

CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS PRODUCIDOS POR CÉLULAS OVIDUCTALES *IN VIVO* E *IN VITRO*, EN LA ESPECIE BOVINA

Characterization of *in vivo* and *in vitro* exosomes in the bovine specie

Rueda, A.¹; Toledo, S.^{1*}; Matás C.^{1,2*}

1. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Internacional para la Educación Superior y la Investigación “Campus Mare Nostrum”, Universidad de Murcia, Murcia, 30100, España.
2. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Murcia (IMIB-Arrixaca), Murcia, 30120, España.

Autores de correspondencia: C. Matás, cmatas@um.es, A. Rueda, smaria.toledo@um.es

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Grado (Veterinaria)

Enviado: 4/11/2022

Aceptado: 13/2/2023

RESUMEN

Las vesículas extracelulares (VEs), exosomas y micro vesículas son un tipo de estructuras heterogéneas presentes en la mayoría de los fluidos orgánicos incluyendo el fluido oviductal. Las VEs contienen varios compuestos derivados de la célula original, como proteínas, lípidos, ARNm, miARN y ADN. Las VEs en el oviducto son producidas por las células epiteliales y entre sus funciones se encuentran: la interacción con los espermatozoides, mantener la viabilidad de éstos, participar en la maduración de los ovocitos y en el proceso de fecundación.

Durante la fecundación *in vitro* y con el fin de mejorarla imitando las condiciones *in vivo*, numerosos investigadores han utilizado cultivos de células del epitelio oviductal bovino (CEOB) con notables mejoras. Estas células producen, entre otros componentes VEs, por ello, en este trabajo hemos planteado un estudio comparativo de VEs presentes en el fluido oviductal (FO) bovino recogido en momentos próximos a la ovulación (*in vivo*) y de aquellas VEs producidas en cultivos de CEOB a los 7 días de cultivo (*in vitro*) comparando el tamaño, la distribución de la población y la concentración de proteína en ambos tipos. Las VEs se identificaron mediante microscopía electrónica, su tamaño mediante dispersión de luz láser y la concentración de proteínas mediante el método Bradford.

Los resultados mostraron que el tamaño de las VEs fue similar entre ambos grupos experimentales. Por otro lado, sí que se observaron diferencias en cuanto a la concentración de proteínas. Las VEs obtenidas *in vivo* contenían mayor cantidad de proteína en su cargo que en las VEs obtenidas *in vitro*.

En cuanto a identificación de las VEs mediante microscopía electrónica de transmisión, solo pudieron ser observadas aquellas obtenidas *in vivo*. Este hecho podría deberse al lugar de dónde han sido recogidas, al método de cultivo de células epiteliales oviductales bovinas o la escasez en su producción.

Palabras clave: vesículas extracelulares, bovino, fluido oviductal, cultivo celular, oviducto.

SUMMARY

Recent studies have shown that extracellular vesicles may play an important role in modulating the fertilizing capacity of sperm during their journey through the female reproductive tract. Extracellular vesicles (EVs), exosomes and micro vesicles, are a class of heterogeneous structures found in most body fluids, including bovine oviductal fluid. EVs contain various compounds derived from the original cell, such as proteins, lipids, mRNA, miRNA and DNA. EVs in the oviduct are produced by epithelial cells and their functions include interaction with spermatozoa, maintenance of their viability, participation in oocyte maturation and the fertilization process.

During the *in vitro* fertilization process and to improve it by mimicking *in vivo* conditions, many researchers have used bovine oviductal epithelial cell (BOEC) cultures with remarkable improvements. These cells produce, among other components, EVs, for this reason, in this work we have proposed a comparative study of the EVs present in the bovine oviductal fluid (OF) collected at times close to ovulation (*in vivo*) and those produced in BOEC cultures after 7 days of culture (*in vitro*) comparing the size, population distribution and protein concentration in both types. The EVs were identified by electron microscopy, their size by dynamic light scattering and their protein concentration by the Bradford method.

The results showed that the size of EVs evaluated per intensity was similar between both experimental groups. However, differences were observed in terms of protein concentration. EVs obtained *in vivo* contained a greater amount of protein in their cargo than the EVs obtained *in vitro*. Regarding the identification of EVs by transmission electron microscopy, only those obtained *in vivo* could be observed. This fact could be due to the place of collection, the method of culturing bovine oviductal epithelial cells or the scarcity of their production.

Keywords: extracellular vesicles, bovine, oviductal fluid, cell culture, oviduct.

INTRODUCCIÓN

El paso de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino es una forma compleja de selección para aumentar al máximo la probabilidad de que los espermatozoides que alcancen el ovocito tengan la mayor calidad y probabilidad de fecundar al ovocito con éxito.

En la vaca el tracto reproductivo está compuesto por varios órganos. Entre ellos se encuentran: los ovarios, encargados de producir los gametos; los oviductos que participan en la formación de un ambiente necesario para que se lleve a cabo la unión de los gametos; el útero, lugar donde el embrión va a llevar a cabo su

desarrollo embrionario; la vagina, que protege el tracto genital superior; y por último la vulva, que es la abertura del tracto genital hacia el exterior y además, permite la entrada del pene durante la cópula y la salida del ternero al ambiente (Ball & Peters, 1987). En la figura 1 se muestra el tracto genital de la vaca completo y separado del resto de tejidos adyacentes y ligamentos, respectivamente.

En la especie bovina, el oviducto mide aproximadamente entre 25-30 cm y presenta cuatro regiones: el infundíbulo, la ampolla, el istmo y la región útero-tubárica. En la figura 2 se muestran estas regiones. En términos generales, el oviducto interviene en el transporte,

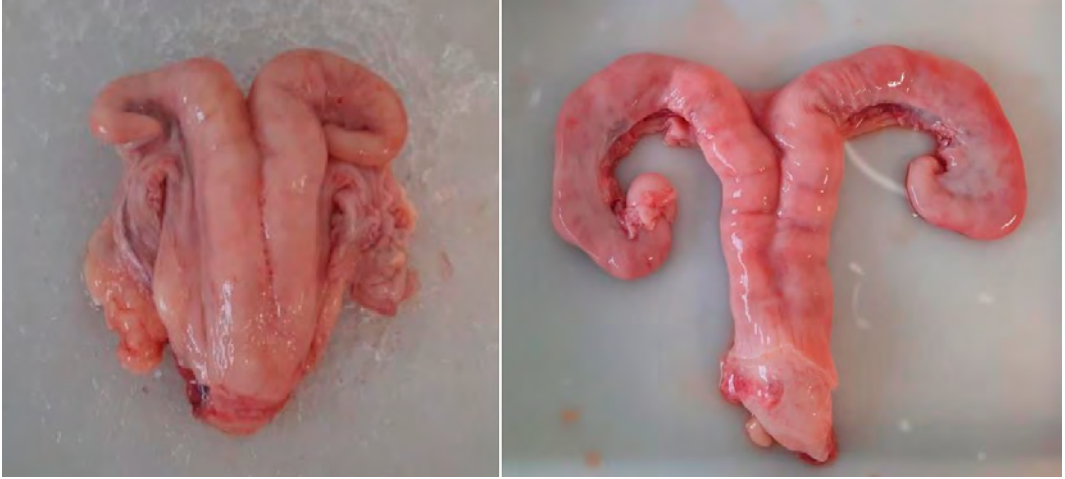


Figura 1. Tracto genital de la vaca. En la imagen de la izquierda podemos observar el tracto genital de la vaca completo. En la imagen de la derecha, podemos observar cómo se encuentra el tracto genital separado de los ligamentos y tejidos adyacentes.



