



## Vesículas extracelulares: Mediadoras en la interacción materno-embriónaria bovina

Yulia Nathaly Cajas<sup>2</sup>  , Kevin Burbano Espín<sup>3,4</sup>  , María Encina González Martínez<sup>5</sup>  , Karina Cañón-Beltrán<sup>1,6</sup>  

Departamento de Producción Agraria, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.

### Extracellular vesicles: mediators in bovine embryo- maternal interaction

**Abstract.** Extracellular vesicles (EVs) are crucial for intercellular communication, carrying proteins, lipids, and nucleic acids. They play a vital role in embryo-maternal interactions, essential for establishing and maintaining pregnancy. EVs from the oviduct enhance early embryo development by influencing cell proliferation, mitochondrial activity, and gene expression. The interaction is bidirectional, with embryos also affecting the oviduct through microRNAs and proteins. Later, when the embryo implants in the uterus, the EVs are crucial for conceptus elongation, and pregnancy recognition by affecting cell proliferation and gene expression. This review summarizes the EVs role in supporting preimplantation development and early pregnancy, emphasizing their importance in reproductive success and potential to improve animal breeding efficiency.

**Keywords:** Extracellular vesicles, embryo, cattle, oviduct, uterus, embryo-maternal communication

**Resumen.** Las vesículas extracelulares (VEs) son cruciales para la comunicación intercelular, transportando proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Desempeñan un papel vital en las interacciones materno-embriónarias, esenciales para establecer y mantener de la gestación. Las VEs del oviducto mejoran el desarrollo temprano del embrión al influir en la proliferación celular, la actividad mitocondrial y la expresión génica. La interacción es bidireccional y los embriones también afectan el oviducto a través de microARN y proteínas. Posteriormente, cuando el embrión se implanta en el útero, las VEs son cruciales para la elongación del concepto y el reconocimiento de la preñez al afectar la proliferación celular y la expresión génica. Esta revisión resume el papel de las VEs en el apoyo al desarrollo previo a la implantación y la gestación temprana, destacando su importancia en el éxito reproductivo y el potencial para mejorar la eficiencia de la reproducción animal.

**Palabras clave:** Vesículas extracelulares, embrión, bovino, oviducto, útero, comunicación materno-embriónaria

<sup>1</sup> Autor para la correspondencia: [kecanon@gmail.com](mailto:kecanon@gmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Técnica Particular de Loja, UTPL, Loja, Ecuador

<sup>3</sup>Departamento de Reproducción Animal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA-CSIC, Madrid, España.

<sup>4</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, UCM, Madrid, España

<sup>5</sup>Departamento de Embriología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, UCM, Madrid, España.

<sup>6</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, UCM, Madrid, España.

**Resumo.** Vesículas extracelulares (VEs) são cruciais para a comunicação intercelular, uma vez que transportam proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Elas desempenham um importante papel na comunicação materno-embryonária, o qual é essencial para o estabelecimento e a manutenção da gestação. As VEs provenientes do oviduto melhoraram o desenvolvimento inicial do embrião ao auxiliar à proliferação celular, atividade mitocondrial e a expressão gênica. Além disso, essa interação é bidirecional, uma vez que as VEs secretadas pelos embriões também afetam o oviduto por meio de microRNAs e proteínas. Ainda, previamente à implantação do embrião no útero, as VEs são fundamentais para a elongação do conceito e o reconhecimento da gestação, afetando a proliferação celular e a expressão gênica. Esta revisão resume o papel das VEs no suporte ao desenvolvimento pré-implantacional do embrião no início da gestação, enfatizando sua importância no sucesso reprodutivo e seu potencial para melhorar a eficiência da reprodução animal.

**Palavras-chave:** Vesículas extracelulares, embrião, bovino, oviduto, útero, comunicação materno-embryonária.

## Introducción

La interacción entre el embrión bovino y el tracto reproductivo materno es un proceso complejo y crucial para el éxito de la gestación. Durante las primeras semanas del desarrollo embrionario, se llevan a cabo eventos clave como la fertilización, las primeras divisiones celulares, la activación del genoma embrionario y la formación del blastocisto, siendo un periodo crítico, especialmente porque se estima que, en vacas de alta producción, alrededor del 50% de los embriones ya no son viables para los días 6 y 7 (Gad *et al.* 2012; Lonergan *et al.* 2016).

El embrión es capaz de desarrollarse hasta la fase de blastocisto de manera relativamente autónoma *in vitro*. Existe una clara evidencia de que la interacción con el ambiente materno mejora significativamente su calidad y potencial de implantación, como se observa en embriones desarrollados *in vivo*, que presentan una mejor estructura ultramicroscópica, perfiles de expresión génica más adecuados y una mayor capacidad de resistir la criopreservación, lo que subraya la importancia de la interacción materno-embryonaria temprana (Gad *et al.* 2012; Lonergan *et al.* 2016; Kölle *et al.* 2020; Almiñana and Bauersachs 2020).

Uno de los mecanismos emergentes en la interacción entre el embrión y el entorno materno es la liberación de vesículas extracelulares (VEs). Estas vesículas, que incluyen exosomas y microvesículas, son secretadas tanto por las células del oviducto como del útero, y se ha demostrado que juegan un papel clave en la comunicación célula a célula al transferir biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Raposo and Stoorvogel 2013; Stahl and Raposo 2019) (Figura 1). Las VEs no solo son secretadas por las células maternas, sino que también pueden ser captadas por los embriones, lo que mejora su desarrollo y calidad *in vitro*, y sugiere una comunicación bidireccional que es vital para la regulación de la calidad embrionaria (Almiñana and Bauersachs 2020; Pavani *et al.* 2022)

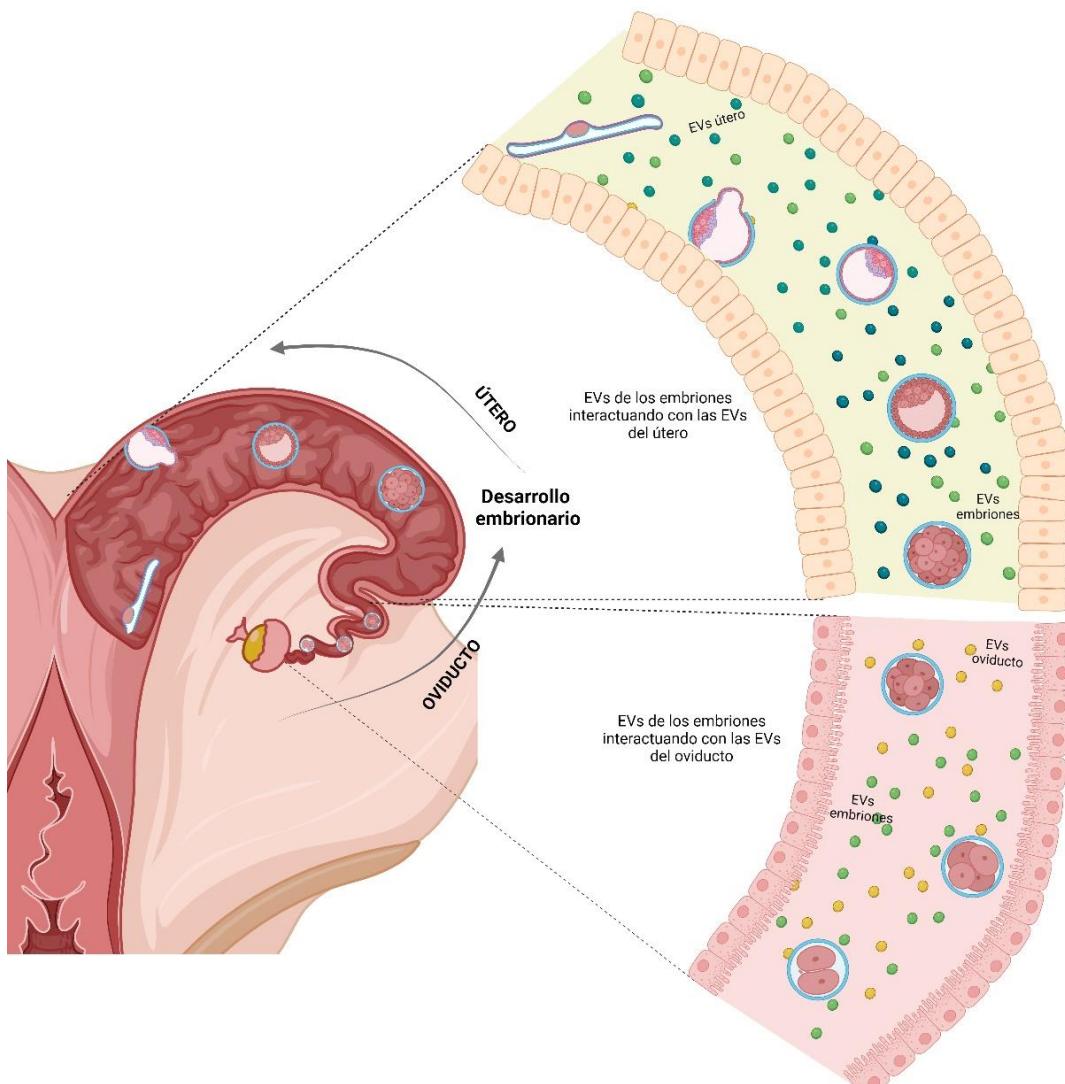
Estudios recientes han explorado cómo las VEs del fluido folicular (FO) y fluido uterino (FU) pueden influir en el desarrollo embrionario y, en particular, cómo la secuencialidad de estas vesículas mejora la calidad de los embriones cultivados *in vitro*, aumentando el número de células y reduciendo el contenido lipídico de los blastocistos (Leal *et al.* 2022). Esta evidencia refuerza la noción de que la interacción temprana entre el embrión y el ambiente materno es crucial no solo para el desarrollo óptimo del embrión, sino también para preparar el útero para la implantación exitosa y el mantenimiento del embarazo.

