

***TRABAJO DE FIN DE MÁSTER***  
***En***  
***Biología y Tecnología Aplicada a la  
Reproducción Humana Asistida***

**APLICACIÓN DE VESÍCULAS  
EXTRACELULARES EN LA MEJORA DE LOS  
TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN  
ASISTIDA: POTENCIAL, MECANISMOS Y  
PERSPECTIVAS CLÍNICAS**

**Autor:** Nerea Ventosa Coba

**Tutor:** David Agudo Garcillán

**Co-tutora:** Paloma Carmen Santos Moriano

Alcobendas, Septiembre 2025

## ÍNDICE

<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>7</b>
4.1. Definición y características generales de las EVs .....	7
4.2. Contenido molecular.....	8
4.3. Captación e internalización de las EVs .....	10
4.4. Funciones y relevancia biomédica.....	11
4.5. EVs en el contexto reproductivo .....	13
4.5.1. EVs embrionarias .....	13
4.5.2. EVs del oviducto .....	14
4.5.3. EVs endometriales.....	15
4.5.4. EVs del ambiente folicular ovárico .....	16
4.5.5. EVs placentarias.....	16
4.5.6. Otras fuentes de EVs en el embarazo .....	17
4.7. Interacción y modelos de estudio .....	17
4.8. Comunicación embrión-endometrial .....	19
4.9. EVs como biomarcadores en medicina reproductiva .....	20
4.9.1. Biomarcadores para el cáncer reproductivo femenino .....	21
4.9.2. Biomarcadores para la fertilidad femenina .....	22
4.9.3. Biomarcadores para la calidad embrionaria .....	22
4.9.4. Biomarcadores para la calidad placentaria.....	23
4.9.5. Biomarcadores para el aborto temprano.....	24
4.10. Potencial terapéutico de las EVs .....	24
4.11. Otras aplicaciones concretas de las EVs en medicina reproductiva.....	25
4.11.1. Reparación del endometrio y mejora de la receptividad .....	25
4.11.2. Tratamiento de la insuficiencia ovárica prematura (IOP) .....	25
4.11.3. Rejuvenecimiento ovárico y mejora en la fertilidad natural y asistida .....	26

4.11.4. Soporte en cultivo embrionario <i>in vitro</i> .....	26
<b>9. Discusión y futuras perspectivas clínicas .....</b>	<b>27</b>
<b>10. Conclusiones .....</b>	<b>33</b>
<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>34</b>

## Abstract

Human reproduction relies on precise cellular communication that regulates processes such as gametogenesis, fertilization, implantation, and embryonic development. However, the limitations of assisted reproductive technologies, combined with the high prevalence of infertility, drive the search for novel strategies to optimize clinical outcomes. In this context, EVs have emerged as key mediators due to their ability to facilitate intercellular signaling and modulate the reproductive microenvironment. This work provides a critical review of the scientific literature on biology, mechanisms of action, and applications of EVs in reproduction. Their general characteristics, molecular cargo, and uptake by target cells are discussed, alongside their roles in both physiological and pathological processes. In the reproductive setting, EVs derived from the embryo, oviduct, endometrium, follicular environment, and placenta have demonstrated essential functions in oocyte maturation, embryo-endometrium interaction, implantation, and the maintenance of pregnancy. Moreover, their potential as non-invasive biomarkers of fertility, oocyte, embryo, and placental quality, as well as their use in detecting reproductive disorders and gestational complications, is examined. Concurrently, emerging therapeutic applications, including endometrial repair, ovarian rejuvenation, treatment of premature ovarian insufficiency, and supplementation of embryonic culture media are discussed. Despite their promising potential, challenges remain related to methodological heterogeneity, lack of standardized EV isolation and characterization protocols, and the need for validation in human models. Addressing these limitations will be crucial to establishing EVs as innovative diagnostic and therapeutic tools capable of improving the efficacy and safety of assisted reproductive treatments.

**Keywords:** extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, apoptotic bodies, biomarkers, assisted reproduction, fertilization, implantation, endometrium, embryo, placenta, fertility.

## Resumen

La reproducción humana depende de una comunicación celular precisa que regula procesos como la gametogénesis, la fecundación, la implantación y el desarrollo embrionario. Sin embargo, las limitaciones de las técnicas de reproducción asistida, unidas a la elevada prevalencia de infertilidad, impulsan la búsqueda de nuevas estrategias que optimicen los resultados clínicos. En este marco, las EVs se perfilan como elementos decisivos, dada su capacidad para mediar en la señalización intercelular y modular el microambiente reproductivo. Este trabajo revisa críticamente la literatura científica sobre la biología, los mecanismos de acción y las aplicaciones de las EVs en reproducción. Se abordan sus características generales, su contenido molecular y los procesos de captación por células diana, así como su implicación en funciones fisiológicas y patológicas. En el ámbito reproductivo, las EVs procedentes del embrión, el oviducto, el endometrio, el ambiente folicular y la placenta han mostrado roles esenciales en la maduración ovocitaria, la interacción embrión-endometrio, la implantación y el mantenimiento de la gestación. Asimismo, se analiza su potencial como biomarcadores no invasivos de fertilidad, calidad ovocitaria, embrionaria y placentaria, así como en la detección de patologías reproductivas y complicaciones gestacionales. En paralelo, se discuten las aplicaciones terapéuticas emergentes, entre ellas la reparación endometrial, el rejuvenecimiento ovárico, el tratamiento de la insuficiencia ovárica prematura y la suplementación de cultivos embrionarios. Pese a sus prometedoras aplicaciones, persisten limitaciones relacionadas con la heterogeneidad metodológica, la falta de estandarización en el aislamiento y caracterización de EVs y la necesidad de validar hallazgos en modelos humanos. Superar estos retos permitirá consolidar su uso clínico a través de herramientas diagnósticas y terapéuticas innovadoras, con capacidad para mejorar la eficiencia y seguridad de los tratamientos de reproducción asistida.

**Palabras clave:** vesículas extracelulares, exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos, biomarcadores, reproducción asistida, fecundación, implantación, endometrio, embrión, placenta, fertilidad.

## 1. Introducción

La reproducción humana constituye un proceso altamente regulado que depende de una comunicación celular precisa y eficiente para garantizar su éxito. La comunicación intercelular es un proceso esencial en la fisiología reproductiva. Las células que conforman los tejidos y estructuras del sistema reproductor interactúan constantemente entre sí, mediante mecanismos de señalización endocrina, paracrina y autocrina [1]. Esta interacción coordinada es clave para el desarrollo de los gametos, la fecundación, la implantación y la consolidación del embarazo [2].

Sin embargo, diversos factores pueden alterar estos mecanismos de comunicación, afectando directamente la fertilidad. Tanto es así que, según estimaciones combinadas de los últimos 25 años, la prevalencia de infertilidad durante la vida y en un período de 12 meses es del 17,5 % y 12,6 %, respectivamente [3]. Esta considerable proporción de personas que enfrentan infertilidad a nivel mundial se suma a las limitaciones de los tratamientos de reproducción asistida (ART), los cuales aún presentan bajas tasas de éxito por ciclo y riesgos asociados para la salud del embrión y del recién nacido vivo (LNB). Se ha observado que el entorno *in vitro* puede afectar negativamente a la calidad de los gametos y embriones, modificando su expresión génica y su estructura celular [1].

Por ello, resulta fundamental comprender en profundidad los mecanismos celulares y moleculares que regulan la reproducción, especialmente aquellos relacionados con la comunicación intercelular, para optimizar las condiciones de cultivo y mejorar los resultados clínicos. En este contexto, las vesículas extracelulares (EVs) han emergido como herramientas prometedoras, tanto por su papel en la fisiología reproductiva como por su potencial como biomarcadores y agentes terapéuticos [4]. Estas vesículas son estructuras membranosas liberadas por células de distintos orígenes, capaces de transportar y transferir moléculas biológicamente activas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos a células diana. Existen diferentes tipos de EVs, según su tamaño, contenido y mecanismo de biogénesis [5].

Los **exosomas** se generan dentro de la red endosomal, formándose como vesículas intraluminales (ILVs) en los cuerpos multivesiculares (MVBs), que se fusionan con lisosomas para degradar su contenido o con la membrana plasmática para liberarlo al espacio extracelular [6,7]. Este proceso permite que ciertos lípidos y proteínas sean degradados, mientras que otros son reciclados o secretados al exterior celular mediante exocitosis [7]. La biogénesis depende de la coordinación de múltiples rutas y puede seguir una vía dependiente del complejo ESCRT

(Endosomal Sorting Complex Required for Transport) o una vía independiente mediada por tetraspaninas como CD9, CD63 y CD81 que regulan la selección y el empaquetamiento de su contenido. Además, proteínas como Alix, TSG101, RAB27 y componentes SNARE regulan su secreción [6].

Por el contrario, las **microvesículas (MVs)** se forman por gemación y desprendimiento desde la membrana plasmática. La formación de las MVs implica la reorganización del citoesqueleto de actina-miosina, la redistribución de fosfolípidos como la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana, y la acción de proteínas como ARF6 y complejos ESCRT-III, que facilitan su escisión final. Estas vesículas también incorporan selectivamente proteínas transmembrana, RNA y otras moléculas funcionales. Durante la nucleación, las proteínas con modificaciones de anclaje lipídico se acumulan en el lumen para iniciar la formación de la curvatura de la membrana destinada a la gemación [6,7].

Por su parte, los **cuerpos apoptóticos** se liberan durante la apoptosis en forma de vesículas celulares [6]. Contienen fragmentos de DNA, histonas, orgánulos y restos celulares encapsulados, y aunque se consideraron durante mucho tiempo como residuos inertes, actualmente se reconoce su participación en la modulación inmune y la comunicación intercelular [6,7].

El interés por estas vesículas ha aumentado exponencialmente en biomedicina, y especialmente en el ámbito de la reproducción, donde han sido identificadas en múltiples fluidos clave: el líquido folicular, el fluido oviductal, el endometrio, la placenta, el medio de cultivo embrionario y el líquido amniótico [8]. Su implicación en la maduración ovocitaria, la interacción embrión-endometrio, la implantación y la remodelación del ambiente uterino las convierte en candidatas ideales para optimizar las ART [1].

A pesar del creciente interés por las EVs en el ámbito de la medicina reproductiva, la mayoría de los estudios disponibles se centran en aspectos específicos, sin ofrecer una visión global de su potencial clínico. En este contexto, resulta necesario revisar de forma crítica la literatura científica para integrar los hallazgos recientes, identificar sus aplicaciones más prometedoras y delimitar las principales limitaciones que aún impiden su implementación clínica. Con este fin, el presente trabajo tiene como objetivo explorar el potencial de las EVs en el campo de la reproducción asistida, abordando su biología, mecanismos de acción y aplicaciones emergentes, con especial énfasis en su papel como moduladoras del microambiente reproductivo y como posibles biomarcadores pronósticos de éxito reproductivo.

## 2. Objetivos

- Objetivo general
  - Analizar el potencial de las vesículas extracelulares en la mejora de los tratamientos de reproducción asistida.
- Objetivos específicos:
  - Describir el papel de las EVs en el microambiente reproductivo materno natural.
  - Evaluar la evidencia experimental sobre su uso en cultivos ovocitarios y embrionarios.
  - Identificar los retos actuales en su aplicación clínica.
  - Proponer futuras líneas de investigación.