Figura 2. Disección de oviducto bovino. Se muestran las tres regiones: ampolla (a), unión istmo-ampular (uia), istmo (i) y unión útero-tubárica.

almacenamiento y capacitación de los gametos, bloqueo de la polispermia y el desarrollo embrionario temprano (Holt & Fazeli, 2010). El infundíbulo es la región del oviducto que conecta el ovario y el oviducto. Es asimétrico y con forma de embudo y contiene fimbrias adyacentes al ovario que permiten la captación del ovocito. Además, se encarga del transporte de los ovocitos (Yániz, Lopez-Gatius, Santolaria & Mullins, 2000). La ampolla se encuentra en el centro y es la región de mayor longitud. En ella ocurre la fecundación, de ahí su impor-

tancia. Por su parte, el istmo forma el tercio proximal del oviducto y está conectado al útero mediante la unión útero-tubárica. Esta región, el istmo, es el lugar dónde ocurre la capacitación de los espermatozoides (Hunter, 1998).

La pared del oviducto está formada por tres capas: serosa, muscular y mucosa. La túnica serosa es la capa más externa y está compuesta en gran parte por el mesotelio del peritoneo y una capa de tejido conectivo muy vascularizada (túnica subserosa). La túnica muscular está formada por dos capas de músculos: longitudinal

en la parte externa y circular en la parte interna. Y, por último, la túnica mucosa que es la más interna y está compuesta por una lámina propia de tejido conjuntivo laxo y epitelio columnar simple (Lombard, Morgan & McNutt, 1950).

En la especie bovina el ciclo estral dura entre 17 a 24 días y se divide en cuatro fases: i) el estro, período de receptividad sexual (día 0), ii) el metaestro, período post-ovulatorio (días 1-4), iii) el diestro, donde el cuerpo lúteo está activo (días 5-18) y en último lugar iv) el pro-estro, período antes del celo (días 18-20). Además, el ciclo estral también puede ser definido según la función ovárica en dos fases que dependen del tipo de folículo: la fase folicular (proestro y estro) y la fase luteal (metaestro y diestro) (Forde, Beltman, Lonergan, Diskin, Roche & Crowe, 2011).

El inicio del ciclo estral se produce por la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo, que ejerce su acción en la adenohipófisis para la síntesis y liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que a su vez, estimula el crecimiento folicular. La FSH sólo se almacena en gránulos secretores del citoplasma durante cortos períodos de tiempo, al contrario que la LH, que se almacena en períodos más largos durante todo el ciclo estral. Los folículos que se encuentran en desarrollo secretan estradiol (E2), lo que estimula la producción de LH que, a su vez, induce la ovulación y la liberación del ovocito hacia el oviducto para ser fecundado (Webb, Nicholas, Gong, Campbell, Gutiérrez, Garverick & Armstrong, 2003). El pico de LH dura aproximadamente 7-8 horas y 24-32 horas después de este momento ocurre la ovulación (Ball & Peters, 1987).

En la vaca se desarrollan varios folículos hasta la etapa antral pero, sólo el folículo dominante, que es el más maduro, responde a los niveles de FSH y será el que ovule (Webb *et al.*, 2003). Está demostrado que la progesterona (P4) y el E2 controlan la actividad secretora del oviducto, incluso el contenido de vesículas ex-

tracelulares (VEs) oviductales. Además, el sitio donde se produce la ovulación cambia la composición del fluido oviductal (Gatien, Mermilod, Tsikis, Bernardi, Janati Idrissi, Uzbekov, Le Bourhis, Salvetti, Almiñana & Saint-Dizier, 2019). La concentración, el tamaño y el contenido de las VEs va cambiando a lo largo de todo el ciclo estral. Por ejemplo: durante la fase luteal, el número y el tamaño de VEs es mayor que en la fase folicular y esto parece ser consecuencia de la mayor presencia de la P4 (Laezer, Palma-Vera, Liu, Frank, Trakooljul, Vernunft, Schoen & Chen, 2020).

Tras la ovulación, las estructuras foliculares evolucionan para formar cuerpos lúteos (CL) que comienzan a producir y liberar P4, hormona que permite que pueda mantenerse la gestación y bloquear el eje hipotálamo-hipofisario. Si no hay fecundación, los niveles de P4 son bajos en el estro y van aumentando hasta llegar a niveles más altos en diestro. La oxitocina induce la secreción pulsátil de prostaglandina F2 α (PGF2 α) del útero que provoca la regresión del CL e interrumpe la fase luteal dando lugar al inicio de un nuevo ciclo ovárico (Forde *et al.*, 2011). En la figura 3 se muestra el esquema del patrón de secreción de las hormonas LH, FSH, P4 y el patrón de crecimiento de los folículos ováricos durante el ciclo estral de la vaca.

El fluido oviductal (FO) en el momento de la fecundación tiene un pH neutro o ligeramente básico y es el medio fisiológico en el que tiene lugar la capacitación de espermatozoides, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Carrasco, Coy, Avilés, Gadea & Romar, 2008). Las hormonas, principalmente esteroides ováricos, controlan el funcionamiento del oviducto que es una región donde se producen numerosos cambios en la composición del fluido oviductal en diferentes lugares del mismo, y durante las diferentes etapas del ciclo estral (Carrasco *et al.*, 2008). Estas hormonas participan en la tasa de secreción del fluido a través del control del paso de iones por el epitelio del oviducto (Leese, Tay, Reischl & Downing, 2001). Los

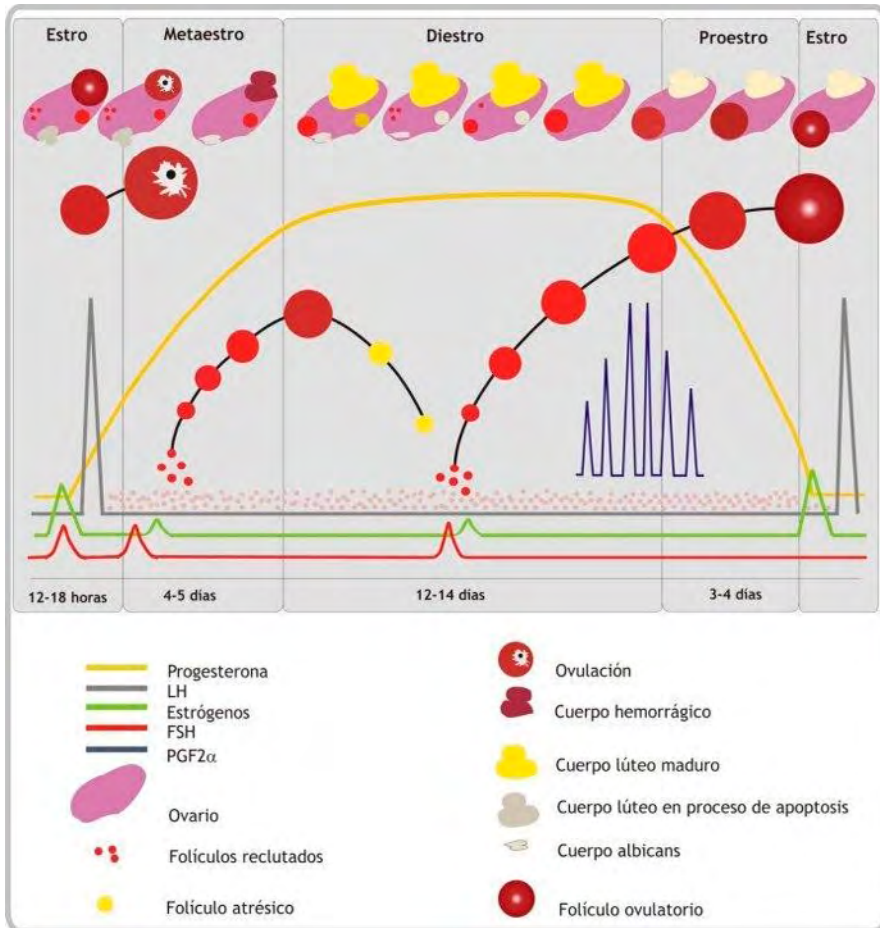


Figura 3. Representación esquemática del patrón de secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la progesterona (P4) así como, el patrón de crecimiento de los folículos ováricos durante el ciclo estral en la especie bovina (Imagen tomada de https://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/el-ciclo-estral-de-la-vaca/#Ciclo_estral_de_la_vaca).

estrógenos provocan hipertrofia, maduración y aumento en la altura de las células secretoras y reponen las células ciliadas. Por otro lado, la P4 causa atrofia y disminución de la actividad secretora. Todo esto, provoca alteraciones en la actividad de síntesis proteica lo que conlleva a cambios en la producción del fluido oviductal (Leese *et al.*, 2001).

