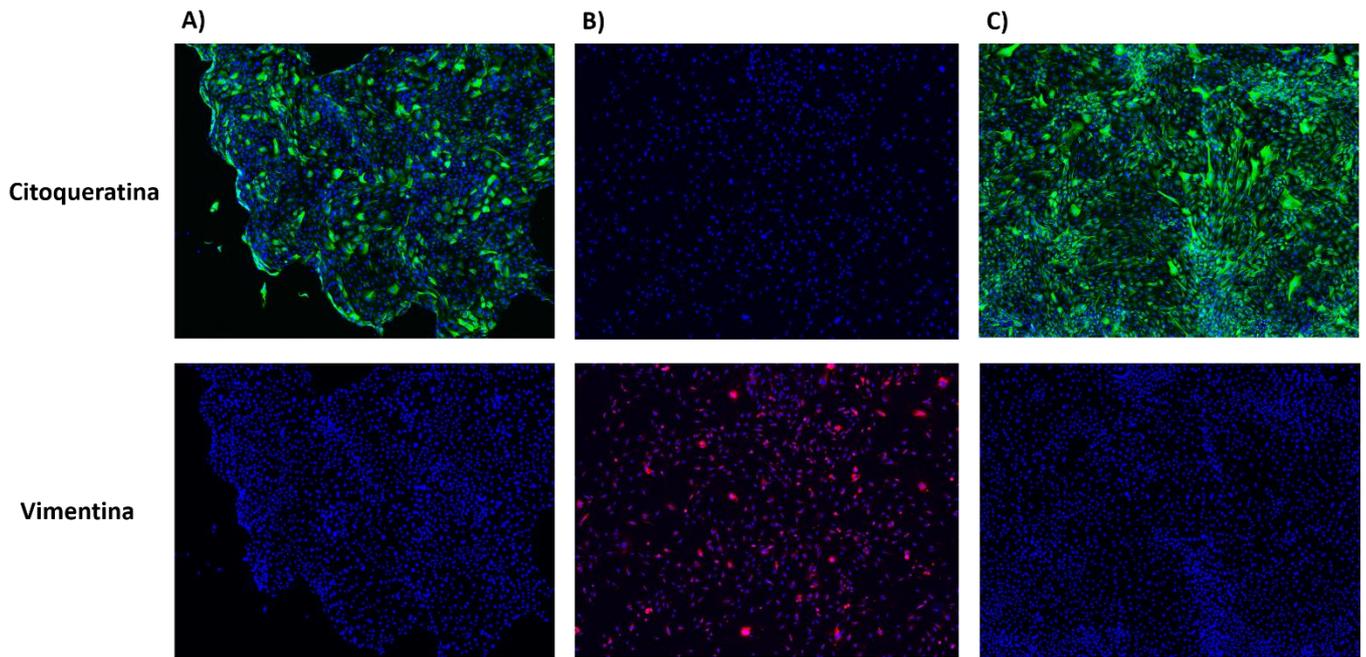


Figura 8: Inmunofluorescencia por microscopia de fluorescencia. A), B) y C) Corresponden a las CEEP, CEES y BOEC, respectivamente. El fluoróforo azul corresponde a Hoechst 33342, utilizado para marcar el ADN en el núcleo celular. El fluoróforo verde corresponde a Alexa Fluor 488 conjugado al anticuerpo secundario, cuyo antígeno es el anticuerpo anti-citoqueratina. El fluoróforo rojo corresponde a Alexa Fluor 647 conjugado al anticuerpo primario anti-vimentina.

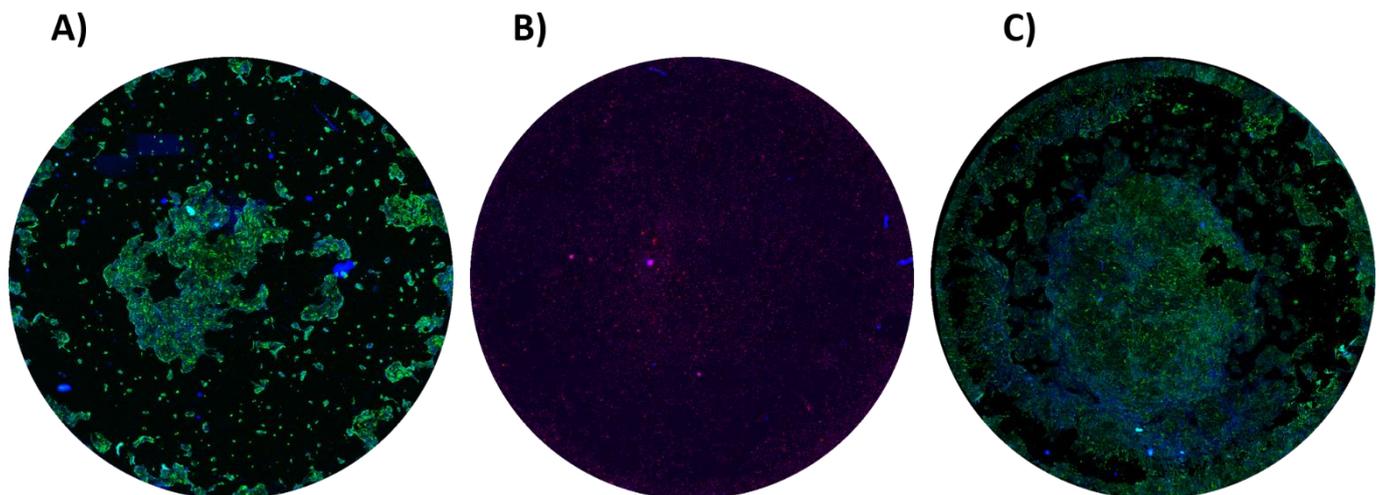


Figura 9: Evaluación de la pureza de los cultivo mediante un *scanning* mediante citometría por microscopia de fluorescencia. A), B) y C) Corresponden a microfotografías representativas de pocillos de 14 mm cultivados con CEEP, CEES y BOEC, respectivamente. No se observan colonias de células incorrectas en ninguno de los pocillos.

Aislamiento y caracterización de endometriomas pequeños

Los endometriomas provenientes de ambos tipos celulares fueron aislados con éxito. La microscopía electrónica de barrido de transmisión (STEM), develó una morfología vesicular coincidente con las sEVs reportadas en la literatura (**Fig. 10**). Por otra parte, la inmunodetección mediante western blot de

los marcadores proteicos específicos de sEVs, validó lo observado en las microfotografías obtenidas por STEM, debido a que se pudieron observar bandas específicas que se corresponden con los pesos moleculares de las proteínas CD9, CD63 y TSG101 (**Fig. 10C**). En cuanto al análisis del tamaño de partículas por DLS, este develó un diámetro promedio de 202,6 y 214,9 nm para los endometriomas provenientes de las CEEP y CEES, respectivamente, mientras que no se observaron partículas de un tamaño similar en un control realizado con el reactivo *Total Exosome Isolation* (**Fig. 10D, 10E y 10F**).

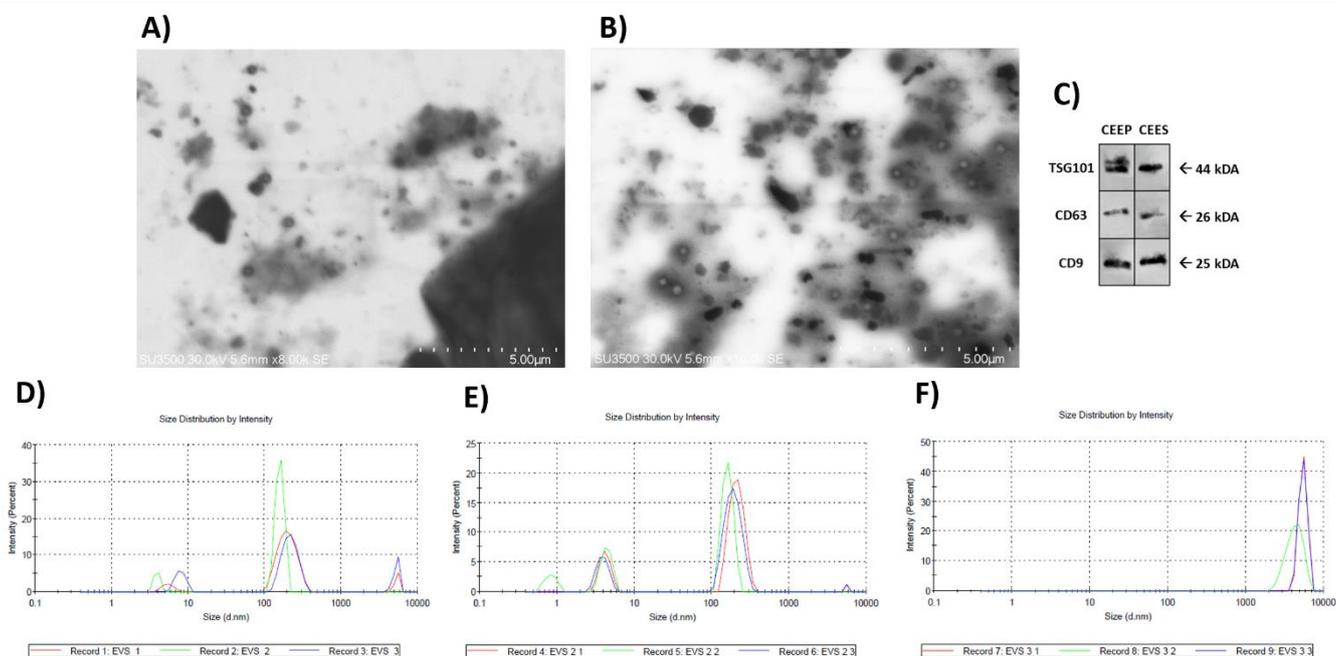


Figura 10: Caracterización fenotípica de los endometriomas. A) microfotografía obtenida por STEM de los endometriomas provenientes de las células endometriales epiteliales. B) microfotografía obtenida por STEM de los endometriomas provenientes de las células endometriales estromales. C) Inmunodetección mediante western blot de las proteínas CD9, CD63 y TSG101. D), E) y F) Corresponden al análisis del tamaño de partículas por DLS de los endometriomas de las CEEP, CEES y un control sin sEVs, respectivamente.

Estimación de la tasa de secreción de proteína de endometriomas de las CEEP, CEES y BOEC

Los análisis por citometría de flujo revelaron que en cada pocillo de 15,5 mm, cuando las CEEP, CEES y BOEC llegan a una confluencia del 100%, hay aproximadamente 40.000, 60.000 y 120.000 células totales, respectivamente (**Fig. 11A**). El número de células totales se estimó en proporción a la cantidad de eventos contabilizados por el equipo en 30 μL. Por otra parte, la cuantificación de proteínas mediante el ensayo de Micro-BCA de endometriomas proveniente las CEEP, CEES y BOEC, develó que en un pocillo de 15,5 mm se secretan aproximadamente 35, 20 y 90 ng de proteínas de sEVs por hora, respectivamente (**Fig. 11B**). Por lo tanto, según los datos anteriores la tasa de secreción de proteínas de sEVs por hora de una sola CEEP, CEES y BOEC, corresponde aprox. a 800, 350 y 700 fg, respectivamente (**Fig. 11C**). No existe una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de secreción de proteína de sEVs aparente entre los 3 distintos tipos celulares.