A pesar de los avances en los modelos *in vitro*, todavía existen limitaciones para estudiar de manera exhaustiva la comunicación embrio-materna en estos sistemas. Por lo tanto, la combinación de modelos *in vivo* e *in vitro* se presenta como la estrategia más adecuada para profundizar en la comprensión de este diálogo complejo. Este trabajo tiene como objetivo describir el origen, la clasificación, la biogénesis y los métodos de aislamiento de las VEs. Además, revisa los hallazgos más recientes sobre la interacción mediada por las VEs entre los embriones y el tracto reproductivo materno durante el período de pre-elongación, con un enfoque dirigido a dilucidar cómo estos microambientes influyen en el éxito de la gestación.

## Origen, clasificación y biogénesis

Vesículas extracelulares es el término genérico que hace referencia a una población heterogénea de estructuras delimitadas por una bicapa lipídica incapaces de auto-replicarse (Welsh *et al.* 2024), que están involucradas en el transporte intercelular de moléculas de señalización como proteínas (de superficie y como carga), lípidos y ácidos nucleicos (Jeppesen *et al.* 2023). Las VEs influyen en las células diana a través de diversas rutas de captación, siendo la endocitosis, la fusión de membranas y la señalización las más comunes. Las vías reguladas por clatrina, junto con las familias de proteínas SNARE y





**Figura 1. Papel de las EVs en el desarrollo del embrión bovino. La interacción entre el embrión y el sistema materno, así como la comunicación entre ellos, está mediada por las EVs en cada etapa del desarrollo.**

Rab, son las principales involucradas tanto en la endocitosis como en la internalización de las VEs (Mettlen *et al.* 2018), mientras que la señalización depende del sistema ligando-receptor (Gurung *et al.* 2021).

La investigación sobre las VEs comenzó a desarrollarse formalmente entre las décadas de 1980 y 1990. Sin embargo, ya cuarenta años antes, se habían llevado a cabo numerosas investigaciones que describían o especulaban sobre la existencia de estructuras similares a las VEs. No fue hasta la década de 1990 cuando se demostró de manera concluyente la liberación de vesículas intraluminales al espacio extracelular durante la maduración de los reticulocitos, un proceso en el que se externaliza el receptor de transferrina. Inicialmente, este fenómeno se interpretó erróneamente como la externali-

zación de proteínas obsoletas (Johnstone *et al.* 1987). Actualmente se conoce que las VEs son uno de los principales mediadores de la comunicación intercelular por medio de la transferencia de información compleja, siendo secretadas por todas las líneas celulares (Mohammadipoor *et al.* 2023).

Actualmente, la International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) separa los subtipos de VEs en función de sus características físicas (densidad y diámetro), marcadores moleculares, rutas de biogénesis (exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos) (Welsh *et al.* 2024).

Entre los subtipos de VEs, Bongiovanni *et al.* (2021) reportan que la densidad de los exosomas oscila entre 1.13 y 1.19 g/mL, mientras que la de las microvesículas varía



entre 1.10 y 1.18 g/mL. No obstante, las VEs también se clasifican por su diámetro en grandes ( $> 200$  nm) y pequeñas ( $< 200$  nm), aunque este tamaño puede variar según el método de medición empleado, ya que no existe un consenso sobre los límites superiores e inferiores de esta clasificación (Welsh *et al.* 2024).

De acuerdo a los mecanismos celulares (biogénesis) involucrados en el origen de las VEs, estas se clasifican en tres grandes grupos: aquellas que surgen a partir de cuerpos multivesiculares endosómicos (MVB) denominadas exosomas, las que se externalizan por gemación directa de la membrana plasmática denominadas microvesículas o ectosomas, y las llamadas cuerpos apoptóticos que se desprenden tras la muerte celular programada (Gurung *et al.* 2021). Pese a lo antes mencionado, y debido a la heterogeneidad molecular y estructural de las VEs, su caracterización actualmente resulta un reto por la falta de precisión en las técnicas usadas y la ausencia de marcadores moleculares universales de microvesículas, exosomas u otros subtipos de VEs (Welsh *et al.* 2024).

El término exosoma, adoptado a partir de la investigación de Johnstone *et al.* (1987) en la maduración de reticulocitos, corresponde a un subtipo de VEs de 30-150 nm de diámetro que se externalizan luego de la fusión de membranas entre los MVB y la membrana plasmática de la célula progenitora. Están enriquecidos particularmente con las proteínas transmembrana tetraspaninas (CD63, CD9, CD81 y CD82), identificables a través de Western Blot, así como también proteínas derivadas de complejo ESCRT (Alix, HSC70; HSP90 $\beta$ ) (Doyle and Wang 2019; Liu and Wang 2023). Los MVB son compartimentos endocíticos maduros, que, gracias al reclutamiento del complejo proteico citosólico ESCRT, al unirse con proteínas de membrana genera invaginaciones de los MVB produciendo vesículas intraluminales (ILV) que se almacenan en su luz, y que al ser externalizadas pasan a ser exosomas. Sin embargo, no todos ILV se externalizan, muchos de los MVB suelen fusionarse con lisosomas para la degradación de contenidos celulares; esto parece estar mediado por la cantidad de colesterol de los MVB (Edgar, 2016).

Las microvesículas (MV) es otro subtipo de VEs de diámetro variable, llegando a ser grandes (200 -1000 nm) o pequeñas ( $<200$  nm). Difieren de los exosomas en que se externalizan por gemación directa de la membrana plasmática. El contenido de las MV está determinado por la célula progenitora, pero no todas las proteínas de ésta se incorporan a la membrana de las MV (Cocucci *et al.* 2009). Están enriquecidas con fosfatidilserina, colesterol,

diacilglicerol y expresan marcadores como el CD40, selectinas, integrinas (Ratajczak and Ratajczak, 2020) y particularmente la integrina  $\beta$ 1, que se concentra en la membrana de las microvesículas de manera ubicua. Su biogénesis recuerda al proceso de abscisión de la citocinesis mitótica, gracias a proteínas contráctiles como la ARRDC1 y Bin-1, que se reclutan en el surco de división de la membrana junto al complejo ESCRT, que generan fuerza de tracción a las membranas adyacentes formando curvaturas moleculares (Stahl and Raposo 2019).

Los cuerpos apoptóticos (AB), por otro lado, son los fragmentos resultantes de la muerte celular programada (apoptosis). Tienden a tener un gran tamaño en comparación con los exosomas y las microvesículas, y se diferencian de estos porque contienen en su interior cromatina, orgánulos intactos y proteínas glicosiladas (Doyle and Wang 2019). Son reconocidos como mediadores de la comunicación entre la célula apoptótica y el sistema inmunológico y aunque no son una característica universal de las células apoptóticas se suelen observar al inicio de la apoptosis al deslaminar el citoesqueleto cortical y generar una evaginación de la membrana con el sistema actina-miosina mediado por la quinasa ROCK1 (Wickman *et al.* 2012); este proceso inicia mucho antes de la fragmentación del ADN y la exposición de la fosfatidilserina (Jeppesen *et al.* 2014).

### Métodos de Aislamiento y Caracterización

Actualmente no existe un método estandarizado para el aislamiento y/o purificación de VEs sino que este depende de las características fisicoquímicas del biofluido sobre el que se realiza el aislamiento, la sensibilidad, el rendimiento y la aplicación final de la muestra (Mohammadipoor *et al.* 2023). Se debe considerar también que las alteraciones fisicoquímicas generadas sobre las células o tejidos en las etapas de recolección, procesamiento y almacenamiento de la muestra son variables que pueden afectar a las VEs de forma cuantitativa y cualitativa. Así también, muchos métodos de aislamiento y caracterización resultan en el co-aislamiento de partículas extracelulares no vesiculares (NVEP) junto con VEs, disminuyendo la pureza de la muestra (Lötvall *et al.* 2014; Welsh *et al.* 2024).

A pesar de estas limitaciones, se han desarrollado varios métodos para el aislamiento de VEs, incluidos los basados en ultracentrifugación, filtración, inmunoafinidad y precipitación (Konoshenko *et al.* 2018). En el caso de biofluidos complejos, como los del tracto reproductivo femenino, nuestro grupo de investigación ha estandarizado un método de aislamiento de VEs para estudios funcionales a partir de fluidos uterinos y oviductales, empleando cromatografía de exclusión por tamaño (Cañón-Beltrán *et al.* 2021).



La ultracentrifugación es el método más usado para el aislamiento de VEs a partir de cultivos celulares y biofluidos, el cual consiste en dos etapas: una primera etapa de centrifugaciones de baja velocidad (10.000 a 20.000 × g), para sedimentar detritus celulares o cuerpos apoptóticos (Witwer *et al.* 2013). La segunda etapa consiste en una centrifugación de alta velocidad (100.000 × g durante 1h), que permite sedimentar las VEs (Théry *et al.* 2006). No obstante, este método resulta en rendimientos bajos de los productos degradados y el perfil de VEs sedimentadas varía en función de la línea celular (Jeppesen *et al.* 2014), y no se logra una separación absoluta por tamaño de las VEs debido a su carga molecular (Witwer *et al.* 2013).