Las células oviductales pueden conferir mejor ambiente a los espermatozoides, sobre todo, cuando la calidad del semen es inadecuada o cuando se quiere utilizar estos espermatozoides para la fecundación *in vitro* (FIV) (López-Úbeda, García-Vázquez, Gadea & Matás, 2017). La interacción que se produce entre las CEOB y el reservorio de espermatozoides permite que se realice

una selección de los espermatozoides adecuada y un mantenimiento de la competencia en la fecundación (Luño, López-Úbeda, García-Vázquez, Gil & Matás, 2013).

El FO es una mezcla compleja de iones, azúcares, proteínas y lípidos (Hugentobler, Sreenan, Humpherson, Leese, Diskin & Morris, 2010) cuyo volumen y composición varían a lo largo del ciclo estral (Carrasco *et al.*, 2008). En la vaca, se ha observado que el volumen de FO incrementa durante la fase folicular (Hunter, 2012). Muchas proteínas del fluido provienen del trasudado del suero, por ejemplo: albúminas, α -, β -, γ -globulinas y lipoproteínas de alta densidad (Stanke, Sikes, Deyoung & Tumbleson, 1974). Sin embargo, algunos estudios realizados *in vitro* en cultivos de CEOB han demostrado que las células cultivadas también pueden sintetizar y secretar una gran variedad de proteínas y péptidos. En el oviducto también se encuentran las VEs y su función en las diferentes partes del mismo, se encuentra relacionada con la participación en sus acciones biológicas como son: la migración/función de los espermatozoides, la fecundación, el desarrollo del embrión antes de la implantación y, finalmente, el transporte del embrión (Harris, Stephens & Winuthayanon, 2020).

Las células del cultivo de CEOB, así como su secretoma, crean unas condiciones adecuadas para la fecundación *in vitro* y facilitan el desarrollo embrionario temprano (Sidrat, Khan, Joo, Wei, Lee, Xu & Kong, 2020). Las aplicaciones del sistema de cultivo de CEOB y sus derivados se consideran un gran avance en la reproducción asistida. Hasta el momento, se han formulado multitud de medios de cultivo para el desarrollo *in vitro* de embriones preimplantacionales (Sidrat *et al.*, 2020). Aunque estos medios están producidos para que se parezcan a la composición del fluido oviductal *in vivo*, los que se encuentran disponibles en la actualidad todavía carecen de varias proteínas y VEs del FO que son desconocidos (Abe & Hoshi, 1997). En cuanto a la embriogénesis,

los factores secretados por las CEOB provocan un intercambio de señales entre el embrión y el ambiente externo (Perrini, Esposti, Cremonesi & Consiglio, 2018). Sin embargo, los cambios metabólicos de los embriones en el desarrollo siguen sin conocerse (Saadeldin, Kim, Choi & Lee, 2014).

Se ha comprobado que los sistemas de cocultivo en monocapa de CEOB evitan los bloqueos del desarrollo del embrión y, además, favorecen la formación de blastocistos durante períodos prolongados de cultivo *in vitro* (Abe & Hoshi, 1997). Según el estudio de Ellington (1991) se demostraron cambios en los espermatozoides bovinos en el sistema de cocultivo CEOB en el que se observó que había espermatozoides unidos al cocultivo de monocapa de CEOB y que éstos mostraban un movimiento enérgico de la cola. Por otro lado, los espermatozoides que no se habían unido presentaban pérdida de la membrana acrosómica, movimiento de la cola hiperactivo y menor motilidad respecto a los espermatozoides que si se habían adherido.

Las VEs son unas estructuras envueltas en una bicapa lipídica que se secretan desde gran cantidad de células hacia el espacio extracelular y a los biofluidos. El tamaño y contenido de las VEs son heterogéneos y dependen del tipo de célula (Ayaz, Houle & Pilsner, 2021). Como se ha comentado anteriormente, las VEs se clasifican dependiendo de su tamaño en: exosomas, que se forman a través de la membrana plasmática y miden entre 30-100 nm de diámetro y las micro vesículas, que se forman a partir de la membrana celular y miden entre 100–1000 nm de diámetro (Harris *et al.*, 2020). La principal función de las VEs es participar en la comunicación intercelular donde actúan como medio de transporte de proteínas, lípidos, ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) y otros metabolitos entre las diferentes células (Raposo & Stoorvogel, 2013). Las micro vesículas y los exosomas pueden fijarse a la membrana plasmática de una célula diana. Estas vesículas que se han fijado pueden unirse

definitivamente con la membrana plasmática o, por otra parte, pueden ser endocitadas. Ambas opciones producen la liberación de proteínas y ARN en la membrana o en el citosol de la célula diana (Van Niel, D'Angelo & Raposo, 2018). Se cree que la especificidad de la célula diana se basa en interacciones específicas entre las proteínas enriquecidas en la superficie de las VEs y los receptores en la membrana plasmática de las células receptoras, como ocurre en las células dendríticas foliculares, en las células epiteliales intestinales, etc. (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Por un lado, los exosomas se consideran vesículas intraluminales (VIL) que se forman por la gemación interna de la membrana endosomal cuando se produce la maduración de los cuerpos multivesiculares y éstos son secretados tras su fusión con la superficie celular.

Por otro lado, las micro vesículas son generadas mediante gemación y fusión de la membrana plasmática. Después, éstas se liberan en el espacio extracelular (Van Niel *et al.*, 2018).

En la figura 4 se observa el proceso de formación y liberación de las VEs.

En la figura 5 se muestra un esquema de la participación de las VEs en las distintas regiones del tracto reproductivo de la hembra.

Estudios recientes han demostrado que las VEs secretadas por las CEOB pueden realizar numerosas acciones sobre los espermatozoides como mejorar la motilidad o mantener el acrosoma intacto y con ello, mantener la viabilidad. Además, participan en la inducción de la capacitación y la reacción acrosómica (Harris *et al.* 2020).