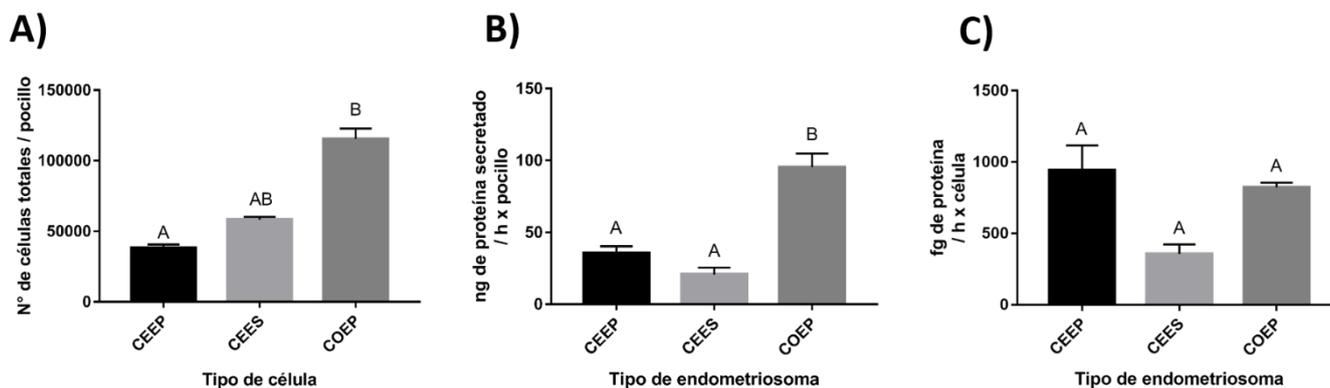


Figura 11: Tasa de secreción de proteínas de sEVs de las CEEP, CEES y BOEC. A) Recuento del número de células en pocillos de 15,5 mm al 100% de confluencia. B) nanogramos de proteínas de sEVs secretadas por hora en cada pocillo de 15,5 mm. C) femtogramos de proteínas de sEVs secretada por hora por una sola célula. Los datos están expresados como porcentaje \pm D.E. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Efecto de los endometriomas de las CEES y CEEP sobre el desarrollo y calidad de los embriones bovinos preimplantacionales

Los resultados indican que entre ambos controles y los endometriomas no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto al clivaje y la tasa de blastocitos, mientras que los endometriomas provenientes de las CEEP sí muestran una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tratamientos control en cuanto al clivaje y la tasa de blastocitos. Los datos se muestran en detalle en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Desarrollo de embriones bovinos generados mediante FIV suplementados con endometriomas en el día 0 de cultivo

Tratamiento	n	No. de embriones clivados (%)	No. de blastocitos (%)
Control	125	101 (80,8) ^a	36 (28,8) ^a
Vehículo	122	98 (80,3) ^a	32 (26,2) ^a
CEES	125	111 (88,8) ^{ab}	43 (34,4) ^{ab}
CEEP	124	119 (95,9) ^b	54 (43,5) ^b

El clivaje se registró pasadas 72 h de cultivo y la tasa de blastocitos se registró al día 7 de cultivo. Los datos mostrados corresponden a 5 repeticiones. Los grupos CEES y CEEP se suplementaron con 80 ng/ μ L de proteína de endometrioso. ^{a,b} Los datos seguidos de diferentes superíndices en la misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$).

Internalización de los endometriomas en los embriones bovinos

Las microfotografías z-stack obtenidas por microscopía confocal, muestran una alta internalización de endometriomas en los embriones, mientras que en el control no se observaron patrones similares (**Fig. 12**). Los endometriomas de las CEEP parecen tener una distribución más uniforme en el embrión, que los endometriomas de las CEES.

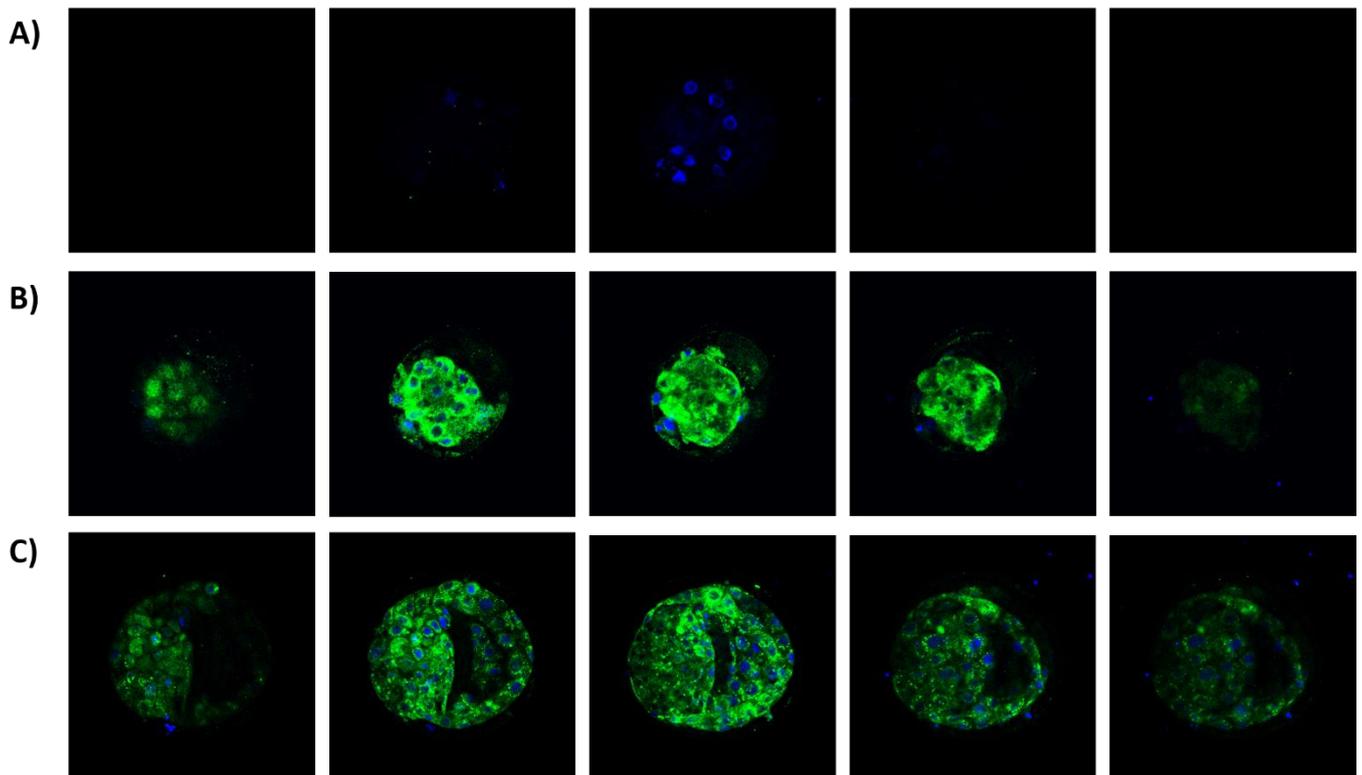


Figura 12: Microfotografías z-stack representativas obtenidas por microscopía confocal. A) Embrión no suplementado con endometriosomas. B) Embrión suplementado con endometriosomas de CEES. C) Embrión suplementado con endometriosomas de CEEP.

Validación de Constructos

El pTMB fue construido adecuadamente según muestran los resultados de resistencia a ampicilina por parte de las bacterias transformadas (**Fig. 13A**) y la expresión del mCherry y la resistencia a blasticidina en las células endometriales transfectadas con el pTMB (**Fig. 15**). También se realizó la PCR al ADN plasmidial extraído de las bacterias con el fin de validar la presencia del policistrón TAG-mCherry, el cual se puede apreciar en la **Fig. 13B**. Por otro lado, la inserción del ARNg dirigido al gen NDRG1 y la transformación de las bacterias con el plásmido portador del ARNg también fue confirmada mediante Colony-PCR y la resistencia a ampicilina de que muestran las bacterias, respectivamente (**Fig. 14**).

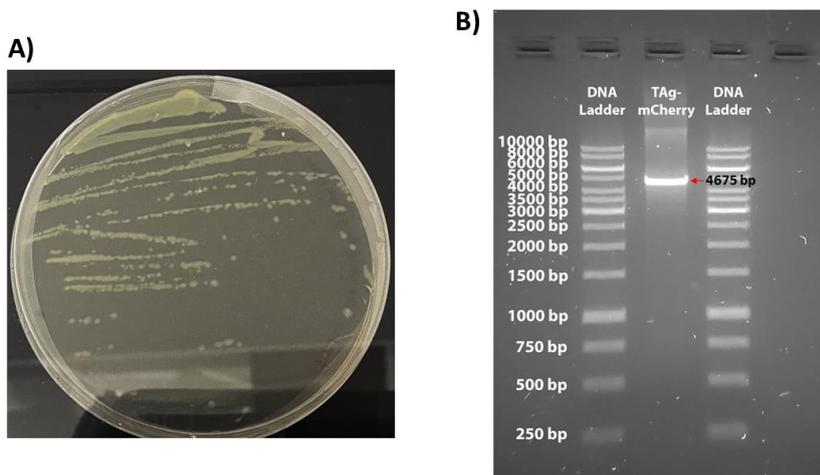
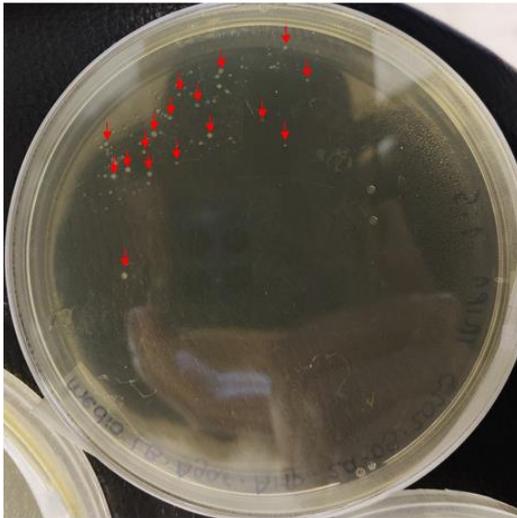


Figura 13: Bacterias resistentes a ampicilina transformadas con el pTMB.

A) placa con medio LB suplementado con ampicilina en donde se pueden apreciar colonias blancas de bacterias *E. coli* DH5 alfa sembradas en estrías, las cuales son resistentes al antibiótico debido a que portan copias del pTMB. B) Electroforesis del resultado de una PCR realizada al ADN

plasmídico extraído de las bacterias, se puede apreciar un amplicón de 4675 pb que concuerda con el policistrón TAG-mCherry. La escalera de ADN corresponde al Estándar de ADN de 1 kb GeneRuler (Cat. #SM0311 – ThermoFisher)

A)



B)

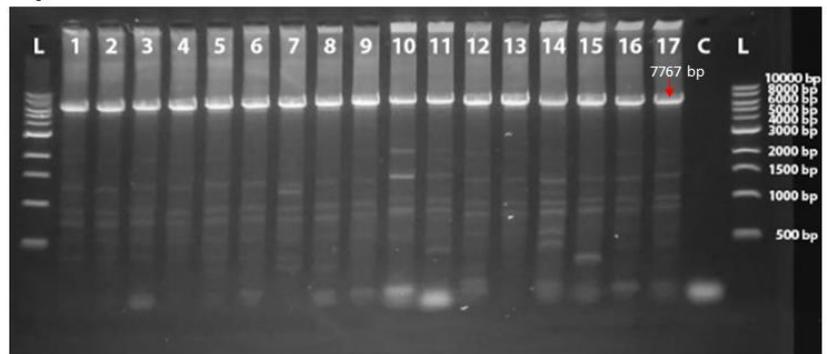


Figura 14: Bacterias resistentes a ampicilina transformadas con el pCEB-ARNg-NDRG1. A) Placa con medio LB suplementado con ampicilina en donde se pueden apreciar colonias blancas aisladas de bacterias *E. coli* DH5 alfa, al día siguiente de la transformación con el pCEB-ARNg-NDRG1, las cuales son resistentes al antibiótico debido a que portan copias de dicho plásmido. B) Electroforesis del resultado de la Colony-PCR realizada a las colonias bacterianas de la figura A. Cada carril enumerado en el gel de agarosa corresponde a cada una de las colonias analizadas, apreciándose en todos los carriles un amplicón definido de 7767 pb que concuerda con lo esperado, validando la presencia del ARNg-NDRG1 en el pCEB. El carril C corresponde a una PCR control realizada al pCEB sin el ARNg-NDRG1. La escalera de ADN corresponde al Estándar de ADN de 1 kb (Cat. # N3232S – New England Biolabs).

Inmortalización de las Células

Las fotografías de fluorescencia revelan que la expresión del policistrón TAG-mCherry es positiva en ambos tipos celulares (**Fig. 15**). La validación de la correcta transfección e inmortalización se confirmó mediante la adición de la blasticidina, siendo también ambos tipos celulares resistentes al antibiótico, mientras que los controles, sin resistencia a blasticidina, mostraron la muerte de todas las células luego de 5 días de la adición del antibiótico al medio de cultivo celular.