## 3. Materiales y métodos

El presente trabajo se desarrolló como una revisión bibliográfica narrativa centrada en el papel de las EVs en los procesos reproductivos y en su relevancia durante la comunicación embrión-endometrio y la implantación. La búsqueda bibliográfica se llevó a cabo entre abril y julio de 2025 en bases de datos de referencia como PubMed, ScienceDirect, SpringerLink y Wiley Online Library, aunque la mayor parte de los artículos seleccionados procedieron de PubMed y ScienceDirect.

Para la estrategia de búsqueda se emplearon combinaciones de términos en inglés utilizando conectores booleanos. Los descriptores principales fueron “*extracellular vesicles*”, “*exosomes*” y “*microvesicles*”, que se combinaron con conceptos relacionados con la reproducción mediante la expresión AND, generando ecuaciones como *extracellular vesicles AND embryo*, *extracellular vesicles AND implantation*, *extracellular vesicles AND gamete* o *extracellular vesicles AND reproduction*. Asimismo, se añadieron términos como *role*, *function*, *biogenesis* o *mechanisms* para ampliar la búsqueda, y se empleó el conector OR para englobar sinónimos o términos equivalentes, como en (*extracellular vesicles OR exosomes OR microvesicles*) *AND reproduction*.

Tras la aplicación de criterios de inclusión y exclusión, priorizando artículos originales, revisiones narrativas y sistemáticas, así como guías internacionales como las MISEV (2014, 2018, 2023), se recuperó un conjunto de alrededor de 50 trabajos, de los cuales se seleccionaron

25, en consonancia con la normativa del programa de máster que establece un límite máximo de referencias.

La gestión y organización de las referencias se realizó mediante el programa Zotero, lo que permitió clasificar la bibliografía por temáticas y aplicar de manera uniforme el estilo de citación requerido. Posteriormente, se efectuó una lectura crítica y se sintetizó la información en función de los objetivos del trabajo, organizando el análisis en torno a los aspectos fundamentales de las EVs: su definición y características, contenido molecular, mecanismos de acción, papel en el microambiente reproductivo, potencial como biomarcadores y posibles aplicaciones terapéuticas.

## **4. Resultados**

### ***4.1. Definición y características generales de las EVs***

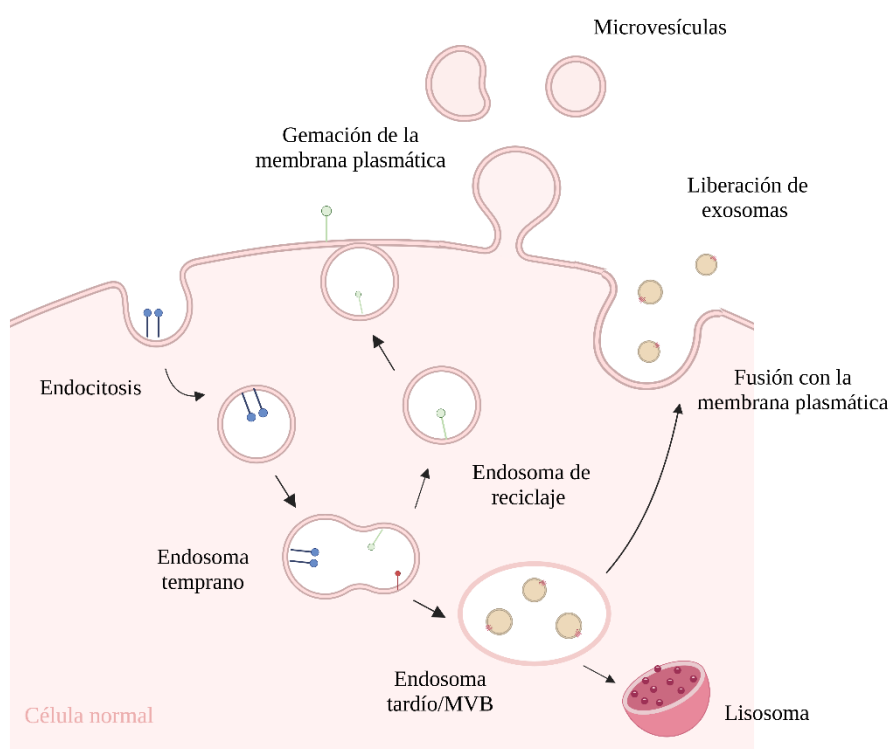
Las EVs se definen como partículas nanométricas liberadas por las células, delimitadas por una bicapa lipídica, que carecen de un núcleo funcional y, por tanto, no pueden replicarse por sí mismas [9]. Actúan como vehículos de transporte intercelular de material genético, lípidos y proteínas, y participan en numerosos procesos fisiológicos. Además de su función en la comunicación celular, las EVs presentan una gran heterogeneidad en cuanto a su origen, tamaño, composición y mecanismos de secreción [10,11].

Según las directrices establecidas por la International Society for Extracellular Vesicles (ISEV), se recomienda utilizar el término genérico “EV” para referirse a estas vesículas, ya que resulta difícil atribuir con certeza una vía de biogénesis concreta a cada subtipo. No obstante, se fomenta el uso de términos operativos complementarios que describen características físicas (como el tamaño o la densidad), bioquímicas (como la presencia de proteínas específicas) o funcionales [12].

Esta clasificación, sin embargo, presenta limitaciones. A lo largo de las últimas décadas se han propuesto múltiples subtipos de EVs en función de su origen celular o de funciones específicas, como prostasomas (vesículas derivadas de células prostáticas), sinaptosomas (procedentes de neuronas), oncosomas (liberadas por células tumorales) o cardiosomas (de cardiomiocitos); aunque su utilidad suele estar restringida a contextos muy específicos. En cambio, los términos más ampliamente aceptados en la literatura científica son exosomas, microvesículas y cuerpos



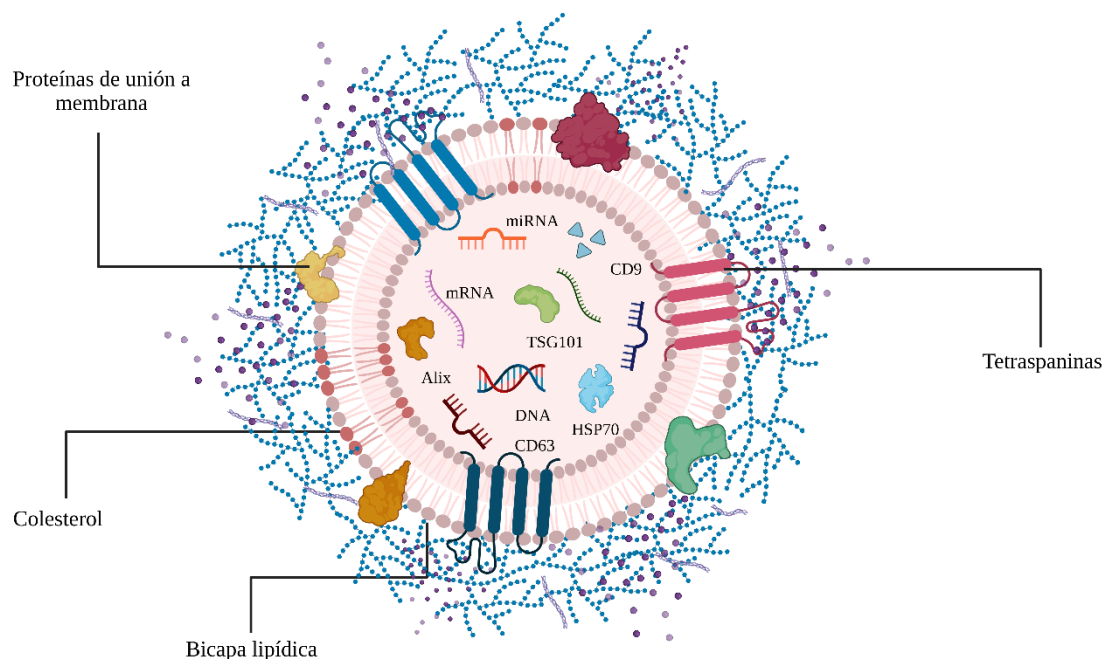
apoptóticos, que se diferencian principalmente por su vía de biogénesis (**figura 1**). Sin embargo, el solapamiento en el tamaño (exosomas: 40–120 nm; microvesículas: 50–1000 nm; cuerpos apoptóticos: 500–2000 nm), junto con la ausencia de marcadores moleculares exclusivos, dificulta su distinción inequívoca [13]. Esta falta de criterios universales complica la estandarización y continúa siendo motivo de debate dentro de la comunidad científica. A pesar de ello, y con fines prácticos, la mayoría de los estudios clasifican actualmente a las EVs en tres categorías principales, basadas en su mecanismo de biogénesis: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos.



**Figura 1.** Vía de biogénesis de exosomas y microvesículas. Los exosomas se forman mediante la red endosomal, mientras que las microvesículas geman de la membrana plasmática. Modificada de [7].

#### 4.2. Contenido molecular

El contenido de las vesículas extracelulares incluye lípidos, ácidos nucleicos y proteínas que provienen de las células donantes, es decir, las células que las generan y liberan. Este material molecular transportado refleja el estado y las características funcionales de la célula origen, lo que confiere a las vesículas un papel importante en la comunicación intercelular y en la transferencia de información biológica (**figura 2**) [14].



**Figura 2.** Morfología típica de una EV. Las EVs son partículas nanométricas rodeadas por una membrana. Estas EVs contienen diversas biomoléculas en su interior, otras unidas a su membrana y algunas asociadas de manera laxa en forma de corona. Modificada de [15].

En cuanto a los **lípidos**, las EVs presentan una bicapa lipídica similar a la membrana plasmática celular, aunque con ciertas particularidades que reflejan su biogénesis y contribuyen a su estabilidad estructural. Por ejemplo, los exosomas suelen estar enriquecidos en esfingomielina, colesterol, gangliósidos y fosfatidilserina en la cara externa de la membrana, lo que puede facilitar su reconocimiento e internalización por las células receptoras [14].

Los **ácidos nucleicos** presentes en las EVs incluyen principalmente distintos tipos de RNA y DNA. En cuanto al RNA, es predominantemente de tamaño corto (menos de 200 nucleótidos) como miRNAs, y se encuentran otros como tRNA, lncRNA y mRNA. La composición y cantidad de RNA varía según la célula de origen, y en algunos casos, el perfil transcriptómico de las EVs es distinto al de la célula que las produce, lo que sugiere mecanismos selectivos para el empaquetamiento de ciertos RNA, regulados por motivos de secuencia y modificaciones postranscripcionales. Además, se ha demostrado que este RNA puede ser funcional en las células receptoras, ya que los mRNA poliadenilados pueden ser traducidos y los miRNAs pueden regular la expresión génica, evidenciando un papel activo de las EVs en la comunicación intercelular tanto a nivel local como sistémico [14].