La cromatografía de exclusión por tamaño es un método que permite aislar las partículas en función de la velocidad a la que atraviesan una resina cromatográfica, que a su vez depende del tamaño de dichas partículas (Burgess 2018). Las partículas más pequeñas se eluyen en altos porcentajes a través de la matriz de resina, mientras que las partículas más grandes como proteínas o lípidos atraviesan la matriz en menor volumen. Esta mayor retención de proteínas contaminantes disminuye la interferencia en la estructura de las VEs a la hora de caracterizarlas (Gámez-Valero *et al.* 2016), por otro lado, este método conserva mejor la funcionalidad de las VEs en relación a otros métodos de aislamiento.

Los métodos de aislamiento por inmunoadsorción aprovechan las moléculas de superficie de las VEs (ligandos potenciales) que se adhieren a "fases fijas", las cuales son recuperadas junto con las VEs mediante diversos procedimientos (Konoshenko *et al.* 2018). La diversidad de fases fijas y ligandos ha dado lugar a múltiples protocolos, entre los que destacan el uso de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos dirigidos a marcadores moleculares de vesículas y micropuntas de sílice monolíticas, que, en combinación con ensayos ELISA sándwich, permiten aislar y cuantificar exosomas (Ueda *et al.* 2014).

El aislamiento mediante agentes hidrofílicos se basa en la reducción de la solubilidad de la muestra, lo que provoca la precipitación de las VEs tras incubación y centrifugación a baja velocidad (1500 × g) (Konoshenko *et al.* 2018). Sin embargo, a pesar de la simplicidad de este método, la precipitación conjunta de proteínas puede resultar en una contaminación de las VEs aisladas.

El uso de microfluídica en el aislamiento de VEs permite aplicar enfoques tradicionales como tamaño, inmunoadsorción o densidad, con una reducción significa-

tiva del volumen de muestra y reactivos. Además, se pueden combinar con técnicas más innovadoras, como la manipulación acústica basada en ultrasonido y nanofiltros (Lee *et al.* 2015).

En los párrafos anteriores, se ha destacado la significativa heterogeneidad de los métodos empleados para el aislamiento de VEs. Esta variabilidad, junto con la complejidad inherente de los biofluidos, la experiencia de los investigadores y la diversidad de instrumentos y tecnologías disponibles complica la obtención de una fracción pura de VEs libre de partículas no vesiculares. Por esta razón, la ISEV recomienda una serie de procedimientos bioquímicos, biofísicos y funcionales para diferenciar las VEs del resto de partículas extracelulares. No obstante, dicha diferenciación se ve dificultada por la misma heterogeneidad de las partículas y la ausencia de marcadores moleculares universales para las VEs (Welsh *et al.* 2024). El primer criterio para la caracterización general de las VEs es la identificación semicuantitativa de proteínas transmembrana o citosólicas presentes en las VEs de interés, mediante técnicas como Western Blot, citometría de flujo o espectrometría de masas. Adicionalmente, se sugiere la caracterización individual de las VEs utilizando al menos dos tecnologías: (1) microscopía electrónica o de fuerza atómica y (2) análisis de distribución de tamaño de las VEs mediante seguimiento de nanopartículas, detección de pulsos resistivos o dispersión de luz dinámica, con el fin de evaluar la heterogeneidad de la población de VEs en una muestra dada (Lötvall *et al.* 2014).

### **Interacción de las VEs en el oviducto (estudios *in vivo* e *in vitro*)**

Los estudios sobre VEs en el sistema reproductivo femenino son relativamente recientes, aunque este campo fue ganando notable atención en la última década, con un incremento significativo en el número de investigaciones. Estudios iniciales en modelos murinos revelaron la presencia de vesículas extracelulares (VEs) tanto en el fluido oviductal (FO) como en el fluido uterino (FU). Posteriormente, esta presencia ha sido confirmada en una variedad de especies, incluyendo humanos (Bathala *et al.* 2018), bovinos (Lopera-Vasquez *et al.* 2017; Kusama *et al.* 2018; Qiao *et al.* 2018; Almiñana *et al.* 2018; Almiñana and Bauersachs 2020), caninos y felinos (Lange-Consiglio *et al.* 2017; Ferraz *et al.* 2019). Además, las VEs se han aislado con éxito *in vivo* mediante lavados de oviductos (Lopera-Vasquez *et al.* 2017; Almiñana *et al.* 2017; Hamdi *et al.* 2021); o *in vitro* a partir de medios de cultivo condicionados por células epiteliales oviductales (OEC) (Lopera-Vásquez *et al.* 2016; Almiñana *et al.* 2017).



### Efecto del oviducto sobre el embrión

El oviducto es el sitio donde ocurre el desarrollo embrionario temprano, y se llevan a cabo las primeras divisiones celulares y la activación del genoma. Debido a su papel crucial en estos procesos, la mayoría de los estudios se han centrado en el oviducto, analizando el impacto de sus VEs en el desarrollo embrionario *in vitro*, dado que los embriones tienen la capacidad de captar estas VEs (Almiñana *et al.* 2017; Leal *et al.* 2022) (Figura 1). Cuando se suplementaron VEs aisladas de células epiteliales oviductales bovinas (BOEC) a embriones bovinos durante el cultivo *in vitro* (CIV), no se observaron efectos significativos en el rendimiento de los blastocistos. Sin embargo, se evidenció una mejora en su calidad, incluyendo un aumento en el número total de células y de trofoblastos, así como una mayor criotolerancia y una modulación positiva de los genes asociados con la calidad embrionaria (Lopera-Vásquez *et al.* 2016).

Además, cuando se utilizaron VEs aisladas de FO bovino, los mismos autores reportaron un mejor desarrollo de blastocistos, pero este efecto se observó únicamente cuando las VEs se aislaron del istmo (Lopera-Vásquez *et al.* 2017). Estos hallazgos sugieren que diferentes regiones del oviducto pueden liberar VEs con composiciones distintas, lo que refleja variaciones funcionales en las células oviductales según su origen anatómico. En este contexto, Jamaludin *et al.* (2019) observaron que las VEs obtenidas de OEC porcinas (pOEC) de la ampolla e istmo exhibieron diferencias en la composición de su membrana, lo que podría estar relacionado con sus funciones específicas. No obstante, se requieren estudios adicionales para comprender mejor las diferencias funcionales entre las regiones del oviducto, la composición de sus VEs y sus efectos sobre las células diana.

Por otro lado, Almiñana *et al.* (2017) observaron una mejora en el desarrollo y la calidad de los embriones cuando se añadieron VEs de todo el oviducto bovino al medio de CIV. En contraste, Banliat *et al.* (2020) no observaron mejoras en el desarrollo o la calidad de los blastocistos, aunque encontraron que las VEs modificaron el lipidoma del embrión. Por su parte, Bauersachs *et al.* (2020) mostraron variaciones en el transcriptoma embrionario y la composición de lípidos de membrana. El uso de VEs de BOEC durante el CIV aumentó el desarrollo de blastocistos, la eclosión, la proliferación celular y la actividad mitocondrial, mientras que los contenidos de ROS, apoptosis y lípidos disminuyeron. Además, se moduló la expresión de numerosos genes relacionados con el desarrollo y la calidad embrionaria, así como con los antioxidantes y el metabolismo energético (Leal *et al.* 2022).

En nuestro estudio, Leal *et al.* (2022) demostramos que el miR-148b, un microARN involucrado en la regulación de la expresión génica, está regulado al alza en las VEs-FO de vacas cíclicas y está vinculado a la vía TGF- $\beta$ . Posteriormente, investigamos el impacto del miR-148b en el desarrollo embrionario. Encontramos que el miR-148b puede ser absorbido por embriones en diferentes etapas de desarrollo y que disminuye el ARNm de SMAD5, indicando que este gen podría ser un objetivo del miRNA. La suplementación con miR-148b mejoró la calidad del embrión, aumentando el número total de células, las células del trofoblasto y las células de la masa interna, sin afectar las tasas de segmentación y blastocistos. Además, observamos una disminución en los ARNm de SMAD1 y SMAD5, junto con una regulación positiva de POU5F1 y NANOG. Estos resultados sugieren que el miR-148b influye en la vía TGF- $\beta$  y contribuye a la mejora de la calidad del embrión mediante la alteración de la transcripción de genes relacionados con la diferenciación y proliferación celular (Cañón-Beltrán *et al.* 2024). Así, estos hallazgos sugieren que las VEs pueden inducir una variedad de cambios fenotípicos en los embriones, incluyendo modificaciones en la expresión genética, el perfil y contenido de lípidos, el metabolismo y la respuesta al estrés oxidativo, lo que a su vez influye en el desarrollo y la calidad del embrión y, en última instancia, afecta el éxito de la preñez.