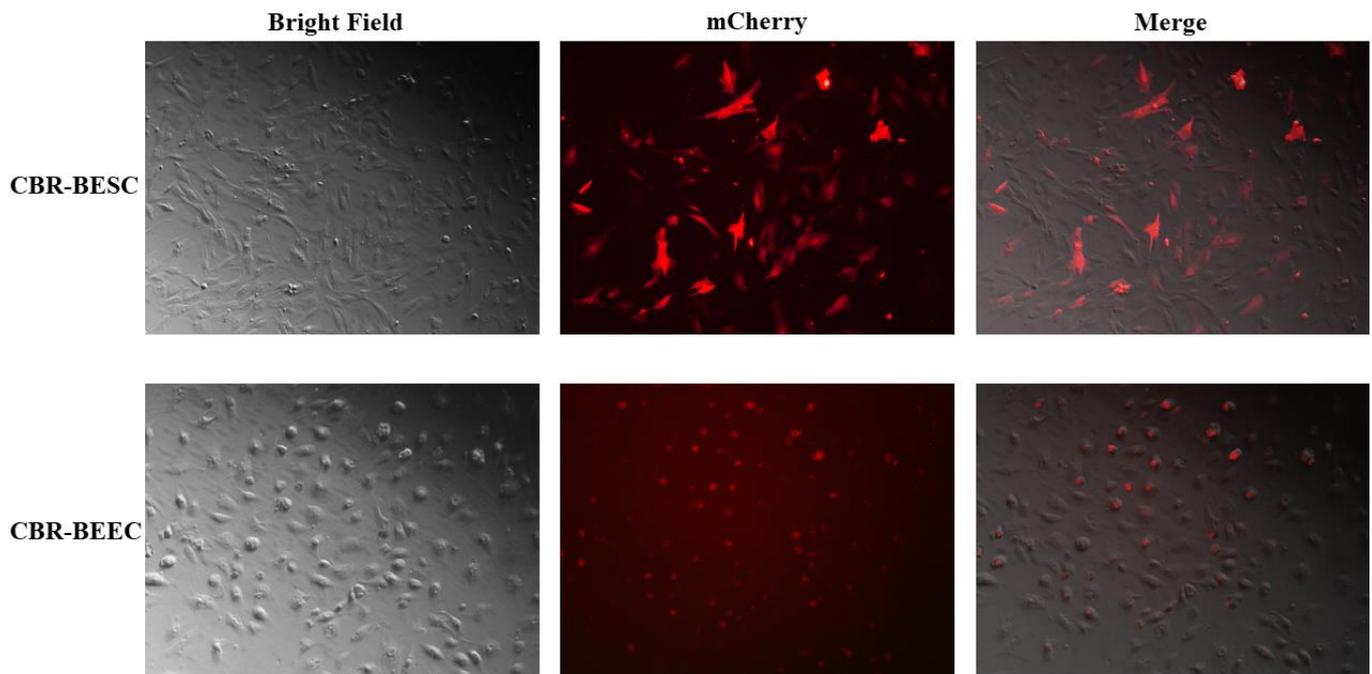


Figura 15: Expresión de la mCherry 72 horas después de la transfección de las células CEES y CEEP con el plásmido pTMB. En la figura se pueden apreciar a ambos tipos celulares expresando la proteína fluorescente roja mCherry confirmando la expresión del policistrón TAg-mCherry y por lo tanto la inmortalización de las CEES y CEEP.

Edición genética mediante CRISPR-Cas9

La transfección correcta del pCEB se confirmó por visualización de la expresión del policistrón Cas9-EGFP mediante microscopia de fluorescencia (**Fig. 16**). La validación de la edición se realizó mediante el ensayo EIT7, en donde se confirmó la presencia de INDELS en el gen NDRG1 al observarse 3 bandas (**Fig. 17**).

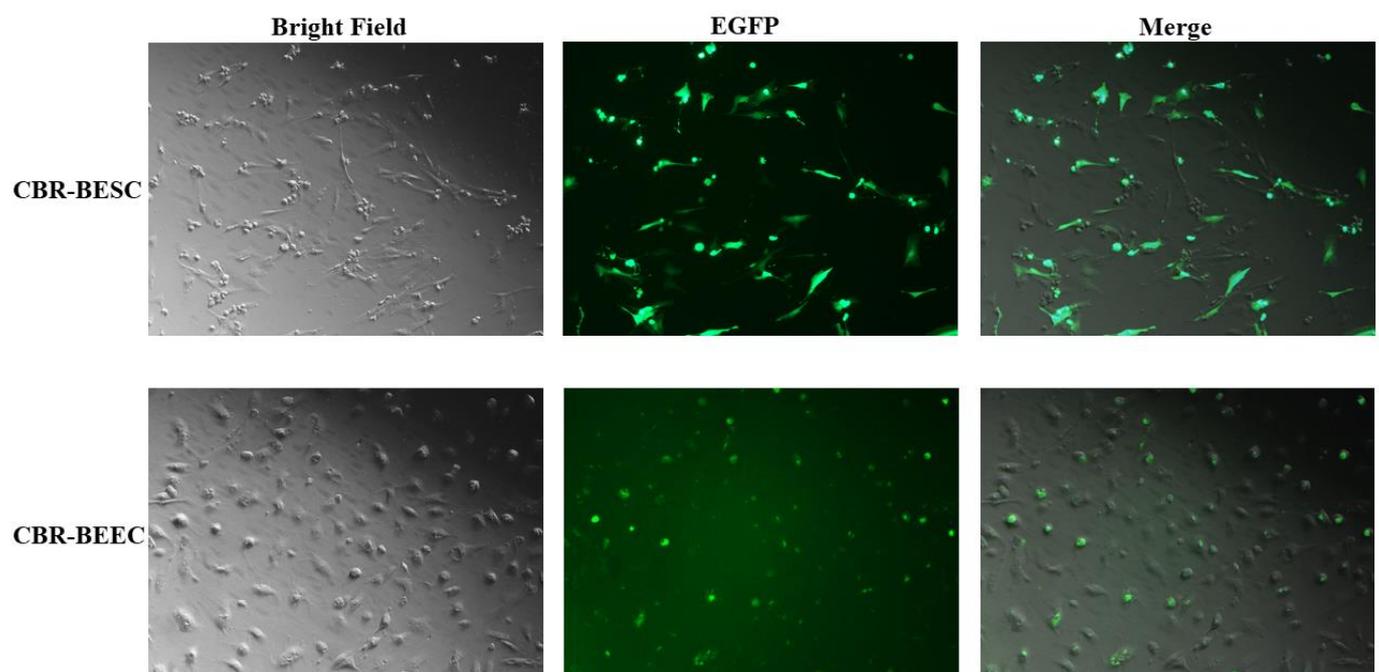


Figura 16: Expresión de la EGFP 72 horas después de la transfección de las líneas celulares CBR-BESC y CBR-BEEC. En la figura se pueden apreciar a ambas líneas celulares expresando la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) confirmando la expresión del policistrón Cas9-EGFP.

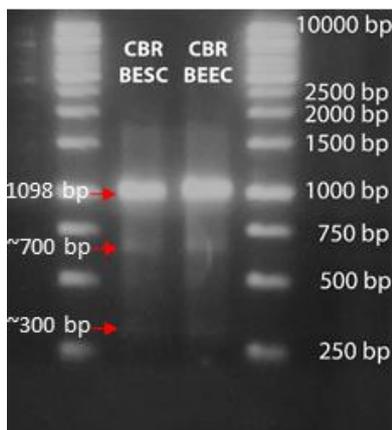


Figura 17: Ensayo de la Endonucleasa I del Virus T7 (EIT7 Assay). En la figura se puede observar un gel de electroforesis que muestra el resultado de la digestión enzimática con la Endonucleasa I del Virus T7 de los ADN mezclados (Mutado-WildType). El mix de homoduplex y heteroduplex se confirma debido a las 3 bandas en cada carril. La banda de 1098 pb corresponde a los homodúplex sin presencia de INDELS, mientras que las banda de aproximadamente 700 y 300 pb corresponden a los heterodúplex que al contener bucles de ADN monocatenario producto de los INDELS fueron cortados por la EIT7, confirmando de esta forma el knock-out del gen NDRG1 en las líneas celulares CBR-BESC y CBR-BEEC. Es importante mencionar que la suma de las bandas de 700 y 300 pb debe ser igual a la banda superior de 1098 pb.

Determinación de la concentración y tasa de secreción de sEVs

Los resultados obtenidos por el equipo Nanosight, mostraron que el diámetro promedio de las sEVs secretadas por las CEES, CEEP, CBR-BESC-UPEX, CBR-BEEC-UPEX y BOEC fue de 160, 169, 207, 151 y 155 nm, respectivamente (**Fig. 18**). En cuanto a la concentración de sEVs/mL, se observó que los medios condicionados por las CEES, CEEP, CBR-BESC-UPEX, CBR-BEEC-UPEX y BOEC contenían $9,64 \times 10^7$, $2,06 \times 10^7$, $1,67 \times 10^8$, $2,39 \times 10^8$ y $1,96 \times 10^9$ sEVs/mL, respectivamente (**Fig. 18**). Por otro lado, los resultados del análisis de seguimiento de nanopartículas mostraron un aumento significativo en la tasa de secreción de sEVs por parte de las y CBR-BEEC-UpEx (65 sEVs/h) con respecto a sus homologas WildType (13 sEVs/h), confirmando que la edición del gen NDRG1 mejora la tasa de secreción de sEVs en esta línea celular (**Fig. 19**). En el caso de las CEES y CBR-BESC-UPEX se observó una tasa de secreción de 18 sEVs/h y 26 sEVs/h, respectivamente (**Fig. 19**). En cuanto a las BOEC su tasa de secreción de sEVs por hora en un pocillo con un diámetro de 15,5 y su tasa de secreción de sEVs por hora por célula, fueron de 14.189.815 sEVs/h y 118 sEVs/h por célula, respectivamente.

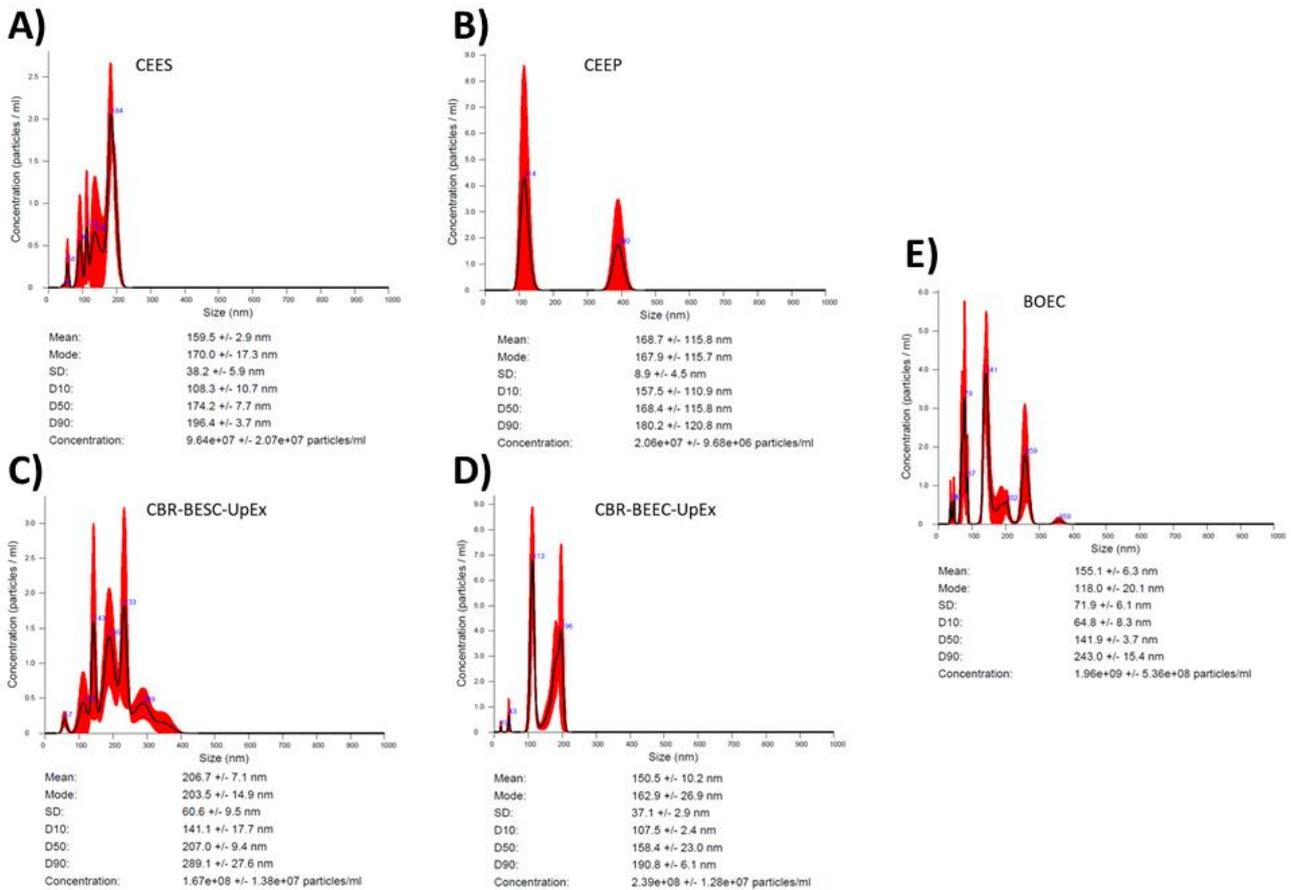


Figura 18: Reporte del análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Se puede apreciar el diámetro y la concentración promedio de las sEVs secretadas por las CEES, CEEP, CBR-BESC-UPEX, CBR-BEEC-UPEX y BOEC.