El **DNA** transportado por las EVs varía en tamaño desde 100 pb hasta 2,5 kb. Este DNA refleja secuencias genómicas completas y puede contener mutaciones propias de la célula origen, incluyendo aquellas relacionadas con procesos patológicos como el cáncer (por ejemplo, en genes como BRAF, EGFR, KRAS o p53). A pesar de que la presencia de DNA en las EVs está bien establecida, su función biológica aún no está completamente clara [14].

La **composición proteica** de las EVs en algunos casos está relacionada con el tipo celular y el modo de biogénesis. Los exosomas están enriquecidos en moléculas como el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y diversas tetraspaninas (CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CD9). También contienen proteínas del complejo ESCRT, junto con proteínas accesorias como Alix y TSG101, así como chaperonas (Hsc70, Hsp90), presentes independientemente del tipo celular. En general, los exosomas muestran un mayor contenido en glicoproteínas y proteínas transmembrana [14].

Debido a su origen en la membrana plasmática, las MVs presentan proteínas como integrinas, GPIb y P-selectina, además de modificaciones postraduccionales (glicoproteínas y fosfoproteínas). También pueden incorporar la GTPasa ARF6, implicada en la liberación de oncosomas. Por su parte, los cuerpos apoptóticos, contienen histonas y una menor proporción de glicoproteínas [14].

Muchas de las proteínas mencionadas, especialmente MHC II, tetraspaninas, proteínas ESCRT, Alix, TSG101 y chaperonas, se encuentran comúnmente en EVs, independientemente del tipo celular, por lo que se consideran marcadores generales de EVs. La composición proteica de los diferentes subtipos de EV muestra un solapamiento considerable, aunque algunas proteínas están más enriquecidas en ciertos subtipos. No está claro si este solapamiento se debe en parte a las técnicas de aislamiento, que actualmente no permiten una separación completa entre subtipos de EV y agregados proteicos [14].

#### ***4.3. Captación e internalización de las EVs***

Las EVs desempeñan un papel fundamental en la comunicación intercelular, facilitando el intercambio de información entre células. Una vez internalizadas por las células receptoras a través de distintos mecanismos, las EVs pueden inducir alteraciones en sus características biológicas y funcionales. Esta internalización puede activar rutas de señalización intracelular mediante interacciones específicas entre ligandos presentes en la superficie de las EVs y receptores celulares, lo que permite la transferencia de su contenido molecular. Como

consecuencia, se pueden producir cambios en la expresión génica y en la actividad de señalización, que a su vez pueden desencadenar modificaciones fenotípicas asociadas con el inicio y la progresión de diversas patologías [6].

Los mecanismos de captación de EVs por las células receptoras varían en función del tipo de vesícula y del contexto celular. En términos generales, se han descrito tres vías principales: la fusión directa con la membrana plasmática, la endocitosis dependiente de clatrina y la endocitosis independiente de clatrina, que abarca procesos como la pinocitosis y la fagocitosis. Además, factores como las balsas lipídicas y determinadas interacciones proteína-proteína también han demostrado influir en la eficiencia y especificidad de este proceso [6].

#### ***4.4. Funciones y relevancia biomédica***

Una de las principales formas de comunicación intercelular en los distintos tejidos del organismo humano es la secreción de EVs hacia los fluidos corporales circundantes. Estas vesículas han sido identificadas y aisladas en una amplia variedad de medios, como el líquido cefalorraquídeo, la saliva, el líquido broncoalveolar, el fluido sinovial, la bilis, la sangre, la orina y las heces. En el contexto reproductivo, las EVs también se han encontrado en el plasma seminal en hombres, así como en la leche materna, el líquido amniótico y el fluido uterino en mujeres [8].

Actúan mediante la activación de receptores de membrana, fusión con células diana y liberación de su contenido intracelular, que puede incluir mRNA, miRNA, ncRNA y factores de transcripción [5]. Participan en procesos como mantenimiento de células madre, reparación tisular, coagulación y regulación inmunitaria. Dependiendo del contexto celular, pueden promover la activación de células B, células NK, monocitos o células madre hematopoyéticas, o bien favorecer mecanismos de tolerancia inmunológica mediante la potenciación de células T reguladoras o la inhibición de la maduración de células dendríticas [5]. En el sistema nervioso, las EVs pueden contribuir a la plasticidad sináptica y la comunicación neuronal [5]. Además, pueden inducir cambios en el fenotipo celular y favorecer la regeneración tisular tras daño subrayando su papel en el mantenimiento de la plasticidad celular [5,16].

En reproducción, las EVs se encuentran en procesos fundamentales como la gametogénesis, fecundación, implantación y desarrollo embrionario temprano, influyendo en la maduración ovocitaria, el reconocimiento embrionario y el mantenimiento del embarazo y el parto [2]. Recientemente, también se han asociado a patologías como la pérdida precoz del embarazo, el

síndrome de ovario poliquístico, la endometriosis, la diabetes gestacional, la hipertensión y la preeclampsia [15].

Aunque gran parte del estudio de las EVs reproductivas se ha centrado en el entorno uterino y embrionario, también se ha evidenciado su papel en el componente masculino de la fertilidad. En bovinos, los epididimosomas del fluido epididimal contienen proteínas asociadas a la maduración espermática, mientras que en humanos los prostasomas del fluido seminal reducen la fluidez de la membrana espermática, protegiendo frente a capacitación y reacción acrosómica prematura. En modelos murinos y porcinos, las EVs transfieren proteínas esenciales para la fusión gamética y, además, en murinos se ha descrito su función en la prevención de la polispermia, ya que tras la fecundación la proteína Juno se libera en EVs que neutralizan espermatozoides con reacción acrosómica [2].

Las EVs del fluido uterino y oviductal (uterosomas y oviductosomas) transportan proteínas y moléculas bioactivas implicadas en la capacitación y fecundación espermática. En modelos murinos se ha visto que transfieren proteínas clave como PMCA4 y SPAM1, necesarias para la homeostasis del calcio, la viabilidad y la capacitación espermática. Asimismo, algunas EVs uterinas contienen miRNAs, proteínas y factores inmunomoduladores como LIF, con un posible papel en la comunicación embrión-endometrio durante la implantación [8].

También se han identificado EVs en el líquido amniótico de murinos y mujeres sometidas a amniocentesis, con origen tanto fetal como materno. El riñón fetal libera EVs con marcadores como AQP2, CD24 y anexina-I, mientras que otra fracción, con anexina-I y HSP70 pero sin CD24, podría proceder de la madre. Estas EVs regulan la respuesta inmunitaria para favorecer la supervivencia fetal, destacando el papel de HSP72 en la producción de citocinas. Además, se ha demostrado que pueden ser captadas por células THP-1, estimulando la liberación de citocinas y la activación de NFκB/STAT3 mediante receptores TLR [8].

La leche materna, fluido complejo y rico en componentes inmunológicos, contiene EVs de origen incierto, posiblemente derivadas de células presentes en la propia leche, del epitelio mamario o de otros compartimentos corporales a través de la circulación. Estas EVs presentan altos niveles de miRNAs relacionados con la inmunidad, como miR-181a y miR-17, especialmente durante los primeros 6 meses de lactancia. Estudios de secuenciación han confirmado la abundancia de miRNAs inmunológicos en estas vesículas, lo que sugiere su transferencia al lactante y su implicación en el desarrollo de su sistema inmunitario. A nivel

funcional, se ha demostrado que estas EVs inhiben la producción de citoquinas en células T activadas (anti-CD3 y anti-PHA) y aumentan el número de células T reguladoras [8].

#### **4.5. EVs en el contexto reproductivo**

Durante la reproducción, las EVs facilitan el intercambio de señales biológicas entre distintos tipos celulares. En este trabajo se aborda la comunicación intercelular mediada por EVs que tiene lugar entre el embrión fecundado y los tejidos maternos.

##### **4.5.1. EVs embrionarias**

Diversos estudios han identificado EVs en medios condicionados de cultivo embrionario, tanto en humanos como en modelos bovinos y porcinos. En estadios como el día 3 (D3) y día 5 (D5) del desarrollo embrionario, aislaron EVs con un tamaño promedio de 100 nm, que mostraron inmunorreactividad frente a marcadores exosómicos como CD9, CD63 y Alix. En el caso de embriones humanos, estas EVs expresaron HLA-G y mRNA de genes relacionados con la pluripotencia, como OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC y NANOG. Asimismo, se vio que eran capaces de transportar diferentes especies de miRNA con potencial para actuar sobre células epiteliales y estromales. Se ha propuesto que los genes diana de estos miRNA regulan funciones como la adhesión y la migración celular, lo que sugiere que el embrión podría influir activamente sobre el transcriptoma endometrial [1,10].

Aunque es controvertido, algunos estudios sugirieron un mayor éxito en el cultivo de embriones *in vitro* cuando se realiza en grupos, ya que pueden generar un microambiente rico en factores de crecimiento, constituyendo un “secretoma” con efectos autocrinos y paracrinos. En embriones clonados, el cocultivo con embriones partenogenéticos porcinos mejoró su competencia de desarrollo, aumentando el número de blastómeros y la formación de blastocistos. Se ha demostrado que estas EVs pueden atravesar la zona pelúcida y ser internalizadas por blastómeros, lo que respalda su potencial papel funcional en la comunicación celular temprana [2].

En el modelo porcino, la suplementación del medio con EVs embrionarias aumentó las tasas de formación y calidad de blastocistos, mejoró la proporción entre masa celular interna (ICM) y trofoblasto (TE), y elevó las tasas de implantación y LNB, lo que indica un efecto autocrino/paracrino positivo sobre el desarrollo embrionario [10]. Los estudios en el modelo murino, evidenciaron la influencia de las EVs de la ICM en el TE: las células madre embrionarias (ES) secretan MVs con proteínas como laminina y fibronectina, que interactúan

con integrinas de la superficie del trofoblasto y activan vías de señalización que potencian la invasividad del TE. La microinyección de estas MVs en blastocistos incrementó las tasas de implantación *in vivo* [10].

Además de las EVs, se han identificado miRNAs embrionarios en medios de cultivo de blastocistos y en células del TE biopsiadas; y aunque no se ha demostrado que estas moléculas sean transportadas a través de EVs, se postula esta vía dada la abundancia de miRNAs en exosomas [10].

#### 4.5.2. EVs del oviducto

El oviducto constituye el sitio principal para la fecundación y el inicio del desarrollo embrionario temprano. Las secreciones oviductales influyen en procesos clave como la motilidad espermática y la reacción acrosómica. En este contexto, se han aislado exosomas y MVs tanto del fluido oviductal de murinos y bovinos como de cultivos *in vitro* de células epiteliales oviductales bovinas que además de marcadores típicos presentan proteínas específicas del entorno oviductal, como la OVGP1 [10]. Estudios proteómicos identificaron 315 proteínas distintas en EVs oviductales: 97 exclusivas de las EVs *in vivo*, 47 propias de las EVs *in vitro* y 175 compartidas por ambos tipos. El origen de las proteínas únicas presentes en las EVs derivadas *in vitro* no está completamente claro; se ha sugerido que podrían proceder del medio de cultivo, del suero añadido o reflejar adaptaciones celulares a las condiciones artificiales del cultivo [10,17].