Tanto en la ovogénesis como en el crecimiento de los folículos y la maduración de los

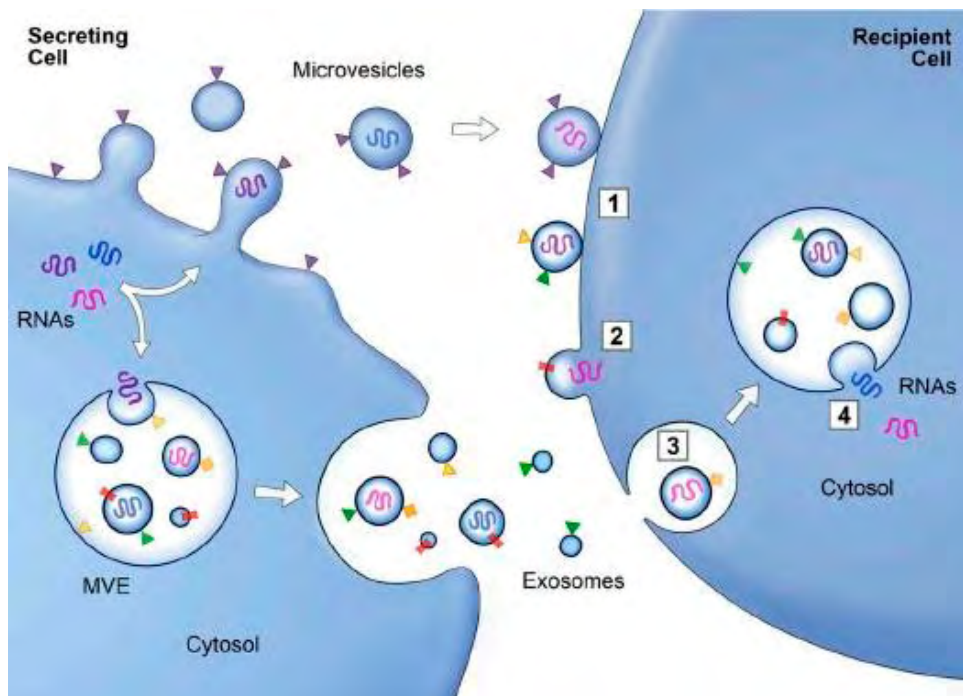


Figura 4. Esquema del proceso de formación y liberación de las VEs: micro vesículas y exosomas (Raposo y Stoorvogel, 2013).

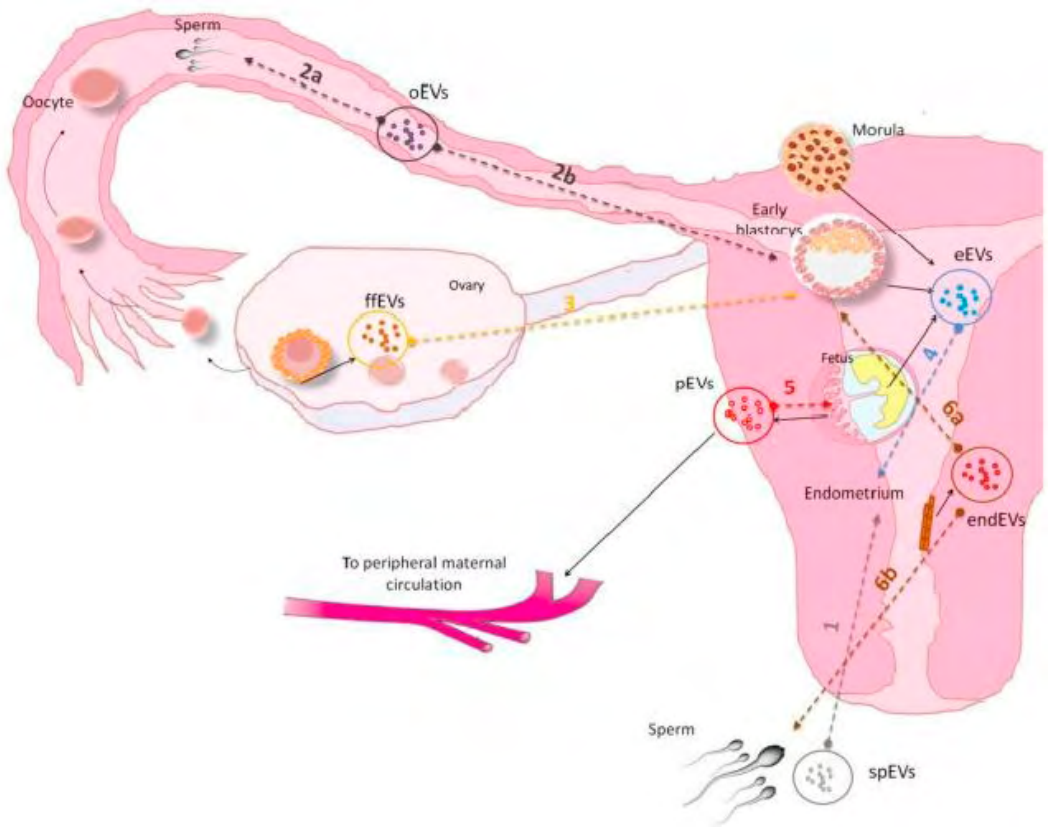


Figura 5. Representación de la participación de las VEs en el sistema reproductivo femenino. (2) Las VEs del tracto oviductal (oEV) interactúa con espermatozoides (2a) y embrión (2b). (5) Las VEs de la placenta (pEV) interactúa con los trofoblastos extravellosos. (6a) Las VEs del endometrio (endEV) interactúan con el embrión. (Capra & Lange-Consiglio, 2020).

ovocitos, es necesario que haya un constante intercambio de información mediado por las VEs producidas por células somáticas (granulosa, cúmulo y teca) y por células germinales (ovocitos) presentes en los fluidos foliculares (Capra & Lange-Consiglio, 2020). Además, las VEs que se encuentran en el fluido oviductal serán las encargadas de incorporarse a los ovocitos, los espermatozoides y los embriones para ayudar en el proceso de fecundación y evitar la polispermia (Machtinger, Baccarelli & Wu, 2021).

Algunos autores demostraron que las VEs del oviducto son capaces de atravesar la zona pelúcida ya que se obtuvieron VEs del FO en el contenido citoplasmático de blastocistos. También se ha visto que la incubación de embriones con VEs oviductales del istmo incrementa la criotolerancia y la expresión del ADN obteniendo una mayor tasa de supervivencia de éstos (Harris *et al.*, 2020).

Las VEs bovinas intrauterinas son fundamentales para que se lleve con éxito la implantación del embrión y se pueda producir el

desarrollo de blastocistos (Harris *et al.*, 2020). Además, las VEs derivadas de la placenta contienen moléculas proinflamatorias que controlan el sistema inmunitario endometrial para evadir la inmuno-vigilancia materna, reduciendo así los problemas que pudieran surgir entre el embrión y la madre (Capra & Lange-Consiglio, 2020). Por otro lado, las VEs que derivan de los embriones pueden utilizarse como marcadores de calidad embrionaria (De Ávila, Andrade, Bridi, Gimenes, Meirelles, Perecin & da Silveira, 2020). Este hecho se debe a que el tamaño y la concentración de las VEs liberadas por los embriones está relacionado con la calidad de los embriones que secretan estas VEs (Machtinger *et al.*, 2021). Algunos autores han demostrado que la carga que presentan las VEs depende del estado fisiológico del embrión e incluso refleja la calidad de éste antes de la implantación. Por este motivo, las VEs podrían utilizarse como biomarcadores del potencial de implantación embrionaria (Capra & Lange-Consiglio, 2020).

A lo largo de numerosos años, se ha podido comprobar como la producción *in vitro* de embriones ha sido fundamental para mejorar las técnicas de reproducción asistida (TRA) (Capra & Lange-Consiglio, 2020). Sin embargo, el medio en el que se realiza la FIV puede no ser el más propicio para los gametos, el desarrollo del embrión y el posterior establecimiento de la gestación. Una de las causas de este hecho puede ser la falta de mecanismos fisiológicos como la comunicación intercelular (De Ávila *et al.*, 2020).

Estudios recientes han demostrado que suplementar con VEs oviductales el medio de FIV disminuía la polispermia (problema importante en FIV porcina) y, por lo tanto, incrementaba el rendimiento de la misma (Machtinger *et al.*, 2021).