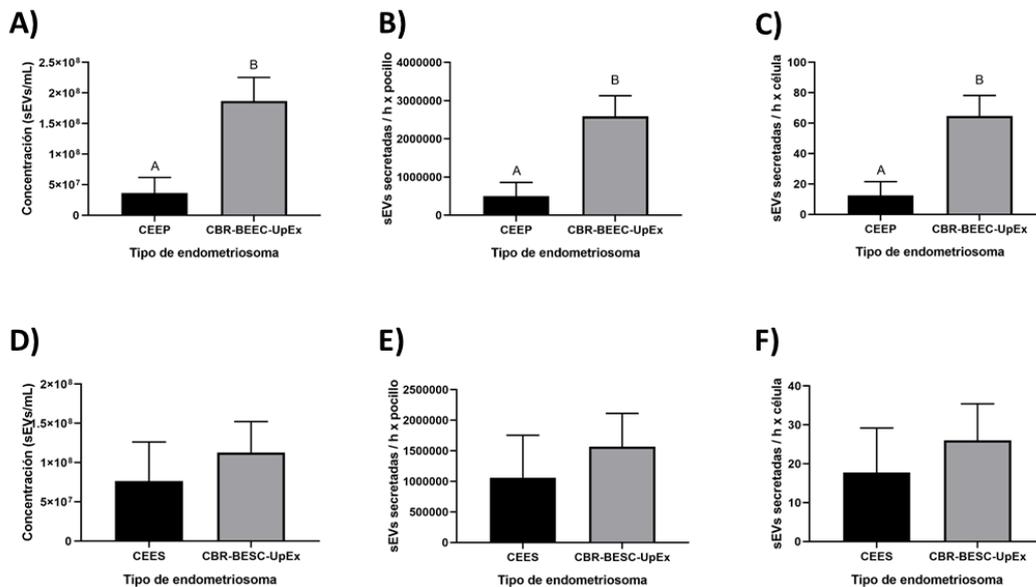


Figura 19: Tasa de secreción de sEVs. Las figuras A y D, B y E, y C y F, muestran la concentración total de sEVs, la tasa de secreción de sEVs por hora en un pocillo con un diámetro de 15,5, y la tasa de secreción de sEVs por hora por célula, respectivamente. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Efecto de los endometriosomas de las CBR-BESC-UpEx y CBR-BEEC-UpEx sobre el desarrollo y calidad de los embriones bovinos preimplantacionales

Los resultados indican que entre el control y los embriones tratados con las sEVs de las CBR-BESC-UpEx no hay diferencias significativas en cuanto al clivaje y la tasa de blastocistos, mientras que los endometriosomas proveniente de las CBR-BEEC-UpEx si muestran una diferencia estadísticamente significativa con respecto al tratamiento control en cuanto al clivaje y la tasa de blastocistos. Los datos se muestran en detalle en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Desarrollo de embriones bovinos generados mediante FIV suplementados con endometriosomas de células endometriales editadas

Tratamiento	n	No. de embriones clivados (%)	No. de blastocistos (%)
Control	177	148 (82,2) ^a	57 (31,7) ^a
CBR-BESC-UpEx	178	153 (86,0) ^{ab}	64 (36,0) ^a
CBR-BEEC-UpEx	180	159 (89,8) ^b	75 (42,4) ^b

El clivaje se registró pasadas 72 h de cultivo y la tasa de blastocistos se registró al día 7 de cultivo. Los datos mostrados corresponden a 7 repeticiones. Los grupos CBR-BESC-UpEx y CBR-BEEC-UpEx se suplementaron con 400.000 endometriosomas el día 3 de cultivo. a,b Los datos seguidos de diferentes superíndices en la misma columna, difieren significativamente ($p < 0,05$).

Análisis de expresión génica relativa por RT-qPCR

Los análisis de expresión relativa de genes mediante RT-qPCR muestran diferencias estadísticamente significativas en los genes CDX2 y CASP3 implicados en la diferenciación y muerte celular, respectivamente (**Fig. 20**).

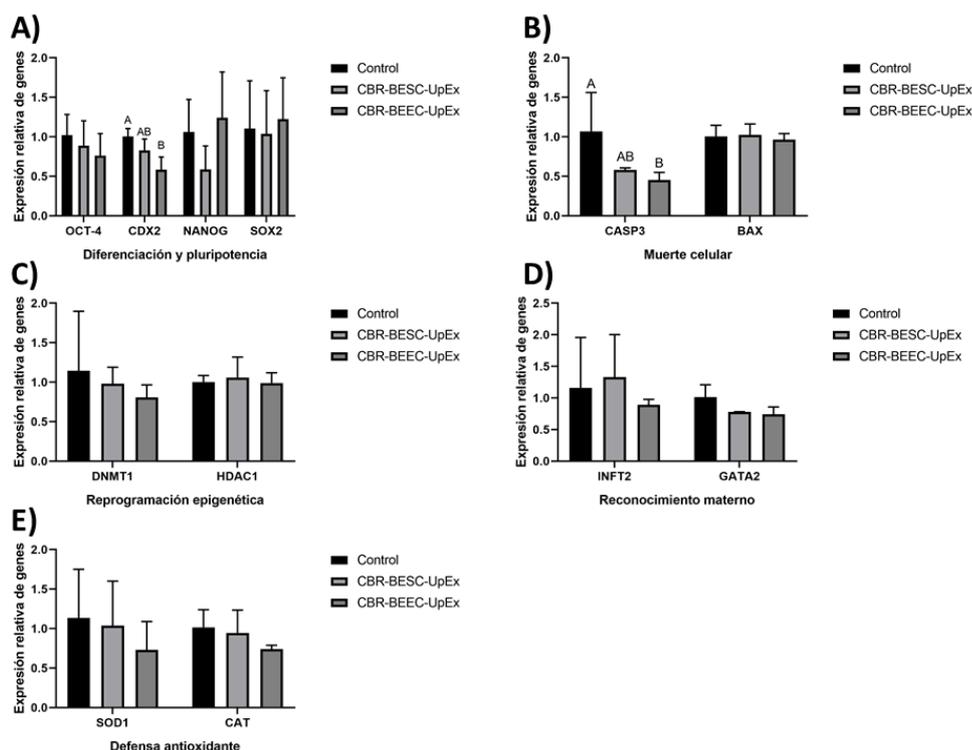


Figura 20: Análisis por RT-qPCR de la expresión génica relativa en los embriones producidos por FIV. A – E se puede apreciar la expresión relativa de los distintos genes estudiados, ordenados por su función celular. Las distintas letras en la parte superior de las barras indican diferencias estadísticamente significativas.

Caracterización y determinación del contenido de ARNm en las sEVs

Con el fin de caracterizar y determinar el contenido de ARNm de las sEVs secretadas por las BOEC, CBR-BESC-UpEx y CBR-BEEC-UpEx, se realizó una RT-qPCR para identificar y cuantificar la presencia de transcritos de los genes OCT-4, CDX2, NANOG, SOX2, IFNT2, GATA2, SOD1, CAT, DNMT1, HDAC1 y CASP3. Como control negativo, para descartar posibles contaminaciones se utilizaron los genes housekeeping SF3A1, HMBS y PPIA los cuales se tiene evidencia que están presentes en embriones. Los resultados muestran que en los oviductosomas hay presencia de ARNm de los genes OCT-4, DNMT1, IFNT2 y CAT. Por su parte, los endometriosomas de las CBR-BESC-UpEx contienen transcritos de los genes OCT-4, DNMT1, IFNT2 y SOD1, mientras que las sEVs provenientes de las CBR-BEEC-UpEx contienen ARNm de los genes OCT4, CDX2, IFNT2 y CAT (**Fig. 21**). Finalmente con el fin de caracterizar las proteínas de las sEVs aisladas por SEC, se realizó la inmunodetección de las tetraspaninas CD9 y CD63, ubicadas en la membrana de los exosomas y de la proteína TSG101, ubicada en su lumen. Citocromo c fue utilizado como control negativo, debido a que esta proteína es abundante en lisados celulares, pero no en los lisados de sEVs. Los resultados del inmunoensayo se presentan en la **Figura 22**.

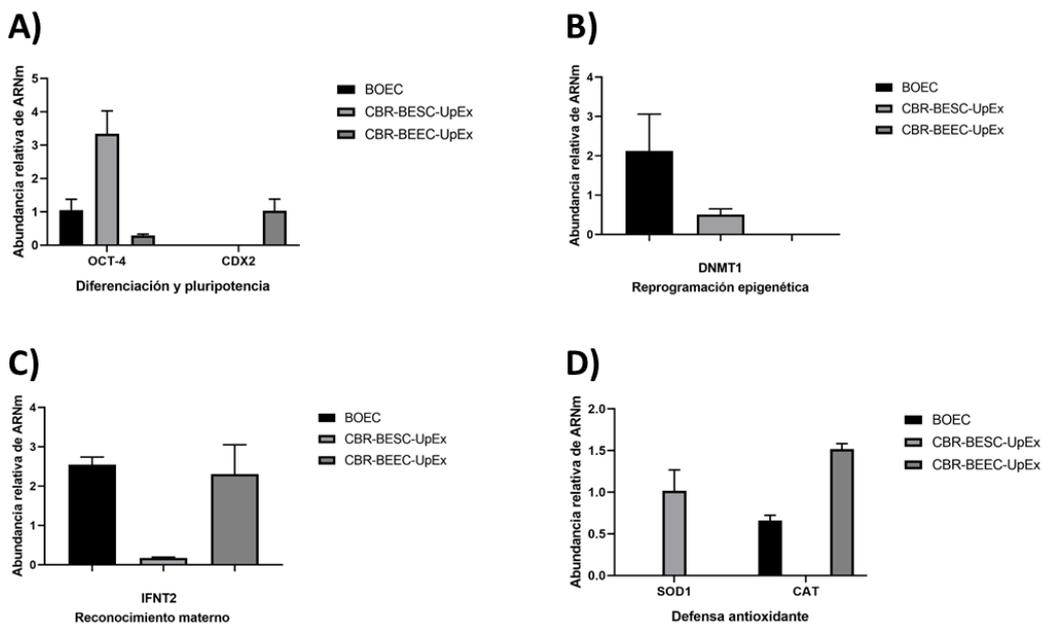


Figura 21: Análisis por RT-qPCR de la abundancia relativa de ARNm en los oviductosomas y endometriosomas. A – C se puede apreciar la abundancia relativa de los distintos ARNm de los genes estudiados, ordenados por su función celular.