Además de las diferencias cualitativas, se han descrito diferencias en la expresión proteica entre las EVs oviductales obtenidas *in vivo* e *in vitro*, lo que subraya la influencia del entorno de cultivo en su composición molecular [17]. En este sentido, los modelos *in vitro* bovinos han demostrado que la suplementación del medio con EVs oviductales mejora la calidad embrionaria, incrementando la formación de blastocistos, el número de células del TE y la supervivencia tras vitrificación [15]. Estos efectos dependen del origen regional: las EVs del istmo favorecen la viabilidad embrionaria, posiblemente mediante la regulación positiva de AQP3, mientras que las de la ampolla tubárica no mostraron efectos significativos [15]. En modelos murinos, la adición de EVs oviductales al medio de transferencia incrementó las tasas de LNB, confirmando su potencial en reproducción asistida. Además, pueden inducir cambios en la expresión génica embrionaria, afectando rutas relacionadas con la biosíntesis proteica, unión a nucleótidos u organización del citoesqueleto de actina [15,17].

Si bien se ha estudiado ampliamente cómo el oviducto influye sobre el embrión, se ha prestado menor atención al efecto inverso: cómo las EVs embrionarias pueden afectar al oviducto. En bovinos, el cocultivo con células epiteliales redujo la expresión de genes de la vía BMP, mientras que EVs derivadas de embriones de alta calidad en D5 modificaron la expresión de 25 genes en células oviductales, incluyendo ISG-15, MX1, OAS1Y y LOC100139670, activados por IFN- $\tau$ , factor clave en el reconocimiento materno de la gestación en rumiantes. Estos hallazgos sugieren que el embrión podría usar EVs como medio para comunicar su presencia y calidad a la madre [15].

#### 4.5.3. EVs endometriales

La comunicación entre embrión y endometrio es un proceso bidireccional fundamental para la implantación. No solo el embrión envía señales, sino que el endometrio también modula activamente su capacidad de implantación y desarrollo temprano. Aunque tradicionalmente se atribuyó este diálogo a moléculas solubles, evidencias recientes destacan el papel de las EVs derivadas del endometrio como mediadores clave [18,19]. Estas vesículas, con tamaños compatibles con exosomas y MVs, se han identificado en fluido uterino y moco de mujeres fértiles durante la fase secretora del ciclo menstrual. Mediante inmunomarcaje de tetraspaninas como CD9 y CD63 se ha observado la presencia de EVs en la superficie apical del epitelio endometrial con una expresión variable que sugiere una regulación cíclica. También se han aislado EVs de aspirados uterinos, moco cervical y cultivos celulares, con tamaños entre 50 y 150 nm [10,19].

En modelos bovinos, se ha evidenciado la liberación de EVs endometriales durante la etapa peri-implantacional, con un incremento tras la implantación, lo que sugiere una participación activa del endometrio en la regulación embrionaria mediante señales empaquetadas en EVs [10,20]. Estudios en la línea celular epitelial endometrial (EEC1) revelaron que estas células y sus EVs comparten la mayoría de sus miRNAs, excepto algunos miRNAs exclusivos de las vesículas que sugieren mecanismos específicos de selección y carga [19]. Entre sus posibles funciones, estos miRNAs podrían regular genes de adhesión celular (cadherinas e integrinas) y rutas de señalización celular críticas para la implantación, como VEGF, Jak-STAT y TLR [19]. Además, se detectaron otros ncRNAs (U6, RNU44, RNU48) vinculados al procesamiento y modificación de RNA, aunque su papel en este contexto aún no está claro [10].

El análisis proteómico de EVs derivadas de EEC1 identificó 1043 proteínas, de las cuales la mayoría se encontraron asociadas a biogénesis de exosomas (ESCRT, tetraspaninas) y otras



exclusivas del epitelio endometrial, incluyendo enzimas como quinasas, fosfatasas, transferasas o metaloproteinasas [10,18]. Se ha comprobado que su secreción, al igual que en el entorno *in vivo*, está modulada por hormonas esteroideas, con variaciones dependientes de tratamientos con estrógenos o estrógenos-progesterona, lo que concuerda con la influencia hormonal en el reciclaje endosomal y su relación con la fertilidad [10,18]. Funcionalmente, estas EVs favorecen la adhesión de células trofoblásticas HTR8, aumentando la activación de FAK, su fosforilación y la expresión de fibronectina, lo que sugiere su papel en la modulación de la fisiología del trofoblasto para favorecer la implantación [18].

Más allá del epitelio, también se han identificado EVs estromales, potencialmente implicadas en la decidualización, proceso esencial en la regulación de la invasión trofoblástica y la placentación. Aunque no se ha demostrado la producción directa de EVs por la decidua, sí se han aislado en los sobrenadantes de cultivos de células estromales endometriales bovinas y humanas, tanto de mujeres con y sin endometriosis, lo que refuerza el papel de las EVs en la implantación [10].

#### *4.5.4. EVs del ambiente folicular ovárico*

El folículo ovárico constituye un microambiente altamente especializado en el que las células de la teca, granulosa, cúmulo y el ovocito interactúan de forma dinámica para regular la foliculogénesis. Durante este proceso, las células foliculares liberan EVs al líquido folicular que transportan mRNAs, proteínas y miRNAs, actuando como mediadores de la comunicación intercelular [1]. Diversos estudios han demostrado que las EVs, especialmente las exosómicas, son internalizadas por células de la granulosa, modulando rutas clave como la señalización del TGF- $\beta$  a través de la regulación de genes como ACVR1 e ID2. Además, las EVs derivadas de folículos pequeños favorecen la expansión del cúmulo, la proliferación celular y el desarrollo embrionario *in vitro*, mostrando un efecto superior al de las procedentes de folículos mayores. Estas diferencias sugieren una regulación dependiente del estado folicular sobre la biogénesis y el contenido molecular de las EVs [1].

#### *4.5.5. EVs placentarias*

La placenta, en particular los sincitiotrofoblastos, constituye una fuente principal de EVs durante la gestación, actuando en la comunicación materno-fetal [10]. Estas vesículas se han aislado de líneas celulares, cultivos placentarios y sangre materna, observándose un incremento progresivo de su concentración en plasma a lo largo del embarazo, especialmente bajo

condiciones de hipoxia o hipoglucemia [10]. Su contenido incluye proteínas de membrana específicas (ligandos NKGD2, FasL, TRAIL y sincitina), que contribuyen a la tolerancia inmunológica entre madre y feto; factores solubles (TGF- $\beta$  y fosfatasa alcalina placentaria); y mRNA y miRNA, que cumplen funciones biológicas diversas [10]. Alteraciones en sus niveles y composición se han asociado con complicaciones como la preeclampsia, donde las EVs presentan propiedades proinflamatorias, antiangiogénicas y procoagulantes, promoviendo inflamación sistémica, disfunción endotelial y activación de la coagulación. Por ello, se investigan como potenciales biomarcadores en esta y otras patologías del embarazo, como la diabetes mellitus [10].

#### *4.5.6. Otras fuentes de EVs en el embarazo*

Además de las EVs de origen placentario, otras células maternas y microbianas liberan EVs que pueden influir en la gestación. Las células endoteliales modifican el contenido de sus exosomas en situaciones de hiperglucemia y estrés oxidativo, alterando la función del endotelio fetoplacentario y asociándose con hipertensión, edema, trombosis e infartos placentarios. De manera similar, el tejido adiposo materno, especialmente en contextos de obesidad o diabetes gestacional, produce EVs con perfiles alterados de miRNAs. En modelos murinos, exosomas derivados de macrófagos de tejido adiposo obeso indujeron resistencia a la insulina y tolerancia alterada a la glucosa en ratones sanos, lo que sugiere un papel en la inflamación sistémica y en la fisiopatología placentaria vinculada a trastornos metabólicos [10].

Por último, se investiga la contribución de las EVs microbianas en el embarazo. El microbioma reproductivo femenino puede liberar vesículas bacterianas con componentes biológicamente activos que modulan la respuesta inmunitaria materna. Destaca el caso del *Streptococcus* del grupo B (GBS), cuya colonización vaginal se asocia con parto pretérmino y rotura prematura de membranas. En modelos experimentales, sus vesículas cargadas con proteasas y toxinas han mostrado capacidad para degradar membranas, inducir muerte fetal y desencadenar parto prematuro [10].

#### *4.7. Interacción y modelos de estudio*

La comunicación celular es fundamental para diversos procesos moleculares que permiten a las poblaciones celulares intercambiar información entre sí, favoreciendo la especialización tisular o la coordinación de interacciones entre distintos órganos. Las EVs han sido identificadas como elementos clave en la regulación de las secuencias temporales e interacciones espaciales, así

como en la señalización célula a célula durante todos los eventos de la reproducción sexual, tales como la gametogénesis, la fecundación y la embriogénesis, y en el diálogo embrión-materno [4].

Los estudios en modelos embrionarios animales han mostrado que el perfil de secreción de EVs se relaciona con la calidad embrionaria: los embriones con menor potencial de desarrollo liberan más EVs, probablemente como respuesta al estrés, mientras que perfiles más homogéneos y estables se asocian a mayor viabilidad, especialmente en bovinos [21]. También se han descrito variaciones en el tamaño de las EVs, aunque su valor como biomarcador no es del todo consistente, pues algunos estudios asocian un mayor tamaño a embriones viables y otros a no viables. En general, la producción de EVs aumenta en fases avanzadas como la blastulación, reflejando una mayor actividad celular [21].

El análisis del contenido molecular de estas vesículas ha identificado miRNAs con potencial como biomarcadores de calidad no invasivos. Por ejemplo, en embriones con desarrollo detenido se observa la sobreexpresión de miR-103, miR-100, miR-502a y miR-1, en contraste con la disminución de miR-92a, miR-140, miR-2285av y miR-222 [21]. Además, la dinámica de los miRNAs varía según la fase de desarrollo: durante la compactación destacaron aquellos implicados en señalización de hormonas como oxitocina y estrógeno, mientras que en blastulación emergieron perfiles vinculados a la señalización de la prolactina. Otros miRNAs, como miR-21 y miR-130, parecen intervenir en la activación del genoma embrionario, mientras que miR-30c se asoció a apoptosis y menor calidad embrionaria [21]. Aunque estos hallazgos destacan el potencial biomarcador distintivo de miRNAs de las EVs, las incoherencias en los métodos de aislamiento y secuenciación de miRNAs subrayan la necesidad crítica de protocolos estandarizados que permitan la validación entre estudio.

Más allá de los miRNAs, se ha observado DNA en EVs tanto de embriones viables como no viables, así como proteínas inmunorreguladoras como HLA-G, que podrían favorecer un ambiente receptivo. Se ha demostrado que exosomas positivos para CD9 y CD63, de menos de 100 nm, son liberados continuamente desde el cigoto hasta el blastocisto, atravesando la zona pelúcida e interactuando con células endometriales maternas [21]. Estas vesículas contienen también transcritos asociados a pluripotencia y parecen participar en la modulación inmune materna [21].