La principal hipótesis que nos planteamos en este trabajo es que las VEs producidas por las CEOB durante los momentos próximos a la ovulación (*in vivo*) y las producidas en un cultivo *in vitro* son similares en términos de tamaño y concentración de proteínas, por lo que, para aceptar

o rechazar nuestra hipótesis nos planteamos el siguiente objetivo: Realizar un estudio comparativo entre las VEs de un medio de cultivo de CEOB de 7 días de incubación y las VEs producidas de forma natural en el oviducto bovino. Para ello, aislaremos las VEs obtenidas *in vitro* de cultivos de CEOB en monocapa y las del FO de oviductos bovinos obtenidos en matadero, analizaremos el tamaño medio de las VEs y determinaremos la concentración de proteínas presentes en ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de fluido oviductal

Los oviductos se recogieron a partir de los tractos genitales de vacas sacrificadas en el matadero de Orihuela S.L (Alicante). El transporte de los oviductos se realizó sobre hielo para evitar en la medida de lo posible, la acción de las enzimas de las células en el proceso de necrosis.

Una vez en el laboratorio, los oviductos fueron lavados y clasificados en función de la morfología ovárica, que, en este caso, todos fueron de hembras en fase peri-ovulatoria. Dicha clasificación se basó en la morfología de los ovarios según la descripción de Carrasco *et al.* (2008).

Después, sobre una placa Petri, con hielo en su interior, se procedió a la disección del oviducto con unas tijeras y unas pinzas previamente desinfectadas con alcohol al 70%, separándolo del resto de ligamentos y tejidos adyacentes (mesosalpinx) y del ovario.

El protocolo seguido para recoger el FO a partir del cual se aíslan las VEs fue el descrito por Alcántara-Neto, Fernández-Rufete, Corbin, Tsikis, Uzbekov, Garanina, Coy, Almiñana y Mermillod (2019). Este protocolo consiste en introducir 5 ml de PBS por el infundíbulo con un catéter de 24G BD Insite™ (381212, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems, Inc.). Después se presionó el oviducto con los dedos para poder desplazar el contenido hacia la unión útero-tubárica y, a continuación, se procedió a su recogida en un tubo eppendorf.

Una vez recogido el fluido oviductal de todas las muestras, se realizaron dos centrifugaciones a 1.500 g durante 10 min. El pellet fue descartado y el sobrenadante obtenido se congeló a -80°C hasta el momento de proceder a la obtención de las VEs.

2. Cultivo de células del epitelio oviductal bovino

Las CEOB fueron obtenidas de 20 oviductos de hembras sacrificadas en el matadero de Orihuela (Alicante). Los oviductos fueron transportados al laboratorio en un recipiente isoterma con PBS atemperado a 37°C en un intervalo máximo de 2 horas post-mortem.

Con el fin de conseguir las máximas condiciones de esterilidad, este proceso se realizó íntegramente en la cabina de flujo laminar, dado que la exposición de las células para cultivar durante un largo periodo de tiempo puede contaminar las muestras.

Para la obtención de las CEOB, con un portaobjetos de microscopio previamente flameado, se realizó una compresión suave, pero firme sobre el oviducto, arrastrando el portaobjetos desde la unión útero-tubárica hasta la ampolla. Este proceso se realizó sobre una placa Petri, con hielo en su interior, para mantener la temperatura lo más cercana a 4°C.

Posteriormente, se recogió el FO con las células en 1 ml de medio de lavado el cual contenía (TCM-199/HEPES), suplementado con 10% (v/v) de FBS, 200UI/ml de penicilina, 200µg/ml estreptomycin y 26,2mM de bicarbonato. Seguidamente, esta mezcla celular se transfirió a un tubo de 15 ml, homogeneizando muy bien, con el fin de que se disgregaran las células. A continuación, se rellenó el tubo hasta 10 ml con el contenido de los oviductos y se dejó reposar en baño maría durante 10 min. Una vez terminado el tiempo de sedimentación, se retiró el sobrenadante y se lavaron las células agregando nuevamente medio de lavado hasta llenar el tubo a 10 ml. Este mismo proceso se repitió 3 veces más.

Finalizado el proceso de lavado, se llenó el tubo con 2 ml de medio de cultivo (TCM-199) previamente equilibrado durante 2h a 38,5°C, al 5% de CO₂.

Tras ello, se calculó la concentración de células en una cámara de conteo celular (Neubauer) y se realizó la siembra de 1x10⁶ células por placa Petri, las cuales contenían 2 ml de medio de cultivo.

A las 72 horas se realizó el primer cambio de medio y los siguientes cambios cada 48 horas. Todo el cultivo se realizó a 38,5°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. En el caso que el medio durante el proceso se viese contaminado se procedía a la eliminación de la placa de cultivo.

Pasados los 7 días de cultivo, se seleccionaron aquellas placas en las que hubiese un tapizado completo de la placa de Petri por las células. Seguidamente, se recogió el sobrenadante y se procedió a la realización de dos centrifugaciones a 7000 g durante 10 min con el fin de eliminar los restos celulares que pudieran quedar del cultivo. El sobrenadante se congeló y se almacenó -80°C hasta su uso.

3. Obtención de las vesículas extracelulares

Para la extracción de las VEs, tanto procedentes del FO como de los cultivos de las células epiteliales, se procedió siguiendo el protocolo descrito por Théry Amigorena, Raposo y Clayton (2006).

Como primer paso, se descongelaron las muestras de los sobrenadantes obtenidos previamente. Una vez descongelados, fueron centrifugados 10.000 x g durante 30 min a 4°C para eliminar cualquier posible resto celular. El sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g durante 70 min a 4°C dos veces en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-100XP (edificio CAID, Universidad de Murcia). Finalmente, los pellets obtenidos se resuspendieron en 50 µl de PBS-filtrado (filtro de 0,22 µm) y se almacenaron a -80°C en alícuotas de 5 µl (preparaciones de VEs) hasta su análisis.

4. Análisis de concentración de proteína de las vesículas extracelulares Bovinas

La medición de la concentración de proteína se realizó mediante el método Bradford, el cual consiste en la unión entre el colorante azul brillante Coomassie G-250 (CBBG) y las proteínas. Este se realiza a 595 nm en un espectrofotómetro, midiendo el complejo CBBG con la proteína (Olson, 2016).

El ensayo de Bradford no es lineal respecto a la concentración de proteína. Sin embargo, cuando se crea una curva estándar, un ajuste de segundo orden proporcionaría unos resultados mejores que un ajuste lineal. Después, los datos son analizados con un software capaz de ajustar las curvas de segundo orden (Olson, 2016).

Una característica clave en el ensayo Bradford es que el punto cero debe ser preciso ya que es un ensayo que no responde de forma no lineal a la concentración de proteína. Como este valor es crítico para poder realizar un correcto ajuste de la curva, es necesario que se incluyan al menos dos espacios en blanco de tampón. Si no hay interferencia se puede utilizar el blanco de agua. Tanto

los blancos de agua como el tampón tienen una absorbancia alta por lo que el espectrofotómetro se debe poner a cero con el aire, produciendo una absorbancia 595 de 0,5 para el blanco. El hecho de poner el espectrofotómetro a cero provocaría una reducción elevada de la cantidad de la muestra (Olson, 2016). La albúmina de suero bovino (BSA) fue la proteína estándar de elección original ya que es normalmente la que suele aparecer en los kits comerciales (Olson, 2016).