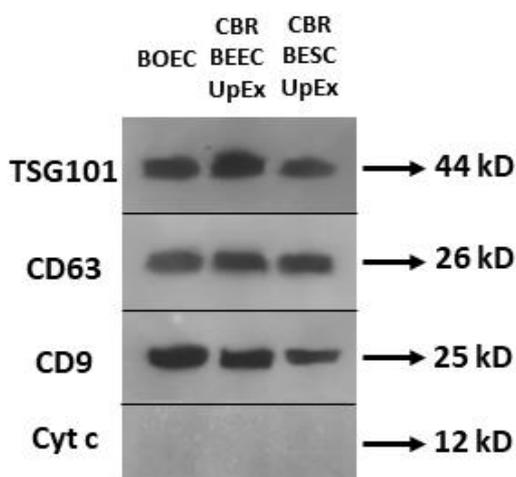


Figura 22: Caracterización de las sEVs mediante Western Blot. En la figura se puede apreciar la inmunodetección mediante western blot de las proteínas CD9, CD63 y TSG101 mediante un extracto proteico de las BOEC, CBR-BEEC-UpEx y CBR-BESC-UpEx. La proteína mitocondrial Citocromo C (Cyt c), fue utilizada como control negativo.

DISCUSIÓN

La principal función de las CEEP es secretar factores que acondicionen el ambiente uterino para la implantación del presunto embrión, mientras que las CEES juegan el rol de soporte del tejido endometrial. No obstante, ambos tipos celulares tienen funciones a nivel yuxtacrino y paracrino relevantes para el embrión, siendo la implantación y desarrollo embrionario uno de sus principales objetivos (Simón et al., 2000; Ng et al., 2013; Koh et al., 2016). De esta forma, cuando no existe fecundación, tanto las CEEP como las CEES son reabsorbidas por el miometrio en cada ciclo estral (Wang et al., 2007). Por otro lado, cuando ocurre la fecundación y posterior implantación, las células endometriales decidualizadas dan origen a la fracción materna de la placenta (Benner et al., 2018). Debido a lo anterior, las células endometriales tienen una naturaleza relativamente efímera y su fenotipo no está preparado para mantenerse por largos periodos de tiempo. En el presente trabajo, las CEEP y CEES pudieron mantenerse por al menos 7 pasajes.

Durante este trabajo de tesis doctoral se observó que el suero fetal bovino libre de esteroides (SFBle), no es una buena alternativa como fuente de nutrientes para las células endometriales bovinas en cultivo, ya que las células crecían más lento y perdían su morfología inicial más rápidamente, entrando en el estado de senescencia (Hernandez-Segura et al., 2018). Lo anterior se revirtió cuando se reemplazó el SFBle por suero fetal bovino estándar (SFB). El mal desarrollo de las células con el SFBle, puede deberse a al tratamiento con carbón activado para eliminar los esteroides del suero, pudiendo ser un procedimiento inespecífico que elimina otros nutrientes esenciales para el correcto cultivo celular. Durante 7 pasajes las CEEP aisladas mostraron un fenotipo acorde a lo reportado por otros trabajos como el de Krishnaswamy et al. (2009), ya que presentaron una morfología redondeada, y en la inmunofluorescencia fueron positivas para la citoqueratina y negativas para la vimentina, siendo ambas características típicas en células epiteliales. Por su parte, durante 7 pasajes, las CEES aisladas también presentaron un fenotipo que concuerda con lo reportado por Krishnaswamy et al. (2009), ya que se observó una morfología fibroblástica, y fueron positivas para vimentina y negativas para citoqueratina. Mantener las células cultivadas en un estado óptimo resulta esencial para aislar sus sEVs, ya que se ha reportado que las células senescentes secretan sEVs que modifican de forma negativa su microambiente (Takasugi, 2018), los cuales podrían tener un efecto perjudicial sobre la calidad y desarrollo de los embriones bovinos. No obstante, aunque la capacidad proliferativa y morfología de las células no se vea afectada por los reiterados pasajes, Murakami et al. (2003) han demostrado que las CEEP y CEES, no pueden conservar su fisiología uterina más allá de los pasajes 2 y 4, respectivamente (Murakami et al., 2003). Lo anterior sugiere que las células sufren una modificación importante de su fenotipo, que podría alterar los efectos de sus endometriosomas sobre los embriones, por lo que no es recomendable utilizar sus sEVs para realizar ensayos de actividad biológica una vez alcanzada dicha cantidad de pasajes.

Por otro lado, es interesante mencionar que la capacidad de adherirse a la superficie de cultivo y de alcanzar la confluencia celular de las CEES, fue siempre mayor que la de las CEEP, lo cual puede deberse a la naturaleza de ambos tipos celulares. En el caso de la velocidad de proliferación de las CEES, esta característica resulta ser determinante durante la fase proliferativa del endometrio, en donde se produce un aumento de aproximadamente el 20% del volumen del tejido endometrial en 4 días (Dhaliwal et al., 2002). En cuanto a la baja velocidad de adhesión de las CEEP, la cual se produce aproximadamente a las 48 horas de cultivo (mientras que la de las CEES a las 4 horas aproximadamente), esta puede deberse a que tales células están preparadas fisiológicamente para adherirse a la matriz extracelular de colágeno que es fabricada principalmente por las células estromales (Asselin et al., 1996; Schwarz, 2015). Por lo tanto, en ausencia de CEES y colágeno, las CEEP pueden tener una mayor dificultad para adherirse a la superficie de cultivo (Asselin et al., 1996). En cuanto a las BOEC aisladas, su fenotipo concuerda con el reportado por Walter (1995), destacando además que es común que las cultivos primarios de BOEC se agrupen formando estructuras esféricas como las que se observan en la **Fig. 7C**. Es interesante mencionar que la velocidad de adhesión y proliferación de las BOEC es mayor que de las CEEP, facilitando mucho más su cultivo.

Los endometriosomas son los intermediarios de la comunicación entre las células endometriales y el embrión. Para que esto ocurra, distintas proteínas presentes en la membrana de las sEVs, como integrinas y tetraspaninas, deben permanecer intactas para interactuar con la superficie de su célula target y de esta forma llevar a cabo el proceso fusogénico (Griffiths et al., 2008; Al-Dossary et al., 2015; Niu et al., 2017). De acuerdo a lo anterior, se ha demostrado que protocolos basados en ultracentrifugación pueden resultar destructivos y reducir o acabar con la actividad biológica de las vesículas extracelulares, principalmente dañando a las proteínas implicadas en el proceso fusogénico (Niu et al., 2017). Por lo tanto, en el presente trabajo se optó por un enfoque menos agresivo, aislando los endometriosomas mediante precipitación basada en polímeros. En tal metodología las sEVs no se expusieron a velocidades superiores a los 20.000 RCF. Se ha demostrado que la precipitación basada en polímeros tiene la capacidad de aislar sEVs sin reducir su actividad biológica, conservando tanto proteínas, como ácidos nucleicos (Tang et al., 2017; Niu et al., 2017; Patel et al., 2019). Además, la eficiencia en el número de sEVs aisladas no difiere de los protocolos basados en la ultracentrifugación (Patel et al., 2019), sumando también la ventaja de no necesitar equipamiento costoso como ultracentrífugas para llevar a cabo el proceso de aislamiento, lo que hace mucho más fácil de implementar este tipo de metodología en los distintos laboratorios. El actual trabajo utilizó el kit comercial “*Total Exosome Isolation*” (Cat. #4478359 – ThermoFisher), que se basa en un polímero patentado con características similares a las del polietilenglicol (PEG). El polímero al ser mezclado con el medio de cultivo condicionado por las células, paraliza las moléculas de agua y expulsa a los componentes menos solubles como los endometriosomas, permitiendo recuperarlos mediante centrifugaciones a baja velocidad. En el presente trabajo, se demostró que es posible aislar los endometriosomas desde el medio de cultivo condicionado por las CEEP CEES, y BOEC mediante este enfoque. No obstante, las trazas del reactivo *Total Exosome Isolation*, resultaron ser altamente embrióticas, deteniendo el 100% del desarrollo embrionario al día 2 de cultivo. Por lo tanto, se buscó una metodología para limpiar los endometriosomas del reactivo de precipitación, optando por eluir el medio que contiene los endometriosomas a través de una membrana de policarbonato con poros de 10 nm generados por *Track Etch*. Este tipo de membranas tiene un tamaño y distribución de poros uniforme en comparación a membranas de profundidad como por ejemplo las utilizadas en los dispositivos de ultrafiltración vivaspin. La diferencia entre la membrana con poros generados por *Track Etch* o “grabado en pista”, es que esta se trata de un nanofiltro de una sola capa, mientras que las membranas de profundidad se componen por un entramado de fibras superpuestas con poros de tamaño variable, lo que da lugar a la pérdida de las sEVs más pequeñas y a la acumulación de proteínas extracelulares (Niu et al., 2017), reduciendo la pureza de las sEVs aisladas. Por su parte, las membranas de una sola capa funcionan como un colador y debido su menor superficie de contacto se reduce la cantidad de proteínas que pudieran copurificarse con los endometriosomas. Además, todos los poros de la membrana de policarbonato son en teoría de 10 nm, lo cual imposibilita la pérdida de los endometriosomas más pequeños. No obstante, es importante destacar que se debe evitar que la muestra que se eluya a través de la membrana contenga altas concentraciones de sales y proteínas, ya que se corre el riesgo de obstruir los nanoporos. Durante el diseño de la metodología de elución, se probó utilizar presión negativa mediante una bomba de vacío, no obstante la presión ejercida por la bomba no fue suficiente para generar un flujo por la membrana. El uso de holders de filtros para jeringas se descartó rápidamente debido a la posible extrusión de los endometriosomas a través de los nanoporos. Por lo tanto, según lo anterior, se optó por utilizar un holder centrífugo reutilizable.

En las microfotografías de los endometriosomas obtenidas por STEM presentadas en el avance 3, se puede ver que el interior de las sEVs es más denso, observándose más oscuro que las sEVs aisladas por ultrafiltración. Este fenómeno puede observarse también en los resultados de Niu et al. (2017), en donde se aprecia que las sEVs aisladas con el reactivo de precipitación se ven de un color oscuro en comparación a las sEVs aisladas por ultrafiltración, lo cual concuerda con los resultados de este trabajo. Por su parte, los análisis de tamaño por DLS, evidenciaron que las partículas recuperadas desde la parte superior del nanofiltro coinciden con las dimensiones que se espera que tengan las sEVs.

En cuanto a los endometriomas liberados por las CEES, estos no parecen tener un efecto significativo en el desarrollo embrionario, lo cual puede deberse a que en el entorno materno, este tipo de células no interactúa directamente con el presunto embrión. Por su parte, las células que sí interactúan directamente con el embrión son las CEEP, y sus sEVs si demostraron tener un efecto significativo sobre el desarrollo embrionario. Un estudio reciente en donde se evaluó el efecto de las sEVs aisladas desde el fluido uterino sobre embriones bovinos preimplantacionales, no encontró un efecto significativo sobre la tasa de formación de blastocistos (Leal et al., 2022). Lo anterior puede deberse a que las sEVs aisladas desde el fluido biológico no necesariamente provienen solo de las CEEP, y aunque se ha demostrado que el entorno fisiológico juega un papel positivo en el efecto de las sEVs (Almiñana et al., 2017), es probable que dichos beneficios se dilaten cuando se combinan vesículas extracelulares de distintos orígenes. Además, el efecto biológico que pueda tener un determinado tipo de sEVs, depende de distintos factores, siendo importante la metodología empleada para aislar las vesículas extracelulares y por consiguiente la pureza lograda, ya que si hay un exceso de proteínas extracelulares contaminantes, se podría sobrestimar la concentración real de sEVs aplicadas. Por último, cabe destacar que en el ensayo de internalización de sEVs los endometriomas provenientes de las CEES no tienen una distribución uniforme en el embrión, en comparación con los endometriomas de las CEEP. Lo anterior puede deberse a que los endometriomas de las células estromales no están fisiológicamente preparados para interactuar con el embrión, lo que podría explicar en cierta medida su menor efecto en el desarrollo embrionario.