Las condiciones de cultivo, en particular la tensión de oxígeno alterada y la renovación del medio, afectan significativamente la composición y función de las EVs. Variaciones en el

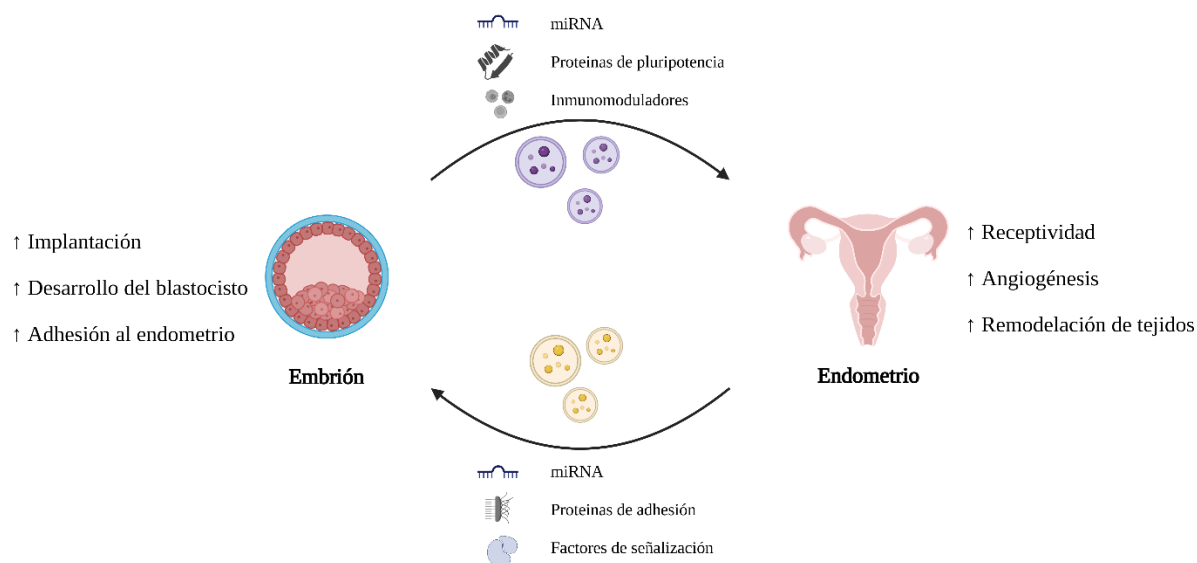
oxígeno alteran la cantidad, el tipo y el perfil de miRNAs contenidos en estas vesículas. Por ejemplo, se ha descrito una mayor expresión de miR-210 bajo condiciones de hipoxia, posicionándolo como un posible biomarcador no invasivo del estado del cultivo. Además, los embriones generados *in vitro* secretan EVs con un perfil molecular distinto al de los embriones desarrollados *in vivo*, incluyendo rutas asociadas a procesos de estrés celular [21].

En este contexto, numerosos estudios recientes han profundizado en la caracterización de las EVs secretadas por embriones animales al medio de cultivo, especialmente en modelos bovinos, aunque también se han utilizado modelos ovinos, porcinos y murinos. Para su aislamiento, se han empleado principalmente métodos como la centrifugación diferencial, la ultrafiltración, la cromatografía de exclusión por tamaño y la precipitación polimérica. La caracterización de las EVs ha recurrido a técnicas como el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), microscopía electrónica de transmisión y barrido (TEM y SEM), citometría de flujo con marcadores específicos, inmunotinción, y estudios del contenido molecular de las vesículas (RNA, DNA y proteínas). Esta diversidad metodológica ha permitido obtener una visión más detallada del papel que desempeñan las EVs en la comunicación celular durante el desarrollo embrionario temprano [21].

Recientes investigaciones han identificado perfiles específicos de RNA en EVs procedentes de embriones aneuploides, que podrían servir como indicadores no invasivos de aneuploidía. Estos EVs parecen modificar la expresión génica en las células estromales endometriales, aumentando barreras a la implantación y alterando vías celulares relacionadas con la comunicación y la apoptosis [21].

#### ***4.8. Comunicación embrión-endometrial***

La implantación embrionaria constituye un proceso altamente regulado, que depende de una interacción bidireccional entre un embrión competente y un endometrio receptivo. En este contexto, las EVs han emergido como mediadoras clave en esta comunicación, actuando como portadoras de señales moleculares que coordinan el diálogo materno-embrionario (**figura 3**).



**Figura 3.** Esquema de la comunicación bidireccional mediada por EVs entre embrión y endometrio durante la implantación.

Diversos estudios han demostrado que tanto el embrión como el endometrio liberan EVs capaces de modificar el comportamiento celular del otro [10]. Las EVs embrionarias pueden influir en la receptividad endometrial mediante la transferencia de miRNAs, proteínas de pluripotencia o factores inmunomoduladores, como se ha evidenciado en estudios que identifican en estas vesículas la presencia de moléculas como POU5F1, NANOG y HLA-G, implicadas en la promoción de un entorno uterino receptivo [2,10,15]. Por su parte, las EVs de origen endometrial pueden preparar el entorno uterino para facilitar la implantación, ya que modulan la expresión génica relacionada con adhesión celular, angiogénesis y remodelación tisular, como se ha demostrado en modelos tanto *in vitro* como en fluidos uterinos humanos y animales [4,18,19].

#### **4.9. EVs como biomarcadores en medicina reproductiva**

Las EVs se han consolidado como mediadores clave en la comunicación intercelular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En contextos de enfermedad, las alteraciones metabólicas y celulares modifican su composición y liberación, lo que las posiciona como posibles biomarcadores diagnósticos y herramientas terapéuticas [4]. En el tracto reproductivo, la interacción celular mediada por EVs, incluida la diafonía embrión-madre, es esencial, y sus cambios en estados patológicos pueden favorecer la aparición y progresión de distintas patologías reproductivas y obstétricas (**Tabla 1**) [4].

**Tabla 1.** Resumen de estudios que reportan el uso de la carga molecular de EVs como biomarcadores en medicina reproductiva. Los estudios se clasificaron por diferentes condiciones patológicas describiendo la fuente y el método de aislamiento de EVs y los resultados principales obtenidos. Modificada de [4].

Biomarcadores para:	EVs aisladas de	Especie	Método de aislamiento	Resultados principales
Cáncer reproductivo femenino	serum	<i>Homo sapiens</i>	Precipitación de polímeros	Se observa un incremento de miRNAs de EVs en el serum de pacientes con cáncer epitelial de ovario
Fertilidad femenina	Fluido folicular	<i>Homo sapiens</i>	Ultracentrifugación	miRNAs de EVs en el fluido folicular están asociadas a concentraciones urinarias de fenoles y metabolitos de ftalatos
Fertilidad femenina	Medio de blastocistos y cocultivo de células endometriales	<i>Homo sapiens</i>	Precipitación de polímeros	Los miRNAs secretados unidos a EVs se encuentran alterados en experimentos de cocultivo con blastocitos y células endometriales aisladas de pacientes diagnosticadas de AMA o endometriosis.
Calidad embrionaria	Medio de cultivo embrionario	<i>Homo sapiens</i>	No aislamiento	El contenido de DNA en EVs aisladas de cultivos embrionarios está relacionado con implantación exitosa
Calidad placentaria	Citotrofoblastos primarios y serum	<i>Homo sapiens</i>	Precipitación de polímeros y ultracentrifugación	Las EVs en serum de pacientes con preeclampsia muestran alteración en el contenido de sincitina
Calidad placentaria	Plasma	<i>Homo sapiens</i>	Ultracentrifugación	Los miRNAs de EVs en plasma están alterados en preeclampsia
Calidad placentaria	Plasma	<i>Homo sapiens</i>	Precipitación de polímeros y ultracentrifugación	EVs de pacientes con preeclampsia liberan factores antiangiogénicos a células endoteliales
Calidad placentaria	Plasma	<i>Homo sapiens</i>	Ultracentrifugación y cromatografía de exclusión por tamaño	El análisis proteómico de las EVs en plasma revela alteraciones proteicas relacionadas con la diabetes mellitus gestacional
Calidad placentaria	Medio condicionado de vellosidades coriónicas	<i>Homo sapiens</i>	Ultracentrifugación	La diabetes mellitus gestacional altera el perfil de miRNA de EVs aisladas de cultivos de explantes de vellosidades coriónicas
Aborto temprano	Serum	<i>Bos taurus</i>	Ultracentrifugación	Las EVs en serum contienen miRNAs relacionadas con la mortalidad embrionaria bovina

Se ha observado que los niveles fisiológicos de EVs presentes en tejidos, suero u otros fluidos biológicos pueden variar considerablemente en función del modelo experimental, del tiempo tras la enfermedad (horas o días), del tipo de patología y del método empleado para su cuantificación. A pesar de esta variabilidad, la caracterización precisa de estos perfiles podría contribuir a establecer dosis terapéuticas adecuadas y a optimizar futuras intervenciones clínicas [4].

#### 4.9.1. Biomarcadores para el cáncer reproductivo femenino

Las EVs reflejan el estado fisiológico o patológico de la célula de origen, lo que ha despertado interés en su aplicación como biomarcadores en oncología. A diferencia de las biopsias tisulares, que son invasivas y limitadas para monitorizar la progresión tumoral, las EVs pueden obtenerse de fluidos biológicos de forma no invasiva y protegen frente a la degradación a moléculas de interés como miRNAs, proteínas o mRNAs [4].

En relación con el cáncer, se ha observado que determinados miRNAs derivados de EVs están asociados a distintos tipos tumorales, incluidos los de pulmón, mama y ovario. En particular, la expresión de miembros de la familia miR-200 (miR-200a, miR-200b y miR-200c) ha demostrado utilidad para discriminar entre tumores ováricos benignos y malignos, alcanzando sensibilidades del 88 % y especificidades del 90 % en algunos estudios. Estos miRNAs también se correlacionan con los niveles séricos de CA125, un marcador clínico ampliamente utilizado para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico del cáncer de ovario [4].

#### *4.9.2. Biomarcadores para la fertilidad femenina*

La disminución de la fertilidad femenina se ha asociado a la exposición a disruptores endocrinos como ftalatos y fenoles, que alteran el perfil de miRNAs en EVs del líquido folicular, interfiriendo en la función ovárica y la maduración ovocitaria [4]. Se ha observado que concentraciones elevadas de estos compuestos se relacionan con cambios en miR-125b, miR-24 y miR-375, implicados en el desarrollo embrionario temprano, la diferenciación embrionaria y la regulación de la apoptosis en células del cúmulo. Estas alteraciones pueden comprometer la producción de estradiol y el desarrollo folicular, tanto en humanos como en modelos animales, con potenciales consecuencias sobre la fertilidad femenina. [4].

En el ámbito veterinario, micotoxinas como las producidas por *Fusarium* también se han vinculado con modificaciones en miRNAs de EVs foliculares y con un impacto negativo en la fertilidad animal [4]. Asimismo, factores intrínsecos como la edad materna avanzada (AMA) o la endometriosis alteran la comunicación embrión-endometrio. En estos contextos se han descrito cambios en los miRNAs contenidos en EVs endometriales, capaces de regular centenares de genes esenciales para la adhesión celular, el desarrollo embrionario y la implantación [4].

#### *4.9.3. Biomarcadores para la calidad embrionaria*

En la actualidad, la selección embrionaria se basa principalmente en criterios morfológicos y, en algunos casos, en biopsias del TE, aunque estas últimas son invasivas y conllevan riesgos. En este contexto, la identificación de biomarcadores no invasivos, como los derivados de EVs, representa una alternativa prometedora [4].