5. Determinación del tamaño de las vesículas extracelulares bovinas mediante dispersión por luz láser (DLS)

Para analizar el tamaño de las VEs empleamos Malvern Autosizer 4800, ubicado en el edificio CAID de la Universidad de Murcia. El equipo tiene un funcionamiento que consiste en la emisión de un rayo láser de 488 nm que pasa a través de la muestra, y según la variación angular de la intensidad de la luz difractada es capaz de medir la distribución del tamaño de partículas en la muestra. Además, permite hacer una distribución de los tamaños midiendo tanto

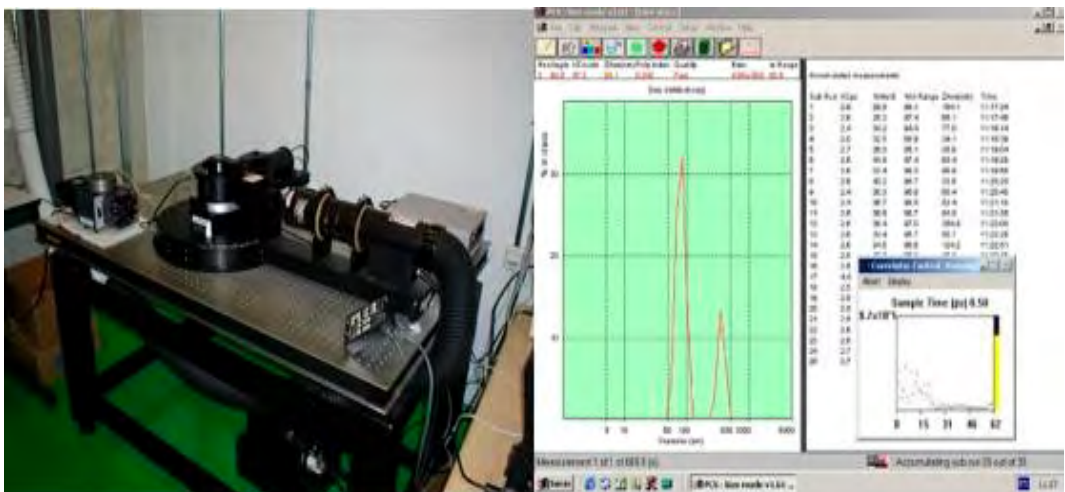


Figura 6. Malvern Autosizer 4800 (Imagen izquierda) y lectura que ofrece el equipo (Imagen derecha).

el volumen como el número de partículas. En este caso se tomaron los valores de intensidad, pues es la que mejor representa los datos de la muestra pura por ser la que asume menor error (criterio tomado de Malvern instruments INC).

En la figura 6 se muestra el equipo, así como una tabla de datos y una gráfica cuyos picos representan las poblaciones de partículas detectadas según su volumen, intensidad y número.

6. Identificación de las vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica de transmisión

Para evaluar las muestras por microscopía electrónica de transmisión (MET), empleamos unas rejillas de níquel y película de formvar de 200 aperturas y 3 mm de diámetro (Figura 7).

Se depositaron 10 μ l de cada una de las muestras en diferentes rejillas y se dejaron reposar durante 1 min, eliminando posteriormente el exceso de muestra. Después, la rejilla se lavó con 10 μ l de agua milliQ y se volvió a eliminar el exceso de agua. Por último, se añadió 10 μ l de acetato de uranilo al 2% como medio de contraste para tinción negativa dejándolo reposar durante 60 segundos, tras los cuales se retiró el exceso y se dejó secar durante 20 min hasta el momento de la captura de las imágenes.

Una vez secas las rejillas, fueron evaluadas y fotografiadas con el microscopio electrónico Philips Tecnai 12, ubicado en el edificio SACE de la Universidad de Murcia.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante el software SPSS Statistics (versión 24, 2021) mediante una prueba ANOVA de una vía. Se consideraron significativamente diferentes aquellos que mostraron un valor $p < 0,05$. Los datos se expresaron como media \pm SEM (error estándar de la media).

8. Diseño experimental

En la figura 8 se muestra un esquema del diseño experimental realizado en este trabajo.

Los oviductos en fase peri ovulatoria se destinaron por un lado a la obtención de células para su cultivo y, por otro lado, para la obtención de fluido oviductal. Se aislaron las VEs del fluido y del medio de cultivo mediante ultra centrifugaciones. Tanto el tamaño de las VEs como la concentración de proteínas contenidas en ellas fue determinada en ambos grupos experimentales: 1) VEs obtenidas *in vivo* y 2) VEs obtenidas *in vitro*.



Figura 7. Imagen de una rejilla de níquel y caja de 50 rejillas de níquel con película de formvar para MET.

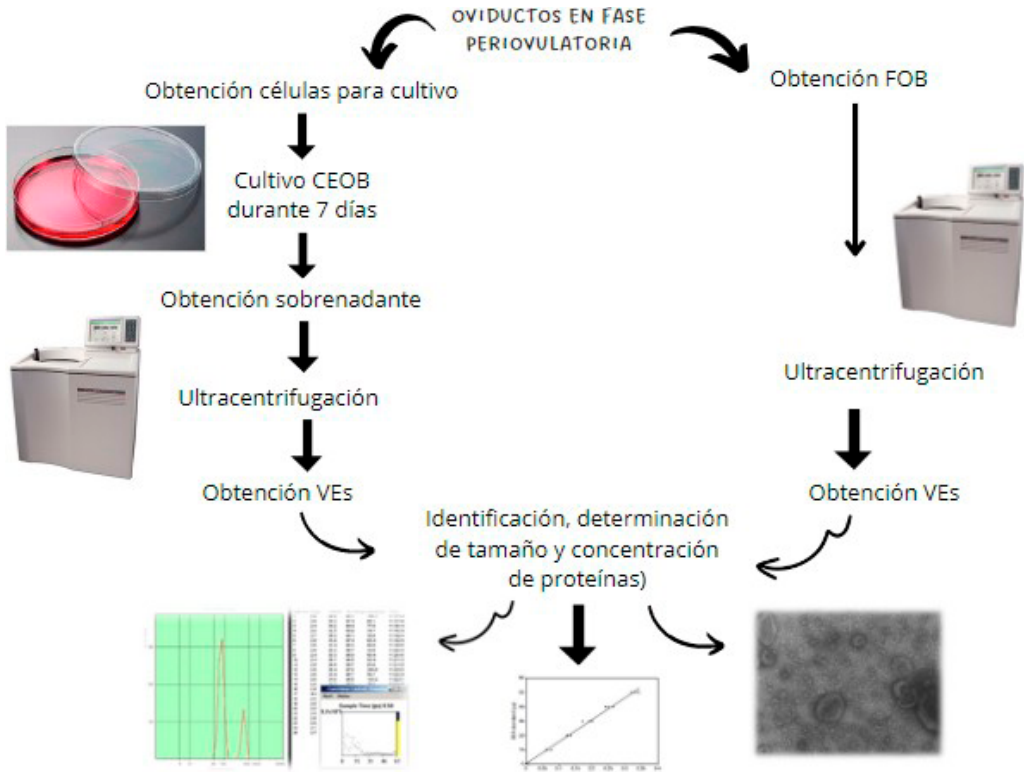


Figura 8. Esquema del diseño experimental.

RESULTADOS

Identificación y observación de las vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica de transmisión

En la figura 9 podemos observar imágenes de las VEs del FO de las vacas. Ello nos permitió confirmar la presencia de VEs en el mismo para poder proseguir con nuestro trabajo.

Tamaño y concentración de proteína de las vesículas extracelulares

En los resultados que hemos obtenido mediante DLS, hemos podido observar la presen-

cia de dos poblaciones en los fluidos, ya que, se detectaron dos picos diferentes. Para realizar el análisis estadístico decidimos emplear los datos del pico 1 dado que este pico se correspondía con el tamaño de las VEs. El segundo pico, debido a su tamaño, podría corresponderse con agregados de VEs, ya que previamente las muestras se pasaron por un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ de diámetro.

Los resultados de tamaño y concentración se muestran en la Tabla 1. Observamos que la concentración de proteínas fue mayor en las VEs obtenidas *in vivo* ($P < 0.05$), es decir, las procedentes del FO tenían mayor carga. Sin embargo, para el tamaño de las vesículas no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Tabla 1. Concentración de proteínas y tamaño de las VEs.