### Efecto de embrión sobre el oviducto

En bovinos, después de la fecundación, el embrión permanece en el oviducto hasta los días 3,5 a 4, tiempo en el que el embrión interactúa con el FO y las células epiteliales del oviducto. Este es un período sensible del desarrollo embrionario porque incluye la activación del genoma embrionario, que ocurre en la etapa de 8 a 16 células en el bovino (Gad *et al.* 2012), y es fundamental para la futura diferenciación celular, la implantación del embrión y el desarrollo fetal. Kölle *et al.* (2009), demostraron en vacas que el embrión temprano es capaz de inducir la formación de células secretoras, modificar la vascularización y regular negativamente la velocidad de transporte. Además, se han reportado diferencias en la expresión génica entre el oviducto ipsilateral y contralateral, durante diferentes etapas del ciclo estral y entre istmo y ampolla (Lopera-Vásquez *et al.* 2016, 2017; Bauersachs *et al.* 2020). De hecho, Maillo *et al.* (2015), encontraron en bovinos que la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune dentro del oviducto está alterada, y observaron una falta de diferencias en el transcriptoma del epitelio del oviducto en presencia de un solo embrión de ocho células en el día 3.5. Esto sugiere que el embrión puede modular activamente el sistema inmunológico del tracto materno para evitar su propio rechazo al reducir la inflamación y la presentación de抗ígenos (Maillo *et al.* 2015). Posteriormente, para



investigar los posibles efectos locales inducidos por un único embrión en el oviducto bovino, se llevó a cabo un estudio en el que se disecaron pequeñas secciones del oviducto (2 cm de largo) el día 2.5 después de la inseminación artificial (Rodríguez-Alonso *et al.* 2020). Aunque no se detectaron diferencias en la expresión génica, la presencia de un solo embrión de ocho células provocó cambios en la composición del FO, incluyendo modificaciones en el contenido proteómico, aminoácidos y carbohidratos. Estos resultados confirman las necesidades específicas del embrión en desarrollo en el oviducto *in vivo* (Rodríguez-Alonso *et al.* 2020). Los cambios en el transcriptoma y los metabolitos del oviducto durante el ciclo estral y los cambios en la expresión de genes seleccionados por la presencia de embriones en el oviducto durante el período de preimplantación refuerzan la opinión de que el embrión tiene efectos específicos sobre las células oviductales que adaptan su entorno de acuerdo con sus necesidades (Lopera-Vásquez *et al.* 2016, 2017; Almíñana *et al.* 2017; Rodríguez-Alonso *et al.* 2020).

Por otro lado, en un estudio *in vitro*, Hamdi *et al.* (2019) observaron que el embrión bovino temprano alteraba la expresión genética de las BOEC, siendo este efecto específico de la etapa del embrión, como resultado de un contacto directo con las BOEC o de secreciones embrionarias liberadas en los medios de cultivo. En ese contexto, se descubrió que las BOEC estimulan a los embriones bovinos del día 4, en la etapa de 16 células, para expresar IFN $\tau$ , que luego actúa sobre las células inmunes para promover una respuesta antiinflamatoria en el oviducto (Talukder *et al.* 2018). Además, Wydooghe *et al.* (2017) describieron las embriotropinas como moléculas bioactivas que incluyen proteínas, lípidos y miARN, secretados por embriones de mamíferos. En los embriones de rumiantes, la embriotropina más conocida es codificada por el gen 15 estimulado por el IFN $\tau$  (ISG15) y otras citoquinas secretadas por las células trofoblásticas. Se ha demostrado que la suplementación de BOEC con VEs aisladas de medios condicionados por embriones de buena calidad inducen cambios transcripcionales específicos en las células, especialmente la regulación positiva de genes como el modificador tipo ubiquitina ISG15 (ISG-15), la dinamina MX como GTPasa 1 (MX1), 2'-O-5'-oligoadenilato sintetasa 1 (OAS1Y) y la proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas 1 (IFIT1). Estos genes son conocidos por ser estimulados por el interferón o por formar parte de la vía IFN $\tau$  (Dissanayake *et al.* 2021).

Además de la regulación genética, los miARN participan

en la comunicación celular materno-embrial. De hecho, Mazzarella *et al.* (2021) evaluaron el perfil de miARN en VEs pequeñas obtenidas por lavado oviductal y de BOEC de vacas preñadas, en comparación con vacas no preñadas, y encontraron que ocho miARN (bta-miR-126-5p, bta-miR-129, bta-miR -140, bta-miR-188, bta-miR-219, bta-miR-345-3p, bta-miR-4523 y bta-miR760-3p) estuvieron regulados positivamente en el FO de las vacas preñadas. Por otro lado, en las BOEC, seis miARN (bta-miR-133b, bta-miR-205, bta-miR-584, bta-miR-551a, bta-miR-1193 y bta-miR-1225-3p) estaban regulados positivamente en vacas no preñadas y ninguno estaba regulado positivamente en vacas preñadas. Además, Pavani *et al.* (2022) cultivaron embriones bovinos y demostraron que miR-378a-3p, que estaba regulado positivamente en las VEs secretadas por blastocistos, desempeñaba un papel crucial estimulando su eclosión. El análisis transcriptómico de embriones tratados con mimético/inhibidor de miR-378 mostró diferencias en la expresión de genes asociados con el desarrollo y la implantación de embriones, tales como RAP1GAP, ARFGEF2, SLC7A6, CENPA, SP1, LDLR, PYCR1, MYD88, TPP1 y NCOA3, demostrándose que el miR-378-3p es un marcador de la calidad embrionaria relacionado con la implantación. Los resultados de estos estudios sugieren que la interacción materno-embrial mediada por las VEs comienza en el oviducto y que las VEs podrían transportar biomoléculas que inducen cambios transcriptómicos en el tracto materno e influyen directamente en el desarrollo temprano del embrión.

### **Interacción de las VEs en el útero (*estudios in vivo e in vitro*)**

Tras desarrollarse durante los primeros días en el oviducto, el embrión finalmente llegará al útero donde se implantará para continuar su desarrollo. Durante este período, el embrión seguirá produciendo sus VEs y al mismo tiempo recibirá los que segregan el útero (Figura 1). La mayoría de los estudios han aislado las VEs de lavados uterinos y han identificado su relación con la gestación, especialmente durante el período preimplantacional, entre los días 16 y 22 de gestación en bovinos (Kusama *et al.* 2018; Nakamura *et al.* 2019; Malo Estepa *et al.* 2020), 10 y 18 en cerdos (Hua *et al.* 2021) y 10 y 17 en ovinos (Burns *et al.* 2016, 2018). Los estudios en humanos sobre las funciones de las VEs uterinas se han basado principalmente en modelos *in vitro* que utilizan líneas celulares endometriales y trofoblásticas (Evans *et al.* 2019; Gurung *et al.* 2021). Los estudios *in vivo* se han centrado principalmente en analizar el contenido de las VEs del líquido uterino [específicamente los microARN (Vilella *et al.* 2015)].



### Efecto del útero sobre el embrión

Varios estudios han utilizado modelos *in vitro* para evaluar los efectos de las VEs uterinas en el desarrollo embrionario temprano (Qiao *et al.* 2018; Lv *et al.* 2018). En un estudio realizado por Lv *et al.* (2018), se suplementaron embriones de 2 células durante el CIV con VEs obtenidas del útero de ratonas preñadas en el período de presencia de blastocistos tempranos (Aproximadamente 76 a 78 horas después de la inyección de Hormona Gonadotropina Coriónica Humana-HCG). Este tratamiento resultó en un aumento en el desarrollo de blastocistos, así como en la relación de células de la Masa interna (con sus siglas en inglés ICM), y en una mayor expresión de los transcriptos antiapoptóticos BCL-2 y del gen de pluripotencia Oct4, junto con una reducción de la apoptosis y del gen proapoptótico BAX (Lv *et al.* 2018).

Por otro lado, Qiao *et al.* (2018), trataron embriones obtenidos por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) bovinos durante el CIV con VEs aisladas de úteros que se encontraban en la etapa 2 del desarrollo del cuerpo lúteo (CL), es decir, 5-10 días después de la ovulación, cuando el embrión está llegando al útero. Se agregaron VEs a partir del día 3, 4 o 5 de cultivo, y se observaron efectos significativos solo cuando el tratamiento comenzó el día 4. Estos efectos incluyeron mayores tasas de desarrollo de blastocistos y de eclosión, mayor número total de células y una mejor relación ICM:TE. Además, se moduló la expresión de ciertos genes, con una regulación positiva de la acrogranina, un mitógeno implicado en la invasividad celular, y de IFN $\tau$ , asociado con la señalización embrionaria para el mantenimiento del CL y de la preñez. También se observó una reducción de la apoptosis y de genes relacionados con el estrés, como la proteína X asociada a BCL-2 (BAX), la proteína de choque térmico 70 y la Proteína de Unión a Inmunoglobulina. En esta línea, Aguilera *et al.* (2024) observaron que las VEs producidas por embriones de 5-7 días, tanto *in vivo* como *in vitro*, indujeron la transcripción de genes estimulados por IFN $\tau$  en el endometrio bovino, lo cual es crucial para el mantenimiento del CL y la modulación de la concentración de VEs y la carga de miARN derivada del endometrio. Así, las VEs uterinas desde los primeros días de gestación parecen estar implicadas en la modulación del desarrollo embrionario, promoviendo la proliferación celular y subregulando la expresión de genes relacionados con la apoptosis y el estrés celular, lo cual es esencial para el desarrollo y la calidad del embrión, así como para el establecimiento temprano de la preñez (Burns *et al.* 2018; Aguilera *et al.* 2024). Sin embargo, los efectos de las VEs liberadas por embriones en etapas tempranas sobre el

útero aún no se comprenden completamente, ya que la mayoría de los estudios se han centrado en las etapas posteriores, específicamente en el período de implantación.