En 2013 se detectó DNA genómico en el líquido blastocélico y en el medio de cultivo embrionario, lo que abrió la puerta a nuevas estrategias diagnósticas [4]. Posteriormente, en 2017, estudios confirmaron la presencia de EVs en medios de cultivo embrionario mediante

TEM y citometría de flujo. Los resultados mostraron que un menor número de EVs positivas al yoduro de propidio (PI<sup>+</sup>), indicador de daño celular, se correlacionaba con un mayor potencial de implantación, lo que resalta la utilidad de las EVs como marcadores no invasivos de viabilidad embrionaria [21].

Asimismo, los miRNAs liberados al medio de cultivo por los embriones han mostrado un papel clave en la comunicación embrión-materno y en la predicción de la implantación [4]. Perfiles específicos de miRNAs en EVs de bovinos, se han relacionado con aneuploidías y con la calidad embrionaria, reflejando tanto el estado fisiológico del embrión como las condiciones de cultivo [4]. En este sentido, se ha propuesto miR-210 como marcador de normoxia durante el cultivo *in vitro*, al estar vinculado con estados hipóxicos [4].

En modelos animales, como en bovinos, los blastocistos implantados y no implantados presentan perfiles diferenciados de miRNAs en los medios de cultivo, siendo más abundantes en embriones de baja calidad. Este fenómeno podría deberse, en parte, a un aumento pasivo por recambio celular más que a una secreción activa mediada por EVs [4].

#### *4.9.4. Biomarcadores para la calidad placentaria*

El embarazo ofrece un modelo idóneo para el estudio de EVs, ya que sus etapas son predecibles y la placenta constituye una fuente accesible de vesículas con marcadores moleculares específicos [4]. Las EVs placentarias, identificables en sangre materna mediante proteínas exclusivas como la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) o miRNAs del clúster C19MC, reflejan procesos esenciales de comunicación feto-materna y pueden aislarse selectivamente mediante procedimientos cromatográficos/inmunosorbentes [4].

Durante la gestación, estas EVs participan en la inmunomodulación, favoreciendo la tolerancia materna al feto. Su concentración plasmática aumenta de forma progresiva, llegando a ser hasta 20 veces superior en mujeres embarazadas respecto a no gestantes [4]. Alteraciones en su perfil se han relacionado con patologías gestacionales: en preeclampsia, por ejemplo, las EVs muestran menor expresión de sincitina-2 y un incremento de factores antiangiogénicos como sFlt-1 y sEng, lo que contribuye a la disfunción endotelial característica de esta enfermedad [4].

El microambiente placentario también influye en la secreción de EVs. Factores como la tensión de oxígeno y las concentraciones de glucosa pueden modular tanto la liberación como la bioactividad de las vesículas trofoblásticas. En este contexto, las EVs placentarias aisladas de mujeres con diabetes mellitus gestacional presentan alteraciones en su contenido proteico,



especialmente en rutas relacionadas con el metabolismo energético, la inflamación y la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético. En algunos casos, los efectos de la hiperglucemia se ven potenciados por condiciones de hipoxia placentaria, como ocurre en mujeres con resistencia a la insulina asociada a diabetes gestacional y preeclampsia [4].

#### *4.9.5. Biomarcadores para el aborto temprano*

Durante la gestación se ha observado un aumento progresivo en la concentración plasmática de EVs y en el número de miRNAs circulantes asociados a ellas, identificándose 194 y 211 miRNAs en bovinos a los días 17 y 24 de gestación, respectivamente [4]. Sin embargo, algunos miRNAs como miR-25, miR-16a/b y miR-3596 mostraron mayor abundancia tanto en controles como en animales con mortalidad embrionaria, en comparación con hembras gestantes en día 17. El incremento de miR-25 en bovinos con pérdida embrionaria temprana podría reflejar la muerte embrionaria o una respuesta sistémica a la misma [4].

El análisis funcional reveló que estos cambios podrían activar rutas relacionadas con la producción de prostaglandinas, moléculas que inducen la regresión del cuerpo lúteo y, por tanto, una caída en los niveles de progesterona, esenciales para el mantenimiento de la gestación [4]. Estos hallazgos sugieren que los perfiles de miRNAs exosomales circulantes podrían emplearse como biomarcadores tanto para el diagnóstico precoz de gestación como para la detección de mortalidad embrionaria temprana [4].

#### *4.10. Potencial terapéutico de las EVs*

Las EVs han demostrado un gran potencial terapéutico. Diversos estudios experimentales sugieren que EVs derivadas de células madre pluripotentes o mesenquimales podrían emplearse como agentes terapéuticos en el tratamiento de condiciones asociadas a infertilidad, como la insuficiencia ovárica primaria o las adherencias intrauterinas. Actualmente, ya se están llevando a cabo ensayos clínicos dirigidos a evaluar su eficacia y seguridad en humanos, con el enfoque en su futura aplicación en la práctica clínica [5,15]. Con la evidencia clínica adecuada y un marco regulatorio apropiado, estas terapias basadas en EVs podrían beneficiar en el futuro a pacientes con problemas de fertilidad [15].

Estudios recientes han demostrado que los exosomas endometriales pueden estar implicados en el fallo de implantación [22], lo que ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias clínicas basadas en EVs. Gracias a su estructura de membrana biológica, son vehículos ideales para

transportar moléculas como RNA, proteínas, factores de crecimiento o compuestos antiinflamatorios.

Un caso destacado fue el uso experimental de MVs derivadas del líquido amniótico para tratar una endometritis crónica en una yegua con infertilidad persistente. La administración intrauterina de estas EVs mejoró el estado del endometrio y permitió una gestación exitosa, sugiriendo un posible efecto regenerativo y antiinflamatorio que favorece la implantación embrionaria. Aunque este es, hasta la fecha, el único estudio publicado con EVs en enfermedades reproductivas, abre la puerta a futuras aplicaciones clínicas en el tratamiento de trastornos de fertilidad humanos [23].

#### ***4.11. Otras aplicaciones concretas de las EVs en medicina reproductiva***

##### ***4.11.1. Reparación del endometrio y mejora de la receptividad***

Las EVs derivadas de células madre mesenquimales de médula ósea (BMSC-EVs) han demostrado capacidad para reparar tejido endometrial dañado, promoviendo la proliferación, inhibiendo la apoptosis y facilitando la angiogénesis en modelos murinos (**figura 4**). Se indujo un modelo de lesión endometrial *in vivo* utilizando etanol al 95%, y se aplicaron EEC tratadas con mifepristona como modelo de lesión endometrial *in vitro*. Tras su aislamiento e identificación, las BMSC-EV fueron eficaces en la reparación de lesiones endometriales *in vivo* y facilitaron la proliferación de EEC y reprimieron la apoptosis celular *in vitro*; los sobrenadantes de EEC aceleraron la proliferación, migración e invasión de células endoteliales de vena umbilical humana y facilitaron la angiogénesis tras lesiones endometriales *in vitro* [16].

##### ***4.11.2. Tratamiento de la insuficiencia ovárica prematura (IOP)***

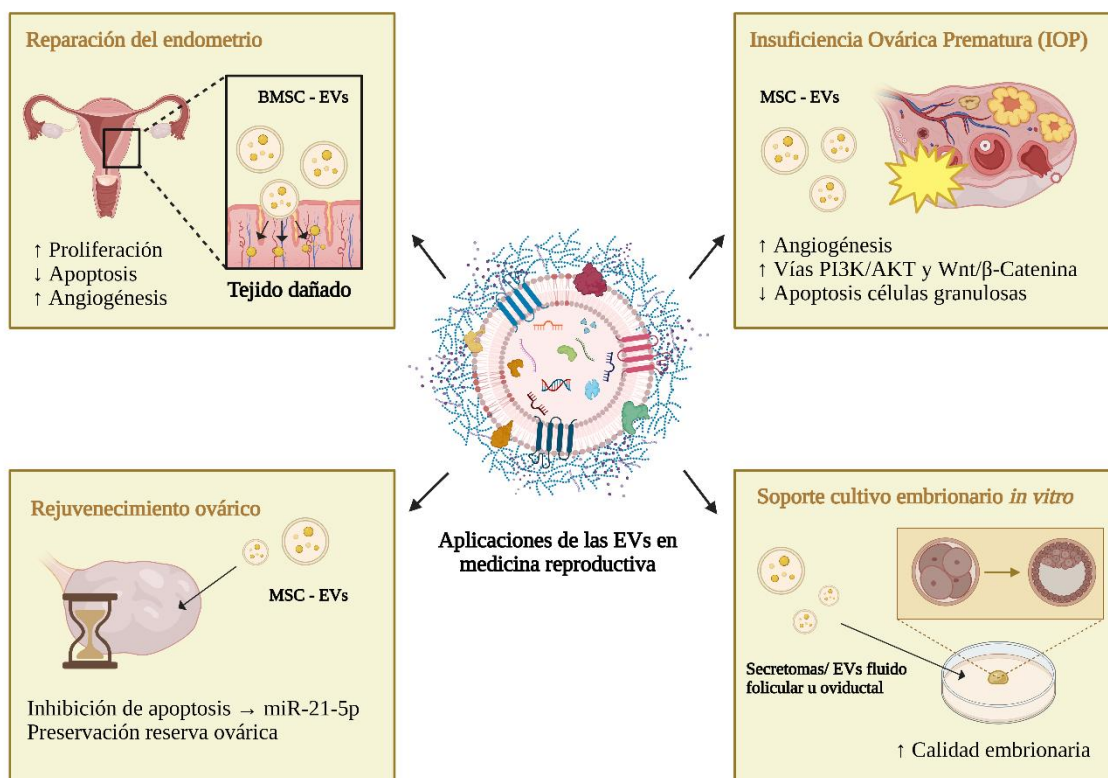
Las EVs de células madre mesenquimales (MSC) derivadas del cordón umbilical han restaurado la función ovárica en modelos de IOP inducida químicamente en ratones (**figura 4**). Tras inyección intravenosa, estas vesículas promovieron la angiogénesis en el ovario, redujeron la apoptosis de células granulosas y normalizaron el ciclo estral, sin efectos adversos en la descendencia. Se ha identificado que el miRNA-126-3p y otros miRNA como miR-29a, transportados en EVs, activan las vías PI3K/AKT y Wnt/ $\beta$ -catenina, mejorando la proliferación celular y reduciendo el daño folicular [24,25].

#### 4.11.3. Rejuvenecimiento ovárico y mejora en la fertilidad natural y asistida

Las EVs obtenidas de células MSC del cordón umbilical han mostrado efectos regenerativos en ovarios envejecidos naturalmente, restaurando parcialmente la función ovárica mediante la inhibición de la apoptosis a través del miR-21-5p que modula PTEN. Asimismo, se exploran aplicaciones en la preservación de la reserva ovárica antes de tratamientos gonadotóxicos (**figura 4**) [25].