Tipo	Concentración de proteína (mg/ml)	Tamaño (nm)
VEs Células	0.00165 ± 0.0003 a	13.475 ± 6.7
VEs Fluido	0.0745 ± 0.02 b	109.3 ± 39.8

Los superíndices a y b indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

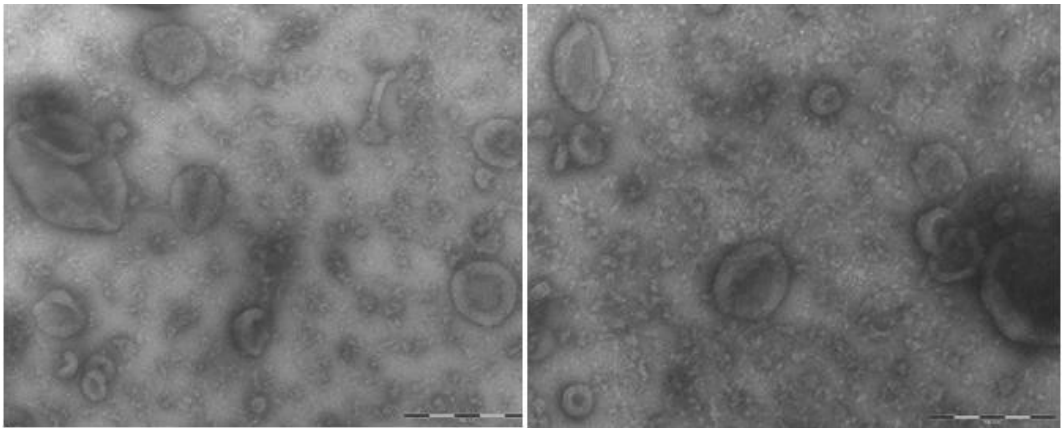


Figura 9. Imágenes de VEs obtenidas con TEM procedentes del fluido oviductal. La escala que se observa en las imágenes representa una longitud de 200nm.

DISCUSIÓN

En la actualidad son pocos los estudios que se han llevado a cabo para esclarecer la forma en la que los componentes, tanto orgánicos como inorgánicos, del FO influyen de manera notoria en lo referido a la fecundación de la especie bovina. Según Hamdi, Lopera-Vasquez, Mañllo, Sánchez-Calabuig, Núñez, Gutiérrez-Adán y Rizos (2018), la reducida investigación en este ámbito se debe principalmente a que resulta complicado obtener muestras del fluido oviductal en condiciones fisiológicas.

En este trabajo nos planteamos que las VEs podían ser obtenidas de los cultivos de CEOB y que presentarían características similares (en cuanto a concentración de proteína y tamaño)

a las producidas *in vivo* en el oviducto. Según el estudio realizado por Sidrat *et al.* (2020), los cultivos de CEOB en condiciones adecuadas pueden imitar la composición del FO *in vivo* y llevar a cabo las mismas funciones. Por el contrario, según Abe y Hoshi (1997) y, a pesar de que los medios están producidos para que se parezcan a la composición del FO *in vivo*, los que se encuentran disponibles en la actualidad todavía carecen de varias proteínas y VEs del FO que son desconocidas.

Como primer paso, se procedió a aislar las VEs en ambos grupos experimentales. Para ello, se realizaron varias centrifugaciones y ultra centrifugaciones. Para visualizarlos se utilizó microscopia de transmisión (Szatanek, Baj-Krzyworzeka, Zimoch, Lekka, Siedlar &

Baran, 2017). La presencia de éstas reafirma que el protocolo que hemos llevado a cabo a lo largo de todo el trabajo es correcto y eficaz. No obstante, sólo pudimos visualizar las VEs procedentes del FO y no las procedentes de los cultivos celulares. Una de las razones por las que no hemos podido observar imágenes de VEs en las muestras de CEOB es porque éstas se cultivaron en monocapa y no en suspensión cómo recomiendan algunos autores como Szatanek *et al.* (2017), que afirma, que es conveniente realizarlo de esa forma para facilitar el trabajo y obtener resultados más fiables tanto del DLS como del microscopio electrónico. Otro motivo podría ser la escasez de estas vesículas como consecuencia del lavado que se debe hacer de los cultivos un día antes de la recogida del medio de cultivo. Este lavado es imprescindible para eliminar el suero fetal que se adiciona como suplemento al medio de cultivo y que también contiene VEs.

Las imágenes obtenidas de las VEs procedentes del FO nos han permitido observar la presencia de dos poblaciones: VEs de gran tamaño (micro vesículas) y VEs de menor tamaño (exosomas). Según Raposo y Stoorvogel (2013), las VEs presentan dos formas (en copa o redondeada) cuando se encuentran en un estado cercano al nativo. En las imágenes que pudimos obtener, vimos estas formas características de las VEs.

El DLS es una técnica que se utiliza para la determinación del tamaño de las partículas. Según Szatanek *et al.* (2017), los datos que se obtienen con esta técnica son más fiables cuando las partículas se encuentran en suspensiones mono-dispersas. Los resultados, mostraron que el tamaño medio de partícula de los fluidos era diferente en las distintas fases del ciclo. No obstante, las dimensiones de éstas eran compatibles con exosomas, ya que su tamaño oscila entre los 30-100 nm en la especie bovina (Harris *et al.*, 2020). Además, se encontró otra población de partículas superior en todos los casos a 300 nm. Este hecho no podía ser correcto

porque con anterioridad habíamos realizado una filtración de nuestra muestra con un filtro de 0,22 μm de diámetro y, por lo tanto, el tamaño no podía superar los 220 nm. Por consiguiente, esta población fue rechazada por ser considerada como agregados de VEs.

Según Uzbekova, Almiñana, Labas, Teixeira-Gomes, Combes-Soia, Tsikis, Carvalho, Uzbekov y Singina (2020), la concentración de proteínas de VEs obtenidas del medio *in vitro* era muy superior a la que se obtenía de fluidos *in vivo*. Por el contrario, en nuestro estudio se obtuvieron concentraciones de proteínas mayores en el fluido que en el cultivo *in vitro*. Una de las razones de esta diferencia de resultados, podría ser el lugar de obtención de las células, ya que, según Harris *et al.* (2020), la concentración de proteínas de las células de la ampolla es más elevada que la de las obtenidas en la región del itsmo. Sin embargo, el método de recolección de las CEOB en este estudio fue el mismo en ambos casos, por lo que no explicaría esta diferencia con el trabajo de Uzbekova *et al.* (2020).

En cuanto al tamaño por intensidad, en nuestro trabajo no existen diferencias significativas. Según Zakharov y Scheffold (2009), este hecho se debe a que los datos de la distribución por intensidad son sensibles a partículas de gran tamaño. En nuestro estudio hemos descartado esta población y por ese motivo no han provocado esas variaciones.

CONCLUSIONES

En este estudio se investigó la presencia de VEs en el medio de cultivo de CEOB (*in vitro*) para compararlas con las que se obtuvieron *in vivo*. Las conclusiones que se obtuvieron fueron:

El método que se utilizó para aislar y caracterizar las VEs fue adecuado debido a que se observó la presencia de las mismas en las muestras procedentes de FO, tanto por microscopía electrónica como por DLS.

La concentración de proteínas es superior en las VEs producidas *in vivo*.

El tamaño de las VEs no presenta diferencias significativas entre las producidas *in vivo* e *in vitro*.