### VEs derivadas del embrión y su efecto durante la elongación del conceptus y reconocimiento de la preñez

La elongación del concepto, que en el ganado vacuno comienza alrededor del día 12-13 y continúa hasta aproximadamente el día 19 después del estro, es un paso crucial para establecer la preñez. Durante el período de elongación se produce una rápida expansión del trofoblasto, así como también cambios en las membranas extraembrionarias y un aumento de la longitud y el peso del concepto (Lonergan and Forde 2015; Spencer *et al.* 2016).

El alargamiento embrionario está regulado por diversos factores, como las señales hormonales (por ejemplo, la progesterona, P4), la expresión génica (Spencer *et al.* 2016; Lonergan and Forde 2015) y las secreciones uterinas presentes en el fluido uterino. Estos elementos influyen en las células del trofoblasto, promoviendo la remodelación, proliferación, crecimiento y migración celular.

El alargamiento embrionario está regulado por diversos factores, como las señales hormonales (por ejemplo, la progesterona, P4), la expresión génica (Spencer *et al.* 2016; Lonergan and Forde 2015) y las secreciones uterinas (fluido uterino). Estos elementos influyen en las células del trofoblasto, promoviendo la remodelación, proliferación, crecimiento y migración celular. (Brooks *et al.* 2014). El FU es producido por células glandulares endometriales y contiene nutrientes esenciales para el crecimiento y el alargamiento del concepto, como carbohidratos, lípidos, aminoácidos y factores de crecimiento (Simintiras *et al.* 2019). De hecho, la falta de secreción de las glándulas uterinas impide que el embrión reciba el soporte necesario para su desarrollo, similar a lo que sucede *in vitro* donde no se logra la elongación embrionaria más allá del blastocisto eclosionado debido a falta de un ambiente adecuado.

Además, el FU también está compuesto por VEs que transportan sustancias bioactivas esenciales para la interacción entre el embrión y el entorno uterino materno (Bridi *et al.* 2020). Se ha identificado que las VEs en el FU de diversas especies de mamíferos desempeñan funciones importantes en las interacciones entre el concepto y el endometrio durante las primeras etapas de la gestación. Por ejemplo, en ovejas cíclicas, el número total de VEs



aumenta en el FU entre los días 10 y 14 post-estro, coincidiendo con el inicio de la elongación del concepto (Burns *et al.*, 2018). Durante las primeras etapas de la gestación en ovejas, se ha observado que las VEs marcadas con fluorescencia (KH67) son internalizadas tanto por el trofoectodermo del concepto como por las células del epitelio endometrial (Burns *et al.* 2016). Estás VEs contienen miARN, ARN y proteínas que modulan la proliferación de células del trofoectodermo, un proceso crucial para el alargamiento del embrión (Burns *et al.* 2016; Kusama *et al.* 2018). Además, las VEs de FU de ovejas preñadas en el día 14 contenían 195 proteínas, 81 miARN maduros conservados, así como 512 ARNm, con genes altamente expresados asociados con funciones y componentes ribosómicos (Burns *et al.* 2016).

Si bien estudios recientes han sugerido que los embriones producen y secretan VEs que las células endometriales pueden absorber (Kusama *et al.* 2018), el papel exacto de las VEs en la comunicación paracrína y el reconocimiento materno de la gestación aún no están claros. Por ejemplo, Kusama *et al.* (2018) identificaron 596 proteínas dentro de exosomas del FU de vacas preñadas, entre ellas IFN $\tau$ . Estos exosomas aumentaron la expresión de genes relacionados con la apoptosis, como TNFA, BAX, TP53 y CASP3, en células endometriales cultivadas *in vitro*. De manera similar, Nakamura *et al.* (2016) identificaron 266 proteínas específicas en el FU de ovejas preñadas, de las cuales 172 fueron proteínas exosomales. Este estudio también demostró que las VEs de ovejas gestantes en los días 15 y 17 contenían IFN $\tau$ , así como proteína bloqueadora de macrófagos (CAPG) y proteína miembro B1 de la familia aldo-ceto reductasa 1 (AKR1B1), y que estas VEs eran capaces de regular positivamente los niveles estimulados por IFN $\tau$ .

Un estudio reciente demostró que las VEs secretadas por embriones bovinos antes de la eclosión, tanto los producidos *in vitro* como *in vivo*, pueden modular la expresión de genes estimulados por IFN $\tau$  en células endometriales bovinas. En particular, las VEs liberados por embriones producidos *in vitro* indujeron un mayor número de genes expresados diferencialmente (3552) en comparación con las VEs de embriones *in vivo* (1838) en células endometriales bovinas. Esta investigación aporta evidencia valiosa sobre el impacto del origen embrionario en las interacciones tempranas mediadas por las VEs entre los embriones y el ambiente materno (Aguilera *et al.* 2024).

Además, en otro estudio realizado por Aguilera *et al.* (2024), se investigó el impacto de las VEs embrionarias en células endometriales bovinas cultivadas *in vitro*,

centrándose en cómo afectan la expresión de genes relacionados con la función endometrial y la respuesta al IFN $\tau$ . Los resultados mostraron que solo los embriones derivados *in vitro* indujeron genes estimulados por interferón no clásico. En un experimento adicional, se añadieron VEs liberadas por células endometriales en cultivo y recolectadas del fluido uterino (EV-UF) a embriones bovinos producidos *in vitro*. Se observó que el tratamiento con EV-UF mejoró la calidad de los embriones al aumentar la expresión de IFN $\tau$  y promover un mayor número de blastocitos expandidos y eclosionados. Por otro lado, el tratamiento con VEs de células endometriales también indujo la expresión de algunos genes relacionados con la calidad del embrión (Aguilera *et al.* 2024).

Estos hallazgos respaldan la idea de que la carga de VEs en el FU probablemente desempeña una función biológica relevante en las interacciones paracrinas entre el concepto y el endometrio durante el período de elongación. La ventana de elongación del concepto en el ganado se superpone con un período de alta pérdida de preñez. De hecho, Neupane *et al.* (2017) demostraron que aproximadamente un tercio de los blastocitos viables no logran alargarse ni secretar suficiente IFN $\tau$ , lo cual puede deberse a una interacción inadecuada entre el embrión y el útero, y a una receptividad uterina subóptima. Por lo tanto, la comunicación efectiva entre el embrión y el entorno uterino materno, incluido el papel de las VEs en esta interacción, es crucial para el reconocimiento materno de la gestación.

#### Avances de las VEs en Reproducción

Desde el descubrimiento de las vesículas extracelulares (VEs) como mediadoras en la comunicación entre el embrión y la madre, se ha realizado una extensa investigación para explorar su rol en los procesos reproductivos, tanto *in vivo* como *in vitro*. A pesar de los avances alcanzados, persisten desafíos importantes para replicar de manera precisa esta compleja comunicación en un entorno *in vitro*.

Las VEs se han consolidado como actores clave en la biología reproductiva, abriendo nuevas posibilidades para aplicaciones diagnósticas. En la reproducción asistida, la evaluación de gametos y embriones tradicionalmente se basa en métodos invasivos, como biopsias o análisis morfoquímicos. Sin embargo, el uso de VEs como biomarcadores no invasivos para evaluar la calidad de gametos y embriones está ganando cada vez más atención.

Por ejemplo, las VEs provenientes del embrión, del oviducto y del ambiente uterino se han asociado



estrechamente con el desarrollo exitoso del embrión. Estos hallazgos sugieren que los ensayos basados en VEs podrían ofrecer herramientas más precisas y menos invasivas para la evaluación de la fertilidad. En particular, ciertos miARNs, como el bta-mir-133b y bta-mir-483, presentes exclusivamente en las VEs del fluido folicular de vacas preñadas (Mazzarella et al., 2021), son absorbidos por los embriones cuando se añaden a los cultivos *in vitro* (Cañón-Beltrán et al., 2023; Mazzarella et al., 2023a). Aunque estos miARNs no afectan las tasas de clivaje ni la formación de blastocistos, el miR-483-3p mejora la actividad mitocondrial y reduce el contenido lipídico en los blastocistos, lo que sugiere su papel en la interacción entre el embrión y la madre durante la preimplantación (Mazzarella et al., 2023b). Además, la regulación al alza de bta-miR-148b en las VEs del fluido folicular mejora la calidad del embrión y modula la vía de señalización TGF- $\beta$  cuando se añade al sistema de cultivo *in vitro* (Cañón-Beltrán et al., 2024). Estos resultados subrayan la importancia de comprender los efectos funcionales del contenido de las VEs derivadas de fluidos maternos en el desarrollo y la calidad embrionaria.

A medida que las tecnologías de reproducción asistida continúan avanzando, el enfoque está cambiando hacia la transferencia electiva de un solo embrión, cuya tasa de éxito depende en gran medida de la selección precisa de los embriones. Estudios recientes sugieren que las VEs derivadas del embrión podrían ser un marcador confiable de la calidad embrionaria, influyendo en las respuestas de las células maternas y mejorando potencialmente el éxito de la implantación. Una vez que los diagnósticos basados en VEs se optimicen, podrían revolucionar el campo, aumentando las tasas de éxito en la transferencia de embriones.

El futuro de la investigación sobre las VEs en la biología reproductiva se beneficiará de la colaboración interdisciplinaria entre biología molecular, ciencias reproductivas, salud ambiental y medicina clínica. Al desvelar los roles de las VEs en los procesos reproductivos, los investigadores están en condiciones de desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas que, en última instancia, podrían mejorar los tratamientos de fertilidad y ampliar nuestra comprensión sobre las implicaciones de la salud reproductiva dentro del marco de One Health.