#### 4.11.4. Soporte en cultivo embrionario *in vitro*

Aunque no hay ensayos directos, se propone suplementar medios de cultivo embrionario con EVs fisiológicas (de fluido folicular u oviductal) o con secretomas de cocultivo embrionario para recrear condiciones más favorables (**figura 4**). En modelos porcinos, se observó que el cocultivo con embriones partenogenéticos mejora el desarrollo de embriones clonados, evidenciando el potencial del secretoma, que incluye EVs, en la mejora de la calidad embrionaria [2].



**Figura 4.** Aplicaciones emergentes de las EVs en medicina reproductiva. Diversos estudios preclínicos muestran su potencial en la reparación endometrial, restauración y rejuvenecimiento ovárico, así como en el soporte de cultivos embrionarios *in vitro*, lo que las posiciona como una herramienta prometedora en la mejora de la fertilidad natural y asistida.

## 9. Discusión y futuras perspectivas clínicas

Las EVs son elementos clave en la fisiología reproductiva, participando desde la maduración ovocitaria hasta la implantación y el diálogo materno-embrionario, así como en la fecundación, desarrollo embrionario y parto [2,5,15,16]. Su implicación también se extiende a trastornos reproductivos y gestacionales, como disfunciones ovulatorias, endometriosis y complicaciones hipertensivas [2,15]. Si bien esta revisión y gran parte de los estudios se centran en el entorno uterino y embrionario cabe destacar la importancia de su implicación en el factor masculino, como la capacitación espermática, la reacción acrosómica o la polispermia [2].

A pesar de su ubicuidad en el organismo, muchos mecanismos de acción de las EVs permanecen poco comprendidos y algunos resultados son contradictorios, probablemente debido a variaciones en cultivos celulares, protocolos de purificación o falta de caracterización [5]. Entre los principales retos metodológicos destaca la ausencia de criterios estandarizados para su aislamiento y clasificación, el solapamiento de tamaños entre exosomas, MVs y cuerpos apoptóticos, y la influencia de las condiciones de cultivo sobre su contenido y secreción [5,13]. Por tanto, la estandarización de protocolos es fundamental para avanzar en la comprensión de sus funciones, su aplicación terapéutica y su fiabilidad como herramienta diagnóstica en reproducción asistida.

Las EVs embrionarias podrían desempeñar un papel activo en la comunicación con el entorno materno, modulando procesos como la implantación, el desarrollo del blastocisto y la proliferación endometrial. En humanos se han identificado miRNAs en medios de cultivo de blastocistos y en células del TE, observándose niveles más altos en los que implantaron, lo que apoya su implicación positiva en la implantación [10]. Sin embargo, todavía no se ha demostrado un mecanismo causal directo, por lo que son necesarios más estudios.

Los modelos animales han aportado información relevante: en porcinos, las EVs embrionarias mejoran la proporción ICM/TE y aumentan la implantación y la tasa de nacidos vivos, mientras que en murinos se ha visto que las células madre embrionarias secretan MVs captadas por el TE que promueven su migración, aunque no se ha confirmado que estas sean producidas *in vivo* por la ICM del blastocisto, ya que se obtuvieron de líneas cultivadas [10].

En humanos, la validación de estos hallazgos presenta una dificultad añadida, dado que los medios de cultivo incorporan suplementos séricos que aportan EVs exógenas, complicando la identificación de las producidas específicamente por el embrión [2]. Además, los embriones

generados *in vitro* se desarrollan en condiciones muy diferentes a las del oviducto y útero, lo que provoca alteraciones morfológicas, metabólicas y moleculares. Estudios proteómicos han mostrado diferencias claras entre EVs derivadas del ambiente *in vivo* e *in vitro*, lo que indica que las obtenidas en cultivo pueden proceder del propio medio, del suero añadido o de adaptaciones celulares [1,10,17]. Por ello, aunque las EVs embrionarias son prometedoras, es necesario interpretar con cautela los resultados obtenidos exclusivamente en sistemas *in vitro*, ya que podrían no reflejar las condiciones fisiológicas reales.

Aunque gran parte de la caracterización de las EVs del tracto reproductivo femenino se ha realizado en modelos animales, también se han aislado en humanos a partir de aspirados uterinos, moco cervical y cultivos celulares, con un tamaño atribuible a exosomas [10,19]. Su concentración y contenido proteico varían durante la implantación y etapas posteriores: las EVs preimplantacionales inducen la activación de genes apoptóticos en células epiteliales, mientras que las postimplantacionales activan genes relacionados con la adhesión, lo que sugiere un efecto paracrino en la regulación de la receptividad endometrial [10,20]. Además, en EEC1 se han identificado miRNAs específicos contenidos en EVs, lo que apunta a una compleja red de regulación post-transcripcional esencial para la pluripotencia, la regeneración cíclica del endometrio y la diferenciación celular. Esta riqueza en miRNAs podría estar implicada en patologías como endometriosis o cáncer endometrial, con un potencial valor diagnóstico y terapéutico [10,19].

Las EVs derivadas de células estromales endometriales también se relacionan con la implantación. Aunque la producción directa de EVs por la decidua no ha sido confirmada, su detección en cultivos bovinos y humanos respalda una comunicación intercelular activa mediada por EVs. Bajo condiciones patológicas como la endometriosis, la liberación y el contenido de estas vesículas se alteran, lo que sugiere un papel en la desregulación de la receptividad uterina [10,18]. Futuras investigaciones deberían caracterizar en mayor detalle sus perfiles moleculares y su efecto fisiológico sobre células trofoblásticas e inmunes.

Por otra parte, EVs derivadas de fluidos foliculares, placenta y otras fuentes maternas o microbianas desempeñan funciones adicionales. Las EVs foliculares podrían mejorar la maduración ovocitaria *in vitro*, aunque deben considerarse los cambios fisiológicos del folículo [1]. Las EVs placentarias son claves en la comunicación materno-fetal y su alteración se asocia a complicaciones como la preeclampsia [10]. Asimismo, EVs derivadas de endotelio, tejido adiposo o microbiota configuran una red compleja de señales extracelulares influida por el

estado metabólico o infeccioso materno, que puede afectar el desarrollo gestacional. En este sentido, las EVs bacterianas han mostrado un papel en la disfunción feto-placentaria, aunque aún no se conoce si la microbiota genera EVs con función en la implantación o el mantenimiento del embarazo [10]. Estos hallazgos subrayan el valor emergente de las EVs como potenciales biomarcadores y herramientas terapéuticas en medicina reproductiva.

En conjunto, la evidencia indica que las EVs embrionarias y maternas participan activamente en la regulación del desarrollo temprano y la comunicación embrión-materno. La mayor liberación de EVs por embriones con baja viabilidad podría reflejar un mecanismo de respuesta al estrés celular, lo que refuerza su potencial como biomarcadores no invasivos de calidad embrionaria [4,21]. Sin embargo, las discrepancias entre estudios en cuanto a concentración y tamaño obligan a interpretar estos parámetros con cautela, integrándolos siempre con otros marcadores moleculares [21].

La variabilidad en los perfiles de miRNA a lo largo del desarrollo embrionario refleja la complejidad de su papel en la señalización y el metabolismo, destacando su implicación en procesos clave como la activación del genoma embrionario o la transición materno-embrionaria, lo que refuerza el potencial diagnóstico de las EVs en reproducción asistida [21]. La presencia de miRNAs, DNA y transcriptos de pluripotencia en estas vesículas abre la posibilidad de utilizarlas como herramientas no invasivas, incluso para evaluar la ploidía sin necesidad de biopsia embrionaria. Su capacidad de atravesar la zona pelúcida e interactuar con células endometriales sugiere un papel en el diálogo molecular temprano que condiciona la implantación [21].

No obstante, la heterogeneidad metodológica en el aislamiento y análisis de EVs limita su aplicación clínica, lo que subraya la necesidad de protocolos estandarizados y de optimizar los sistemas de cultivo *in vitro* para reproducir de manera más fiel el entorno fisiológico, mejorando así tanto la calidad embrionaria como la fiabilidad de las EVs como biomarcadores [21]. En este contexto, los perfiles alterados de EVs en embriones aneuploides y sus efectos negativos sobre células estromales maternas evidencian que estas vesículas tienen funciones que trascienden al propio embrión, consolidando su relevancia en la selección embrionaria [21].

Diversos hallazgos apoyan su papel activo en la comunicación embrio-materna: la presencia predominante de exosomas en blastocistos de D5, identificados con CD9 y CD63 e internalizados por células endometriales, los miRNAs vinculados con señalización de IL-6 y proliferación epitelial, así como proteínas inmunorreguladoras como HLA-G y factores de

pluripotencia como POU5F1 y NANOG [2,10,15,21]. Estas características refuerzan el valor de las EVs como marcadores no invasivos de viabilidad y receptividad endometrial.

Por otro lado, las EVs derivadas del endometrio también modulan la expresión génica en el embrión y el entorno uterino, influyendo en adhesión celular y remodelación tisular. Esta comunicación bidireccional evidencia que las EVs no solo reflejan el estado de las células emisoras, sino que actúan como agentes reguladores con un prometedor potencial diagnóstico y terapéutico en medicina reproductiva [4,18,19].

En el contexto oncológico, se han identificado contenidos moleculares derivados de EVs asociados a tumores ováricos, tanto benignos como malignos. Entre ellos destacan los miRNAs, cuya expresión diferencial podría servir no solo para la detección temprana de neoplasias, sino también para distinguir entre el tipo tumoral, con importantes implicaciones diagnósticas y terapéuticas [4].

En medicina reproductiva, los miRNAs presentes en EVs del líquido folicular representan una vía prometedora como biomarcadores de fertilidad femenina. Factores como la AMA, la endometriosis o la exposición a disruptores endocrinos pueden modular su contenido y alterar procesos críticos como la implantación. Aunque los resultados *in vitro* refuerzan su papel activo en la comunicación embrio-materna, su validación *in vivo* en humanos y la estandarización metodológica siguen siendo necesarias [4]. En conjunto, aunque todavía en fases iniciales, estos hallazgos abren la puerta a nuevas herramientas diagnósticas no invasivas tanto en medicina reproductiva humana como veterinaria, con potencial para anticipar y manejar problemas de fertilidad con mayor precisión.

También se ha explorado el uso del mitDNA como marcador de calidad embrionaria con el objetivo de sustituir las biopsias invasivas. Sin embargo, el uso de mitDNA como marcador de calidad embrionaria presenta limitaciones, debido a la posible contaminación del medio con DNA de células maternas, como las células del cúmulo. Para reducir este riesgo, se podrían aplicar protocolos de lavado más estrictos tras la retirada del cúmulo, asegurando una limpieza cuidadosa de los ovocitos antes de la fecundación [4]. Además, sería útil incorporar marcadores específicos que permitan distinguir el DNA embrionario del materno, así como emplear técnicas más precisas de cuantificación, como la PCR digital (dPCR), que aporta mayor sensibilidad y especificidad. Como estrategia complementaria, también se podría correlacionar la concentración de mitDNA con otros indicadores de calidad embrionaria, como los



parámetros morfocinéticos obtenidos por sistemas de time-lapse, para validar si la señal mitocondrial refleja realmente el estado del embrión.