Es necesario destacar que para poder realizar una comparación correcta y fiable de las VEs producidas *in vivo* e *in vitro* sería necesario realizar un cultivo de las CEOB en suspensión mono-dispersa como se recomienda en algunos estudios, así como incrementar el número de replicados.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a los trabajadores del Centro de Apoyo a la Investigación y el Desarrollo (CAID) y del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia que me ayudaron a realizar el estudio de las VEs y a todos los componentes del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por haberme ayudado a realizar este trabajo.

FUENTE DE FINANCIACIÓN:

Fundación Séneca 21656 / 21 y Ministerio de Ciencia e Innovación (PID 2019 106380 RB I 00 / 10 13039 501100011033)

REFERENCIAS

- Abe, H., & Hoshi, H. (1997). Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology*, 23(1-3), 171–183. <https://doi.org/10.1023/A:1007929826186>
- Alcántara-Neto, A. S., Fernández-Rufete, M., Corbin, E., Tsikis, G., Uzbekov, R., Garantina, A. S., Coy, P., Almiñana, C., & Mermillod, P. (2020). Oviduct fluid extracellular vesicles regulate polyspermy during porcine *in vitro* fertilisation. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(4), 409. <https://doi.org/10.1071/RD19058>
- Ayaz, A., Houle, E., & Pilsner, J. R. (2021). Extracellular vesicle cargo of the male reproductive tract and the paternal preconception environment. *Systems biology in reproductive medicine*, 67(2), 103–111. <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1867665>
- Ball P. J. H. & Peters A. R. (1987). *Reproduction in Cattle* (3a ed.). Blackwell publishing. 13-55.
- Capra, E., & Lange-Consiglio, A. (2020). The Biological Function of Extracellular Vesicles during Fertilization, Early Embryo-Maternal Crosstalk and Their Involvement in Reproduction: Review and Overview. *Biomolecules*, 10(11), 1510. <https://doi.org/10.3390/biom10111510>
- Carrasco, L. C., Coy, P., Avilés, M., Gadea, J., & Romar, R. (2008). Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(7), 808. <https://doi.org/10.1071/RD08113>
- De Ávila, A., Andrade, G. M., Bridi, A., Gimenes, L. U., Meirelles, F. V., Perecin, F., & da Silveira, J. C. (2020). Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. *Animal reproduction*, 16(1), 31–38. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-00101>
- Ellington J. E. (1991). The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *The Cornell veterinarian*, 81(3), 313–328.
- Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., & Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124(3-4), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>
- Gatien, J., Mermillod, P., Tsikis, G., Bernardi, O., Janati Idrissi, S., Uzbekov, R., Le Bourhis, D., Salvetti, P., Almiñana, C., & Saint-Dizier, M. (2019). Metabolomic Profile of Oviductal Extracellular Vesicles across the Estrous Cycle in Cattle. *International Jour-*

- nal of Molecular Sciences*, 20(24), 6339. <https://doi.org/10.3390/ijms20246339>
- Hamdi, M., Lopera-Vasquez, R., Maíllo, V., Sánchez-Calabuig, M. J., Núñez, C., Gutiérrez-Adán, A., & Rizos, D. (2018). Bovine oviductal and uterine fluid support *in vitro* embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(7), 935. <https://doi.org/10.1071/RD17286>
- Harris, E. A., Stephens, K. K., & Winuthayanon, W. (2020). Extracellular Vesicles and the Oviduct Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8280. <https://doi.org/10.3390/ijms21218280>
- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2010). The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection: SPERM-OVIDUCT INTERACTIONS. *Molecular Reproduction and Development*, 77(11), 934-943. <https://doi.org/10.1002/mrd.21234>
- Hugentobler, S. A., Sreenan, J. M., Humpherson, P. G., Leese, H. J., Diskin, M. G., & Morris, D. G. (2010). Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(4), 684. <https://doi.org/10.1071/RD09129>
- Hunter R. H. (1998). Have the Fallopian tubes a vital role in promoting fertility? *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 77(5), 475-486. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9654166/>
- Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews*, 87(1), 244-255. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>
- Laezer, I., Palma-Vera, S. E., Liu, F., Frank, M., Trakooljul, N., Vernunft, A., Schoen, J., & Chen, S. (2020). Dynamic profile of EVs in porcine oviductal fluid during the periovulatory period. *Reproduction*, 159(4), 371-382. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0219>
- Leese, H. J., Tay, J. I., Reischl, J., & Downing, S. J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(3), 339-346. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210339>
- Lombard, L., Morgan, B. B., & McNutt, S. H. (1950). The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the estrous cycle. *Journal of Morphology*, 86(1), 1-23. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050860102>
- López-Úbeda, R., García-Vázquez, F., Gadea, J., & Matás, C. (2017). Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. *Asian Journal of Andrology*, 19(4), 396. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173936>
- Luño, V., López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Gil, L., & Matás, C. (2013). Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: *In vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* models. *Reproduction*, 146(4), 315-324. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0159>
- Machtinger, R., Baccarelli, A. A., & Wu, H. (2021). Extracellular vesicles and female reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(3), 549-557. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02048-2>
- Olson, B. J. S. C. (2016). Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 73(1). <https://doi.org/10.1002/cpph.3>
- Perrini, C., Esposti, P., Cremonesi, F., & Consiglio, A. L. (2018). Secretome derived from different cell lines in bovine embryo production *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(4), 658. <https://doi.org/10.1071/RD17356>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Saadeldin, I. M., Kim, S. J., Choi, Y. B., & Lee, B. C. (2014). Improvement of Cloned Embryos Development by Co-Culturing

- with Parthenotes: A Possible Role of Exosomes/Microvesicles for Embryos Paracrine Communication. *Cellular Reprogramming*, 16(3), 223-234. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0003>
- Sabapatha, A., Gercel-Taylor, C., & Taylor, D. D. (2006). Specific Isolation of Placenta-Derived Exosomes from the Circulation of Pregnant Women and Their Immunoregulatory Consequences. *American Journal of Reproductive Immunology*, 56(5-6), 345-355. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00435.x>
- Sidrat, T., Khan, A. A., Joo, M.-D., Wei, Y., Lee, K.-L., Xu, L., & 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(20), 7589. <https://doi.org/10.3390/ijms21207589>
- Sohel, Md. M. H., Hoelker, M., Noforesti, S. S., Salilew-Wondim, D., Tholen, E., Looft, C., Rings, F., Uddin, M. J., Spencer, T. E., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2013). Exosomal and Non-Exosomal Transport of Extra-Cellular microRNAs in Follicular Fluid: Implications for Bovine Oocyte Developmental Competence. *PLoS ONE*, 8 (11), e78505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078505>
- Stanke D. F., Sikes J. D., Deyoung D. W. & Tumbleson M. E. (1974) Proteins and amino acids in bovine oviducal fluid. *J. Reproduction Fertility*. Jun;38(2):493-6. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0380493>.
- Szataneck, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1153. <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Uzbekova, S., Almiñana, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Combes-Soia, L., Tsikis, G., Carvalho, A. V., Uzbekov, R., & Singina, G. (2020). Protein Cargo of Extracellular Vesicles From Bovine Follicular Fluid and Analysis of Their Origin From Different Ovarian Cells. *Frontiers in veterinary science*, 7, 584948. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.584948>
- Van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Webb, R., Nicholas, B., Gong, J. G., Campbell, B. K., Gutiérrez, C. G., Garverick, H. A., & Armstrong, D. G. (2003). Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction (Cambridge, England)*. Supplement, 61, 71-90.
- Yániz, J. L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., & Mullins, K. J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record*, 260(3), 268-278. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20001101\)260:3<268::AID-AR60>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20001101)260:3<268::AID-AR60>3.0.CO;2-L)
- Zakharov, P., Scheffold, F. (2009). Advances in dynamic light scattering techniques. In: Kokhanovsky, A.A. (eds) *Light Scattering Reviews 4*. Springer Praxis Books. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74276-0_8.