## Conclusión

Esta revisión destaca el papel crucial de las VEs en la interacción entre el embrión bovino y epitelio oviductal y el endometrio uterino. Estas vesículas son mediadores esenciales en la comunicación célula a célula durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, desempeñando un papel fundamental en la mejora de la calidad del embrión y en el éxito de la implantación, al influir en la modulación genética y el metabolismo embrionario. Además, las VEs tienen la capacidad de ajustar el entorno materno para satisfacer las necesidades del embrión. Sin embargo, persisten desafíos significativos, como la falta de estandarización en los métodos de aislamiento y caracterización de las VEs, lo que limita la comparación de resultados y la discriminación entre las diversas subpoblaciones de

vesículas. Aunque se han realizado avances importantes en la identificación de componentes específicos, como microARNs y proteínas en las VEs, es necesario conocer todas las biomoléculas presentes para comprender plenamente su función. Estos antecedentes sugieren un papel destacado de las VEs en la comunicación intercelular dentro del sistema reproductivo, revelando nuevas perspectivas en la embriogénesis y en diversos trastornos reproductivos. Asimismo, se considera que las VEs podrían convertirse en marcadores diagnósticos clave para evaluar la fertilidad, facilitando la evaluación de la calidad embrionaria mediante pruebas no invasivas o mínimamente invasivas, así como en la valoración de la receptividad endometrial.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés

**Contribuciones de los autores:** Todos los autores contribuyeron, en mayor o menor grado, a la consecución de la presente revisión y la redacción del manuscrito final.

**Aprobación del Comité de Experimentación Animal:** No se requiere.

**Financiación:** Este estudio no recibió financiación específica.



## Literatura Citada

- Aguilera C., Wong Y. S., Gutierrez-Reinoso M. A., Velásquez A. E., Melo-Báez B., Cabezas J., Caamaño D., Navarrete F., Castro F. O., and Rodriguez-Alvarez L. L. 2024. Embryo-maternal communication mediated by extracellular vesicles in the early stages of embryonic development is modified by in vitro conditions. *Theriogenology* 214, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.10.005>
- Almiñana C., and Bauersachs S. 2020. Extracellular vesicles: Multi-signal messengers in the gametes/embryo-oviduct cross-talk. *Theriogenology* 150, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.077>
- Almiñana C., Corbin E., Tsikis G., Alcántara-Neto A. S., Labas V., Reynaud K., Galio L., Uzbekov R., Garanina A. S., Druart X., and Mermilliod P. 2017. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction* 154, 153–168. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0054>
- Almiñana C., Tsikis G., Labas V., Uzbekov R., da Silveira J. C., Bauersachs S., and Mermilliod P. 2018. Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC Genomics* 19, 622. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4982-5>
- Alzahrani F. A., and Saadeldin I. M. (Eds) 2021. 'Role of Exosomes in Biological Communication Systems.' (Springer Singapore: Singapore) <https://doi.org/10.1007/978-981-15-6599-1>
- Atha D. H., and Ingham K. C. 1981. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *Journal of Biological Chemistry* 256, 12108–12117. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43240-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43240-1)
- Banlati C., Le Bourhis D., Bernardi O., Tomas D., Labas V., Salvetti P., Guyonnet B., Mermilliod P., and Saint-Dizier M. 2020. Oviduct Fluid Extracellular Vesicles Change the Phospholipid Composition of Bovine Embryos Developed In Vitro. *Int J Mol Sci* 21, E5326. <https://doi.org/10.3390/ijms21155326>
- Bathala P., Fereshteh Z., Li K., Al-Dossary A. A., Galileo D. S., and Martin-DeLeon P. A. 2018. Oviductal extracellular vesicles (oviductosomes, OVS) are conserved in humans: murine OVS play a pivotal role in sperm capacitation and fertility. *Mol Hum Reprod* 24, 143–157. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay003>
- Bauersachs S., Blum H., Mallok S., Wenigerkind H., Rief S., Prell K., and Wolf E. 2003. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol Reprod* 68, 1170–1177. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010660>
- Bauersachs S., Mermilliod P., and Almiñana C. 2020. The Oviductal Extracellular Vesicles' RNA Cargo Regulates the Bovine Embryonic Transcriptome. *Int J Mol Sci* 21, E1303. <https://doi.org/10.3390/ijms21041303>
- Bidarimath M., Khalaj K., Kridli R. T., Kan F. W. K., Koti M., and Tayade C. 2017. Extracellular vesicle mediated intercellular communication at the porcine maternal-fetal interface: A new paradigm for conceptus-endometrial cross-talk. *Sci Rep* 7, 40476. <https://doi.org/10.1038/srep40476>
- Bongiovanni L., Andriessen A., Wauben M. H. M., Hoen E. N. M. N.-t, and De Bruin A. 2021. Extracellular Vesicles: Novel Opportunities to Understand and Detect Neoplastic Diseases. *Vet Pathol* 58, 453–471. <https://doi.org/10.1177/0300985821999328>
- Bridi A., Perecin F., and Silveira J. C. da 2020. Extracellular Vesicles Mediated Early Embryo-Maternal Interactions. *Int J Mol Sci* 21, 1163. <https://doi.org/10.3390/ijms21031163>
- Brooks K., Burns G., and Spencer T. E. 2014. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *J Anim Sci Biotechnol* 5, 53. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-53>
- Burgess R. R. 2018. A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein Expression and Purification* 150, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.007>
- Burns G. W., Brooks K. E., O'Neil E. V., Hagen D. E., Behura S. K., and Spencer T. E. 2018. Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. *Biol Reprod* 98, 612–622. <https://doi.org/10.1093/biolre/foy011>
- Burns G. W., Brooks K. E., and Spencer T. E. 2016. Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. *Biol Reprod* 94, 56. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134973>
- Burns G., Brooks K., Wildung M., Navakanitworakul R., Christenson L. K., and Spencer T. E. 2014. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS One* 9, e90913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090913>
- Cañón-Beltrán K., Cajas Y. N., Almparis V., Egido S. G., Gutierrez-Adan A., González E. M., and Rizos D. 2024. MicroRNA-148b secreted by bovine oviductal extracellular vesicles enhance embryo quality through BPM/TGF-beta pathway. *Biol Res* 57, 11. <https://doi.org/10.1186/s40659-024-00488-z>



- Cañón-Beltrán K., Hamdi M., Mazzarella R., Cajas Y. N., Leal C. L. V., Gutiérrez-Adán A., González E. M., Da Silveira J. C., and Rizos D. 2021. Isolation, Characterization, and MicroRNA Analysis of Extracellular Vesicles from Bovine Oviduct and Uterine Fluids. Next Generation Culture Platforms for Reliable In Vitro Models'. (Eds TAL Brevini, A Fazeli and K Turksen) Methods in Molecular Biology. pp. 219–238. (Springer US: New York, NY) [https://doi:10.1007/978-1-0716-1246-0\\_16](https://doi:10.1007/978-1-0716-1246-0_16)
- Cocucci E., Racchetti G., and Meldolesi J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends in Cell Biology 19, 43–51. <https://doi:10.1016/j.tcb.2008.11.003>
- Cruz L., Romero J. A. A., Iglesia R. P., and Lopes M. H. 2018. Extracellular Vesicles: Decoding a New Language for Cellular Communication in Early Embryonic Development. Front. Cell Dev. Biol. 6, 94. <https://doi:10.3389/fcell.2018.00094>
- Dissanayake K., Nömm M., Lättekivi F., Ord J., Ressaissi Y., Godakumara K., Reshi Q. U. A., Viil J., Jääger K., Velthut-Meikas A., Salumets A., Jaakma Ü., and Fazeli A. 2021. Oviduct as a sensor of embryo quality: deciphering the extracellular vesicle (EV)-mediated embryo-maternal dialogue. J Mol Med (Berl) 99, 685–697. <https://doi:10.1007/s00109-021-02042-w>
- Dissanayake K., Nömm M., Lättekivi F., Ressaissi Y., Godakumara K., Lavrits A., Midekessa G., Viil J., Bæk R., Jørgensen M. M., Bhattacharjee S., Andronowska A., Salumets A., Jaakma Ü., and Fazeli A. 2020. Individually cultured bovine embryos produce extracellular vesicles that have the potential to be used as non-invasive embryo quality markers. Theriogenology 149, 104–116. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2020.03.008>
- Doyle L., and Wang M. 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. Cells 8, 727. <https://doi:10.3390/cells8070727>
- Edgar J. R. 2016. Q&A: What are exosomes, exactly? BMC Biol 14, 46. <https://doi:10.1186/s12915-016-0268-z>
- Evans J., Rai A., Nguyen H. P. T., Poh Q. H., Elgass K., Simpson R. J., Salamonsen L. A., and Greening D. W. 2019. Human Endometrial Extracellular Vesicles Functionally Prepare Human Trophectoderm Model for Implantation: Understanding Bidirectional Maternal-Embryo Communication. Proteomics 19, e1800423. <https://doi:10.1002/pmic.201800423>
- Ferraz M. de A. M. M., Carothers A., Dahal R., Noonan M. J., and Songsasen N. 2019. Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat. Sci Rep 9, 9484. <https://doi:10.1038/s41598-019-45857-x>
- Gad A., Hoelker M., Besenfelder U., Havlicek V., Cinar U., Rings F., Held E., Dufort I., Sirard M.-A., Schellander K., and Tesfaye D. 2012. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. Biol Reprod 87, 100. <https://doi:10.1095/biolreprod.112.099697>
- Gámez-Valero A., Monguió-Tortajada M., Carreras-Planella L., Franquesa M., Beyer K., and Borràs F. E. 2016. Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. Sci Rep 6, 33641. <https://doi:10.1038/srep33641>
- Giacomini E., Vago R., Sanchez A. M., Podini P., Zarovni N., Murdica V., Rizzo R., Bortolotti D., Candiani M., and Viganò P. 2017. Secretome of in vitro cultured human embryos contains extracellular vesicles that are taken up by the maternal side. Sci Rep 7, 5210. <https://doi:10.1038/s41598-017-05549-w>
- Greening D. W., Nguyen H. P. T., Elgass K., Simpson R. J., and Salamonsen L. A. (2016). Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. Biol Reprod 94, 38. <https://doi:10.1095/biolreprod.115.134890>
- Gurung S., Perocheau D., Touramanidou L., and Baruteau J. 2021. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. Cell Commun Signal 19, 47. <https://doi:10.1186/s12964-021-00730-1>
- Hamdi M., Cañón-Beltrán K., Mazzarella R., Cajas Y. N., Leal C. L. V., Gutierrez-Adan A., González E. M., Da Silveira J. C., and Rizos D. 2021. Characterization and profiling analysis of bovine oviduct and uterine extracellular vesicles and their miRNA cargo through the estrous cycle. FASEB J 35, e22000. <https://doi:10.1096/fj.202101023R>
- Hamdi M., Sánchez-Calabuig M. J., Rodríguez-Alonso B., Bagés Arnal S., Roussi K., Sturmey R., Gutiérrez-Adán A., Lonergan P., and Rizos D. 2019. Gene expression and metabolic response of bovine oviduct epithelial cells to the early embryo. Reproduction 158, 85–94. <https://doi:10.1530/REP-18-0561>
- Hua R., Wang Y., Lian W., Li W., Xi Y., Xue S., Kang T., and Lei M. 2021. Small RNA-seq analysis of extracellular vesicles from porcine uterine flushing fluids during peri-implantation. Gene 766, 145117. <https://doi:10.1016/j.gene.2020.145117>
- Ismail N., Wang Y., Dakhlallah D., Moldovan L., Agarwal K., Batte K., Shah P., Wisler J., Eubank T. D., Tridandapani S., Paulaitis M. E., Piper M. G., and Marsh C. B. 2013. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. Blood 121, 984–995. <https://doi:10.1182/blood-2011-08-374793>