Luego de evaluar el efecto de la modulación de los endometriomas provenientes de las CEES y CEEP sobre el desarrollo embrionario, se optó por immortalizar ambos tipos celulares y observar si existe una diferencia en el efecto de sus sEVs luego de la immortalización. Para immortalizar los 2 tipos de células se optó por utilizar el antígeno T grande del SV40 (Virus Vacuolador Simio 40 TAg), una oncoproteína hexámerica que provoca la inactivación de las proteínas supresoras de tumores como Retinoblastoma (pRB) y p53, forzando a las células en G1 entrar a la fase S del ciclo celular, induciendo la immortalización (DeCaprio et al., 1988; Ahuja et al., 2005). Se ha visto además que el TAg interactúa con los coactivadores transcripcionales p300 y CBP (Ali & DeCaprio, 2001). En este sentido, los coactivadores transcripcionales se unen a factores de transcripción para facilitar la expresión de determinados genes. Se ha reportado que p300 como CBP están implicadas en una amplia variedad de procesos celulares, incluida la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular, la apoptosis y la respuesta a señales extracelulares (Cattori et al., 2020; Ansari et al., 2023). Según lo anterior, el TAg funciona inactivando proteínas supresoras de tumores y regulando el ciclo celular, lo que permite que las células transfectadas se dividan de manera indefinida en cultivo celular *in vitro*. La expresión del TAg en las CEES y CEEP se llevó a cabo mediante la transfección del pTMB que codifica un policistrón sintético que contiene el gen de esta proteína. La confección del plásmido TAg se realizó para optimizar su tamaño, y por ende su eficiencia de transfección (Walker et al., 2004), eliminando secuencias génicas no útiles para esta tesis, reduciendo el tamaño del plásmido de los 11.418 pb hasta los 8.768 pb, añadiendo además un gen de selección por blastidina utilizado para eliminar las células no transfectadas. El policistrón que contiene el gen TAg también incluye el gen de la mCherry, una proteína roja fluorescente que ayuda a verificar de forma rápida la expresión del TAg mediante su coexpresión. No obstante, la proteína mCherry en el pTMB también podría ser útil para seleccionar clones celulares mediante metodologías como el Cell Sorter, utilizando un citómetro de flujo (Lee et al., 2020). Como se describió en los resultados, la transfección con el pTMB se realizó de manera correcta en ambos tipos celulares, confirmándose mediante la visualización de la proteína mCherry (**Fig. 15**). En tal sentido, la immortalización de las CEES y CEEP no provocó cambios morfológicos aparentes y sus sEVs modularon el desarrollo embrionario del mismo modo que cuando no estaban immortalizadas, descartando efectos no deseados en los embriones suplementados con las sEVs secretadas por las CBR-BESC-UPEX y CBR-BEEC-UPEX. No obstante, un ensayo de expresión genética más exhaustivo puede ser necesario para descartar cualquier otro efecto no deseado.

Por otro lado, el gen NDRG1 codifica para la proteína del mismo nombre, la cual está implicada en la regulación a la baja del gen N-Myc, un protooncogen implicado en la regulación de la proliferación y el desarrollo celular (Li et al., 2023). En este sentido, se ha reportado que la sobreexpresión de los genes Myc mejora la inmortalización celular, haciendo que las células inmortalizadas por TAg, puedan ser cultivadas durante muchos más pasajes sin perder sus características (Kim et al., 2001; Li et al., 2023). Según lo anterior, el knock-out del gen NDRG1 provoca una regulación al alza del gen N-Myc, pudiendo mejorar la inmortalización de las células endometriales. No obstante, el objetivo principal de knockear el gen NDRG1 en este estudio fue para aumentar la tasa de secreción de sEVs, ya que como se ha reportado en la literatura el gen NDRG1 también está implicado en la regulación del tráfico endosómico, afectando el reciclaje de los receptores LDL, la función lisosómica y la regulación del metabolismo de lípidos mediante la síntesis y absorción exógena de ácidos grasos (Pietiäinen et al., 2013; Askautrud et al., 2014; Sahni et al., 2014; Wang et al., 2017a; Sevinsky et al., 2018). En este sentido, Ortega et al., reportaron que el knock-out de este gen aumentó de forma significativa la tasa de secreción de exosomas, un tipo de sEVs, en células cardíacas progenitoras humanas (CPCs), células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) y células del músculo cardíaco de ratón (HL-1) (Ortega et al., 2019). El resultado de este trabajo de tesis doctoral concuerda con lo reportado por Ortega et al., ya que se observó una mejora significativa en la tasa de secreción de sEVs en las CBR-BEEC-UPEX con respecto a las CEEP (**Fig. 19**). Con respecto a lo anterior, se determinó que en promedio una sola célula endometrial epitelial bovina libera 13 sEVs por hora, mientras que su contraparte inmortalizada libera en promedio 65 sEVs por hora, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, ya que se ha observado que el número de sEVs secretadas durante 1 hora por cada célula cancerígena, las cuales tienen un fenotipo parecido al de las células inmortalizadas, varía entre 60 a 65 sEVs/h (Chen et al., 2021).

En cuanto a la modulación del desarrollo y calidad de embriones bovinos generados por FIV, en este trabajo se confirmó que las sEVs aisladas desde el medio condicionado por células endometriales epiteliales inmortalizadas, mejoraron la tasa de clivaje y formación de blastocistos cuando son añadidas al medio de cultivo de embriones. Lo anterior concuerda con un trabajo similar, en donde se añadieron exosomas derivados del útero bovino al medio de cultivo embrionario (Qiao et al., 2018). Los endometriomas, presentes en el útero, pueden contener factores de crecimiento y moléculas señaladoras que promueven la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia celular (Muñoz et al., 2022). Al suplementar el medio de cultivo de los embriones con sEVs proveniente de las células inmortalizadas, estos factores extras pueden jugar un importante rol durante el desarrollo embrionario. Es probable que las sEVs producidas por las células inmortalizadas contengan una mayor cantidad de n-Myc y otros factores que apoyen la proliferación y desarrollo celular debido a la transfección del gen TAg y al knock-out del gen NDRG1, lo que podría explicar en cierto grado la mejora en la tasa de blastocistos. En este sentido, transcritos del gen OCT4 fueron detectados en las sEVs secretadas por las BOEC, CBR-BESC-UPEX y CBR-BEEC-UPEX. El gen OCT4, también conocido como POU5F1, codifica para una proteína que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia y la autorenovación de las células madres embrionarias (Sakurai et al., 2016; Patel & Parchem, 2022). Por lo tanto, la expresión de OCT4 se va reduciendo a medida que los linajes celulares se van definiendo en el embrión, haciendo poco probable que células diferenciadas expresen OCT4 (Mehravar & Poursani, 2021). Se han reportado casos en los que OCT4 se expresa en células diferenciadas, particularmente en células cancerosas y en células somáticas manipuladas experimentalmente, como por ejemplo la reprogramación o inmortalización celular (Roudi et al., 2020; Aguirre et al., 2023). Con respecto a lo anterior, es altamente probable que la presencia de OCT4 (**Fig. 21**) en las sEVs endometriales esté orquestada por la manipulación de estas células *in vitro*. Por su parte, CDX2 está involucrado en la diferenciación de las células del embrión en dos poblaciones distintas: la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TE) (Jedrusik et al., 2008). Se ha reportado que la expresión de CDX2 en el blastocisto es crucial para la segregación correcta de las células del embrión en la MCI y la TE (Jedrusik et al., 2008; Sakurai et al., 2016). La expresión adecuada de CDX2 en el TE es necesaria para la adhesión y la formación de la placenta, mientras que su baja o nula expresión

en la MCI es esencial para mantener la pluripotencia de las células madre embrionarias, por lo tanto, el gen CDX2 juega un rol importante en la diferenciación de las células embrionarias (Jedrusik et al., 2008; Sakurai et al., 2016). Por otra parte, en las células endometriales, CDX2 aparece en la fase secretora del endometrio donde es esencial para la implantación del embrión (Bhagwat et al., 2013), por lo que la presencia de este ARNm en las sEVs puede explicarse debido a que las CEEP fueron aisladas correctamente durante la fase secretora del endometrio. En los 3 tipos de sEVs también se encontraron ARNm del gen IFNT2, el cual es particularmente importante en la comunicación materno-fetal y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la gestación en rumiantes (Bazer et al., 2015; Ruiz-González et al., 2015). Por otro lado, también se identificaron ARNm del gen CAT, que codifica para la catalasa, en las sEVs de las células oviductales y de las CBR-BEEC-UPEX, esto pudo haber generado una mayor defensa antioxidante en el embrión mejorando su desarrollo. Además, en los oviductosomas, agregados el día 0 de cultivo de los embriones en todos los tratamientos, se observó la presencia del transcrito del gen DNMT1, que codifica para una ADN metiltransferasa esencial para mantener la estabilidad epigenética de los embriones (Branco et al., 2008). La metilación del ADN mediada por las enzimas DNMT es esencial para la regulación de procesos biológicos clave, como la diferenciación celular, la supresión de la expresión génica y la regulación de la impronta genómica (Branco et al., 2008; Hirasawa et al., 2008). Alteraciones en la metilación del ADN, como la hipometilación o la hipermetilación, pueden estar asociadas con trastornos en el desarrollo celular embrionario (Jackson et al., 2004). Todos estos transcritos presentes en el tratamiento con sEVs secretadas por las CBR-BEEC-UPEX podrían explicar la mejora en el desarrollo embrionario. No obstante, cabe destacar que los endometriosomas secretados por las CBR-BEEC-UPEX fueron los únicos que contenían transcritos del gen SOD1, que codifica para la superóxido dismutasa 1, una enzima antioxidante que desempeña un papel clave en la protección contra el estrés oxidativo en las células (Muñoz & Fuentes et al., 2024). Otro punto que resulta importante mencionar, es que no se encontraron ARNm de genes proapoptóticos como BAX o CASO3 en ninguna sEVs, lo cual es importante porque permite descartar la inducción de la apoptosis en los embriones, por parte de las sEVs añadidas. Por otro lado, los endometriosomas pueden tener efectos moduladores en el microambiente extracelular que rodea a los embriones, como por ejemplo reducir, mediante enzimas antioxidantes sintetizadas en las células endometriales, radicales libres presentes en el medio de cultivo producto del metabolismo embrionario (Muñoz et al., 2022). Los endometriosomas también podrían ayudar en la eliminación de desechos celulares y en la regulación del pH del entorno embrionario, e incluso contener proteínas antimicrobianas que representan una barrera de defensa extra para los embriones (Muñoz et al., 2022). En este punto resulta importante destacar también que las sEVs pueden llevar otros tipos de moléculas distintos a ácidos nucleicos y proteínas, como por ejemplo lípidos, carbohidratos e iones que pueden ayudar a mejorar la tasa de desarrollo embrionario (Muñoz et al., 2022). En cuanto a los oviductosomas secretados por las BOEC, se puede apreciar un pequeño aumento en la tasa de formación blastocistos en el tratamiento control suplementado con oviductosomas (**Tabla 4**), con respecto al control sin oviductosomas (**Tabla 3**). Lo anterior puede deberse a los ARNm y otras moléculas donados desde estas sEVs a los embriones durante sus primeros estadios, simulando en cierta medida lo que ocurre en el ambiente materno *in vivo*, en donde se espera que el cigoto recién formado interactúe primero con los oviductosomas y luego con los endometriosomas (Muñoz et al., 2022).

En cuanto a la calidad embrionaria, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, en los genes CDX2 y CASP3. Paradójicamente las sEVs secretadas por las CBR-BEEC-UPEX fueron las únicas que mostraron presencia del transcrito del gen CDX2. No obstante, como se puede apreciar en los resultados de análisis de expresión génica por RT-qPCR (**Fig. 20**), los embriones tratados con las sEVs de las CBR-BEEC-UPEX son los que menos expresión de este gen mostraron. Esto puede atribuirse a mecanismos reguladores tempranos en el embrión, ya que la traducción de los ARNm de CDX2 donados por las sEVs podrían traducirse rápidamente en proteínas, lo que regularía a la baja la síntesis *de novo* de nuevos transcritos de este gen (Jedrusik et al., 2010). En cuanto al gen CASP3, este tuvo una expresión a la baja estadísticamente significativa en los embriones tratados con endometriosomas, con respecto a los que no (**Fig. 20**). Esto podría deberse a la donación,

desde los endometriomas a los embriones, de transcritos génicos de enzimas antioxidantes como CAT y SOD1 (**Fig. 21**), que podrían traducirse en los primeros estadios de los embriones, como se ha explicado anteriormente. Es probable que estas enzimas pudieron permitir la reducción del estrés oxidativo en los embriones, evitando el daño en las biomoléculas de las células embrionarias y por lo tanto previniendo la expresión de genes involucrados en la apoptosis intrínseca (Muñoz & Fuentes et al., 2024). Por último, debido a la vida media de un ARNm, que se estima que en promedio oscila entre unos minutos y horas, y teniendo en cuenta que los sEVs se añadieron a los embriones en el día 3 de cultivo, y que tardan hasta 24 horas en internalizarse, tal y como se reporta en este trabajo de tesis (**Fig. 12**), resulta poco probable que en el día 7 todavía sea posible pesquisar por RT-qPCR los diferentes ARNm donados por las sEVs en los embriones, lo que podría explicar por qué no se observó un aumento de los diferentes ARNm donados por las sEVs en el análisis de expresión génica de los embriones (Chen et al., 2008; Herrmann et al., 2021).