El embarazo ofrece un modelo excepcional para estudiar las EVs, ya que la placenta libera vesículas con marcadores específicos (PLAP, miRNAs del clúster C19MC) cuyo aumento progresivo en la circulación materna refleja su papel fisiológico. Alteraciones en este patrón se han vinculado a complicaciones como preeclampsia o diabetes gestacional, donde cambios en proteínas como sincitina-2, sFlt-1 o sEng evidencian la influencia de la hipoxia y la hiperglucemia sobre la función placentaria [4]. Así, el estudio de las EVs placentarias no solo aporta información sobre la biología del embarazo sano, sino que también ofrece nuevas vías para la detección temprana y el entendimiento de complicaciones gestacionales, facilitando así intervenciones clínicas más eficaces [4].

Finalmente, estudios en bovinos han mostrado que ciertos miRNAs, como miR-25, aparecen en mayor abundancia en animales con mortalidad embrionaria temprana. Estos cambios podrían estar relacionados con la pérdida gestacional al afectar la síntesis de prostaglandinas y la producción de progesterona, fundamentales para preservar el embarazo. Aunque prometedores, estos hallazgos requieren validación en humanos para su futura aplicación clínica [4].

En el ámbito de la reproducción asistida, las EVs han demostrado un notable potencial terapéutico. Estudios experimentales indican que las derivadas de células madre pluripotentes o mesenquimales podrían emplearse para tratar patologías como la insuficiencia ovárica primaria o las adherencias intrauterinas, y ya existen ensayos clínicos orientados a evaluar su seguridad y eficacia [22]. Además, las EVs constituyen una plataforma innovadora para el transporte de RNA, proteínas y factores de crecimiento, lo que las convierte en vehículos idóneos para terapias dirigidas a mejorar la función reproductiva.

Un ejemplo relevante es el uso de MVs del líquido amniótico en una yegua con infertilidad persistente, donde la administración intrauterina revirtió la endometritis crónica y permitió una gestación exitosa [23]. Este hallazgo respalda el efecto regenerativo y antiinflamatorio de las EVs, con posibles aplicaciones clínicas en humanos. También los exosomas endometriales se han vinculado al fallo de implantación, impulsando el interés de explorar nuevas estrategias basadas en EVs para mejorar las tasas de embarazo, aunque aún se requieren investigaciones más amplias para su validación y aplicación segura en humanos [23].



Los resultados en modelos animales y celulares muestran que las EVs pueden modular proliferación, apoptosis y angiogénesis, lo que abre vías terapéuticas no invasivas y con menor riesgo que las intervenciones convencionales. No obstante, la heterogeneidad en su producción, aislamiento y caracterización limita la reproducibilidad, y persisten dudas sobre su biodistribución y posible inmunogenicidad [16]. En insuficiencia ovárica, el papel de miRNAs reguladores de PI3K/AKT y Wnt/ $\beta$ -catenina ofrece una base molecular prometedora, aunque aún es necesario definir la regulación temporal y dosis-efecto de estos mediadores. El potencial rejuvenecedor sobre ovarios envejecidos resulta especialmente atractivo ante la creciente demanda de terapias frente a la infertilidad relacionada con la edad, aunque aún debe evaluarse la durabilidad y seguridad a largo plazo [24,25].

En paralelo, se investiga el uso de EVs para optimizar medios de cultivo embrionario y mejorar la calidad embrionaria, si bien todavía no existen ensayos clínicos que lo respalden y la complejidad del microambiente *in vitro* plantea retos importantes para su implementación práctica [2]. Asimismo, se han descrito biomoléculas específicas en EVs espermáticas y ovocitarias asociadas a motilidad, integridad del DNA, maduración y potencial de fecundación, lo que podría dar lugar a pruebas diagnósticas no invasivas para la evaluación gamética [15]. También las EVs embrionarias se perfilan como marcadores de viabilidad, útiles para seleccionar los embriones con mayor potencial de implantación [15]. La validación en humanos, el desarrollo de estándares regulatorios y la comprensión profunda de su mecanismo de acción serán esenciales para que estas terapias se integren efectivamente en la práctica clínica, ofreciendo nuevas esperanzas para pacientes con infertilidad difícil de tratar.

Desde el descubrimiento de sus funciones biológicas, múltiples investigaciones han profundizado en aspectos clave de las EVs, como su biogénesis, composición, interacción con células diana, así como los métodos para su aislamiento y caracterización [9]. Aunque los desafíos técnicos persisten, incluyendo los tiempos de procesamiento, el limitado volumen de muestras y el conocimiento aún incompleto de su tráfico y función en entornos *in vivo*, se están desarrollando vesículas sintéticas y semisintéticas con el objetivo de optimizar su uso en aplicaciones clínicas y reproductivas [1]. Por tanto, es fundamental seguir ampliando el conocimiento sobre la biología de las EVs en tejidos reproductivos. Esto permitirá avanzar hacia nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas que mejoren las condiciones de cultivo embrionario, la calidad de los gametos y, en última instancia, el éxito reproductivo en humanos y animales.

## 10. Conclusiones

Las EVs juegan un papel fundamental en la regulación del microambiente reproductivo, mediando la comunicación embrión-materna y modulando procesos críticos como implantación, proliferación y diferenciación celular. Su contenido molecular (miRNAs, DNA y proteínas) influye en la receptividad endometrial, la calidad ovocitaria y el desarrollo embrionario, lo que las posiciona como herramientas prometedoras tanto diagnósticas como terapéuticas en reproducción asistida.

La evidencia experimental indica que la incorporación de EVs en cultivos ovocitarios y embrionarios mejora la maduración, viabilidad e implantación, y que sus perfiles moleculares pueden servir como biomarcadores no invasivos de calidad gamética y embrionaria. Sin embargo, la heterogeneidad en los métodos de aislamiento y caracterización limita actualmente su aplicación clínica, subrayando la necesidad de estandarización y de una comprensión más profunda de su biodistribución y mecanismos de acción.

Además de su relevancia en el factor femenino, las EVs derivadas de espermatozoides y plasma seminal emergen como una línea de investigación clave, capaces de influir en la capacitación espermática, la reacción acrosómica y la integridad del DNA, sugiriendo que su modulación podría complementar los tratamientos de reproducción asistida desde la perspectiva masculina.

En conjunto, las EVs representan un recurso innovador con potencial para optimizar el diagnóstico, la selección embrionaria y la terapia reproductiva. La investigación futura debe centrarse en la estandarización de protocolos, la validación clínica, la integración del factor masculino y femenino y la optimización de estrategias terapéuticas, con el objetivo de mejorar el éxito reproductivo y la seguridad de los pacientes.

## 11. Bibliografía

1. Ávila ACFCMD, Andrade GM, Bridi A, Gimenes LU, Meirelles FV, Perecin F, et al. Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. *Anim Reprod*. 2019;16(1):31-8.
2. Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update*. marzo de 2016;22(2):182-93.
3. Cox CM, Thoma ME, Tchangalova N, Mburu G, Bornstein MJ, Johnson CL, et al. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Open*. 1 de enero de 2022;2022(4):hoac051.
4. Capra E, Lange-Consiglio A. The Biological Function of Extracellular Vesicles during Fertilization, Early Embryo—Maternal Crosstalk and Their Involvement in Reproduction: Review and Overview. *Biomolecules*. 4 de noviembre de 2020;10(11):1510.
5. El Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. mayo de 2013;12(5):347-57.
6. Yu J, Sane S, Kim JE, Yun S, Kim HJ, Jo KB, et al. Biogenesis and delivery of extracellular vesicles: harnessing the power of EVs for diagnostics and therapeutics. *Front Mol Biosci*. 3 de enero de 2024;10:1330400.
7. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*. mayo de 2013;113(1):1-11.
8. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 14 de mayo de 2015;4:10.3402/jev.v4.27066.
9. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. febrero de 2024;13(2):e12404.
10. Kurian NK, Modi D. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. *J Assist Reprod Genet*. febrero de 2019;36(2):189-98.
11. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. abril de 2018;19(4):213-28.
12. Zhang Y, Lan M, Chen Y. Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV): Ten-Year Evolution (2014–2023). *Pharmaceutics*. 29 de octubre de 2024;16(11):1394.
13. Chen X, Yang F. Classification and Nomenclature of Extracellular Vesicles. En: Wang Q, Zheng L, editores. *Extracellular Vesicles* [Internet]. Singapore: Springer Nature Singapore; 2024 [citado 15 de mayo de 2025]. p. 3-7. Disponible en: [https://link.springer.com/10.1007/978-981-99-8365-0\\_1](https://link.springer.com/10.1007/978-981-99-8365-0_1)
14. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 1 de agosto de 2015;65(8):783-97.

15. Fazeli A, Godakumara K. The evolving roles of extracellular vesicles in embryo-maternal communication. *Commun Biol*. 21 de junio de 2024;7(1):754.
16. Wang X, Wu J, Xie Y, Liu Y, Feng W, Zhang L, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles facilitate endometrial injury repair by carrying the E3 ubiquitin ligase WWP1. *Biochem Cell Biol*. agosto de 2022;100(4):357-69.
17. Almiñana C, Corbin E, Tsikis G, Alcântara-Neto AS, Labas V, Reynaud K, et al. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct–embryo cross-talk. 1 de septiembre de 2017 [citado 15 de julio de 2025]; Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/154/3/REP-17-0054.xml>
18. Greening DW, Nguyen HPT, Elgass K, Simpson RJ, Salamonsen LA. Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions1. *Biol Reprod* [Internet]. 1 de febrero de 2016 [citado 15 de julio de 2025];94(2). Disponible en: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.115.134890>
19. Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. *PLOS ONE*. 13 de marzo de 2013;8(3):e58502.
20. Kusama K, Nakamura K, Bai R, Nagaoka K, Sakurai T, Imakawa K. Intrauterine exosomes are required for bovine conceptus implantation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1 de enero de 2018;495(1):1370-5.
21. Ovčar A, Kovačič B. Biogenesis of Extracellular Vesicles (EVs) and the Potential Use of Embryo-Derived EVs in Medically Assisted Reproduction. *Int J Mol Sci*. enero de 2025;26(1):42.
22. Gurung S, Greening DW, Catt S, Salamonsen L, Evans J. Exosomes and soluble secretome from hormone-treated endometrial epithelial cells direct embryo implantation. *Mol Hum Reprod*. 1 de julio de 2020;26(7):510-20.
23. Lange-Consiglio A, Funghi F, Cantile C, Idda A, Cremonesi F, Riccaboni P. Case Report: Use of Amniotic Microvesicles for Regenerative Medicine Treatment of a Mare With Chronic Endometritis. *Front Vet Sci* [Internet]. 17 de junio de 2020 [citado 15 de julio de 2025];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2020.00347/full>
24. He J, Ao C, Li M, Deng T, Zheng S, Zhang K, et al. Clusterin-carrying extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells restore the ovarian function of premature ovarian failure mice through activating the PI3K/AKT pathway. *Stem Cell Res Ther*. 13 de septiembre de 2024;15(1):300.
25. Martirosyan YO, Silachev DN, Nazarenko TA, Birukova AM, Vishnyakova PA, Sukhikh GT. Stem-Cell-Derived Extracellular Vesicles: Unlocking New Possibilities for Treating Diminished Ovarian Reserve and Premature Ovarian Insufficiency. *Life*. diciembre de 2023;13(12):2247.