- Jamaludin N. A., Thurston L. M., Witek K. J., Meikle A., Basatvat S., Elliott S., Hunt S., Andronowska A., and Fazeli A. 2019. Efficient isolation, biophysical characterisation and molecular composition of extracellular vesicles secreted by primary and immortalised cells of reproductive origin. *Theriogenology* 135, 121–137. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2019.06.002>
- Jeppesen D. K., Hvam M. L., Primdahl-Bengtson B., Boysen A. T., Whitehead B., Dyrskjøt L., Ørntoft T. F., Howard K. A., and Ostenfeld M. S. 2014. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J of Extracellular Vesicle* 3, 25011. <https://doi:10.3402/jev.v3.25011>
- Jeppesen D. K., Zhang Q., Franklin J. L., and Coffey R. J. 2023. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends in Cell Biology* 33, 667–681. <https://doi:10.1016/j.tcb.2023.01.002>
- Johnstone R. M., Adam M., Hammond J. R., Orr L., and Turbide C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry* 262, 9412–9420. [https://doi:10.1016/S0021-9258\(18\)48095-7](https://doi:10.1016/S0021-9258(18)48095-7)
- Kölle S., Dubielzig S., Reese S., Wehrend A., König P., and Kummer W. 2009. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol Reprod* 81, 267–274. <https://doi:10.1095/biolreprod.108.073874>
- Kölle S., Hughes B., and Steele H. 2020. Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. *Molecular Reproduction and Development* 87, 650–662. <https://doi:10.1002/mrd.23352>
- Konoshenko M. Yu., Lekchnov E. A., Vlassov A. V., and Laktionov P. P. 2018. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed Research International* 2018, 1–27. <https://doi:10.1155/2018/8545347>
- Krawczynski K., Najmula J., Bauersachs S., and Kaczmarek M. M. 2015. MicroRNAome of porcine conceptuses and trophoblasts: expression profile of microRNAs and their potential to regulate genes crucial for establishment of pregnancy. *Biol Reprod* 92, 21. <https://doi:10.1095/biolreprod.114.123588>
- Kusama K., Nakamura K., Bai R., Nagaoka K., Sakurai T., and Imakawa K. 2018. Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 1370–1375. <https://doi:10.1016/j.bbrc.2017.11.176>
- Lange-Consiglio A., Perrini C., Albini G., Modina S., Lodde V., Orsini E., Esposti P., and Cremonesi F. 2017. Oviductal microvesicles and their effect on in vitro maturation of canine oocytes. *Reproduction* 154, 167–180. <https://doi:10.1530/REP-17-0117>
- Leal C. L. V., Cañón-Beltrán K., Cajas Y. N., Hamdi M., Yaryes A., Millán de la Blanca M. G., Beltrán-Breña P., Mazzarella R., da Silveira J. C., Gutiérrez-Adán A., González E. M., and Rizos D. 2022. Extracellular vesicles from oviductal and uterine fluids supplementation in sequential in vitro culture improves bovine embryo quality. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 13, 116. <https://doi:10.1186/s40104-022-00763-7>
- Lee K., Shao H., Weissleder R., and Lee H. 2015. Acoustic Purification of Extracellular Microvesicles. *ACS Nano* 9, 2321–2327. <https://doi:10.1021/nn506538f>
- Liu Y.-J., and Wang C. 2023. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Commun Signal* 21, 77. <https://doi:10.1186/s12964-023-01103-6>
- Lonergan P., Fair T., Forde N., and Rizos D. 2016. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology* 86, 270–277. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.040>
- Lonergan P., and Forde N. 2015. The Role of Progesterone in Maternal Recognition of Pregnancy in Domestic Ruminants. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 216, 87–104. [https://doi:10.1007/978-3-319-15856-3\\_6](https://doi:10.1007/978-3-319-15856-3_6)
- Lopera-Vásquez R., Hamdi M., Fernandez-Fuertes B., Maillo V., Beltrán-Breña P., Calle A., Redruello A., López-Martín S., Gutierrez-Adán A., Yáñez-Mó M., Ramírez M. Á., and Rizos D. 2016. Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One* 11, e0148083. <https://doi:10.1371/journal.pone.0148083>
- Lopera-Vasquez R., Hamdi M., Maillo V., Gutierrez-Adan A., Bermejo-Alvarez P., Ramírez M. Á., Yáñez-Mó M., and Rizos D. 2017. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction* 153, 461–470. <https://doi:10.1530/REP-16-0384>
- Lötvall J., Hill A. F., Hochberg F., Buzás E. I., Di Vizio D., Gardiner C., Gho Y. S., Kurochkin I. V., Mathivanan S., Quesenberry P., Sahoo S., Tahara H., Wauben M. H., Witwer K. W., and Théry C. 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J of Extracellular Vesicle* 3, 26913. <https://doi:10.3402/jev.v3.26913>