CONCLUSIONES

Durante esta tesis doctoral se abordó el papel crucial de las células endometriales y sEVs en la modulación del desarrollo y calidad de embriones bovinos preimplantacionales generados por IVF. Se demostró que las CEES y CEEP, junto con sus sEVs, desempeñan funciones específicas en la comunicación madre-embrión y en la modulación del microambiente uterino.

El estudio reveló que las CEES y las CEEP son capaces de mantener su fenotipo y su función secretora de sEVs durante al menos siete pasajes, lo que resulta crucial para la interacción con el embrión. Además, se identificaron diferencias en la capacidad proliferativa y adherente entre estos tipos celulares, lo que sugiere adaptaciones fisiológicas distintas para su función en el endometrio.

La inmortalización de las CEES y las CEEP mediante la expresión del TAg y la modulación del gen NDRG1, dio lugar a un aumento en la cantidad de pasajes celulares posibles y de la secreción de sEVs, manteniendo las mejoras en el desarrollo embrionario en términos de tasas de clivaje y formación de blastocistos. Este hallazgo pone de manifiesto el potencial de las CEEP inmortalizadas como herramienta para mejorar la eficiencia de la fecundación *in vitro* y permite obtener una mayor cantidad de sEVs a partir de una menor cantidad de medio de cultivo condicionado. Por otro lado, la inmortalización de las células endometriales bovinas, implicó el diseño de un constructo que puede ser utilizado para inmortalizar teóricamente cualquier célula somática animal, facilitando de esta manera posibles estudios que requieran de esta metodología.

Se desarrolló una metodología para el aislamiento de cultivos celulares puros mediante micromanipulación, así como una metodología eficaz para el aislamiento y purificación de sEVs utilizando precipitación basada en polímeros y membranas de policarbonato, la cual preserva la actividad biológica de las sEVs y facilita su aplicación en futuras investigaciones y aplicaciones clínicas.

Se concluye que este trabajo de tesis doctoral aporta nuevos conocimientos sobre el papel de las células endometriales y sus sEVs en la reproducción bovina, abriendo oportunidades para el desarrollo de terapias y tecnologías innovadoras en la mejora de la reproducción asistida y la producción ganadera.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguirre, M., Escobar, M., Forero Amézquita, S., Cubillos, D., Rincón, C., Vanegas, P., ... & Celis, L. G. (2023). Application of the Yamanaka transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc from the laboratory to the clinic. *Genes*, 14(9), 1697.
- Ahuja, D., Sáenz-Robles, M. T., & Pipas, J. M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, 24(52), 7729-7745.
- Al-Dossary AA, Bathala P, Caplan JL and Martin-DeLeon PA (2015). Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery: detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM). *J Biol Chem* 290, 17710-17723.
- Ali, S. H., & DeCaprio, J. A. (2001, February). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 11, No. 1, pp. 15-22). Academic Press.
- Almiñana, C., Corbin, E., Tsikis, G., Alcântara-Neto, A. S., Labas, V., Reynaud, K., ... & Mermillod, P. (2017). Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction*, 154(3), 253-268.
- Alvarez, V., Blazquez, R., Sanchez-Margallo, F. M., DelaRosa, O., Jorge, I., Tapia, A., & Casado, J. G. (2015). Estudio comparativo del aislamiento de exosomas derivados de células madre mesenquimales humanas para uso clínico. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 49(3), 311-320.
- Anderson, B. L. (1995). Effects of antioxidants on development of in vitro fertilized bovine embryos.
- Ansari, M. S. Z., Stagni, V., Iuzzolino, A., Rotili, D., Mai, A., Del Bufalo, D., ... & Trisciuglio, D. (2023). Pharmacological targeting of CBP/p300 drives a redox/autophagy axis leading to senescence-induced growth arrest in non-small cell lung cancer cells. *Cancer gene therapy*, 30(1), 124-136.
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, J. M., Mornet, S., & Brisson, A. R. (2014). Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(5), 614-627.
- Arias, M. E., Risopatrón, J., Sánchez, R., & Felmer, R. (2015). Intracytoplasmic sperm injection affects embryo developmental potential and gene expression in cattle. *Reproductive Biology*, 15(1), 34-41.
- Askautrud, H. A., Gjernes, E., Gunnes, G., Sletten, M., Ross, D. T., Børresen-Dale, A. L., ... & Frengen, E. (2014). Global gene expression analysis reveals a link between NDRG1 and vesicle transport. *PLoS One*, 9(1), e87268.
- Asselin, E., Goff, A. K., Bergeron, H., & Fortier, M. A. (1996). Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 α and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biology of Reproduction*, 54(2), 371-379.

- Benner, M., Ferwerda, G., Joosten, I., & Van der Molen, R. G. (2018). How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Human reproduction update*, 24(4), 393-415.
- Batagov, A. O., Kuznetsov, V. A., & Kurochkin, I. V. (2011). Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. In *BMC genomics*, 12(S3), 18.
- Bauersachs, S., Mermillod, P., & Almiñana, C. (2020). The Oviductal Extracellular Vesicles' RNA Cargo Regulates the Bovine Embryonic Transcriptome. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1303.
- Bazer, F. W., Ying, W., Wang, X., Dunlap, K. A., Zhou, B., Johnson, G. A., & Wu, G. (2015). The many faces of interferon tau. *Amino Acids*, 47(3), 449-460.
- Bhagwat, S. R., Chandrashekar, D. S., Kakar, R., Davuluri, S., Bajpai, A. K., Nayak, S., ... & Sachdeva, G. (2013). Endometrial receptivity: a revisit to functional genomics studies on human endometrium and creation of HGEx-ERdb. *PLoS One*, 8(3), e58419.
- Blazquez, R., Sánchez-Margallo, F. M., Alvarez, V., Matilla, E., Hernandez, N., Marinaro, F., ... & Macias-Garcia, B. (2018). Murine embryos exposed to human endometrial MSCs-derived extracellular vesicles exhibit higher VEGF/PDGF AA release, increased blastomere count and hatching rates. *PLoS One*, 13(4), e0196080.
- Bongso, A., Ng, S. C., & Ratnam, S. (1990). Co-cultures: their relevance to assisted reproduction. *Human Reproduction*, 5(8), 893-900.
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F., & Dressel, M. A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of reproduction*, 27(1), 147-158.
- Branco, M. R., Oda, M., & Reik, W. (2008). Safeguarding parental identity: Dnmt1 maintains imprints during epigenetic reprogramming in early embryogenesis. *Genes & development*, 22(12), 1567-1571.
- Burns, G. W., Brooks, K. E., O'Neil, E. V., Hagen, D. E., Behura, S. K., & Spencer, T. E. (2018). Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. *Biology of Reproduction*, 98(5), 612-622.
- 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), 56-1.
- Cattori, V., Pilger, B., & Kessler, U. (2020). Identification and characterization of tumor types that are driven into apoptosis/regression upon treatment with p300/CBP interactome modulator INTH-454. *Cancer Research*, 80(16_Supplement), 6376-6376.
- Chen, C. Y. A., Ezzeddine, N., & Shyu, A. B. (2008). Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods in enzymology*, 448, 335-357.

- Chen, H., Wang, L., Zeng, X., Schwarz, H., Nanda, H. S., Peng, X., & Zhou, Y. (2021). Exosomes, a new star for targeted delivery. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 751079.
- Cuman, C., Menkhorst, E., Winship, A., Van Sinderen, M., Osianlis, T., Rombauts, L. J., & Dimitriadis, E. (2014). Fetal–maternal communication: the role of Notch signalling in embryo implantation. *Reproduction*, 147(3), R75-R86.
- da Silveira, J. C., Andrade, G. M., del Collado, M., Sampaio, R. V., Sangalli, J. R., Silva, L. A., ... & Cesar, A. S. (2017). Supplementation with small-extracellular vesicles from ovarian follicular fluid during in vitro production modulates bovine embryo development. *PLoS One*, 12(6).
- DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., ... & Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54(2), 275-283.
- Desai, N. N., Kennard, E. A., Kniss, D. A., & Friedman, C. I. (1994). Novel human endometrial cell line promotes blastocyst development. *Fertility and sterility*, 61(4), 760-766.
- Dhaliwal, G. S., Murray, R. D., Rees, E. M., Howard, C. V., & Beech, D. J. (2002). Quantitative unbiased estimates of endometrial gland surface area and volume in cycling cows and heifers. *Research in Veterinary Science*, 73(3), 259-265.
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., ... & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, 34(2), 184-191.
- Greve, T., Madison, V., Avery, B., Callesen, H., & Hyttel, P. (1993). In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Animal Reproduction Science*, 33(1-4), 51-69.
- Griffiths GS, Galileo DS, Reese K and Martin-DeLeon PA (2008). Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol Reprod Dev* 75, 1627-1636.
- Gurung, S., Greening, D. W., Catt, S., Salamonsen, L., & Evans, J. (2020). Exosomes and soluble secretome from hormone-treated endometrial epithelial cells direct embryo implantation. *Molecular Human Reproduction*.
- Herrmann, I. K., Wood, M. J. A., & Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nature nanotechnology*, 16(7), 748-759.
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of cellular senescence. *Trends in cell biology*, 28(6), 436-453.
- Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R., & Sasaki, H. (2008). Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes & development*, 22(12), 1607-1616.

- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4), 683-700.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31(9), 827-832.
- INTAGRI. (2018) *Endocrinología del ciclo estral*. Editorial INTAGRI.
- Ireland, J. J., Coulson, P. B., & Murphree, R. L. (1979). Follicular development during four stages of the estrous cycle of beef cattle. *Journal of animal science*, 49(5), 1261-1269.
- Jackson, M., Krassowska, A., Gilbert, N., Chevassut, T., Forrester, L., Ansell, J., & Ramsahoye, B. (2004). Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 24(20), 8862-8871.
- Jafarpour, F., Ghazvini Zadegan, F., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Kiani-Esfahani, A., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). siRNA inhibition and not chemical inhibition of Suv39h1/2 enhances pre-implantation embryonic development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *Plos one*, 15(6), e0233880.
- Jasmin, Peters, V. M., Spray, D. C., & Mendez-Otero, R. (2016). Effect of mesenchymal stem cells and mouse embryonic fibroblasts on the development of preimplantation mouse embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52(4), 497-506.
- Jedrusik, A., Bruce, A. W., Tan, M. H., Leong, D. E., Skamagki, M., Yao, M., & Zernicka-Goetz, M. (2010). Maternally and zygotically provided Cdx2 have novel and critical roles for early development of the mouse embryo. *Developmental biology*, 344(1), 66-78.
- Jedrusik, A., Parfitt, D. E., Guo, G., Skamagki, M., Grabarek, J. B., Johnson, M. H., ... & Zernicka-Goetz, M. (2008). Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes & development*, 22(19), 2692-2706.
- Johnson, D., Ramos, N., Haimowitz, Z., Surrey, M., Danzer, H., & Barritt, J. (2019). Embryos with no initial PGT-A result can undergo warming/rebiopsy/revitrification for an attempted reanalysis, however they ultimately demonstrate very low clinical potential. *Reproductive BioMedicine Online*, 39, e10.
- Kang, J., Akoum, A., Chapdelaine, P., Laberge, P., Poubelle, P. E., & Fortier, M. A. (2004). Independent regulation of prostaglandins and monocyte chemoattractant protein-1 by interleukin-1 β and hCG in human endometrial cells. *Human Reproduction*, 19(11), 2465-2473.
- Kim, H. S., Shin, J. Y., Yun, J. Y., Ahn, D. K., & Lee, J. Y. (2001). immortalization of human embryonic fibroblasts by overexpression of c-myc and simian virus 40 large T antigen. *Experimental & molecular medicine*, 33(4), 293-298.