- Lv C., Yu W.-X., Wang Y., Yi D.-J., Zeng M.-H., and Xiao H.-M. 2018. MiR-21 in extracellular vesicles contributes to the growth of fertilized eggs and embryo development in mice. *Biosci Rep* 38, BSR20180036. <https://doi:10.1042/BSR20180036>
- Maillo V., Gaora P. Ó., Forde N., Besenfelder U., Havlicek V., Burns G. W., Spencer T. E., Gutierrez-Adan A., Lonergan P., and Rizos D. 2015. Oviduct-Embryo Interactions in Cattle: Two-Way Traffic or a One-Way Street? *Biol Reprod* 92, 144. <https://doi:10.1095/biolreprod.115.127969>
- Malo Estepa I., Tinning H., Rosas Vasconcelos E. J., Fernandez-Fuertes B., Sánchez J. M., Burns G. W., Spencer T. E., Lonergan P., and Forde N. 2020. Protein Synthesis by Day 16 Bovine Conceptuses during the Time of Maternal Recognition of Pregnancy. *Int J Mol Sci* 21, E2870. <https://doi:10.3390/ijms21082870>
- Mazzarella R., Bastos N. M., Bridi A., Del Collado M., Andrade G. M., Pinzon J., Prado C. M., Silva L. A., Meirelles F. V., Pugliesi G., Perecin F., and da Silveira J. C. 2021. Changes in Oviductal Cells and Small Extracellular Vesicles miRNAs in Pregnant Cows. *Front Vet Sci* 8, 639752. <https://doi:10.3389/fvets.2021.639752>
- Mettlen M., Chen P.-H., Srinivasan S., Danuser G., and Schmid S. L. 2018. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 871–896. <https://doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012644>
- Mohammadipoor A., Hershfield M. R., Linsenbardt H. R., Smith J., Mack J., Natesan S., Averitt D. L., Stark T. R., and Sosanya N. M. 2023. Biological function of Extracellular Vesicles (EVs): a review of the field. *Mol Biol Rep* 50, 8639–8651. <https://doi:10.1007/s11033-023-08624-w>
- Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M., Chavrier P., Raposo G., and D’Souza-Schorey C. 2009. ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Current Biology* 19, 1875–1885. <https://doi:10.1016/j.cub.2009.09.059>
- Muralidharan-Chari V., Clancy J. W., Sedgwick A., and D’Souza-Schorey C. 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science* 123, 1603–1611. <https://doi:10.1242/jcs.056000>
- Nakamura K., Kusama K., Bai R., Sakurai T., Isuzugawa K., Godkin J. D., Suda Y., and Imakawa K. 2016) Induction of IFNT-Stimulated Genes by Conceptus-Derived Exosomes during the Attachment Period. *PLoS One* 11, e0158278. <https://doi:10.1371/journal.pone.0158278>
- Nakamura K., Kusama K., Hori M., and Imakawa K. 2021. The effect of bta-miR-26b in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune system during the implantation period. *Biochem Biophys Res Commun* 573, 100–106. <https://doi:10.1016/j.bbrc.2021.08.019>
- Nakamura K., Kusama K., Ideta A., Imakawa K., and Hori M. 2020. IFNT-independent effects of intrauterine extracellular vesicles (EVs) in cattle. *Reproduction* 159, 503–511. <https://doi:10.1530/REP-19-0314>
- Nakamura K., Kusama K., Ideta A., Kimura K., Hori M., and Imakawa K. 2019. Effects of miR-98 in intrauterine extracellular vesicles on maternal immune regulation during the peri-implantation period in cattle. *Sci Rep* 9, 20330. <https://doi:10.1038/s41598-019-56879-w>
- Neupane M., Geary T. W., Kiser J. N., Burns G. W., Hansen P. J., Spencer T. E., and Neiberger H. L. 2017. Loci and pathways associated with uterine capacity for pregnancy and fertility in beef cattle. *PLoS One* 12, e0188997. <https://doi:10.1371/journal.pone.0188997>
- Ng Y. H., Rome S., Jalabert A., Forterre A., Singh H., Hincks C. L., and Salamonsen L. A. 2013. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One* 8, e58502. <https://doi:10.1371/journal.pone.0058502>
- Pavani K. C., Hendrix A., Van Den Broeck W., Couck L., Szymanska K., Lin X., De Koster J., Van Soom A., and Leemans B. 2018. Isolation and Characterization of Functionally Active Extracellular Vesicles from Culture Medium Conditioned by Bovine Embryos In Vitro. *Int J Mol Sci* 20, 38. <https://doi:10.3390/ijms20010038>
- Pavani K. C., Meese T., Pascottini O. B., Guan X., Lin X., Peelman L., Hamacher J., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Boel A., Heindryckx B., Tillemans K., Van Soom A., Gadella B. M., Hendrix A., and Smits K. 2022. Hatching is modulated by microRNA-378a-3p derived from extracellular vesicles secreted by blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2122708119. <https://doi:10.1073/pnas.2122708119>
- Qiao F., Ge H., Ma X., Zhang Y., Zuo Z., Wang M., Zhang Y., and Wang Y. 2018. Bovine uterus-derived exosomes improve developmental competence of somatic cell nuclear transfer embryos. *Theriogenology* 114, 199–205. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2018.03.027>
- Raposo G., and Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200, 373–383. <https://doi:10.1083/jcb.201211138>



- Ratajczak M. Z., and Ratajczak J. 2020. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia* 34, 3126–3135. <https://doi:10.1038/s41375-020-01041-z>
- Rodríguez-Alonso B., Sánchez J. M., Hamdi M., McDonald M., Havlicek V., Besenfelder U., Lonergan P., and Rizos D. 2020. Asynchrony between the early embryo and the reproductive tract affects subsequent embryo development in cattle. *Reprod Fertil Dev* 32, 564–571. <https://doi:10.1071/RD19360>
- Ruiz-González I., Xu J., Wang X., Burghardt R. C., Dunlap K. A., and Bazer F. W. 2015. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes. *Reproduction* 149, 281–291. <https://doi:10.1530/REP-14-0538>
- Schiller M., Bekeredjian-Ding I., Heyder P., Blank N., Ho A. D., and Lorenz H.-M. 2008. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ* 15, 183–191. <https://doi:10.1038/sj.cdd.4402239>
- Sebbagh M., Renvoizé C., Hamelin J., Riché N., Bertoglio J., and Bréard J. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3, 346–352. <https://doi:10.1038/35070019>
- Sidrat T., Khan A. A., Joo M.-D., Wei Y., Lee K.-L., Xu L., and Kong I.-K. 2020. Bovine Oviduct Epithelial Cell-Derived Culture Media and Exosomes Improve Mitochondrial Health by Restoring Metabolic Flux during Pre-Implantation Development. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 7589. <https://doi:10.3390/ijms21207589>
- Simintiras C. A., Sánchez J. M., McDonald M., Martins T., Binelli M., and Lonergan P. 2019. Biochemical characterization of progesterone-induced alterations in bovine uterine fluid amino acid and carbohydrate composition during the conceptus elongation window†. *Biol Reprod* 100, 672–685. <https://doi:10.1093/biolre/ioy234>
- Sohel M. M. H., Hoelker M., Noferesti S. S., Salilew-Wondim D., Tholen E., Looft C., Rings F., Uddin M. J., Spencer T. E., Schellander K., and Tesfaye D. 2013. Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extracellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PLoS One* 8, e78505. <https://doi:10.1371/journal.pone.0078505>
- Spencer T. E., Forde N., and Lonergan P. 2016. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci* 99, 5941–5950. <https://doi:10.3168/jds.2015-10070>
- Spencer T. E., Johnson G. A., Bazer F. W., and Burghardt R. C. 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128, 657–668. <https://doi:10.1530/rep.1.00398>
- Stahl P. D., and Raposo G. 2019. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology* 34, 169–177. <https://doi:10.1152/physiol.00045.2018>
- Talukder A. K., Rashid M. B., Yousef M. S., Kusama K., Shimizu T., Shimada M., Suarez S. S., Imakawa K., and Miyamoto A. (2018). Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. *Sci Rep* 8, 7850. doi:10.1038/s41598-018-26224-8
- Tan Q., Shi S., Liang J., Cao D., Wang S., and Wang Z. 2021. Endometrial cell-derived small extracellular vesicle miR-100-5p promotes functions of trophoblast during embryo implantation. *Mol Ther Nucleic Acids* 23, 217–231. <https://doi:10.1016/j.omtn.2020.10.043>
- Tan Q., Shi S., Liang J., Zhang X., Cao D., and Wang Z. 2020. MicroRNAs in Small Extracellular Vesicles Indicate Successful Embryo Implantation during Early Pregnancy. *Cells* 9, 645. <https://doi:10.3390/cells9030645>
- Théry C., Amigorena S., Raposo G., and Clayton A. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *CP Cell Biology* 30. <https://doi:10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Ueda K., Ishikawa N., Tatsuguchi A., Saichi N., Fujii R., and Nakagawa H. 2014. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci Rep* 4, 6232. <https://doi:10.1038/srep06232>
- Vilella F., Moreno-Moya J. M., Balaguer N., Grasso A., Herrero M., Martínez S., Marcilla A., and 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, 3210–3221. <https://doi:10.1242/dev.124289>



- Welsh J. A., Goberdhan D. C. I., O'Driscoll L., Buzas E. I., Blenkiron C., Bussolati B., Cai H., Di Vizio D., Driedonks T. A. P., Erdbrügger U., Falcon-Perez J. M., Fu Q., Hill A. F., Lenassi M., Lim S. K., Mahoney M. G., Mohanty S., Möller A., Nieuwland R., Ochiya T., Sahoo S., Torrecilhas A. C., Zheng L., Zijlstra A., Abuelreich S., Bagabas R., Bergese P., Bridges E. M., Brucale M., Burger D., Carney R. P., Cocucci E., Crescitelli R., Hanser E., Harris A. L., Haughey N. J., Hendrix A., Ivanov A. R., Jovanovic-Talisman T., Kruh-Garcia N. A., Ku'ulei-Lyn Faustino V., Kyburz D., Lässer C., Lennon K. M., Lötvall J., Maddox A. L., Martens-Uzunova E. S., Mizenko R. R., Newman L. A., Ridolfi A., Rohde E., Rojalin T., Rowland A., Saftics A., Sandau U. S., Saugstad J. A., Shekari F., Swift S., Ter-Ovanesyan D., Tosar J. P., Useckaite Z., Valle F., Varga Z., Van Der Pol E., Van Herwijnen M. J. C., Wauben M. H. M., Wehman A. M., Williams S., Zendrini A., Zimmerman A. J., MISEV Consortium, Théry C., and Witwer K. W. 2024. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J of Extracellular Vesicle* 13, e12404. <https://doi:10.1002/jev2.12404>
- Wickman G., Julian L., and Olson M. F. 2012. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ* 19, 735–742. <https://doi:10.1038/cdd.2012.25>
- Witwer K. W., Buzás E. I., Bemis L. T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-'t Hoen E. N., Piper M. G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M. H., and Hochberg F. 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J of Extracellular Vesicle* 2, 20360. <https://doi:10.3402/jev.v2i0.20360>
- Wydooghe E., Vandaele L., Heras S., De Sutter P., Deforce D., Peelman L., De Schauwer C., and Van Soom A. 2017. Autocrine embryotropins revisited: how do embryos communicate with each other in vitro when cultured in groups? *Biol Rev Camb Philos Soc* 92, 505–520. <https://doi:10.1111/brv.12241>
- Zhao Z., Wijerathne H., Godwin A. K., and Soper S. A. 2021. Isolation and analysis methods of extracellular vesicles (EVs). EVCNA. <https://doi:10.20517/evcna.2021.07>