- Kim, S. H., & Yoon, J. T. (2018). Effects of MMP-2 activation and FSH or LH Hormone Supplementation on Embryo Development in In Vitro Fertilization of Porcine. *Journal of Embryo Transfer*, 33(4), 313-319.
- Krishnaswamy, N., Chapdelaine, P., Tremblay, J. P., & Fortier, M. A. (2009). Development and characterization of a simian virus 40 immortalized bovine endometrial stromal cell line. *Endocrinology*, 150(1), 485-491.
- Koh, Y. Q., Peiris, H. N., Vaswani, K., Reed, S., Rice, G. E., Salomon, C., & Mitchell, M. D. (2016). Characterization of exosomal release in bovine endometrial intercaruncular stromal cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 78.
- Larson, R. C., Ignatz, G. G., & Currie, W. B. (1992). Transforming growth factor β and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Molecular reproduction and development*, 33(4), 432-435.
- Leal, C. L. V., Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y. N., Hamdi, M., Yaryes, A., de la Blanca, M. G. M., ... & Rizos, D. (2022). Extracellular vesicles from oviductal and uterine fluids supplementation in sequential in vitro culture improves bovine embryo quality.
- Lee, J., Liu, Z., Suzuki, P. H., Ahrens, J. F., Lai, S., Lu, X., ... & St-Pierre, F. (2020). Versatile phenotype-activated cell sorting. *Science advances*, 6(43), eabb7438.
- Li, H. L., Dong, L. L., Jin, M. J., Li, Q. Y., Wang, X., Jia, M. Q., ... & Yuan, S. (2023). A review of the regulatory mechanisms of N-myc on cell cycle. *Molecules*, 28(3), 1141.
- Liu, Z., & Foote, R. H. (1995). Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biology of reproduction*, 53(4), 786-790.
- Lopera-Vásquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., Calle, A., ... & Ramirez, M. Á. (2016). Extracellular vesicles from BOEC in in vitro embryo development and quality. *PloS one*, 11(2), e0148083.
- Lozano-Ramos, I., Bancu, I., Oliveira-Tercero, A., Armengol, M. P., Menezes-Neto, A., Portillo, H. A. D., ... & Borràs, F. E. (2015). Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), 27369.
- Marinaro, F., Macías-García, B., Sánchez-Margallo, F. M., Blázquez, R., Álvarez, V., Matilla, E., ... & González-Fernández, L. (2019). Extracellular vesicles derived from endometrial human mesenchymal stem cells enhance embryo yield and quality in an aged murine model. *Biology of reproduction*, 100(5), 1180-1192.
- Mehravar, M., & Poursani, E. M. (2021). Novel variant of OCT4, named OCT4B5, is highly expressed in human pluripotent cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17, 1068-1073.

- Menck, M. C., Guyader-Joly, C., Peynot, N., Le Bourhis, D., Lobo, R. B., Renard, J. P., & Heyman, Y. (1997). Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs in two different coculture systems. *Reproduction Nutrition Development*, 37(2), 141-150.
- Miranda, M. S., Nascimento, H. S., Costa, M. P., Costa, N. N., Brito, K. N., Lopes, C. T., ... & Ohashi, O. M. (2016). Increasing of blastocyst rate and gene expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(10), 1395-1403.
- Mol, E. A., Goumans, M. J., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P., & Vader, P. (2017). Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(6), 2061-2065.
- Moody, C. S., & Hassan, H. M. (1982). Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(9), 2855-2859.
- Morad, G., Carman, C. V., Hagedorn, E. J., Perlin, J. R., Zon, L. I., Mustafaoglu, N., ... & Moses, M. A. (2019). Tumor-derived extracellular vesicles breach the intact blood–brain barrier via transcytosis. *ACS nano*, 13(12), 13853-13865.
- Moreira, F., Paula-Lopes, F. F., Hansen, P. J., Badinga, L., & Thatcher, W. W. (2002). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, 57(2), 895-907.
- Muñoz, E., Fuentes, F., Felmer, R., Arias, M. E., & Yeste, M. (2024). Effects of Reactive Oxygen and Nitrogen Species on Male Fertility. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Muñoz, E. L., Fuentes, F. B., Felmer, R. N., Yeste, M., & Arias, M. E. (2022). Extracellular vesicles in mammalian reproduction: a review. *Zygote*, 1-24.
- Murakami, S., Shibaya, M., Takeuchi, K., Skarzynski, D. J., & Okuda, K. (2003). A passage and storage system for isolated bovine endometrial epithelial and stromal cells. *Journal of Reproduction and Development*, 49(6), 531-538.
- Ng, Y. H., Rome, S., Jalabert, A., Forterre, A., Singh, H., Hincks, C. L., & Salamonsen, L. A. (2013). Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PloS one*, 8(3), e58502.
- Niu, Z., Pang, R. T., Liu, W., Li, Q., Cheng, R., & Yeung, W. S. (2017). Polymer-based precipitation preserves biological activities of extracellular vesicles from an endometrial cell line. *PloS one*, 12(10), e0186534.
- Olson, S. E., & Seidel Jr, G. E. (2000). Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*, 62(2), 248-252.

- Orsi, N. M., & Reischl, J. B. (2007). Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*, 67(3), 441-458.
- Ortega, F. G., Roefs, M. T., de Miguel Perez, D., Kooijmans, S. A., de Jong, O. G., Sluijter, J. P., ... & Vader, P. (2019). Interfering with endolysosomal trafficking enhances release of bioactive exosomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 20, 102014.
- Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Khushman, M., Singh, S., & Singh, A. P. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Patel, I., & Parchem, R. J. (2022). Regulation of Oct4 in stem cells and neural crest cells. *Birth defects research*, 114(16), 983-1002.
- Pauerstein, C. J., Eddy, C. A., Koong, M. K., & Moore, G. D. (1990). Rabbit endosalpinx suppresses ectopic implantation. *Fertility and Sterility*, 54(3), 522-526.
- Piehl, L. L., Fischman, M. L., Hellman, U., Cisale, H., & Miranda, P. V. (2013). Boar seminal plasma exosomes: effect on sperm function and protein identification by sequencing. *Theriogenology*, 79(7), 1071-1082.
- Pietiäinen, V., Vassilev, B., Blom, T., Wang, W., Nelson, J., Bittman, R., ... & Ikonen, E. (2013). NDRG1 functions in LDL receptor trafficking by regulating endosomal recycling and degradation. *Journal of cell science*, 126(17), 3961-3971.
- Qiao, F., Ge, H., Ma, X., Zhang, Y., Zuo, Z., Wang, M., ... & Wang, Y. (2018). Bovine uterus-derived exosomes improve developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 114, 199-205.
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(9), 1574-1584.
- Rodrigues, T. A., Alli, A., Paula-Lopes, F. F., & Hansen, P. (2018). 154 Exosomes in Follicular Fluid Protect the Bovine Oocyte from Heat Shock. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(1), 217-217.
- Rome, S., Forterre, A., Bouzakri, K., & Mizgier, M. L. (2019). Skeletal muscle-released extracellular vesicles: State of the art. *Frontiers in physiology*, 10, 929.
- Roudi, R., Barodabi, M., Madjd, Z., Roviello, G., Corona, S. P., & Panahi, M. (2020). Expression patterns and clinical significance of the potential cancer stem cell markers OCT4 and NANOG in colorectal cancer patients. *Molecular & Cellular Oncology*, 7(5), 1788366.
- Ruiz-González, I., Xu, J., Wang, X., Burghardt, R. C., Dunlap, K. A., & Bazer, F. W. (2015). Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes. *Reproduction*, 149(3), 281-291.

- Rutledge, J. J. (2001). Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology*, 55(1), 105-111.
- Saadeldin, I. M., Kim, S. J., Choi, Y. B., & Lee, B. C. (2014). Improvement of cloned embryos development by co-culturing with parthenotes: a possible role of exosomes/microvesicles for embryos paracrine communication. *Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells)*, 16(3), 223-234.
- Sahni, S., Bae, D. H., Lane, D. J., Kovacevic, Z., Kalinowski, D. S., Jansson, P. J., & Richardson, D. R. (2014). The metastasis suppressor, N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1), inhibits stress-induced autophagy in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 9692-9709.
- Said, H. M., Safari, R., Al-Kafaji, G., Ernestus, R. I., Löhr, M., Katzer, A., ... & Hagemann, C. (2017). Time- and oxygen-dependent expression and regulation of NDRG1 in human brain cancer cells. *Oncology Reports*, 37(6), 3625-3634.
- Sakurai, N., Takahashi, K., Emura, N., Fujii, T., Hirayama, H., Kageyama, S., ... & Sawai, K. (2016). The necessity of OCT-4 and CDX2 for early development and gene expression involved in differentiation of inner cell mass and trophectoderm lineages in bovine embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells)*, 18(5), 309-318.
- Sanin, Y. Y. L., Ángel, M. O., & Morales, A. M. T. (2010). Señales moleculares que afectan la síntesis de PGF2a y PGE2 en el endometrio bovino. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(3), 377-389.
- Schwarz, R. I. (2015). Collagen I and the fibroblast: high protein expression requires a new paradigm of post-transcriptional, feedback regulation. *Biochemistry and biophysics reports*, 3, 38-44.
- Sevinsky, C. J., Khan, F., Kokabee, L., Darehshouri, A., Maddipati, K. R., & Conklin, D. S. (2018). NDRG1 regulates neutral lipid metabolism in breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 20(1), 1-17.
- Shifrin Jr, D. A., Beckler, M. D., Coffey, R. J., & Tyska, M. J. (2013). Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Molecular biology of the cell*, 24(9), 1253-1259.
- Simón, C., Martín, J. C., & Pellicer, A. (2000). Paracrine regulators of implantation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14(5), 815-826.
- Sohel, M. M. H., Hoelker, M., Noforesti, S. S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., ... & Tesfaye, D. (2013). Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular microRNAs in follicular fluid: implications for bovine oocyte developmental competence. *PloS one*, 8(11), e78505.
- Steeves, T. E., & Gardner, D. K. (1999). Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biology of reproduction*, 61(3), 731-740.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., & Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2), 205-212.

- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., & Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(1), 1-10.
- Takahashi, Y., & First, N. L. (1992). In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37(5), 963-978.
- Takasugi, M. (2018). Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging cell*, 17(2), e12734.
- Tang, Y. T., Huang, Y. Y., Zheng, L., Qin, S. H., Xu, X. P., An, T. X., ... & Wang, Q. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International journal of molecular medicine*, 40(3), 834-844.
- Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 biology reports*, 3.
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Ayre, D. C. (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.
- Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martínez, S., ... & 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*, 142(18), 3210-3221.
- Vojtech, L., Zhang, M., Davé, V., Levy, C., Hughes, S. M., Wang, R., ... & Hladik, F. (2019). Extracellular vesicles in human semen modulate antigen-presenting cell function and decrease downstream antiviral T cell responses. *PloS one*, 14(10), e0223901.
- Walker, W. E., Porteous, D. J., & Boyd, A. C. (2004). The effects of plasmid copy number and sequence context upon transfection efficiency. *Journal of controlled release*, 94(1), 245-252.
- Walter, I. (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *The Anatomical Record*, 243(3), 347-356.
- Wang, C. K., Robinson, R. S., Flint, A. P. F., & Mann, G. E. (2007). Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. *Reproduction*, 134(2), 365-371.
- Wang, H., Li, W., Xu, J., Zhang, T., Zuo, D., Zhou, Z., ... & Sun, M. (2017a). NDRG1 inhibition sensitizes osteosarcoma cells to combretastatin A-4 through targeting autophagy. *Cell death & disease*, 8(9), e3048-e3048.
- Yamashita, T., Takahashi, Y., & Takakura, Y. (2018). Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(6), 835-842.



Zambrano, F., Aguila, L., Arias, M. E., Sanchez, R., & Felmer, R. (2017). Effect of sperm pretreatment with glutathione and membrane destabilizing agents lysolecithin and Triton X-100, on the efficiency of bovine intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(2), 305-311.